مقاله علمی پژوهشی
مجله دوفصل نامه
مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
ISSN 2588-5073 چاپی
ISSN 2588-5081 الکترونیکی
دوره ۱۱، شماره ۲، پاییز و زمستان ۱۴۰۱
صفحه ۲۵۲-۲۴۳

https://dorl.net/dor/20.1001.1.25885073.1401.11.2.10.9

DOR:20.1001.1.25885073.1401.11.2.10.9

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 11, Number 2
2023

http://gebsj.ir/

https://ecc.isc.ac/showJournal/23064

شناسایی و بررسی بیان ژن های درگیر در سنتز فلاونوئیدها در مراحل نمو غده سیب زمینی

Identification and expression analysis of some genes involved in flavonoids biosynthesis at different tuber development stages of potato

شیوا سیاه‌منصور[۱]، فرهاد نظریان فیروزآبادی[۲*]، احمد اسماعیلی[۲]، سید سجاد سهرابی[۳]

Shiva Siahmansour[1], Farhad Nazarian-Firouzabadi[2*], Ahmad Ismaili[2], Seyed Sajad Sohrabi[3]

۱- دانشجوی دکترا، ۲- استاد، ۳- دکترا، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران

1. Ph.D. Student, 2. Professor., 3. Ph.D., Department of Plant Production and Genetic Engineering, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran.

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی : *Corresponding Author, Email
nazarian.f@lu.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۷/۱۳ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۸/۴)

چکیده

ارزش غذایی بالای سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum*) ، این گیاه را به عنوان چهارمین منبع مهم غذایی پس از گندم، برنج و ذرت در سراسر دنیا تبدیل کرده است. در مطالعه حاضر به منظور شناسایی و بررسی بیان مهم‌ترین ژن‌های درگیر در سنتز فلاونوئیدها در مراحل نمو غده سیب زمینی و روند تغییرات بیان آنها، مجموعه داده‌های حاصل از توالی‌یابی RNA غده سیب‌زمینی رقم مارفونا در سه مرحله نموی مختلف از شروع تشکیل استولون تا تشکیل غده گردآوری و تجزیه و تحلیل شدند. به منظور اعتبارسنجی بیان ژن‌های شناسایی شده‌ی درگیر در مسیر بیوسنتز فلاونوئیدها در غده سیب‌زمینی (٦٢ ژن)، بیان برخی از آن‌ها با استفاده روش qRT-PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج این مطالعه نشان داد، با عبور غده سیب‌زمینی از مرحله نوک قلاب مانند به مرحله تشکیل استولون، ۱۰ ژن افزایش و ۱۱ ژن کاهش بیان معنی‌دار می‌یابند. در مقایسه مرحله نوک قلاب مانند نسبت به مرحله شروع تشکیل غده، به ترتیب ۷ و ۲۰ ژن به طور معنی‌داری افزایش و کاهش بیان نشان دادند. همچنین مقایسه دو مرحله تشکیل استولون و شروع تشکیل غده نشان داد که ١٤ ژن از کاهش بیان معنی‌داری برخوردار بودند. در مجموع ٤ ژن کلیدی *CYP98A3*، *ACT*، *SAT* و *BEAT* با تغییرات معنی‌دار در بین مراحل نموی غده سیب‌زمینی شناسایی شدند. بررسی میزان فلاونوئید در مراحل نموی سه‌گانه نیز نشان داد که میزان فلاونوئید در طی مرحله نموی، به‌طرز قابل توجهی افزایش می‌یابد، به‌طوری‌که میانگین محتوای فلاونوئید در مراحل ذکر شده به ترتیب به مقادیر ۱/۹، ۷/۲ و ٢٤/٨ میلی‌گرم در گرم وزن تر رسید. از آنجاییکه ژن‌های *CYP98A3*، *ACT*، *SAT* و *BEAT* از جمله ژن‌های مهم درگیر در بیوسنتز متابولیت‌ها هستند، لذا از آنها می‌توان برای تغییر میزان فلاونوئیدها در سیب زمینی استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی

بیان ژن،
توالی‌یابی،
سیب‌زمینی،
فلاونوئید،
مسیرهای متابولیکی

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 11, Number 2, 2023

Abstract

The high nutritional value has made potato the fourth most important food source after wheat, rice and corn worldwide. In this study, in order to identify and investigate the expression pattern of the most significant genes involved in the synthesis of flavonoids at different potato tuber developmental stages, the RNA sequencing data was obtained from three different potato tuber development stages, namely; initiation of stolon formation, stolon swallowing and initiation of tuber formation. In order to validate the expression of identified genes involved in the biosynthesis of flavonoids in potato tuber (62 genes), the expression of significant genes were evaluated by using qRT-PCR method. The results of this study showed that at the stolon swallowing stage, 10 and 11 genes had a significant increase and decrease in expression, respectively. Comparing the stolon swallowing stage with initiation of stolon formation, 7 and 20 genes showed a significant increase and decrease in expression. At the initiation of tuber formation, it was found that 14 genes had a significant decrease in expression. In total, 4 key genes *CYP98A3*, *ACT*, *SAT* and *BEAT* were identified with significant changes among developmental stages. The amount of flavonoid in the three developmental stages was also significantly increased with the transition of developmental stages. The average of flavonoid content was 1.9, 7.2 and 24.8 mg/gFW for tree developmental stages, respectively. Since *CYP98A3*, *ACT*, *SAT* and *BEAT* are key genes involved in the biosynthesis of secondary metabolites in the potato tuber, they can be considered as possible candidate genes for alteration of flavonoids content in potato.

Keywords: Flavonoids, Gene expression, Metabolic pathways, Potato, Sequencing

مقدمه

سیب‌زمینی با نام علمی *Solanum tuberosum* L.، گیاهی اتوتتراپلوئید ($2n = 4x = 48$) و یکی از اعضای خانواده سولاناسه (Solanaceae) است که پس از گندم، برنج و ذرت، چهارمین محصول استراتژیک و غذایی مهم دنیا محسوب می‌شود (Mishra *et al.*, 2020). سیب‌زمینی با تولید جهانی بیش از ۳۵۹ میلیون تن یکی از غذاهای اصلی رژیم غذایی انسان محسوب می‌شود (Frontuto *et al.*, 2019). همچنین، اهمیت اقتصادی زیادی برای تأمین انرژی از نظر مواد غذایی و صنعتی دارد و سال ۲۰۰۸ به‌نام سال جهانی سیب‌زمینی نام‌گذاری شده بود و همواره مورد توجه پژوهشگران بوده است و یافته‌های علمی آن در سایر گیاهان نیز مورد استفاده قرار می‌گیرد (Pazhouhandeh *et al.*, 2017).

از منظر تغذیه، سیب‌زمینی منبع غنی از پروتئین‌ها، مواد معدنی، منیزیم، کلسیم، سدیم، منگنز، پتاسیم و فسفر (Mishra *et al.*, 2020; Nassar *et al.*, 2012) و ویتامین‌های خانواده B (B1، B2، B3، B5، B6 و B9)، C، E و K می‌باشد. غلظت ویتامین‌ها در قسمت گوشتی غده بیشتر از پوست غده سیب‌زمینی است و به دلیل محتوای بالای پتاسیم و سطوح پایین سدیم، برای بیماران مبتلا به فشار خون بالا مناسب است (McGill *et al.*, 2013). محتوای پروتئین سیب‌زمینی با محتوای پروتئین غلات (مانند گندم و برنج) قابل مقایسه است، اما از نظر تغذیه‌ای، پروتئین سیب‌زمینی مشابه پروتئین تخم مرغ کامل است (McGill *et al.*, 2013; Mishra *et al.*, 2020). از نظر نیاز روزانه انسان به ویتامین C، سیب‌زمینی منبع مهمی در تامین ویتامین C لازم برای سلامت انسان است (Burgos *et al.*, 2009).

در میان ترکیبات مختلف گیاهی، پلی‌فنول‌ها گروهی از ترکیبات دارای فعالیت زیستی آنتی‌اکسیدانی در گیاهان هستند که بیش از ۸۰۰۰ نوع از آن‌ها تاکنون شناسایی شده است. فلاونوئیدها، یکی از مهم‌ترین انواع پلی فنول‌ها هستند (Pietta *et al.*, 2003) که از ترکیبات زیست‌فعال محسوب شده و جزء متابولیت‌های ثانویه گیاهی به شمار می‌آیند (Klimczak *et al.*, 2007). فلاونوئیدها تاثیر شگرفی در سلامت انسان و جانوران دارند که از این میان می‌توان به اثراتی مانند کاهش کلسترول، کاهش فشارخون، کاهش خطر

ابتلا به بیماری‌های قلبی، ضدموتاژن، ضدسرطان، تنظیم کننده سیستم ایمنی و ضدالتهاب اشاره کرد (Abeysinghe *et al*., 2007). میزان ترکیبات فنولیک و آنتوسیانین‌ها با افزایش سن غده‌ها و همچنین مدت انبارداری کاهش پیدا می‌کند (Reyes *et al*., 2004)، با این حال، میزان ترکیبات مفید فنولیک سیب‌زمینی به مراتب بیشتر از گیاهان و سبزی‌هایی مانند هویج، کاهو و گوجه‌فرنگی است (Chun *et al*., 2005).

با وجود آنکه توالی ژنوم مرجع گیاه سیب‌زمینی در دسترس می‌باشد، دانسته‌های ژنتیکی در خصوص چگونگی غده‌زایی و همچنین پروفایل ژن‌های درگیر در مسیرهای بیوسنتزی بسیاری از ترکیبات مهم این گیاه ناکافی و یا اصلا وجود ندارد. در جریان مراحل نمو غده سیب‌زمینی، ژن‌های متعددی از یک مرحه به مرحله بعدی افزایش یا کاهش بیان نشان می‌دهند (Lu *et al*., 2010). پژوهش‌ها نشان می‌دهند که متابولیسم فنیل‌پروپانوئید در طول دوره طبیعی رشد غده، از غده‌های نابالغ تا آن‌هایی که از نظر فیزیولوژیکی به‌طور کامل نمو یافته و بالغ شده، در شرایط مزرعه متفاوت است و این تغییرات در متابولیسم فنیل پروپانوئید همراه با رشد غده در طول فصل رشد دیده می‌شود (Chawla *et al*., 2012).

اگرچه تفاوت‌ها در متابولیسم را نمی‌توان صرفاً به تغییرات رشدی نسبت داد، برخی از این تغییرات ممکن است به دلیل اثرات محیطی باشد. با این حال، بر اساس یک مطالعه غده‌های جمع‌آوری شده از ژنوتیپ‌های متعددی که در چهار سال مختلف، از مزارع متعدد در ایالات مختلف جمع‌آوری شده بودند، همگی غلظت‌های بالایی از متابولیت‌ها را در غده‌های نابالغ نشان دادند (Navarre *et al*., 2013). بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که با تغییر میزان تولید متابولیت‌های مختلف، احتمال دارد که بیان ژن‌های درگیر در مسیر بیوسنتز ترکیبات غده نیز تغییر کنند.

امروزه روش‌های توالی‌یابی با توان بالا مانند فناوری توالی‌یابی RNA-seq از جدیدترین و کارآمدترین ابزارهای مولکولی برای بررسی بیان هم‌زمان تعداد زیادی ژن هستند که در یک مسیر بیوسنتزی دخالت دارند. یکی از مهم‌ترین اهداف آزمایش‌های RNA-seq تشخیص تغییرات بیان ژن‌ها در دو یا چند شرایط متفاوت می‌باشد. از این رو هدف از این مطالعه بررسی الگوی بیان ژن‌های درگیر در شبکه بیوسنتز ترکیبات فلاونوئید در مراحل مختلف نمو غده سیب‌زمینی و ارائه تصویر بهتری از شبکه ژنی مسیر بیوسنتز فلاونوئیدها می‌باشد.

مواد و روش‌ها

کشت و نمونه‌برداری: غده سیب‌زمینی تازه از رقم مارفونا با هیپوکلریت سدیم ٤ درصد استریل شد سپس، در گلدان حاوی خاک شنی استریل شده با فرمالین با عمق ۳۰ سانتی‌متر کشت شده و به مدت ٤ هفته در گلخانه دانشکده کشاورزی دانشگاه لرستان، با دمای۲±۲٤ درجه سانتی‌گراد و تحت دوره نوری ١٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. تشخیص مراحل نموی، با بررسی غده‌دهی نمونه‌ها از هفته دوم و تطبیق آن با مراحل موجود در مطالعه شیرانی بیدآبادی و همکاران (۲۰۲۰) انجام شد. سپس نمونه‌برداری در ۳ مرحله نموی شامل: ۱) نوک قلاب مانند، ۲) کلاهک متورم و ۳) شروع غده‌دهی (شکل ۱) صورت گرفت (ShiraniBidabadi *et al*., 2020). از هر مرحله نموی سه نمونه از ۵ گلدان متفاوت برداشت و نمونه‌ها به سرعت در نیتروژن مایع قرار داده شدند و سپس به فریزر ۸۰- درجه سانتی گراد انتقال داده شدند.

تعیین مقدار فلاونوئیدهای کل: برای سنجش میزان فلاونوئید کل ابتدا عصاره از مراحل سه‌گانه نمو غده تهیه شد. برای تهیه عصاره، مقدار ۱ گرم نمونه غده سیب‌زمینی تازه در ۱۰ سی‌سی محلول متانول ۸۰ درصد، خیسانده و به مدت ٤٨ ساعت در دمای اتاق و بر روی شیکر نگهداری گردید. پس از طی شدن زمان مورد نظر، عصاره‌ها با استفاده از کاغذ واتمن صاف شده، سپس در یخچال ٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. در ادامه بـــه ۵۰۰ میکرولیتر از عصاره، ۱/۵ میلی‌لیتر متانول (۸۰ درصد)، ۱۰۰ میکرولیتر محلول آلومینیوم کلراید (۱۰ درصد)، ۱۰۰ میکرولیتر محلول استات پتاسیم ۱ مولار و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد. جذب مخلوط بعد از گذشت ۳۰ دقیقه با دستگاه اسپکتروفتومتر، در طول موج ٤١٥ نانومتر نسبت به بلانک خوانش شد. از ماده کوئرستین در غلظت‌های مختلف (صفر، ۳۱/۲۵، ٦٢/٥، ١٢٥، ٢٥٠، ٥٠٠، ١٠٠٠، ١٥٠٠

و ۲۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر) استفاده و منحنی استاندارد در محیط نرم‌افزار Excel رسم شد، سپس معادله خط y = ax + b به دست آمد. آزمایش‌ها ۳ بار تکرار و میانگین آن‌ها گزارش شد (Chang *et al.*, 2002).

جمع‌آوری، کنترل کیفیت و پردازش داده‌های حاصل از توالی‌یابی RNA: به منظور شناسایی و بررسی بیان ژن‌های درگیر در مسیرهای بیوسنتزی فلاونوئیدها، مجموعه داده‌های حاصل از توالی‌یابی RNA غده سیب‌زمینی در سه مرحله نموی مختلف، از پایگاه داده NCBI، بخش SRA با کد دسترسی PRJNA530118 گردآوری شدند (Shirani-Bidabadi *et al.*, 2020). کیفیت اولیه مجموعه خوانش‌های خام با استفاده از ابزار FastQC (v0.11.6) (Andrews, 2010) مورد ارزیابی قرار گرفت. خطاهای حاصل از توالی‌یابی ناقص و همچنین توالی‌های آداپتور از خوانش‌های کوتاه به ترتیب با استفاده از نرم‌افزارهای RCorrector (Song and Florea, 2015) و Cutadapt (Martin, 2011) حذف شدند. در آخرین مرحله از پردازش داده‌ها، خوانش‌های با کیفیت پایین (Phred quality score ≥ 30) با استفاده از نرم‌افزار Trimmomatic (v0.27) حذف شدند (Bolger *et al.*, 2014).

نقشه‌یابی و تعیین ژن‌های با بیان افتراقی: خوانش‌های با کیفیت بالا (Clean reads) در هر نمونه با استفاده از ابزار Bowtie2 (Langmead and Salzberg, 2012) در مقابل ژنوم مرجع سیب زمینی نقشه‌یابی شدند. سپس خوانش‌های نقشه یابی شده در هر نمونه توسط مجموعه نرم‌افزاری RSEM نرمال‌سازی و کمیت بیان هر ژن با معیارهای تعداد خوانش، FPKM و TPM مشخص شد. ژن‌های با بیان افتراقی (DEGs Differential expressed genes:) (|±1| = < Log2FC و FDR < 0.01) در دوره‌های مختلف نمو غده، با استفاده از نرم‌افزار edgeR تعیین شدند (Trapnell *et al.*, 2009).

شناسایی و بررسی بیان ژن‌های مسیر سنتز فلاونوئیدها: پس از شناسایی ژن‌های این مسیر، بیان نسبی هر کدام از ژن‌ها در آزمایش RNA-seq در دوره‌های نموی غده سیب‌زمینی تعیین و از میان آن‌هاژن‌های نامزد به گونه‌ای انتخاب شدند که در سه دوره نموی دارای بیش‌ترین افتراق بیان بودند.

بیان ژن‌های به دست آمده از تحلیل RNA-Seq، با بررسی بیان نسبی برخی از مهم‌ترین ژن‌های کدکننده آنزیم در مسیرهای تولید متابولیت‌های مورد نظر که با استفاده ازتحلیل RNA-seq بیش‌ترین تفاوت بیان را نشان داده بودند به همراه ژن مرجع (*elf-1*) در مراحل مختلف نمو غده توسط واکنش PCR در زمان واقعی (Real-time PCR) اعتبار سنجی شدند. ژن‌های کاندید شامل چهار ژن *cytochrome P450 98A3-like* (*CYP98A3*)، *agmatine coumaroyltransferase-2-like* (*ACT*)، *salutaridinol 7-O-acetyltransferase-like* (*SAT*) و *acetyl-CoA-benzylalcohol acetyltransferase-like* (*BEAT*) بودند که به ترتیب در مسیر سنتز فلاونوئید نقش داشتند. طراحی جفت آغازگرهای اختصاصی برای هریک از ژن‌های کاندید با استفاده از نرم‌افزار AlleleID (v6.0) (Apte and Singh, 2007) صورت گرفت (جدول ۱).

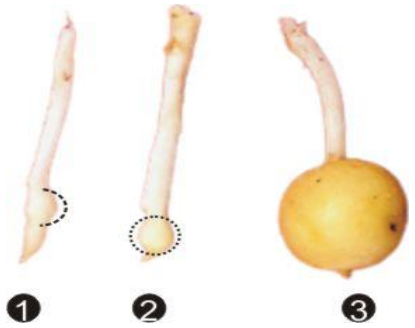
جدول ۱- توالی آغازگرهای ژن‌های کاندید درگیر در بیوسنتز فلاونوئید در طی نمو غده سیب‌زمینی

Table 1. The primer sequences of candidate genes involved in flavonoid biosynthesis during potato tuberization.

Gene symbol		Sequence (5'-3')	Annealing temperature (°C)	Product length (bp)
CYP98A3	F	GCACCCTCCAACTCCCCTAATG	60.1	118
	R	ATCACGACCTAACGCCCACAC	60.05	
ACT	F	GCGGGCTAAGTGGATTTGAGTC	61.57	158
	R	GTGTGGCAGAGGTTCTTGTAGTAG	60.86	
SAT	F	GCTGAAATGGTTGCGAGGAG	59.55	183
	R	GCTCAATAAACAAGGTCTCAAACG	58.85	
BEAT	F	TTTAACACATCTTTACCCTTTAGC	55.37	196
	R	ATTCGTCTCGTCCACATCC	56.96	
elf-1	F	GTCACACTTCCCACATTGCT	58.39	112
	R	CCAGCATCACCGTTCTTCAA	58.48	

برای تهیه کتابخانه cDNA از تمامی نمونه‌ها (سه تکرار در هر سه مرحله نموی) با استفاده از کیت RNX plus (شرکت سیناژن) استخراج RNA صورت گرفت. پس از تأیید کیفیت و کمیّت RNA استخراجی و هم غلظت‌سازی RNA در همه نمونه‌ها از کیت تجاری سنتز cDNA (شرکت سیناژن) طبق شیوه‌نامه استاندارد جهت ساخت کتابخانه‌های cDNA استفاده شد.

اختصاصی بودن تمام آغازگرهای با استفاده از ژل آگارز و منحنی ذوب ارزیابی و با رسم منحنی استاندارد کارایی واکنش تمام آغازگرها بررسی شد. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها بیان، از فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak and Schmittgen, 2001) با در نظر گرفتن ۳ تکرار زیستی و ۲ تکرار تکنیکی استفاده شد. همچنین تغییر بیان محاسبه شده در تحلیل RNA-seq با تغییر بیان حاصل از روش qRT-PCR مقایسه و ضریب همبستگی نتایج این دو روش، محاسبه شد.



شکل ۱- سه نمونه از مراحل نموی غده سیب‌زمینی: ۱: نوک قلاب مانند؛ ۲: کلاهک متورم و ۳: شروع غده‌دهی

Fig 1. Three different developmental stages of potato tuberization: 1: Hook-like tip; 2: Swollen cap and 3: Beginning of tuberization.

نتایج و بحث

پس از بررسی کیفیت مجموعه خوانش‌های خام و در نهایت زدودن خوانش‌های با کیفیت پایین، در مجموع ۲۶۸،۳۰۰،۳۳۲ خوانش با کیفیت بالا برای نقشه‌یابی نگهداری شدند. در ادامه با کمیت سنجی و بررسی بیان نسبی ژن‌ها در مراحل نموی غده سیب‌زمینی، مشخص شد که در مقایسه مرحله ۱ با مرحله ۲ از مجموع ٤۳۰ DEG شناسایی شده، ۱۰ توالی ژنی درگیر در مسیر سنتز فلاونوئید از افزایش بیان معنی‌داری برخوردار بودند که بیش‌ترین میزان بیان ژن مربوط به *ACT* با $Log_2FC = ٤/٧$، سپس *BEAT* با $Log_2FC = ٤/٢$، پس از آن *CYP98A3* با $Log_2FC = ٣/٢$ و در نهایت ژن *SAT* با $Log_2FC = ٢/٥$ بود (شکل ۲-الف).

در این مقایسه، ۱۱ توالی ژنی درگیر در مسیر سنتز فلاونوئیدها نیز کاهش بیان نشان دادند که بالاترین میزان، با $Log_2FC = -٤/٥$ مربوط به ژن *cytochrome P450 98A2-like* بود و پس از آن ژن *flavanone 3 beta-hydroxylase* قرار داشت که کاهش بیان آن $Log_2FC = -٤/٠٣$ بود (شکل ۲-الف).

در پژوهش حاضر بعد از بررسی داده‌ها، چهار ژن *CYP98A3*، *ACT*، *SAT* و *BEAT* شناسایی شد؛ مقایسه میزان بیان نسبی و اعتبار سنجی حاصل از خروجی RNA-seq و Real-time RT-PCR حاکی از این بود که بیان سه ژن *CYP98A3*، *ACT* و *BEAT* منطبق با نتایج تجزیه و تحلیل RNA-seq این ژن‌ها می‌باشد؛ اما نتایج بررسی بیان ژن *SAT* نشان دهنده این موضوع بود که بر خلاف نتایج حاصل از RNA-seq، در نمونه‌های زیستی این پژوهش، دارای افزایش بیان بود. همچنین میزان بیان نسبی و اعتبار سنجی چهار ژن *CYP98A3*، *ACT*، *SAT* و *BEAT* که حاصل از خروجی RNA-seq و Real-time RT-PCR بودند، در مرحله ۱ نسبت به مرحله ۲ مقایسه شده است (شکل ۳-الف).

در مقایسه مرحله ۱ نسبت به مرحله ۳، از میان تمام ۲۱۲۰ ژن DEG شناسایی شده، ۷ توالی ژنی که مرتبط با مسیر سنتز فلاونوئیدها بودند؛ افزایش بیان معنی‌داری نشان دادند. پس از بررسی مقادیر بیان مشخص شد که ژن‌های *spermidine hydroxycinnamoyl transferase* با $Log_2FC = ٧/٨$، سپس ژن *chalcone synthase J-like* با $Log_2FC = ٣/٢$، بعد از آن ژن *ACT* و همچنین ژن *pelargonidin 3-O-6-caffeoylglucoside 5-O-6-O-malonylglucoside 4malonyltransferase-like* با $Log_2FC = ٢/٦$ بالاترین میزان بیان معنی‌دار را نشان دادند. در این مقایسه ۲۰ توالی ژنی درگیر در مسیر سنتز فلاونوئیدها نیز دارای کاهش بیان بودند که بالاترین میزان کاهش با $Log_2FC = -٧/٨$ مربوط به ژن *AOMT3; flavonoid 3',5'-methyltransferase-like* بود و بعد از آن ژن‌های *cytochrome P450 98A3-like* با $Log_2FC = -٥/٢$ و *probable chalcone–flavonone isomerase 3* با مقادیر کاهشی و $Log_2FC = -٤/٩$ در رتبه‌های بعدی قرار داشتند (شکل ۲-ب).

مقایسه میزان بیان نسبی و اعتبار سنجی چهار ژن *CYP98A3*، *ACT*، *SAT* و *BEAT* حاصل از خروجی RNA-seq و Real-time RT-PCR نیز نشان داد که الگوی بیانی هر چهار ژن منطبق با الگوی بیانی در RNA-seq می‌باشد. به نحوی که بیان ژن *CYP98A3* هم در نتایج RNA-seq و هم در نتایج Real-time RT-PCR از کاهش بیان و ژن *ACT* از افزایش بیان برخوردار بودند، این

تایید در مورد دو ژن *SAT* و *BEAT* نیز بدست آمد که به ترتیب کاهش و افزایش بیان داشتند (شکل ۳–ب).

در مرحله ۲ نسبت به ۳ نیز مشخص شد که از بین ٦١٠ DEG شناسایی شده، ١٤ ژن در مسیر سنتز فلاونوئیدها کاهش بیان معنی‌دار نشان دادند که پس از بررسی مقادیر بیان نسبی ژن‌ها، مشخص شد که ژن *SAT* با کاهش ٤/٩– = Log_2FC، بعد از آن ژن *BEAT* با کاهش٣/٦– = Log_2FC، سپس ژن *acylsugar acyltransferase 3-like* با ٣/٤– = Log_2FC بالاترین نرخ کاهش معنی‌دار را نشان دادند (شکل ۲–ج).

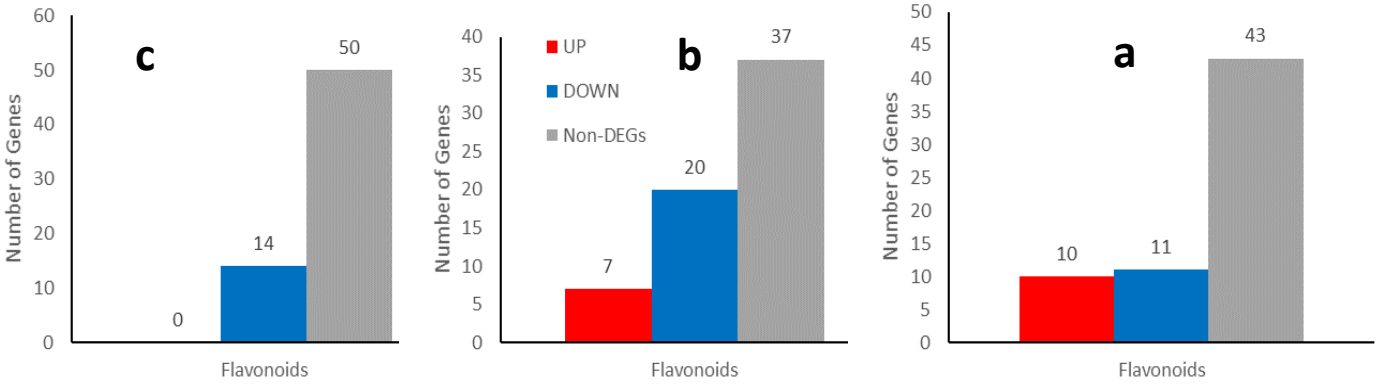
بررسی بیان چهار ژن *CYP98A3*، *ACT*، *SAT* و *BEAT* حاصل از خروجی RNA-seq و همین طور نتایج Real-time RT-PCR نیز نشان داد که الگوی تغییرات بیان ژن در این روش نیز در سه ژن *CYP98A3*، *ACT* و *BEAT* منطبق با نتایج تجزیه و تحلیل RNA-seq می‌باشد؛ اما نتایج حاصل از بررسی بیان ژن *SAT* نشان داد که بر خلاف نتایج حاصل از RNA-seq، در نمونه‌های زیستی این تحقیق از افزایش بیان برخوردار بود (شکل ۳–ج).

در پژوهشی مشابه، در سه مرحله نموی سیب‌زمینی، به منظور بررسی میزان تغییرات نسبی ژن‌های *StABC transporter* در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی، Real time PCR جهت ارزیابی بیان ژن استفاده شد (Pourfarid *etal*., 2021).

در مطالعاتی که تاکنون صورت گرفته به بیوسنتز فلاونوئید در غده سیب‌زمینی در پوست و گوشت غده اشاره کرده‌اند و در سیب زمینی دیپلوئید، سه جایگاه ژنی کلاسیک برای کنترل تجمع فلاونوئید پوست غده شناخته شده‌است (Stushnoff *et al*., 2010). آنزیم *SAT* در بیوسنتز مونوترپنوئیدی و فلاونوئید نقش دارد. این آنزیم در گیاه گلابی در پاسخ به تنش خشکی کاهش بیان نشان می‌دهد (Yang *et al*., 2022) اما در پژوهشی افزایش بیان ژن‌های درگیر در سنتز *Salutaridine reductase* را تحت تنش خشکی به‌طور خاص در بافت برگ *Chrysopogon zizanioides* گزارش کردند (Ziegler *et al*., *2009*). مطالعات نشان می‌دهد که *ACT* در گروه ژن‌های درگیر در بیوسنتز فلاونوئید در گیاه فلفل قرار دارد (Morales Merida *et al*., 2021).

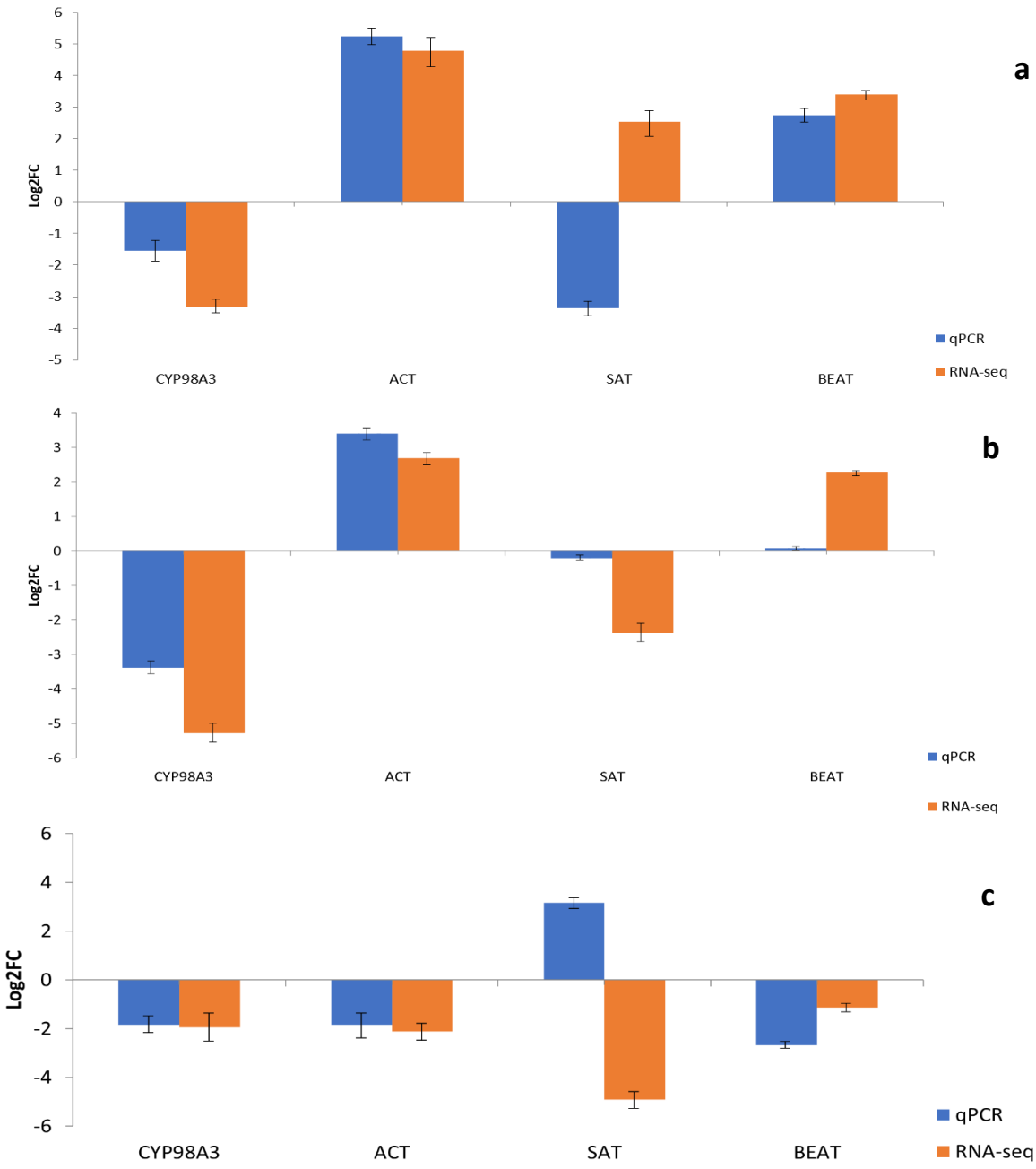
تحقیقات زیادی برای بررسی تغییرات بیان خانواده‌های ژنی درگیر در سنتز فلاونوئیدها، طی مراحل مختلف نموی یا شرایط محیطی متفاوت در گیاهانی چون انگور (Koyama *et al*., 2018)، مرکبات (Zhao *et al*., 2021)، برنج (Ling *et al*., 2021) و توت‌فرنگی (Wu *et al*., 2022) انجام شده است.

در گیاه سیب‌زمینی نیز تغییرات فعالیت آنزیم *flavonoid 3'5' hydroxylase* با میزان سنتز فلاونوئید در ارتباط است (Jung *et al*., 2005). بررسی و سنجش میزان فلاونوئیدها نشان داد که در مراحل مختلف نموی غده به ترتیب میانگین فلاونوئید کل ١/٩، ٧/٢ و ٢٤/٨ میلی‌گرم در گرم وزن تر غده بود (شکل ٤).



شکل ۲– تجزیه و تحلیل بیان ژن‌های درگیر در مسیر بیوسنتز فلاونوئید طی مراحل نموی غده سیب‌زمینی. تعداد ژن‌های افتراقی (DEGs) در (a) مرحله نوک قلاب مانند نسبت به مرحله کلاهک متورم؛ (b) مرحله نوک قلاب مانند نسبت به مرحله شروع غده‌دهی و (c) مرحله کلاهک متورم نسبت به مرحله شروع غده‌دهی

Fig 2. Gene expression analyses of genes involved in the flavonoid biosynthesis pathway during potato tuberization. number of differentially expressed genes (DEGs) in potato tuber (a) Hook-like tip stage vs. Swollen cap stage; (b) Hook-like tip stage vs. Beginning of tuberization stage and (c) Swollen cap stage vs. Beginning of tuberization stage.



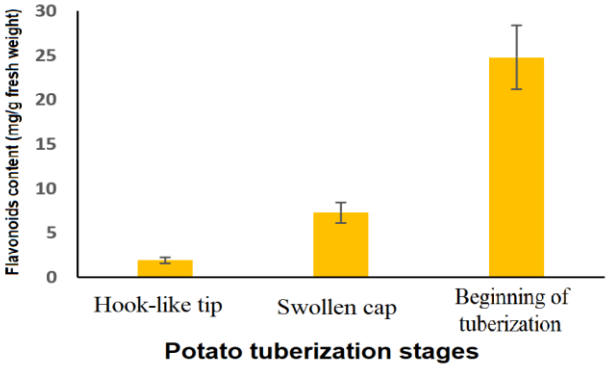
شکل ۳- بیان ژن های کاندید با استفاده از RNA-Seq و qRT-PCR. (الف) مرحله نوک قلاب مانند نسبت به مرحله کلاهک متورم؛ (ب) مرحله نوک قلاب مانند نسبت به مرحله شروع غده‌دهی و (ج) مرحله کلاهک متورم نسبت به مرحله شروع غده‌دهی. نوارهای خطا، نشان دهنده ±SD می باشد.

Fig 3. Comparison of candidate genes expression levels using RNA-Seq and qRT-PCR analysis. (a) Hook-like tip stage vs. Swollen cap stage; (b) Hook-like tip stage vs. Beginning of tuberization stage and (c) Swollen cap stage vs. Beginning of tuberization stage. Error bars indicate ±SD.

در بیشتر پژوهش‌ها، غلظت فلاونوئیدها در محیط رشد وتحت شرایط آزمایشگاهی نیمه استریل اندازه‌گیری کرده‌اند که در حد نانو تا میکرومولار بوده‌اند (Cesco *et al.*, 2010). اگرچه میانگین وزن غده برای هر بوته برداشت شده در طول فصل افزایش می‌یابد، اما با توجه به اینکه شروع تشکیل غده‌های جدید در یک دوره دو ماهه انجام می‌شود، بنابراین طیفی از اندازه‌های مختلف غده در هر برداشت یافت شد که غلظت آنتوسیانین، فلاونوئید و اسید فنولیک در طول رشد غده‌ها با تاریخ برداشت غده‌ها (یعنی سن گیاه) ارتباطی نداشت. با این حال، غلظت آنتوسیانین‌ها، فلاونوئیدها و اسیدهای فنولیک بیشتر با اندازه غده (به جای تاریخ نمونه‌برداری یا سن گیاه) مرتبط بود. با افزایش وزن غده،

غلظت آنتوسیانین‌ها، فلاونوئیدها و اسیدهای فنولیک از هر گرم در هر گیاه افزایش یافت (Lewis *et al.*, 1999).

همچنین، محتوای فنل، فلاونوئید و اسید فنلی فعالیت فنیل‌آلانین آمونیالیاز (*PAL*) و تیروزین آمینوترانسفراز (*TAT*) به روش اسپکتروفتومتری و رزمارینیک اسید سنتاز (*RAS*) را با HPLC اندازه‌گیری نمودند. بیان نسبی ژن‌های ذکرشده، با روش RT-PCR کمّی نیز بررسی شد که نتایج حکایت از افزایش معنی‌دار ($p \leq ۰/۰۵$) محتوای انواع ترکیبات فنلی و فعالیت آنزیم/ژن‌های *TAT* و *RAS* همراه با افزایش سن داشت. در مرحله ۲٤ برگی، مقدار کل فنل، فلاونوئید و اسید فنلی به‌ترتیب ۳/٤۷، ۲/۸۰ و ۷/۷۸ برابر مرحله ۸ برگی بود (Nematshahi *et al.*, 2020).



شکل ٤- تجزیه و تحلیل محتوای فلاونوئید طی مراحل نوک قلاب مانند، کلاهک متورم و مرحله شروع غده‌دهی سیب‌زمینی.

Fig 4. Analysis of flavonoids content during the hook-like tip, swollen cap and the beginning stage of potato tuberization.

ترکیبات فنولی از مهم‌ترین متابولیت‌های ثانویه در گیاهان هستند که بیوسنتز آن‌ها در اکثر بافت‌های گیاهی، از طریق دو مسیر اسید شیکمیک و استات–موالونات تحت تاثیر مرحله نموی گیاه و فاکتورهای بیرونی انجام می‌گیرد، فلاونوئیدها و سایر ترکیبات فنلی انتشار وسیعی در گیاهان دارند و فعالیت زیستی متنوع این ترکیبات از جمله تأثیرات آنتی‌اکسیدان و ضد میکروبی آنها در بسیاری از بررسی‌ها گزارش شده است، اما محتوی آنها در مراحل رشد گیاه متفاوت می‌باشد. تولید متابولیت‌های ثانویه درگیاهان تحت تأثیر عوامل محیطی و ژنی قرار دارد. به نظر می‌رسد که تأثیر عوامل ژنتیکی قوی‌تر از عوامل محیطی باشد (Martz *et al.*, 2010). در گیاهان مختلف مسیر بیوسنتز فلاونوئیدها تحت تأثیر دو سیستم آنزیمی مستقل، فلاون سنتاز۱ (*Flavone synthase I*) و فلاون سنتاز۲ (*Flavone synthase II*) است که به‌طور هم‌زمان در یک گیاه یافت نمی‌شوند. فلاون سنتاز۱ یک دی-اکسیژناز محلول است که اولین بار در سال ۱۹۸۱ در گیاه جعفری از خانواده چتریان گزارش شد و برای اولین بار این آنزیم در خارج از خانواده چتریان در برنج از خانواده گرامینه گزارش شد (Yang *et al.*, 2022).

تغییرات میزان فلاونوئید در مراحل رشد نموی سایر گیاهان مانند سیب‌زمینی شیرین (Krochmal Marczak *et al.*, 2020) عروسک پشت پرده (Hernández Pacheco *et al.*, 2022) گزارش شده است. مطالعات نشان می‌دهند که میزان این تغییرات در اندام‌های مختلف یک گیاه یکسان نیست. به‌طور مثال، در تحقیقی بیش‌ترین میزان فلاونوئید و فلاونول در هر چهار مرحله نموی نیشکر، به‌طور معنی‌داری در برگ‌ها مشاهده شد. علت تفاوت میزان این ترکیبات در سطح اندام‌های مختلف را می‌توان به وجود تفاوت در میزان بیان ژن در بافت‌های مختلف و ویژگی‌های شیمیایی و بیوشیمیایی این ترکیبات نسبت داد (Hashemi *et al.*, 2015). در پژوهشی مشابه، بیان ۱۳ ژن درگیر در بیوسنتز پلی فنل‌ها در غده‌های سیب‌زمینی را با استفاده از RT-PCR مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این مطالعه نشان داد که تغییرات بیان هشت ژن با یکدیگر هماهنگ بودند (Arasteh *et al.*, 2013).

به‌طورکلی نتایج نشان داد که در مجموع ٦۲ DEG در مسیر بیوسنتز فلاونوئیید نقش داشتند که در این میان، مرحله۱ به سه با تعداد ۲۷ ژن افتراقی بیش‌ترین تعداد این ژن‌ها را دارا می‌باشد؛ چهار ژن *CYP98A3*، *ACT*، *SAT* و *BEAT* از جمله ژن‌های درگیر در بیوسنتز فلاونوئید هستند که در جریان مراحل غده‌زایی بیان آنها تغییر می‌کند. به نحوی که *CYP98A3* در هر سه مرحله کاهش بیان نشان داد و سه ژن دیگر در مراحل مختلف کاهش و گاهی افزایش بیان را نشان دادند. همچنین نتایج این مطالعه حاکی از آن است که با افزایش سن غده، میزان فلاونوئید افزایش می‌یابند.

منابع

Abeysinghe D, Li X, Sun C, Zhang W, Zhou C, Chen K. 2007. Bioactive compounds and antioxidant capacities in different edible tissues of citrus fruit of four species. Food Chemistry, 104 (4): 1338-1344.

Andrews S. 2010. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Available online. Retrieved May, 17, 2018.

Apte A, Singh S. 2007. AlleleID. PCR Primer Design, 329-345.

Arasteh Far A, Riyahi Madvar A, Tohidfar M, Yousefi K. 2013. Investigation of the effects of yeast extract on isoflavone synthase gene expression and some biochemical parameters in Glycine max seedlings. Agricultural Biotechnology Journal, 5(3): 1-18. (In Farsi with English Abstact).

Bolger AM, Lohse M, Usadel B. 2014. Trimmomatic :a flexible trimmer for Illumina sequence data. Bioinformatics, 30(15): 2114-2120.

Burgos G, Auqui S, Amoros W, Salas E, Bonierbale M. 2009. Ascorbic acid concentration of native Andean potato varieties as affected by environment, cooking and storage. Journal of Food Composition and Analysis, 22(6): 533-538.

Cesco S, Neumann G, Tomasi N, Pinton R, Weisskopf L. 2010. Release of plant-borne flavonoids into the rhizosphere and their role in plant nutrition. Plant and Soil, 329: 1–25.

Chang C, Yang, MH, Wen HM, Chern JC. 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. Journal of Food and Drug Analysis, 10(3): 3**.**

Chawla R, Shakya R, Rommens. CM. 2012 . Tuber-specific silencing of asparagine synthetase-1 reduces the acrylamide-forming potential of potatoes grown in the field without affecting tuber shape and yield. Plant Biotechnology Jjournal, 10(8): 913-924.

Chun OK, Kim DO, Smith N, Schroeder D, Han JT, Lee CY. 2005. Daily consumption of phenolics and total antioxidant capacity from fruit and vegetables in the American diet. Journal of the Science of Food and Agriculture, 85(10): 1715-1724.

Frontuto D, Carullo D, Harrison S, Brunton N, Ferrari G, Lyng J, Pataro G. 2019. Optimization of pulsed electric fields-assisted extraction of polyphenols from potato peels using response surface methodology. Food and Bioprocess Technology, 12(10): 1708-1720.

Hashemi tabar M, Shomeili M, Kolahi M, Tabandeh MR. 2015. A study of some biochemistry changes of phenylpropanoid pathway in sugarcane (Saccharum officinarum) organs during developmental stages. Iranian Journal of Plant Biology, 7(25): 53-68.

HernándezPacheco CE, Almaraz Abarca N, Rojas López M, Torres-Ricario R, Ávila Reyes J. A, González Valdez LS, Uribe Soto JN. 2022. Salinity generates varying chemical and biochemical responses in Physalis ixocarpa (Solanaceae) during different times of exposure. Electronic Journal of Biotechnology, 59: 25-35.

Jung CS, Griffiths HM, De Jong DM, Cheng S, Bodis M, De Jong WS. 2005. The potato P locus codes for flavonoid 3′, 5′-hydroxylase. Theoretical and Applied Genetics, 110(2): 269-275.

Klimczak I, Małecka M, Szlachta M, Gliszczyńska-Świgło A. 2007. Effect of storage on the content of polyphenols, vitamin C and the antioxidant activity of orange juices. Journal of Food Composition and Analysis, 20(3-4): 313-322.

Koyama R, Roberto SR, De Souza RT, Borges WF, Anderson M, Waterhouse AL, Blanco Ulate, B. 2018. Exogenous abscisic acid promotes anthocyanin biosynthesis and increased expression of flavonoid synthesis genes in Vitis vinifera × Vitis labrusca table grapes in a subtropical region. Frontiers in Plant Science, 9: 323.

Krochmal Marczak B, Cebulak T, Kapusta I, Oszmiański J, Kaszuba J, Żurek N. 2020. The content of phenolic acids and flavonols in the leaves of nine varieties of sweet potatoes (Ipomoea batatas L.) depending on their development, grown in Central Europe. Molecules, 25(15): 3473.

Langmead B, Salzberg SL. 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. Nature methods, 9(4): 357-359 .

Lewis CE, Walker JR, Lancaster JE. 1999. Changes in anthocyanin, flavonoid and phenolic acid concentrations during development and storage of coloured potato (Solanum tuberosum L) tubers. Journal of the Science of Food and Agriculture, 79(2): 311-316.

Ling QL, Feng YX, Lu CJ, Lin YJ, Yu XZ. 2021. Genetic variation and gene expression of anthocyanin synthesis and transport related enzymes in Oryza sativa against thiocyanate. Plant Physiology and Biochemistry, 160: 18-26.

Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $^{2-\Delta\Delta CT}$ method. Methods, 25(4): 402-408.

Lu T, Lu G, Fan D, Zhu C, Li W, Zhao Q, Li W. 2010. Function annotation of the rice transcriptome at single-nucleotide resolution by RNA-seq. Genome Research, 20(9): 1249-1238.

Martin M. 2011. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. EMBnet Journal, 17(1), 10-12. doi:10.14806/ej.17.1.200

Martz F, Jaakola L, JulkunenTiitto R, Stark S. 2010. Phenolic composition and antioxidant capacity of bilberry (Vaccinium myrtillus) leaves in Northern Europe following foliar development and along environmental gradients. Journal of Chemical Ecology, 36(9): 1017-1028.

McGill CR, Kurilich AC, Davignon J. 2013. The role of potatoes and potato components in cardiometabolic health: a review. Annals of Medicine, 45(7): 467-473.

Mishra T, Raigond P, Thakur N, Dutt S, Singh B. 2020. Recent updates on healthy phytoconstituents in potato: a nutritional depository. Potato Research, 63(3): 323-343.

Morales Merida BE, Villicaña C, PeralesTorres AL, Martínez Montoya H, Castillo Ruiz O, León Chan RLeónFélix J. 2021. Transcriptomic Analysis in Response to Combined Stress by UV-B Radiation and Cold in Belle Pepper (*Capsicum annuum*). International Journal of Agriculture And Biology, 25: 1-12.

Nassar AM, Sabally K, Kubow S, Leclerc YN, Donnelly DJ. 2012. Some Canadian-grown potato cultivars contribute to a substantial content of essential dietary minerals. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 60(18): 4688-4696.

Navarre DA, Payyavula RS, Shakya R, Knowles NR, Pillai SS. 2013. Changes in potato phenylpropanoid metabolism during tuber development. Plant Physiology and Biochemistry, 65: 89-101.

Nematshahi N, Abrishamchi P, Radjabian T, Salami SA. 2020. Effects of phenology on the activity and gene expression of phenolic acid -biosynthetic enzymes in Salvia leriifolia Benth. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research, 36(5): 801-821. doi:10.22092/ijmapr.2020.342283.2745.

Pazhouhandeh M, Karvan G, Razavi A S, Tabriz I. 2017. A review on potato genetic engineering researches yet. Genetic Engineering and Biosafety Journal, 6(1): 175-188.

Pietta P, Minoggio M, Bramati L. 2003. Plant polyphenols: Structure, occurrence and bioactivity. Studies in Natural Products Chemistry, 28: 257-312.

Pourfarid B, Sorkheh K, Martinez-Gomez P. 2021. Identification of ABC-Transporter gene family and analysis of gene co-expression network pattern in different stages of potato stolone development in response to drought and salinity stress. Genetic Engineering and Biosafety Journal, 10(1): 23-46.

Reyes L, Miller J, Cisneros Zevallos L. 2004 .Environmental conditions influence the content and yield of anthocyanins and total phenolics in purple- and red-flesh potatoes during tuber development. American Journal of Potato Research, 81(3): 187-193.

Shirani Bidabadi M, Nazarian Firouzabadi F, Sorkheh K, Ismaili A. 2020. Gene set enrichment analysis in potato tubers (Solanum tuberosum L.) during developmental stages. Crop Biotechnology, 9(29): 39-51. (In Farsi with English Abstact).

Song L, Florea L. 2015. Rcorrector: efficient and accurate error correction for Illumina RNA-seq reads. GigaScience, 4(48). https://doi.org/10.1186/s13742-015-0089-y

Stushnoff C, Ducreux LJ, Hancock RD, Hedley PE, Holm DG, McDougall GJ, Sungurtas JA. 2010. Flavonoid profiling and transcriptome analysis reveals new gene–metabolite correlations in tubers of Solanum tuberosum L. Journal of Experimental Botany, 61(4): 1225-1238.

Trapnell C, Pachter L, Salzberg SL. 2009. TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. Bioinformatics, 25(9): 1105-1111.

Wu Y, Zhang C, Huang Z, Lyu L, Li W, Wu W. 2022. Integrative analysis of the metabolome and transcriptome provides insights into the mechanisms of flavonoid biosynthesis in blackberry. Food Research International, 153: 110948.

Yang K, Han H, Li Y, Ye J, Xu F. 2022. Significance of miRNA in enhancement of flavonoid biosynthesis. Plant Biology, 24(2): 217-226.

Zhao C, Liu X, Gong Q, Cao J, Shen W, Yin X, Li X. 2021. Three AP2/ERF family members modulate flavonoid synthesis by regulating type IV chalcone isomerase in citrus. Plant Biotechnology Journal, 19(4): 671-688 .

Z**iegler J, Brandt W, Geißler R, Facchini, PJ. 2009**. Removal of substrate inhibition and increase in maximal velocity in the short chain dehydrogenase/reductase salutaridine reductase involved in morphine biosynthesis. Journal of Biological Chemistry, 284(39): 26758-26767.