

چکیده

واژه‌های کلیدی

بیان ژن،

توالی‌یابی،

سیب‌زمینی،

فلاونوئید،

مسیرهای متابولیکی

شناسایی و بررسی بیان ژن‌های 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 Siahmansour¹, Farhad Nazarian-Firouzabadi^{2*}, Ahmad Ismaili², Seyed
Sajad Sohrabi³

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.

*Corresponding Author, Email : پست الکترونیکی : nazarian.f@lu.ac.ir

nazarian.f@lu.ac.ir

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

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 نمو مختلف از شروع تشکیل استولون تا تشکیل غده گردآوری و تجزیه و تحلیل شدند. به منظور اعتبارسنجی بیان ژن‌های شناسایی شده درگیر در مسیر بیوسنتز فلاونوئیدها در غده سیب‌زمینی (۶۲ 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 ۱۴ ژن از کاهش بیان معنی‌داری برخوردار بودند. در مجموع ۴ ژن کلیدی *ACT*، *CYP98A3*، *SAT* و *BEAT* با تغییرات معنی‌دار در بین مراحل نمو غده سیب‌زمینی شناسایی شدند. بررسی میزان فلاونوئید در مراحل نمو سه‌گانه نیز نشان داد که میزان فلاونوئید در طی مرحله نمو، به طرز قابل توجهی افزایش می‌یابد، به طوری که میانگین محتوای فلاونوئید در مراحل ذکر شده به ترتیب به مقادیر ۱/۹، ۷/۲ و ۲۴/۸ میلی‌گرم در گرم وزن تر رسید. از آنجاییکه ژن‌های *ACT*، *CYP98A3*، *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.

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

سیب زمینی 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 می شود (Mishra, *et al.*, 2020). سیب زمینی با تولید جهانی بیش از ۳۵۹ میلیون تن یکی از غذاهای اصلی رژیم غذایی انسان محسوب می شود (Frontuto *et al.*, 2019). همچنین، اهمیت اقتصادی زیادی برای تأمین انرژی از نظر مواد غذایی و صنعتی دارد و سال ۲۰۰۸ به نام سال جهانی سیب زمینی نام گذاری شده بود و همواره مورد توجه پژوهشگران بوده است و یافته های علمی آن در سایر گیاهان نیز مورد استفاده قرار می گیرد (Pazhouhandeh *et al.*, 2017).

از منظر تغذیه، سیب زمینی منبع غنی از پروتئین ها، مواد معدنی، منیزیم، کلسیم، سدیم، منگنز، پتاسیم و فسفر (Mishra *et al.*, 2012; Nassar *et al.*, 2020) و ویتامین های خانواده B (B1، B2، B3، B5، B6 و B9)، C، E و K می باشد. غلظت ویتامین ها در قسمت گوشتی غده بیشتر از پوست غده سیب زمینی 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 سیب زمینی با محتوای پروتئین غلات (مانند گندم و برنج) قابل مقایسه است، اما از نظر تغذیه ای، پروتئین سیب زمینی مشابه پروتئین تخم مرغ کامل است (McGill *et al.*, 2013; Mishra *et al.*, 2020). از نظر نیاز روزانه انسان به ویتامین C، سیب زمینی منبع مهمی در تأمین ویتامین C لازم برای سلامت انسان است (Burgos *et al.*, 2009).

در میان ترکیبات مختلف گیاهی، پلی فنول ها گروهی از ترکیبات دارای فعالیت زیستی آنتی اکسیدانی در گیاهان هستند که بیش از ۸۰۰۰ نوع از آن ها تاکنون شناسایی شده است. فلاونوئیدها، یکی از مهم ترین انواع پلی فنول ها هستند (Pietta *et al.*, 2003) که از ترکیبات زیست فعال محسوب شده و جزء متابولیت های ثانویه گیاهی به شمار می آیند (Klimczak *et al.*, 2007). فلاونوئیدها تأثیر شگرفی در سلامت انسان و جانوران دارند که از این میان می توان به اثراتی مانند کاهش کلسترول، کاهش فشارخون، کاهش خطر

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 ۴ درصد استریل شد سپس، در گلدان حاوی خاک شنی استریل شده با فرمالین با عمق ۳۰ سانتی‌متر کشت شده و به مدت ۴ هفته در گلخانه دانشکده کشاورزی دانشگاه لرستان، با دمای 24 ± 2 درجه سانتی‌گراد و تحت دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. تشخیص مراحل نمو، 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 نمو شامل: (۱) نوک قلاب مانند، (۲) کلاهک متورم و (۳) شروع غده‌دهی (شکل ۱) صورت گرفت (ShiraniBidabadi et al., 2020). از هر مرحله نمو سه نمونه از ۵ گلدان متفاوت برداشت و نمونه‌ها به سرعت در نیتروژن مایع قرار داده شدند و سپس به فریزر -80°C درجه سانتی‌گراد 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 ۴۸ 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 ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. در ادامه به 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 ۴۱۵ نانومتر نسبت به بلانک خوانش شد. از ماده کوئرستین در غلظت‌های مختلف (صفر، ۳۱/۲۵، ۶۲/۵، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰

ابتلا به بیماری‌های قلبی، ضدموتاژن، ضدسرطان، تنظیم‌کننده سیستم ایمنی و ضدالتهاب اشاره کرد (Abeyasinghe 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 اصلاً وجود ندارد. در جریان مراحل نمو غده سیب‌زمینی، ژن‌های متعددی از یک مرحله به مرحله بعدی افزایش یا کاهش بیان نشان می‌دهند (Lu et al., 2010). پژوهش‌ها نشان می‌دهند که متابولیسم فنیل‌پروپانویید 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 فنیل‌پروپانویید 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

هر ژن با معیارهای تعداد خوانش، FPKM و TPM مشخص شد. ژن های با بیان افتراقی (DEGs Differential expressed genes: $(\log_2FC \geq |1|)$ و $FDR < 0.01$) در دوره های مختلف نمو غده، با استفاده از نرم افزار edgeR تعیین شدند (Trapnell et al., 2009).

شناسایی و بررسی بیان ژن های مسیر سنتز فلاونوئیدها: پس از شناسایی ژن های این مسیر، بیان نسبی هر کدام از ژن ها در آزمایش RNA-seq در دوره های نمو غده سیب زمینی تعیین و از میان آن ها ژن های نامزد به گونه ای انتخاب شدند که در سه دوره نمو دارای بیشترین افتراق بیان بودند.

بیان ژن های به دست آمده از تحلیل RNA-Seq، با بررسی بیان نسبی برخی از مهم ترین ژن های کدکننده آنزیم در مسیرهای تولید متابولیت های مورد نظر که با استفاده از تحلیل 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. ژن های کاندید شامل چهار ژن *cytochrome P450 98A3-like* (*CYP98A3*)، *coumaroyltransferase-2-like* (*ACT*)، *salutaridinol 7-O-acetyltransferase-like* (*SAT*) و *acetyltransferase-like* (*BEAT*) بودند که به ترتیب در مسیر سنتز فلاونوئید نقش داشتند. طراحی جفت آغازگرهای اختصاصی برای هریک از ژن های کاندید با استفاده از نرم افزار AlleleID (v6.0) (Apte and Singh, 2007) صورت گرفت (جدول ۱).

جدول ۱- توالی آغازگرهای ژن های کاندید درگیر در بیوسنتز فلاونوئید در طی نمو غده سیب زمینی

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)
<i>CYP98A3</i>	F GCACCCTCCAACCTCCCTAATG	60.1	118
	R ATCAGGACCTAACGCCCACAC	60.05	
<i>ACT</i>	F GCGGGCTAAGTGGATTGAGTC	61.57	158
	R GTGTGGCAGAGGTTCTGTAGTAG	60.86	
<i>SAT</i>	F GCTGAAATGGTTGCGAGGAG	59.55	183
	R GCTCAATAAACAAGGTCTCAAACG	58.85	
<i>BEAT</i>	F TTAAACACATCTTTACCCTTTAGC	55.37	196
	R ATTCGTCTCGTCCACATCC	56.96	
<i>elf-1</i>	F GTCACACTTCCCACATTGCT	58.39	112
	R CCAGCATCACCGTTCTTCAA	58.48	

و ۲۰۰۰ میلی گرم در لیتر) استفاده و منحنی استاندارد در محیط نرم افزار Excel رسم شد، سپس معادله خط $y = ax + b$ به دست آمد. آزمایش ها ۳ بار تکرار و میانگین آن ها گزارش شد (Chang et al., 2002).

جمع آوری، کنترل کیفیت و پردازش داده های حاصل از توالی یابی RNA: به منظور شناسایی و بررسی بیان ژن های درگیر در مسیرهای بیوسنتزی فلاونوئیدها، مجموعه داده های حاصل از توالی یابی RNA غده سیب زمینی در سه مرحله نمو مختلف، از پایگاه داده NCBI، بخش SRA با کد دسترسی PRJNA530118 گردآوری شدند (Shirani-Bidabadi et al., 2020). کیفیت اولیه مجموعه خوانش های خام با استفاده از ابزار FastQC (v0.11.6) (Andrews, 2010) مورد ارزیابی قرار گرفت. خطاهای حاصل از توالی یابی ناقص و همچنین توالی های آداپتور از خوانش های کوتاه به ترتیب با استفاده از نرم افزارهای RCorrector (Song and Florea, 2015) و Cutadapt (Martin, 2011) حذف شدند. در آخرین مرحله از پردازش داده ها، خوانش های با کیفیت پایین (Phred quality score ≥ 30) با استفاده از نرم افزار (v0.27) Trimmomatic حذف شدند (Bolger et al., 2014).

نقشه یابی و تعیین ژن های با بیان افتراقی: خوانش های با کیفیت بالا (Clean reads) در هر نمونه با استفاده از ابزار Bowtie2 (Langmead and Salzberg, 2012) در مقابل ژنوم مرجع سیب زمینی نقشه یابی شدند. سپس خوانش های نقشه یابی شده در هر نمونه توسط مجموعه نرم افزاری RSEM نرمال سازی و کمیت بیان

پس از آن *CYP98A3* با $\text{Log}_2\text{FC} = 3/2$ و در نهایت ژن *SAT* با $\text{Log}_2\text{FC} = 2/5$ بود (شکل ۲-الف).

در این مقایسه، ۱۱ توالی ژنی درگیر در مسیر سنتز فلاونوئیدها نیز کاهش بیان نشان دادند که بالاترین میزان، با $\text{Log}_2\text{FC} = -4/5$ مربوط به ژن *cytochrome P450 98A2-like* بود و پس از آن ژن *flavanone 3 beta-hydroxylase* قرار داشت که کاهش بیان آن $\text{Log}_2\text{FC} = -4/3$ بود (شکل ۲-الف).

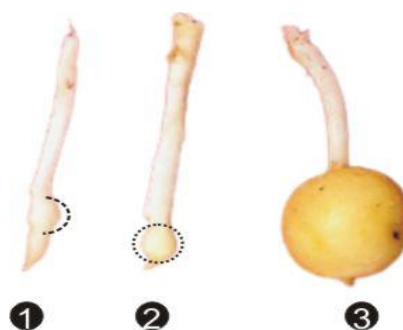
در پژوهش حاضر بعد از بررسی داده‌ها، چهار ژن *CYP98A3*، *ACT*، *SAT* و *BEAT* شناسایی شد؛ مقایسه میزان بیان نسبی و اعتبار سنجی حاصل از خروجی *RNA-seq* و *Real-time RT-PCR* حاکی از این بود که بیان سه ژن *CYP98A3*، *ACT* و *BEAT* منطبق با نتایج تجزیه و تحلیل *RNA-seq* این ژن‌ها می‌باشد؛ اما نتایج بررسی 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 $\text{Log}_2\text{FC} = 7/8$ ، سپس ژن *chalcone synthase J-like* با $\text{Log}_2\text{FC} = 3/2$ بعد از آن ژن *ACT* و همچنین ژن *pelargonidin 3-O-6-caffeoylglucoside 5-O-6-O-malonylglucoside* با $\text{Log}_2\text{FC} = 2/6$ 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 $\text{Log}_2\text{FC} = -7/8$ مربوط به ژن *AOMT3; flavonoid 3',5'-methyltransferase-like* بود و بعد از آن ژن‌های *cytochrome P450 98A3-like* با $\text{Log}_2\text{FC} = -5/2$ و *probable chalcone-flavonone isomerase 3* با $\text{Log}_2\text{FC} = -4/9$ مقادیر کاهشی و $\text{Log}_2\text{FC} = -4/9$ 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

برای تهیه کتابخانه *cDNA* از تمامی نمونه‌ها (سه تکرار در هر سه مرحله نمو) با استفاده از کیت *RNX plus* (شرکت سینژان) استخراج *RNA* صورت گرفت. پس از تأیید کیفیت و کمیت *RNA* استخراجی و هم غلظت‌سازی *RNA* در همه نمونه‌ها از کیت تجاری سنتز *cDNA* (شرکت سینژان) 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 ۴۳۰ *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 $\text{Log}_2\text{FC} = 4/7$ ، سپس *BEAT* با $\text{Log}_2\text{FC} = 4/2$

فلاونوئید پوست غده شناخته شده است (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 می دهد (Yang et al., 2022) اما در پژوهشی افزایش بیان ژن های درگیر در سنتز *Salutaridine reductase* را تحت تنش خشکی به طور خاص در بافت برگ *Chrysopogon zizanioides* گزارش کردند (Ziegler et al., 2009). مطالعات نشان می دهد که *ACT* در گروه ژن های درگیر در بیوسنتز فلاونوئید در گیاه لفل قرار دارد (Morales Merida et al., 2021). تحقیقات زیادی برای بررسی تغییرات بیان خانواده های 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 توت فرنگی (Wu et al., 2022) انجام شده است. در گیاه سیب زمینی نیز تغییرات فعالیت آنزیم *3'5' hydroxylase* (Jung et al., 2005) با میزان سنتز فلاونوئید در ارتباط است. بررسی و سنجش میزان فلاونوئیدها نشان داد که در مراحل مختلف نموی غده به ترتیب میانگین فلاونوئید کل ۱/۹، ۷/۲ و ۲۴/۸ میلی گرم در گرم وزن تر غده بود (شکل ۴).

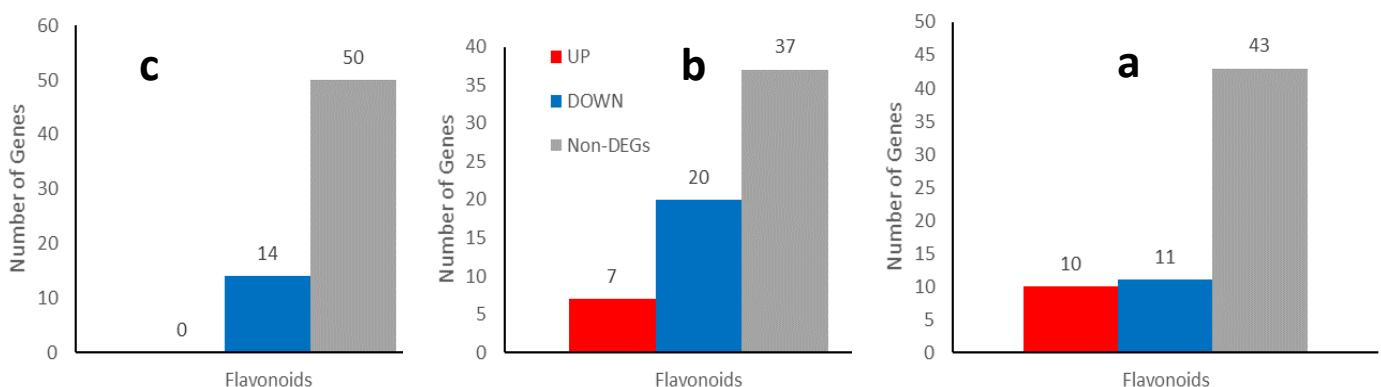
تایید در مورد دو ژن *SAT* و *BEAT* نیز بدست آمد که به ترتیب کاهش و افزایش بیان داشتند (شکل ۳-ب).

در مرحله ۲ نسبت به ۳ نیز مشخص شد که از بین ۶۱۰ شناسایی شده، ۱۴ ژن در مسیر سنتز فلاونوئیدها کاهش بیان معنی دار نشان دادند که پس از بررسی مقادیر بیان نسبی ژن ها، مشخص شد که ژن *SAT* با کاهش $4/9 - \text{Log}_2\text{FC} =$ بعد از آن ژن *BEAT* با کاهش $3/6 - \text{Log}_2\text{FC} =$ سپس ژن *acylsugar acyltransferase 3-like* با $3/4 - \text{Log}_2\text{FC} =$ بالاترین نرخ کاهش معنی دار را نشان دادند (شکل ۳-ج).

بررسی بیان چهار ژن *ACT*، *CYP98A3*، *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 *ACT*، *CYP98A3* و *BEAT* منطبق با نتایج تجزیه و تحلیل *RNA-seq* می باشد؛ اما نتایج حاصل از بررسی بیان ژن *SAT* نشان داد که برخلاف نتایج حاصل از *RNA-seq* در نمونه های زیستی این تحقیق از افزایش بیان برخوردار بود (شکل ۳-ج).

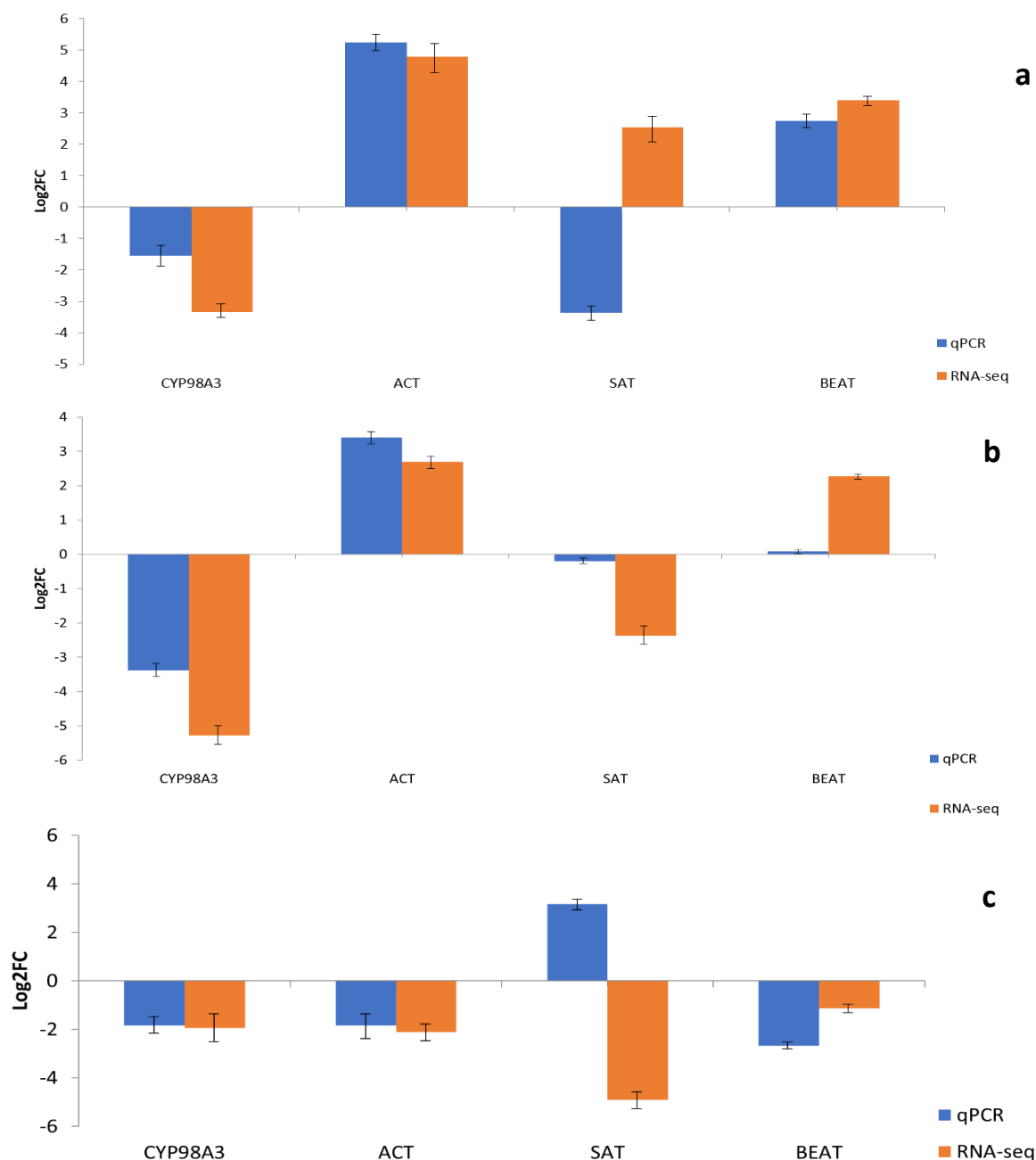
در پژوهشی مشابه، در سه مرحله نموی سیب زمینی، به منظور بررسی میزان تغییرات نسبی ژن های *StABC transporter* در پاسخ به تنش های غیرزیستی، *Real time PCR* جهت ارزیابی بیان ژن استفاده شد (Pourfarid et al., 2021).

در مطالعاتی که تاکنون صورت گرفته به بیوسنتز فلاونوئید در غده سیب زمینی در پوست و گوشت غده اشاره کرده اند و در سیب زمینی دیپلوئید، سه جایگاه ژنی کلاسیک برای کنترل تجمع



شکل ۲- تجزیه و تحلیل بیان ژن های درگیر در مسیر بیوسنتز فلاونوئید طی مراحل نموی غده سیب زمینی. تعداد ژن های افتراقی (DEGs) در (a) مرحله نوک قلاب مانند نسبت به مرحله کلاهک متورم؛ (b) مرحله نوک قلاب مانند نسبت به مرحله شروع غده دهی و (c) مرحله کلاهک متورم نسبت به مرحله شروع غده دهی.

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 ژن‌های 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 $\pm$ SD می‌باشد.

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 $\pm$ SD.

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،

در بیشتر پژوهش‌ها، غلظت فلاونوئیدها در محیط رشد و تحت 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

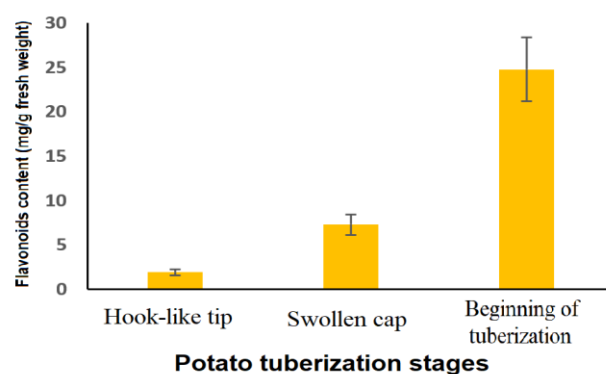
دو سیستم آنزیمی مستقل، فلاون سنتاز ۱ (*Flavone synthase I*) و فلاون سنتاز ۲ (*Flavone synthase II*) است که به طور همزمان در یک گیاه یافت نمی شوند. فلاون سنتاز ۱ یک دی-اکسیژناز محلول است که اولین بار در سال ۱۹۸۱ در گیاه جعفری از خانواده چتریان گزارش شد و برای اولین بار این آنزیم در خارج از خانواده چتریان در برنج از خانواده گرامینه گزارش شد (Yang et al., 2022).

تغییرات میزان فلاونوئید در مراحل رشد نمو سایر گیاهان مانند سیب زمینی شیرین (Krochmal Marczak et al., 2020) عروسک پشت پرده (Hernández Pacheco et al., 2022) گزارش شده است. مطالعات نشان می دهند که میزان این تغییرات در اندام های مختلف یک گیاه یکسان نیست. به طور مثال، در تحقیقی بیشترین میزان فلاونوئید و فلاونول در هر چهار مرحله نمو نیشکر، به طور معنی داری در برگ ها مشاهده شد. علت تفاوت میزان این ترکیبات در سطح اندام های مختلف را می توان به وجود تفاوت در میزان بیان ژن در بافت های مختلف و ویژگی های شیمیایی و بیوشیمیایی این ترکیبات نسبت داد (Hashemi et al., 2015). در پژوهشی مشابه، بیان ۱۳ ژن درگیر در بیوسنتز پلی فنل ها در غده های سیب زمینی 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).

به طور کلی نتایج نشان داد که در مجموع ۶۲ DEG در مسیر بیوسنتز فلاونوئید نقش داشتند که در این میان، مرحله ۱ به سه با تعداد ۲۷ ژن افتراقی بیشترین تعداد این ژن ها را دارا می باشد؛ چهار ژن *CYP98A3*، *ACT*، *SAT* و *BEAT* از جمله ژن های درگیر در بیوسنتز فلاونوئید هستند که در جریان مراحل غده زایی بیان آنها تغییر می کند. 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 می یابند.

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

همچنین، محتوای فنل، فلاونوئید و اسید فنلی فعالیت فنیل آلانین آمونیلایز (*PAL*) و تیروزین آمینوترانسفراز (*TAT*) به روش اسپکتروفتومتری و رزمارینیک اسید سنتاز (*RAS*) را با HPLC اندازه گیری نمودند. بیان نسبی ژن های ذکر شده، با روش RT-PCR کمی نیز بررسی شد که نتایج حکایت از افزایش معنی دار محتوای انواع ترکیبات فنلی و فعالیت آنزیم/ژن های *TAT* و *RAS* همراه با افزایش سن داشت. در مرحله ۲۴ برگی، مقدار کل فنل، فلاونوئید و اسید فنلی به ترتیب ۳/۴۷، ۲/۸۰ و ۷/۷۸ برابر مرحله ۸ برگی بود (Nematshahi et al., 2020).



شکل ۴- تجزیه و تحلیل محتوای فلاونوئید طی مراحل نوک قلاب مانند، کلاهک متورم و مرحله شروع غده دهی سیب زمینی.

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

ترکیبات فنولی از مهم ترین متابولیت های ثانویه در گیاهان هستند که بیوسنتز آنها در اکثر بافت های گیاهی، از طریق دو مسیر اسید شیکمیک و استات-موالونات تحت تاثیر مرحله نمو گیاه و فاکتورهای بیرونی انجام می گیرد، فلاونوئیدها و سایر ترکیبات فنلی انتشار وسیعی در گیاهان دارند و فعالیت زیستی متنوع این ترکیبات از جمله تأثیرات آنتی اکسیدان و ضد میکروبی آنها در بسیاری از بررسی ها گزارش شده است، اما محتوای آنها در مراحل رشد گیاه متفاوت می باشد. تولید متابولیت های ثانویه در گیاهان تحت تأثیر عوامل محیطی و ژنی قرار دارد. به نظر می رسد که تأثیر عوامل ژنتیکی قوی تر از عوامل محیطی باشد (Martz et al., 2010). در گیاهان مختلف مسیر بیوسنتز فلاونوئیدها تحت تأثیر

منابع

- Abeyasinghe 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 Abstract).
- 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 Journal*, 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, Malecka 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, Julkunen-Tiitto 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 R, LeónFélix 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 Abstract).
- 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 .
- Ziegler 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.