

## ردیابی و شناسایی ژن UDP-گلوکز: فلاونوئید ۳-O-گلوکوزیل ترانسفراز در مسیر بیوستز آنتوسیانین‌ها در انار (*Punica granatum*)

Detection and identification of a UDP-glucose: flavonoid 3-O-glucosyltransferase gene involving in anthocyanin pathway in pomegranate (*Punica granatum*)

غزاله خاکسار<sup>۱</sup>، بدرالدین ابراهیم سیدطباطبائی<sup>\*</sup>، احمد ارزانی<sup>۱</sup>

۱- به ترتیب دانشجوی دکتری، استادان، دانشگاه صنعتی اصفهان، ایران

Khaksar Gh<sup>1</sup>, Seyed Tabatabaei BE<sup>\*1</sup>, Arzani A<sup>1</sup>

1. PhD Student, Professors, Isfahan University of Technology, Iran.

\* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: sayedt@cc.iut.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۲/۱۲/۲۷ - تاریخ پذیرش: ۹۳/۶/۲۳)

### چکیده

انار سرشار از رنگدانه‌های ارزشمند آنتوسیانین است که طیف رنگ‌های صورتی تا ارغوانی تیره را در پوست و دانه میوه تشکیل می‌دهد. آنزیم UDP-گلوکز: فلاونوئید ۳-O-گلوکوزیل ترانسفراز مسئول تشکیل آنتوسیانین در سلول‌های رنگی بوده و انتقال یک مولکول قند به آنتوسیانیدین را کاتالیز می‌کند. در این تحقیق، cDNA ژن UDP-گلوکز: فلاونوئید ۳-O-گلوکوزیل ترانسفراز (*UFGT*)، آخرین آنزیم کلیدی دخیل در رنگ‌آمیزی میوه از پوست میوه انار جدا و توالی یابی شد. همچنین، بیان این ژن در سه رقم متمازی انار (پوست سیاه یزد، ملس اصفهان و شیرین شباد شیراز) که در رنگ پوست و الگوی تجمع رنگ متفاوت بودند، مورد سنجش قرار گرفت. توالی اسید آمینه فرض شده از cDNA فوق، شباهت بالایی با گیاهان موجود در پایگاه اطلاعات داده‌ها نظیر انگور و هلو داشت. نتایج شان داد که بیان ژن *PgUFGT* در مرحله گلدهی در سه رقم نسبتاً بالا بود، اما در مرحله رسیدن میوه در رقم پوست سیاه یزد به حداقل میزان خود رسید. برخلاف این رقم، بیان ژن *PgUFGT* در همه مراحل رشد میوه به جز گلدهی در رقم شیرین شباد شیراز در پایین ترین سطح خود بود. علاوه بر این، بیان ژن *PgUFGT* در میوه‌های جوان ملس اصفهان، کاهش یافته؛ به تدریج در میوه‌های بالغ دوباره بر میزان آن افزوده شده و در مرحله رسیدن میوه، به اوج خود رسید. به طور کلی بیان ژن *PgUFGT* به طور چشمگیری با افزایش رنگ پوست در طول رشد میوه، افزایش یافت. پیش‌بینی ساختار پروتئین مورد مطالعه نشان داد که پروتئین *PgUFGT* با ساختار سه بعدی پروتئین UDP-گلوکز: فلاونوئید گلوکوزیل ترانسفراز در انگور دانه قرمز، دارای شباهت حدود ۵۲ درصد بود. شباهت ساختار سه بعدی پروتئین *VvUFGT* به پروتئین *PgUFGT* نشان داد که هر دو پروتئین به احتمال زیاد، مسیر مشابهی را در تولید آنتوسیانین دارند. نتایج حاصل از بیان ژن *PgUFGT* در سه رقم انار مطالعه شده نیز مطلب فوق را تایید کرد.

### واژه‌های کلیدی

آنتوسیانین  
انار  
cDNA  
*UFGT*

## مقدمه

مشخص شده که آنتوسبیانین‌ها سبب کاهش تجمع کادمیوم در کلیه و کبد، کاهش غلظت اوره و بیالی رویین خون و کاهش فعالیت آسپارتات آمینوترانسفراز و آلانین‌ترانسفراز نیز می‌شوند (Lapidot et al. 1998). همچنین شبیه ترکیبات فلاونوئیدی بهشت جاذب نور UV بوده و در مقابل تابش نور UV عموماً در سلول‌های اپیدرمی بافت‌های گیاهی تجمع یافته و به عنوان سپری در برابر Bitsch et al. 2004; Einbond et al. 2004; Garcia-Alonso et al. 2005; De Pascual-Teresa et al. 2008). در سال‌های اخیر مطالعات فراوانی در مورد خواص انار (*Punica granatum*) و ترکیبات موجود در آن انجام شده که موید اثرات مفید انار در پیشگیری و درمان بسیاری از بیماری‌ها می‌باشد. انار غنی از آنتی اکسیدان‌های مهمی است که در غلظت‌های پایین سبب تاخیر یا ممانعت از اکسید شدن ترکیبات بیولوژیکی می‌شود. اطلاعات موجود نشان می‌دهند که فعالیت آنتی اکسیدانی قابل ملاحظه انار به سبب محتوای بالای آنتوسبیانین‌های پوست و آب میوه آن است. آب انار سرشار از رنگدانه‌های آنتوسبیانین است و مانع انسداد عروق قلبی و بروز انواع سرطان‌ها می‌شود (Du et al. 1975; Jurenka et al. 2008; Rajani et al. 2011).

واریته‌های مختلف انار، الگوی متفاوتی از رنگ پوست شامل زرد، صورتی، قرمز، ارغوانی و سیاه دارند که فعالیت آنتی اکسیدانی آن را تحت تاثیر قرار می‌دهند. یکی از دلایل ممکن برای تنوع رنگ مشاهده شده در پوست انار، میزان بیان ژن‌های دخیل در بیوسنتر آنتوسبیانین متأثر از شرایط متفاوت رشد و محیط می‌باشد. مطالعه‌های متعددی به منظور بررسی بیان ژن‌های مسیر ستر آنتوسبیانین‌ها در گیاهان مختلف نظر انگور، هلو، بلو بربری، سیب وغیره در شرایط متفاوت رشد انجام شده است. بررسی بیان این ژن‌ها نشان می‌دهد که روند بیان ژن‌های ساختاری با افزایش آنتوسبیانین ارتباط مستقیم دارد و تا انتهای مرحله رسیدن میوه، حداکثر تولید رنگ در پوست میوه بر میزان بیان آنها افزوده می‌گردد. این در حالی است که در میوه‌های جهش‌یافته و فاقد رنگ، ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتر آنتوسبیانین بیان نشده یا میزان بیان بسیار کمی دارند. همچنین مقدار بیان ژن‌های فرق با افزایش نور دارای همبستگی بالا و مثبت می‌باشد و در این راستا

پدیده رسیدن میوه، ترکیبی پیچیده از بسیاری فرایندهای سلولی نظیر تغییرات ترکیبات سلولی، از دست دادن دیواره سلولی، تجمع هیدروکربن‌ها و متابولیت‌های ثانویه می‌باشد. تولید متابولیت‌های ثانویه در طی رسیدن میوه، پدیده‌ای ضروری است که کیفیت میوه (رنگ، طعم و بو) و بازار پستنده میوه را تحت تاثیر قرار می‌دهد. همچنین بسیاری از این ترکیبات برای تولید دارو، رنگ، حشره‌کش‌ها، طعم دهنده‌های غذایی و عطر استفاده می‌شوند. در بین ترکیبات ثانویه، فلاونوئیدها گروه بزرگ و مهمی را تشکیل می‌دهند و بالغ بر ۶۰۰۰ نوع ترکیب فلاونوئیدی نظیر آرون‌ها، ایزوفلاونوئیدها، فلاونون‌ها، فلاونول‌ها، آنتوسبیانیدین و غیره شناسایی شده که بسیاری از آنها در گیاهان عالی وجود دارند (Harbone 1988-1994, Jaakola 2003, Gould et al. 2006) و میزان ترکیبات فلاونوئیدی در میوه‌های مختلف، تفاوت‌های زیادی دارد که در بیشتر میوه‌ها نوع غالب، آنتوسبیانین‌ها می‌باشد (Jaakola 2003).

آنتوسبیانین‌ها (Antos) برگرفته از کلمه یونانی به معنای گل و Kyanos (به معنای آبی) از مهمترین و فراوان‌ترین رنگدانه‌های طبیعی و یکی از شش زیرگروه متعلق به فلاونوئیدها-بزرگ‌ترین خانواده پلی فنل‌ها- می‌باشند. تاکنون بیش از ۵۶۰ مولکول آنتوسبیانین در گیاهان مختلف شناسایی شده که این رنگدانه‌ها عامل رنگ قرمز، نارنجی، ارغوانی، بنفش، آبی در بسیاری از گل‌ها، برگ‌ها، میوه‌ها و سبزی‌ها هستند. شش نوع بسیار متداول آنتوسبیانین‌ها در گیاهان شامل سیانیدین، دلفینیدین، پلارگونیدین، Konczak 2004؛ Maloidین، پئونیدین و پتونیدین می‌باشد (Cristina et al. 2011). کمبود الکترون از خصوصیات عمومی آنتوسبیانین‌هاست که سبب فعال‌سازی آنها در واکنش با اکسیژن Fعال<sup>1</sup> (ROS) و رادیکال‌های آزاد می‌شود. به این ترتیب خصوصیت آنتی اکسیدانی این ترکیبات از ساختار خاص آنها منشا می‌گیرد. آنتوسبیانین‌ها دارای اثر مثبت در جلوگیری از رشد بی‌رویه سلول‌های سرطانی و بروز بیماری‌های وریدی قلبی می‌باشند (Jing et al. 2008, Tzin et al. 2010).

<sup>1</sup> Reactive oxygen species

در مسیر بيوسترن آنتوسيانيين، به طور كامل شناسايي و جداسازی شده‌اند. در اين مطالعات مشخص شده که براساس مرحله رشد، فقط بيان ڙن *UFGT* همواره با رنگ ميوه ارتباط دارد. تجزيه و تحليل بيان ڙن *UFGT* در ارقام پوست سفيد و قرمز نشان داد که اين ڙن در هر دو رقم وجود دارد اما در رقم پوست سفيد بيان نمي شود. همچنين بررسی بيان ڙنهای مسیر بيوسترن آنتوسيانيين در واريته‌های جهش‌يافته سيب پوست سفيد نشان می‌دهد که به استتنا ڙن *UFGT*، همه ڙنهای بيان می‌شوند. اما در مقایسه بيان ڙنهای مسیر آنتوسيانيين در پرتعال خونی و پرتعال معمولی، افزایش بيان در ڙن *UFGT* به همراه ڙنهای *ANS* و *CHS* مشاهده شد. اين مطلب دليل مطابقت سطح بيان ڙنهای هدف و مجتوى رنگدانه‌های اندازه‌گيری شده، می‌باشد. در گیاه لیتچی چينی<sup>۷</sup> نيز همبستگی مثبت و بالامي بين بيان ڙنهای *UFGT* و *DFR* و رنگ قرمز پوست ميوه گزارش شده است.

در حال حاضر ايران يکي از بزرگ‌ترین توليد کنندگان انار در دنياست و داراي بيش از ۷۶۰ رقم انار خوراکي در اقليم‌های مختلف با تنوع ژنتيکي گسترده در رنگ ميوه می‌باشد. اين تنوع می‌تواند برای تشخيص خصوصيات آنتي اكسيدانتي مطلوب انار بسيار مفيد واقع شده و منع ڙنی برای مطالعات بهنژادی اين گیاه باشد. با توجه به محبوبيت انار بين مصرف کنندگان و با لاحاظ كردن خصوصيات بيلولوژيکي ارزشمند آن و همچنين اهميت اقتصادي اين ميوه، نياز به تحقيقات بيشتر بهمنظور شناسايي ڙنهای منحصر به فرد انار، محرز بهنظر می‌رسد. لذا در مطالعه حاضر به جهت نقش کلیدي و مهم ڙن *UFGT* در تعين رنگ ميوه گیاهان مختلف، ڙن مورد نظر در انار شناسايي و جداسازی شده و بيان آن در سه رقم انار (پوست ميوه صورتی، قرمز و سياه) در دوره ميوه‌دهی بررسی شد.

## مواد و روش‌ها

سه رقم انار، پوست سياه يزد (پوست سياه)، شيرين شعباد شيراز (پوست صورتی) و ملس اصفهان (پوست قرمز) از مجموعه درخت انار در مرکز تحقيقات کشاورزی و منابع طبیعی اصفهان

<sup>7</sup> *Litchi chinensis* Sonn

توليد آنتوسيانيين نيز افروده می‌شود. در واقع، بيوسترن و تجمع آنتوسيانيين از طريق فرآيندهای درونی در طی تمايزدادي Gil et al. 2000، Jaakola et al. 2002، Kim et al. 2003، Ranazzotti et al. (2008).

مسير بيوسترن آنتوسيانيين‌ها در بسياری از گیاهان نظير آرابيدوپسيس، ذرت، انگور، سيب، هلو و بلوبري و غيره شناسايي شده است (شکل ۱). آنزيم فنيل‌آلانين لياز<sup>۱</sup> (*PAL*) داراي نقش اساسی و کلیدي در روند ستز فلاونويٽها می‌باشد و گزارشات بسياری همبستگي بيان اين ڙن و افزایش فعالیت آنتي اكسيدانی را تایید می‌کند. در طی مسیر، اثر پالیوتوريپيك آنزيم سینامیت<sup>۴</sup> -هیدروكسيلانز<sup>۲</sup> (*C4H*)، تنظيم الگوي بيان ڙنهای درگير در ستز مشتقات فلاونويٽها را بهعده دارد. هماهنگی ستز مولکول‌هاي پلي فنلى، بهسبب وجود عناصر *cis C4H* می‌باشد Boudet et al. (2007). در ادامه، آنزيم چالکون سيتاز<sup>۳</sup> (*CHS*) محصول حاصل از واکنش آنزيم *C4H* را در جهت توليد آنتوسيانيين هدایت كرده و در بسياری از گیاهان، نقش مهمی در تنظيم توليد رنگدانه ايفا می‌کند. مرحله بعد دي هيدروفلاؤنول ردوكتاز<sup>۴</sup> (*DFR*) که آنزيم اختصاصي مسیر بيوسترن آنتوسيانيين‌هاست؛ توليد ترکيب بى رنگ لتكوسينيدین را به عهده دارد. سپس آنزيم آنتوسيانيين سيتاز<sup>۵</sup> (*ANS*)، ماده فوق را به ترکيب رنگي آنتوسيانيين تبدل می‌کند. در نهايتم با اتصال يك مولکول گلوگز به آنتوسيانيين توسيع آنزيم UDP-گلوگز: فلاونويٽ ۳-O-گلوكوزيل ترانسفراز<sup>۶</sup> (*UFGT*)، ترکيب آنتوسيانيين توليد می‌شود (Gil et al. 2000; Jaakola et al. 2002; Kim et al. 2003; Ranazzotti et al. (2008).

پژوهش‌های انجام شده در گیاهان انگور، سيب، توت فرنگي و گیلاس نشان می‌دهد که *D-UDP-گلوگز: فلاونويٽ ۳-O-گلوكوزيل ترانسفراز (UFGT)*، آخرین آنزيم کلیدي دخيل در رنگ‌آمizي ميوه می‌باشد. در گیاه انگور ڙنهای ساختاري درگير

<sup>1</sup> Phenylalanine ammonia-lyase

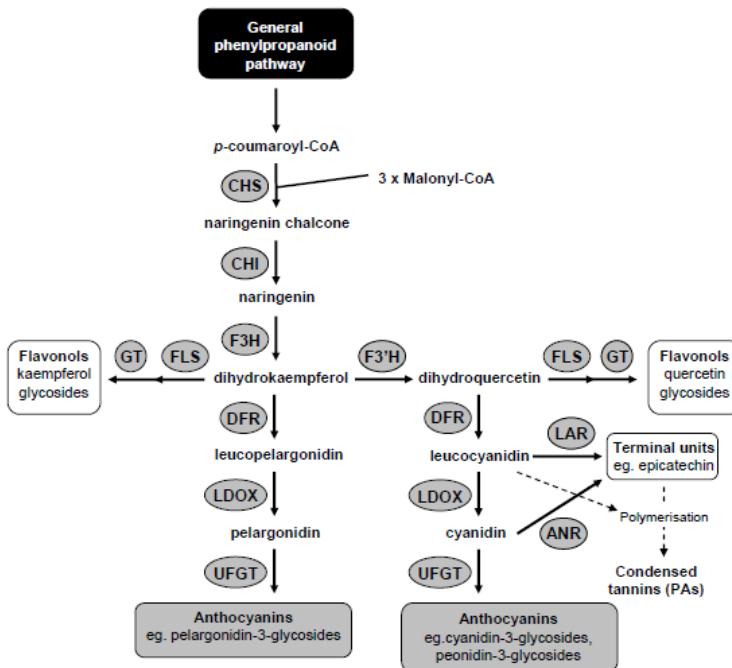
<sup>2</sup> Cinnamate 4-hydroxylase

<sup>3</sup> Chalcone synthase

<sup>4</sup> Dihydroflavonol reductase

<sup>5</sup> Anthocyanidin synthase

<sup>6</sup> UDP-glucose: flavonoid 3-O-glucosyltransferase



شکل ۱- تصویر کلی مسیر بیوستز آنتوسیانین‌ها در گیاهان که منجر به تولید آنتوسیانین می‌شود. (CHS) آنزیم چالکون سیتاز؛ (F3H) آنزیم فلاونوئید ۳-هیدروکسیلаз؛ (UFGT) آنزیم دی‌هیدروفلاونول ردوکتاز؛ (LDOX) آنزیم آنتوسیانین سیتاز؛ (DFR) آنزیم ۳-O-گلوکوزیل ترانسفراز.

واکنش RT-PCR، واکنش در سه چرخه ۲۷، ۳۰ و ۳۵ (در سه تکرار) انجام و تراکم باند روی ژل آگارز یک درصد تعیین شد. تجزیه و تحلیل باندهای تکثیر شده به منظور کمی کردن آنها توسط نرم افزار EZQuant-Gel انجام شد. همچنین، ژن *UFGT* جدا شده از رقم ملس اصفهان در پلاسمید pTZ57R/T (Thermo Scientific, Germany) و پس از انتقال به باکتری *E. coli* (South Korea) Biioneer MC1061 توسط شرکت *Takara* (Japan) همسانه‌سازی شد. براساس توالی به دست آمده، بررسی شباهت سنجی ساختاری ژن مورد مطالعه با ساختار سه بعدی دیگر گیاهان موجود در یاگاه اطلاعات داده‌ها (www.ncbi.nlm.nih.gov) و NCBI (www.ExPASY.org) ExPASY شبکه ژنی مسیر بیوستز آنتوسیانین در سایت ExPASY و تجزیه و تحلیل راهانداز ژن‌های تنظیم کننده مسیر آنتوسیانین در سایت http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/ (Plantcare) (plantcare/html) انجام شد.

جمع‌آوری شد. نمونه‌ها از چهار مرحله مختلف رشد و نمو انار شامل گل (مرحله ۱)، میوه‌های جوان (مرحله ۲)، میوه تقریباً بالغ (مرحله ۳) و میوه‌های رسیده (مرحله ۴) انتخاب شدند. طراحی آغازگرهای دجزیرت به منظور شناسایی و جداسازی ژن UDP-D گلوگز: فلاونوئید ۳-O-گلوکوزیل ترانسفراز (UFGT)، براساس شباهت سنجی دمین حفاظت شده این ژن در گیاهان انگور، هل و غیره صورت پذیرفت (جدول ۱). استخراج RNA کل از نمونه‌های جمع‌آوری شده توسط بافر BioFlux، Japan (Biozol) مطابق با ستورالعمل شرکت سازنده، انجام شد. حذف DNA از تهیه cDNA، توسط آنزیم DNase I، RNase-) DNase (Biozol، Japan) قبل (free/Thermo Scientific, Germany) صورت پذیرفت و cDNA با استفاده از کیت سترن (RevertAid First) مطابق با استفاده از کیت سترن (Strand cDNA Synthesis Kit/Thermo Scientific, Germany) طبق دستورالعمل شرکت سازنده سترن شد. بیان ژن‌های مورد نظر در مرحله مختلف رشد و نمو میوه انار با واکنش RT-PCR مطابق جدول ۱ بررسی و از ژن rRNA ۱۸S به عنوان ژن مرجع برای نرمال‌سازی نمونه‌ها استفاده شد. به منظور اطمینان از صحت

جدول ۱- توالی آغازگرهای طراحی شده و برنامه واکنش RT-PCR

آغازگرها	توالی آغازگر (5'-3')	تعداد چرخه	دماه اتصال (°C)
UDP-F	GAT GCS TTY TTS TGG TTC GCT	۵۸	۳۰
UDP-R	TAA TGA CCY GCA NCA SCT	۵۸	۳۰

S = G or C; Y = C or T; N = A or C or G or T

هنوز هم مبهم و پیچیده است. در این پژوهش ژن *PgUFGT* دخیل در مسیر بیوسنتر آنتوسیانین شناسایی شد و تجزیه و تحلیل بیان ژن نشان داد که تجمع آنتوسیانین در بافت‌های رنگی، ارتباط نزدیکی با میزان بیان این ژن در پوست میوه انار دارد. در طول رشد میوه انار، تغییر سطح بیان ژن *PgUFGT* منعکس کننده رنگ پوست می‌باشد؛ زمانی که رنگ میوه بیشتر به رنگ سبز است، بیان این ژن در سطح پایین خود تشخیص داده شد. در میوه‌های رنگی، هنگامی که رنگ پوست قرمز شد، افزایش سطح رونوشت *PgUFGT* در پوست میوه مشاهده شد. در مجموع، رنگ میوه‌ها نشان دهنده الگوی بیان ژن‌های دخیل در بیوسنتر آنتوسیانین می‌باشد و نتایج دیگر پژوهشگران در بررسی این ژن‌ها در مراحل رشد گیاهان هلو (Tsuda et al. 2004)، سبز (Kim et al. 2003)، اطلسی Ranazzotti et al. (2011) و انگور (scacio-Valdés et al. 2008) این مطلب را تایید می‌کند.

درک عملکرد پروتئین *PgUFGT* با توجه به شباهت سنجی ساختاری آن در پایگاه اطلاعات داده‌ها (NCBI)، میسر شد. نتایج حاصل از پیش‌بینی ساختار پروتئین مورد مطالعه نشان داد که پروتئین *PgUFGT* با ساختار سه بعدی پروتئین *UDP-گلوگز: فلاونوئید گلوکوزیل ترانسفراز*<sup>۲</sup> در انگور دانه قرمز، دارای شباهت حدود ۵۲ درصد بود (شکل ۵). پروتئین VvGT1 با اتصال یک مولکول گلوگز به آنتوسیانیدین، مسئول تشکیل رنگ قرمز در دانه‌های انگور می‌باشد. ساختار سه بعدی *VvGT1* این آنزیم با توجه به جایگاه فعل آن (بخش دهنده UDP-گلوگز) و قسم پذیرنده مولکول کامفرول (توسط روش *NMR*<sup>۳</sup> ترسیم شده است (شکل ۵) (Offen et al. 2006). لازم به ذکر است که

## نتایج و بحث

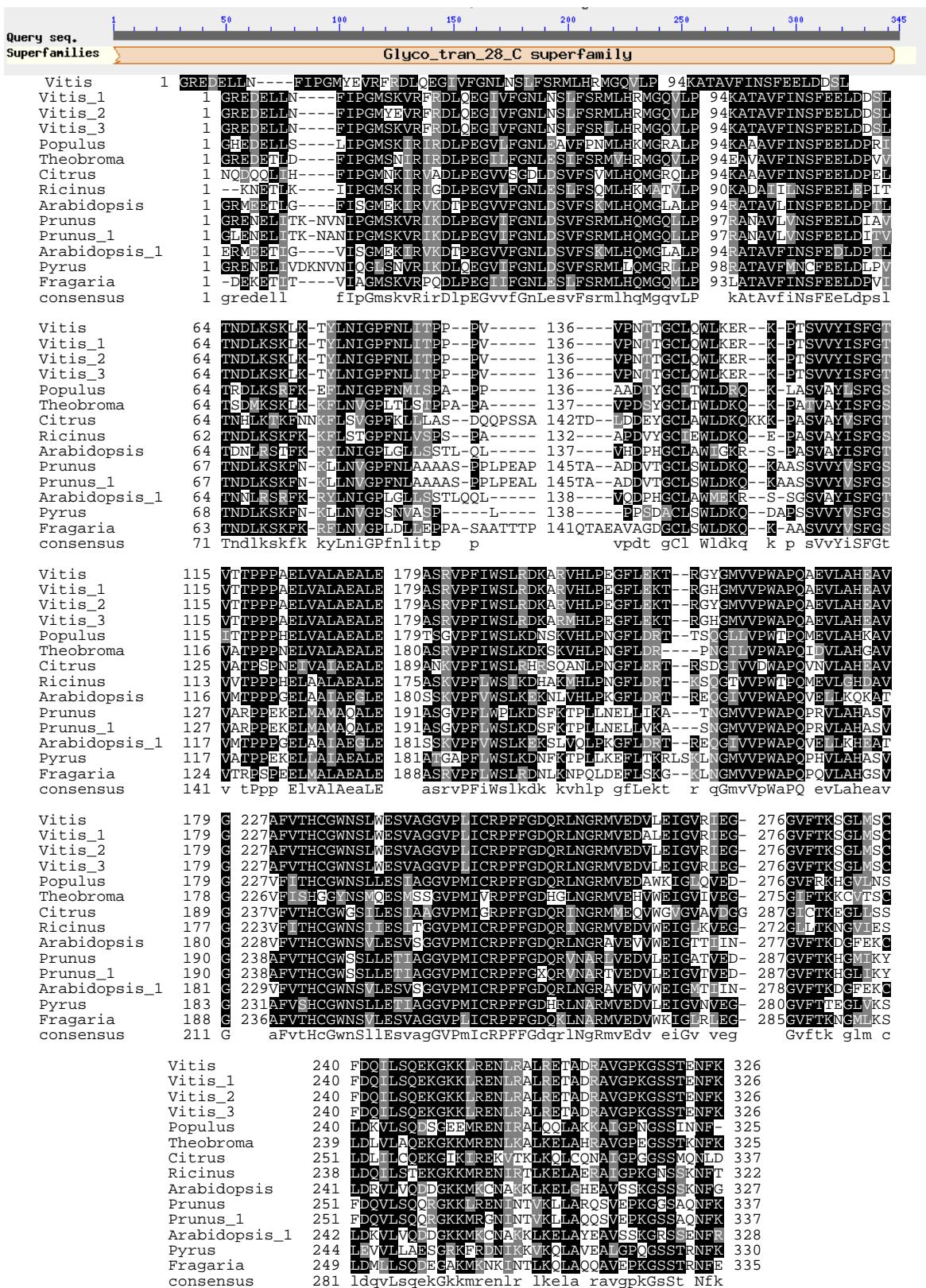
ژن *UFGT* در بسیاری از گیاهان نظری آرابیدوپسیس، انگور، سبز، هلو و غیره شناسایی و جداسازی شده است. وجه مشترک آنها، حضور دمین کاملاً حفاظت شده خانواده UDP-گلوکوزیل ترانسفراز<sup>۱</sup> در توالی ژن مورد مطالعه می‌باشد (شکل ۲). لذا طراحی آغازگرهای اختصاصی براساس این نواحی حفاظت شده انجام و قطعه DNA به طول ۱۰۳۵ جفت باز با الگوی cDNA تکثیر شد (شکل ۳). نتایج توالی‌بایی ژن فوق و مقایسه توالی پروتئین آن با پروتئین‌های همولوگ خانواده UDP-گلوکوزیل ترانسفراز در گیاهان انگور، هلو، کاکائو، صنوبر و آرابیدوپسیس و غیره (پایگاه اطلاعاتی داده NCBI) معلوم کرد که پروتئین مورد نظر نیز دارای دمین حفاظت شده این خانواده می‌باشد.

نتایج حاصل از بررسی بیان *PgUFGT* نشان داد که بیان ژن مورد نظر در مرحله گلدھی در سه رقم (پوست سیاه یزد، شیرین شعباد شیراز و ملس اصفهان) نسبتاً بالا بوده است، اما در مرحله رسیدن میوه در پوست سیاه یزد به حداقل خود رسید. برخلاف این رقم، بیان ژن *PgUFGT* در همه مراحل رشد میوه به جز گلدھی در رقم شیرین شعباد شیراز در پایین سطح خود بود. علاوه بر این، بیان *PgUFGT* در میوه‌های جوان ملس اصفهان در مرحله ۲ کاهش یافته؛ به تدریج در میوه‌های بالغ (مرحله ۳) دوباره افزوده شده و در مرحله ۴ (میوه‌های رسیده) به اوج خود رسید (شکل ۴-الف). رنگ پوست میوه انار در ارقام مختلف انار بسیار متغیر می‌باشد و این پدیده جالب ارزش تجاری میوه و زیبایی آن را تحت تاثیر قرار می‌دهد. در حال حاضر سیستم ژنتیکی جامع برای تجزیه و تحلیل تنوع رنگ در درختان میوه پیشنهاد نشده به طوری که درک اساس ژنتیکی تنوع رنگ پوست در میوه انار

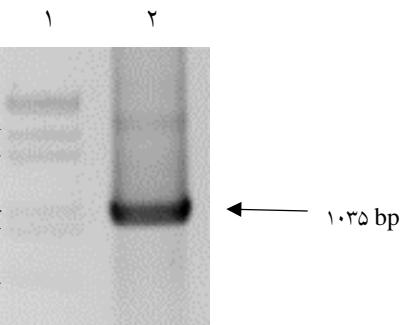
<sup>2</sup> UDP-glucose:flavonoid 3-O glycosyltransferase (VvGT1)

<sup>3</sup> Nuclear magnetic resonance

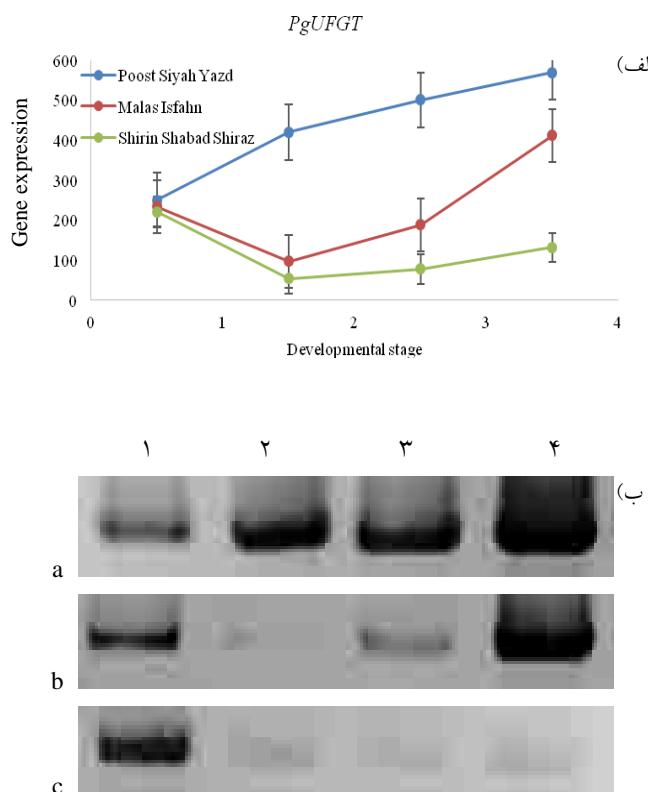
<sup>1</sup> UDP- glucosyltransferase supefamily



شکل ۲- نمایش دمین حفاظت شده در خانواده UDP- گلوكوزيل ترانسферاز (ژن *UFGT*) و شباهت سنجی آن در بسیاری از گیاهان نظیر انگور، کاکائو، هلو و آراید پسپیس وغیره



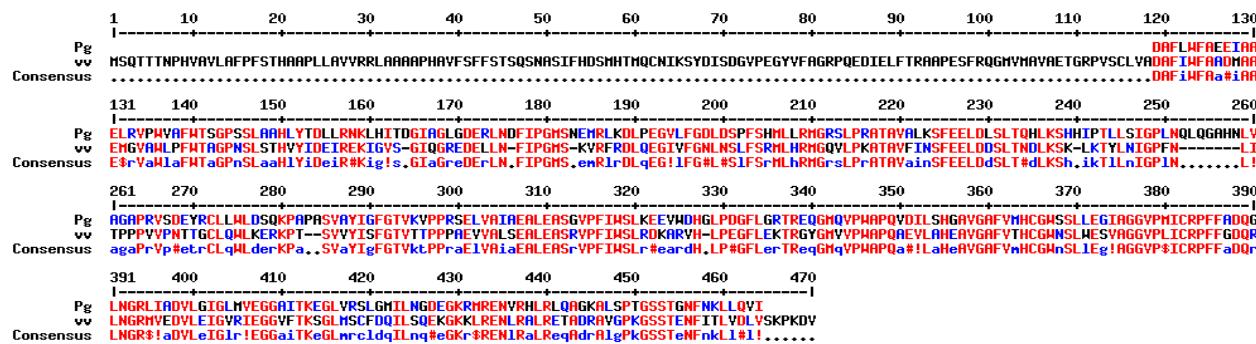
شکل ۳- قطعه تکثیر شده *PgUFGT*: چاهک ۱) نشانگر اندازه III: چاهک ۲) تکثیر قطعه DNA به طول ۱۰۳۵ باز با الگوی cDNA و آغازگرهای UDP-F و UDP-R



شکل ۴- بررسی بیان ڙن *PgUFGT* در ارقام انار توسط RT-PCR (الف) نمایش کمی بیان ڙن *PgUFGT* در ارقام انار و مراحل رشدی مختلف (۱) گله‌ی؛ (۲) میوه ابتدای میوه دهی؛ (۳) اواسط میوه دهی؛ (۴) رسیدن میوه، (ب) نمایش محصول PCR روی ژل آگارز یک درصد. (a) پوست سیاه یزد؛ (b) ملس اصفهان؛ (c) شیرین شعباد شیراز و چاهک‌های مراحل رشد (۱) گله‌ی؛ (۲) میوه ابتدای میوه دهی؛ (۳) اواسط میوه دهی؛ (۴) رسیدن میوه.

گیاهان به نحو فوق العاده‌ای برای درک تغییرات در محیط زیست خود تکامل یافته‌اند و به سرعت برای به حداقل رساندن خطر، به شرایط محیطی متغیر پاسخ می‌دهند. لذا برای انعطاف پذیری این

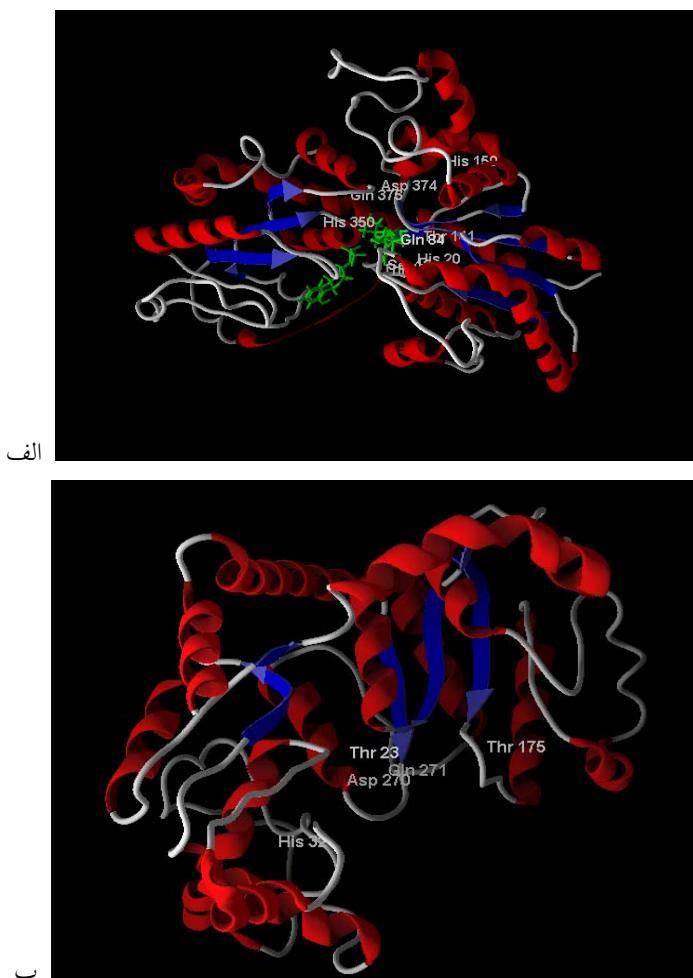
مولکول سیانیدین می‌تواند جایگزین کامپرونول شود. ساختار سه بعدی VvGT1 نشان می‌دهد که در بخش دهنده شش اسید آمینه حفاظت شده شامل ۱۹، Thr141، Asp374، His350، Thr280، Asp270، His246، His32، Gln271 و ۱۵۰ مسئول واکنش اتصال مولکول UDP-گلوکز به کامپرونول و دیگر مولکول‌های پذیرنده می‌باشد (شکل ۶). در واقع واکنش گلیکوزیلاسیون در گیاهان توسط یک خانواده ژنی انجام می‌شود که پروتئین VvGT1 نیز در این خانواده قرار دارد. در ساختار سه بعدی پیش‌بینی شده *PgUFGT* اسید آمینه‌های فوق نیز به صورت حفاظت شده به صورت Thr23، Asp270، His246، His276، Asp270، His176 و Gln271 وجود دارند (شکل ۶). این احتمال وجود دارد که به سبب شباهت ساختار سه بعدی هر دو پروتئین، می‌توان عملکرد مشابه را برای پروتئین *PgUFGT* انتظار داشت؛ بهویژه حضور اسید آمینه‌های کاملاً حفاظت شده در جایگاه فعال، این احتمال را تقویت می‌کند. داشتاده امروز نشان داده که ساختار سه بعدی پروتئین در تعیین عملکرد آن نقش بسزایی ایفا می‌کند؛ لذا پروتئین *PgUFGT* در انانر نیز همانند VvGT1 در انگور دانه قرمز در واکنش گلیکوزیلاسیون دخالت دارد و موجب تجمع رنگ قرمز در پوست انار می‌شود. به علاوه نتایج حاصل از بررسی بیان ڙن *PgUFGT* نشان داد که با افزایش بیان این ڙن بر تجمع آنتوسیانین در پوست انار، افزوده شد. در انگور دانه قرمز نیز در مقایسه با انگور جهش یافته سفید، افزایش سطح mRNA تنها در گیاهان دانه قرمز مشاهده شد.



شکل ۵- شباهت سنجی پروتئین PgUGT و پروتئین PgUGT-گلکوز: فلاونوئید گلکوزیل ترانسفراز ، همچنین نمایش شباهت ۵۲ درصدی و حضور اسید آمینه‌های کاملاً یکسان در جایگاه فعال هر دو آنزیم

جدول ۲- عناصر تنظیمی در را انداز ژن‌های *VvMYBA1* و *VvMYBA3* که به محرک‌های محیطی پاسخ می‌دهند

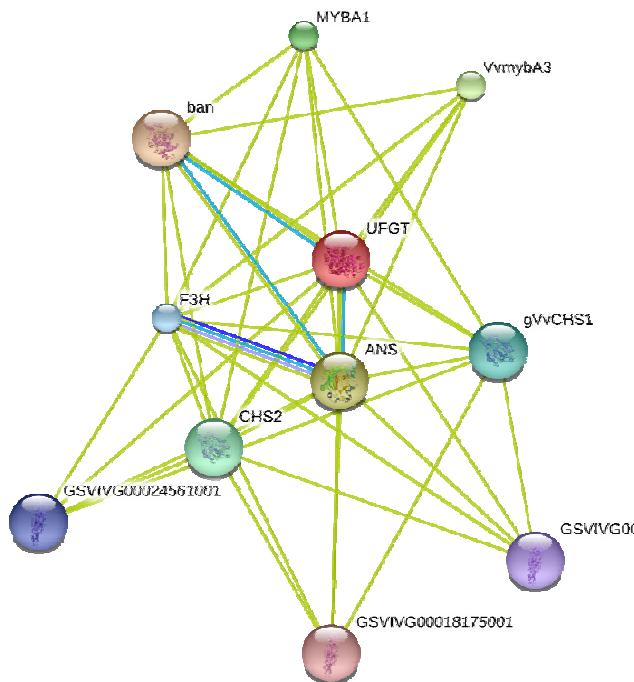
نام عنصر تنظیمی	توالی	عملکرد
LAMP-element	CCAAAACCA	عنصر پاسخ‌دهنده به نور
AE-box	AGAAACAA	عنصر پاسخ‌دهنده به نور
ARE	TGGTTT	عنصر تنظیمی پاسخ‌دهنده به شرایط بی‌هوایی
CGTCA-motif	CGTCA	عنصر تنظیمی پاسخ‌دهنده به مدل جاسمونات
TGACG-motif	TGACG	عنصر تنظیمی پاسخ‌دهنده به مدل جاسمونات
ABRE	CACGTG	عنصر تنظیمی پاسخ‌دهنده به آسبیزیک اسید
GAG-motif	GGAGATG	عنصر پاسخ‌دهنده به نور
Box 4	ATTAAT	قسمت حفاظت شده از DNA پاسخ‌دهنده به نور
Box I	TTTCAAA	عنصر پاسخ‌دهنده به نور
Box-W1	TTGACC	عنصر پاسخ‌دهنده به محرک قارچی
CAAT-box	CAAT	عنصر تنظیمی عمومی سیس در را انداز و ناحیه تقویت کننده
CAT-box	GCCACT	عنصر تنظیمی واپسیت به بیان مریستم
G-Box	CACGTG	عنصر تنظیمی سیس پاسخ‌دهنده به نور
GATA-motif	GATAGGG	بخشی از عنصر پاسخ‌دهنده به نور
HSE	AGAAAATTG	عنصر تنظیمی سیس پاسخ‌دهنده به تشخیص گرمایی
I-box	GATAGGG	بخشی از عنصر پاسخ‌دهنده به نور
Skn-1_motif	GTCAT	عنصر تنظیمی سیس مورد نیاز در بیان اندوسپریم
Sp1	CC(G/A)CCC	عنصر پاسخ‌دهنده به نور
GARE-motif	TCTGTTG	عنصر تنظیمی سیس پاسخ‌دهنده به جبرلین
P-box	CCTTTTG	عنصر تنظیمی سیس پاسخ‌دهنده به جبرلین
MRE	AACCTAA	جایگاه اتصال عامل تنظیم کننده MYB در شرایط تشنش نور
MBS	TAAC TG	جایگاه اتصال عامل تنظیم کننده MYB در شرایط تشنش خشکی
TCA-element	GAGAAGAATA	عنصر تنظیمی سیس پاسخ‌دهنده به سالیسیلیک اسید
TGA-element	AACGAC	عنصر پاسخ‌دهنده به اکسین
W box	TTGACC	نامشخص
circadian	CAANNNNATC	عنصر تنظیمی سیس درگیر در تنظیم چرخه‌ی روز-شب
rbcS-CMA7a	GTCGATAAGG	بخشی از عنصر پاسخ‌دهنده به نور



شکل ۶- (الف) ساختار سه بعدی VvGT1 در بخش دهنده شش اسید آمینه حفاظت شده شامل .Thr191، .Asp374، .His350، .Asp375 و .Gln374 قسمت پذیرنده ۴ اسید آمینه حفاظت شده .Ser18، .His 20، .His 150 و .Gln84 مسئول واکنش اتصال مولکول UDP-گلوگز به کامفروول و دیگر مولکول های پذیرنده می باشد؛ (ب) در ساختار سه بعدی پیش بینی شده PgUFGT اسید آمینه های فرق نیز به صورت حفاظت شده به صورت .His246، .Thr176، .His32، .Thr23 و .Asp270 وجود دارند.

موجب درک تغییرات محیطی و انعطاف پذیری در پاسخ به شرایط تنفس را می شود. در این راستا همکاری چندین ژن در مسیر بیوسنتر آنتوسبیانین ها این هدف را دنبال می کنند (Offen et al. 2006). مطالعه شبکه ژنی دخیل در مسیر سنتز آنتوسبیانین ها در گیاه انگور نشان می دهد که ژن *VvUFGT* محصول ژن *VvANS* را به همراه یک مولکول گلوگز به آنتوسبیانین تبدیل می کند. مطالعات گستردۀ در انگور و نمایش شبکه ژنی بیانگر حضور ژن های شناخته شده ای نظیر *VvCHS* و *VvF3H* نیز در این مجموعه می باشد. اما وجود دو ژن تنظیم کننده *VvMYBA1* و *VvMYBA3* می باشد.

پاسخ، به یکپارچه سازی رشد، توسعه و سوخت و ساز گیاه که به نوعی خود به تکامل منجر شده و در نهایت به مکانیسم های مختلف برای تنظیم هموستاز سلولی، نیاز است. گلیکوزیلاسیون یکی از این مکانیسم ها بوده که توسط خانواده بزرگ چند ژنی گلیکوزیل ترانسفراز، قادر به تشخیص مولکول های کوچک نظیر هورمون ها، متابولیت ثانویه و سموم حاصل از تنفس های زنده و غیر زنده می باشد. ژن *UFGT* یکی از اعضای این خانواده است که قادر به اتصال مولکول گلوگز به آنتوسبیانیدین و تولید رنگدانه های آنتوسبیانین می باشد. در واقع، تولید رنگ علاوه بر زیبایی گیاه،



شکل ۷- شبکه ژنی پیش بینی شده ژن *VvUFGT* در مسیر بیوستر آنتوسیانین در انگور (ExPASY (www.ExPASY.org))

مطالعه تعبیه شده است. نظر به اهمیت هورمون‌های گیاهی در کنترل شرایط رشد و نمو در شرایط مختلف محیطی و تولید متابولیت‌های ثانویه مثل آنتوسیانین، حضور موتفیف‌های تنظیمی پاسخ دهنده به هورمون‌های گیاهی در پرموتور ژن‌های *VvMYBA1* و *VvMYBA3* قابل توجه است.

شباهت ساختار سه بعدی *VvUFGT* به پروتئین *PgUFGT* نشان داد که هر دو پروتئین به احتمال زیاد، مسیر مشابهی را در تولید آنتوسیانین طی می‌نمایند. نتایج حاصل از بیان ژن *PgUFGT* در سه رقم انار مطالعه شده نیز مطلب فوق را تایید کرد. از این‌رو با توجه به ترسیم شبکه ژنی آنتوسیانین در انگور و تجزیه و تحلیل پرموترهای ژن *VvUFGT* و ژن‌های تنظیم کننده *VvMYBA1* و *VvMYBA3*، شرایط محیطی مشابه برای تولید آنتوسیانین قابل انتظار است. بنابراین می‌توان نتیجه‌گیری کرد که تولید رنگدانه‌های آنتوسیانین در انار مانند سایر گیاهان مطالعه شده نظیر انگور، هلو، سیب و بلوبری، واکنش در جهت بقا در شرایط متغیر

در شبکه حاضر، نشان می‌دهد که این مسیر با توجه به شرایط محیطی تنظیم می‌شود (شکل ۷).

تجزیه و تحلیل راهانداز ژن *VvUFGT* توسط سایت PlantCARE نشان داد که ژن مورد مطالعه در ناحیه بالادست خود حاوی عناصر تنظیم کننده MBS (جاگاه اتصال پروتئین تنظیم کننده MYB) بود (شکل ۸). در شرایط تنش بهویژه تنش‌های غیر زنده این پروتئین فعال شده و بیان ژن *VvUFGT* را کنترل می‌کند. به علاوه، نتایج حاصل از اسکن سایت PlantCARE در مورد راهانداز ژن‌های *VvMYBA1* و *VvMYBA3* نیز نشان داد که چندین عناصر تنظیمی موجود در پرموتر ژن‌های تنظیمی *VvMYBA1* و *VvMYBA3*، تولید آنتوسیانین توسط ژن *VvUFGT* را کنترل می‌کنند (جدول ۲).

نتایج حاصل از بررسی راهانداز ژن‌های *VvMYBA1* و *VvMYBA3* نشان داد که نور عامل محیطی مهمی در تنظیم بیان ژن *VvUFGT* می‌باشد. همچنین در پاسخ به تنش‌های محیطی نظیر خشکی و شوری نیز موتفیف‌های تنظیم کننده متعددی در راهاندازهای مورد

```
>userseq29095 1330nt
+ GTTGGATTCG GGGATGTAC AATTGGTT TTGGCTGTG AAGATTATAA ATGAGAGCAA GTGCATGGC
- CAACCTTACCC CCGTACATG TAAACCCAA ACCGACAC TTCTAATAAT TACTCTCGTT CACGTCCCC
+ GTTGAGAG TGGCAACTGC ATGGGGTTG TCATCCACC CTCCAAACAA ACCAACCCAA ACCCAAACCA
- CAACACTCTC ACCGTTACG TACCCCCAAC AGTACGCTEG GACGAATGTT TGGTTCGGTT TGGTTGGT
+ CCAGCTGCA TGGCGCCAA AGGAGAAA AATGGAAAA AAAACAAAAC AAAACAGGG CAAAGTGA
- GGTCAGACGT ACCCCCGGT TCTTCTTTT TACCCCTTTT TTTGTTTIG TTTGGTCCC CCTTCACTT
+ GCTCTGTG ACCTTTACT TTGCCATTGG TGCGATATAC CTGGTGACTA GTACCAAGAC CATGTTTTT
- CGACACACAC TCGAAAATGA AACGGTAAC ACCCTATATG CACCACTCAT CATCCTCTC CTACAAAAAA
+ AATTAACTT AAATTTAT TTTCCATTCT AAAGAAAATA AAATTTGTTT CTAATTGAA AAATATGATT
- TTAAATGAA TTTTTAATA AAAGGTAACA TTCTTTAT TTTACAAA GATTAACATT TTATACAA
+ CAATAAAATT TTTGAAATAA ATTATGTTT CAAAAATTAA TTGATTAAA ACCCCATTGT TTTTAAAT
- CTATTTAAAA AAACCTTTATT TAATTACAAA AGTTTTATT AAACAAATT TCGGCTAAC AAAATTCTA
+ AATTTAAAT TTTTTTTT AGGAATGTTG AAAAGGTGGA GAACGTTTTA AAAGTTTTG TATTCCACAT
- TTAAATTTA AAAAAAAAC TCCTTACAC TTTCCACCT CTGGCAAAAT TTTTAAAC ATAAGGTGTA
+ GATATATAAT ATTTTATGA AGAGAACTAA AAAAATTATT TTATATAATI TGGTTATTCAG ATAGAATT
- CTATATATAA TAAAATTAATC TCTCTGATT TTATATAAA AAAATATAAA ACCAATAATC TATCTAAAAA
+ GTTACCAAA ACAATTGAAA AATATTTAA AGAATTATTT TCAAAAAATA CTTTTAAAGA ATGATTITG
- CAATGGTTT TGTTAATTT TTATAAAATT TCTTAAATAAA AGTTTTTTAT GAAAATTTCT TAATCAAAC
+ AAAAACCAAT TAAATTAAGA AATTAAGAGA GTTGTGAA AACTTTTTG AAAAGATCCA AAAACTGT
- TTTTCCCTA ATTAATTCT TTAAATTCTT CAACAAACTT TTGAAAAAAAC TTTCTAGT TTTGACATA
+ TTAAACTTAA AAGGTAAGG TCTATTTGAT AATTATTTTT TAGAACGGTT TCTTATCTT TAAAACAAA
- AAATGAAAT TTCCAITCCC AGATAAAACTA TTAATAAAAA ATCTTGCAA AAGATAAGAA ATTTTGTTT
+ AATTAAGATA ATACATTAA CAATAAAAAA TTATTTATAA TAGAAAACAA AGTATTTCA AAAATATAT
- TTAATTCAT TATGTAATT TTATTTTTT AATTAATTTT ATCTTTGTT TCATAAAAAGT TTTTATATA
+ TTAAATTATT TTAAATGAA GTTGTAAA ATAATTATAC AAATATGTA ATGAAATAAA AAAAAAATAC
- AAATTAATAA AAAATACTTA CAAAACCTT TATTAATATG TTATACATC TTACTAAATT TTATTTATG
+ TAGATATCAA ACTTATTTT AAAAATTAAT AAAAATATGT TAAAGATTT TAAATTTATA
- ATCTATAGT TGAATTTAA TTATTTGAA TTTTATACA TTTTCTAAA ATTTCTAAA ATTTAATAT
+ AACAAATT TGTTCACAA AACATTAGAT ATGGTTTTA AAAACTATT TTTTATAACT GTTITATAAA
- TTGTTAAAAC ACAAAATGTT TGTAACTCA TTACAAAAT TTTTGATAA AAAATTTGA CAAAATATT
+ ACAGTTATCA AACAGACCTT AAATTTTTA CACAAAATAT TTTTGTAGA ATGCTCTCA AAAACAACTT
- TGTCATAGT TTGCTCGAA TTAAAAAAT GTCTTTATA AAAAAACTCT TACACAAAGT TTTGCTCAA
+ ATTTTAAAGA TCAAGTCTAA TATGCTCTCA ATCGTGTGTT GTAAACTAT TTTAGATAAC AATGAAATA
- TAAAAATCT AGTTCAGATT ATACGAGAGT TAGCACAAA ACATTTCTATA AAATCTAATG TTACTTTAT
+ TGAAAAATAT TTCAACAAAT TTTTATGTC GTATAATTAT ACAACACCTT CATCTGGAAAT AACACAAA
- ACTTTTTATA AAGTGTAA AAAATAACG CATAATTAATA TGTGTGGGA GTACACCTTA TTCTGGTTT
+ TATCGTTTTT CATATTTATG TTCTTAGATA AATTTGTTG TAAAGACAA TTTAAAAAAA AATGATGTC
- ATAGCAAAA GTATAAATAC AAGGATCTAT TTAAACAAAG AATTTCTGTT AAATTTTTT TTACTACAG
```

شکل ۸- تجزیه و تحلیل را انداز ژن *VvUFGT* و نمایش عناصر تنظیم کننده MBS (جاگاه اتصال پروتئین های تنظیم کننده MYB)

## منابع

Bitsch R, Netzel M, Frank T, Strass G, Bitsch I (2004) Bioavailability and biokinetics of anthocyanins from red grape juice and red wine. Journal of Biomedicine and Biotechnology 293-298.

Boudet AM (2007) Evolution and current status of research in phenolic compounds. Photochemistry 68: 2722-2735.

Cristina L, Aizza B, Dornelas MC (2011) A genomic approach to Study anthocyanin synthesis and flower pigmentation in Passionflowers. Journal of Nucleic Acids Article ID 371517, 17 pages.

De Pascual-Teresa S, Sanchez-Ballesta MT (2008) Anthocyanins: from plant to health. Phytochemical Review 7: 281-299.

محیطی می باشد. بر اساس مطالعه حاضر، توجه به شرایط محیطی قابل رشد گیاهان تولید کننده آنتوسبیانین نظری اثار و انگور بسیار حائز اهمیت می باشد. این مطلب به ویژه در تولید آنتوسبیانین در کشت تعلیقی و فراهم آوردن عوامل محیطی موثر در جهت افزایش بیان ژن های سنتز کننده آنتوسبیانین، مصادق بیشتری دارد. لذا به نظر می رسد که کنترل میزان تولید آنتوسبیانین در گیاه بر اساس شناخت تاثیر شرایط محیطی امکان پذیر می باشد.

- Du CT, Wang PL, Francis FJ (1975) Anthocyanins of pomegranate (*Punica granatum*). Journal of Food Science 40: 417-418.
- Einbond LS, Reynertson KA, Luo X, Basile MJ, Kennelly EJ (2004) Anthocyanin antioxidants from edible fruits. Food Chemistry 23-28.
- Garcia-Alonso M, Rimbach G, Sasai M, Nakahara M, Matsugo S, Uchida Y, Rivas-Gonzalo JC, De Pascual-Teresa S (2005) Electron spin resonance spectroscopy studies on the free radical scavenging activity of wine anthocyanins and pyranoanthocyanins. Molecular Nutrition and Food Research 49: 1112-1119.
- Gil M, Toma´s-Barbera n FA, Hess-Pierce B, Holcroft DM, Kader AA (2000) Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. Journal of Agricultural Food Chemical 48: 4581-4589.
- Gould KS, Lister C (2006) Flavonoid functions in plants. Page 397-441 in Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications. Andersen M, Markham KR (eds). Boca Raton, FL: CRC Press.
- Harbone JB (1988) Phytochemical Methods. Chapman and Hall, London.
- Harbone JB (1994) The handbook of Natural Flavonoids. Chapman and Hall, London.
- Jaakola L (2003) Flavonoid biosynthesis in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.). Academic Dissertation. Faculty of Agriculture and Forestry. University of Helsinki, Finland.
- Jing P, Bomser JA, Schwartz SJ, He J, Magnuson BA, Giusti MM (2008) Structure-function relationships of anthocyanin from various anthocyanin-rich extracts on the inhibition of colon cancer cell growth. Journal of Agricultural Food Chemical 56: 9391-9398.
- Jurenka J (2008) Therapeutic applications of pomegranate (*Punica granatum* L.). Alternative Medicine Review 13: 128-144.
- Konczak, I, Zhang W (2004) Anthocyanins: More than nature's colors. Journal of Biomedicine and Biotechnology 5: 239-240.
- Lapidot T, Harel S, Granit R, Kanner J (1998) Bioavailability of red wine anthocyanins as detected in human urine. Journal of Agricultural Food Chemical 46: 4297-4302.
- Offen W, Martinez-Fleites C, Yang M, Eng Kiat-Lim E, Davis BG, Chris A, Tarling CA, Ford CM, Bowles DJ, Davies GJ (2006). Structure of a flavonoid glucosyltransferase reveals the basis for plant natural product modification. EMBO Journal 25: 1396-1405.
- Rajani S, Mahalakshmi S, Deepa VM, Sathya K, Shajiththa S, Thirunalasundari T (2011) Antioxidant potentials of *Punica granatum* fruit rind extracts. International Journal of Pharmaceutical Sciences 3: 82-88.
- Tsuda T, Yamaguchi M, Honda C, Moriguchi T (2004) Expression of anthocyanin biosynthesis genes in the skin of peach and nectarine fruits. Journal of the American Society and Horticulture Science 129: 857-862.
- Tzin V, Galili G (2010) The biosynthetic pathways for shikimate and aromatic amino acids in *Arabidopsis thaliana*. The Arabidopsis Book 8: e0132. doi: 10.1199/tab.0132.