ژنتیک نوین
دوره دهم، شماره ۱، بهار ۱۳۹۴
صفحه ۵۸-۴۷

ردیابی و شناسایی ژن UDP–گلوگز: فلاونوئید ۳– O گلوکوزیل ترانسفراز در مسیر بیوسنتز 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[۱]، بدرالدین ابراهیم سیدطباطبایی*[۱]، احمد ارزانی[۱]

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

Khaksar Gh[1], Seyed Tabatabaei BE*[1], Arzani A[1]

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 -گلوگز: فلاونوئید ۳-O گلوزیل ترانسفراز مسئول تشکیل آنتوسیانین در سلول‌های رنگی بوده و انتقال یک مولکول قند به آنتوسیانیدین را کاتالیز می‌کند. در این تحقیق، cDNA ژن UDP-گلوگز: فلاونوئید ۳-O گلوکوزیل ترانسفراز (*UFGT*)، آخرین آنزیم کلیدی دخیل در رنگ‌آمیزی میوه از پوست میوه انار جدا و توالی‌یابی شد. همچنین، بیان این ژن در سه رقم متمایز انار (پوست سیاه یزد، ملس اصفهان و شیرین شعباد 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 NCBI نظیر انگور و هلو داشت. نتایج نشان داد که بیان ژن *PgUFGT* در مرحله گلدهی در سه رقم نسبتا بالا بوده، اما در مرحله رسیدن میوه در رقم پوست سیاه یزد به حداکثر میزان خود رسید. برخلاف این رقم، بیان ژن *PgUFGT* در همه مراحل رشد میوه به جز گلدهی در رقم شیرین شعباد شیراز در پایین‌ترین 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. به‌طور کلی بیان ژن *PgUFGT* به طور چشمگیری با افزایش رنگ پوست در طول رشد میوه، افزایش یافت. پیش بینی ساختار پروتئین مورد مطالعه نشان داد که پروتئین PgUFGT با ساختار سه بعدی پروتئین UDP–گلوگز: 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

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-18]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.1.5.1]

مقدمه

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 پسندی 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، آنتوسیانیدین و غیره شناسایی شده که بسیاری از آنها در گیاهان عالی وجود دارند (Harbone 1988-1994, Jaakola 2003, Gould et al. 2006.) نوع و میزان ترکیبات فلاونوئیدی در میوه‌های مختلف، تفاوت‌های زیادی دارد که در بیشتر میوه‌ها نوع غالب، آنتوسیانین‌ها می‌باشد (Jaakola 2003)

آنتوسیانین‌ها (Antos برگرفته از کلمه یونانی به‌معنای گل و Kyanos به‌معنای 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 آنتوسیانین 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 آنتوسیانین‌ها در گیاهان شامل سیانیدین، دلفینیدین، پلارگونیدین، مالویدین، پئونیدین و پتونیدین می‌باشد (Konczak 2004; Cristina et al. 2011). کمبود الکترون از خصوصیات عمومی آنتوسیانین‌هاست که سبب فعال‌سازی آنها در واکنش با اکسیژن فعال[1] (ROS) و رادیکال‌های آزاد می‌شود. به این ترتیب خصوصیت آنتی‌اکسیدانی این ترکیبات از ساختار خاص آنها منشا می‌گیرد. آنتوسیانین‌ها دارای اثر مثبت در جلوگیری از رشد بی‌رویه سلول‌های سرطانی و بروز بیماری‌های وریدی قلبی می‌باشند (Jing et al. 2008, Tzin et al. 2010). از سوی دیگر مشخص شده که آنتوسیانین‌ها سبب کاهش تجمع کادمیوم در کلیه و کبد، کاهش غلظت اوره و بیلی‌روبین خون و کاهش فعالیت آسپارتات آمینوترانسفراز و آلانین‌ترانسفراز نیز می‌شوند (Lapidot et al. 1998). همچنین شبیه ترکیبات فلاونوئیدی به‌شدت جاذب نور UV بوده و در مقابل تابش نور UV عموما در سلول‌های اپیدرمی بافت‌های گیاهی تجمع یافته و به‌عنوان سپری در برابر اشعه مضر عمل می‌کنند (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 ganatum*) 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 آنتی‌اکسیدانی قابل ملاحظه انار به سبب محتوای بالای آنتوسیانین‌های پوست و آب میوه آن است. آب انار سرشار از رنگدانه‌های آنتوسیانین 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 آنتی‌اکسیدانی آن را تحت تاثیر قرار می‌دهند. یکی از دلایل ممکن برای تنوع رنگ مشاهده شده در پوست انار، میزان بیان ژن‌های دخیل در بیوسنتز آنتوسیانین متاثر از شرایط متفاوت رشد و محیط می‌باشد. مطالعه‌های متعددی به منظور بررسی بیان ژن‌های مسیر سنتز آنتوسیانین‌ها در گیاهان مختلف نظیر انگور، هلو، بلو بربری، سیب و غیره در شرایط متفاوت رشد انجام شده است. بررسی بیان این ژن‌ها نشان می‌دهد که روند بیان ژن‌های ساختاری با افزایش آنتوسیانین 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 بیوسنتز آنتوسیانین بیان نشده یا میزان بیان بسیار کمی دارند. همچنین مقدار بیان ژن‌های فوق با افزایش نور دارای همبستگی بالا و مثبت می‌باشد و در این راستا

[1] Reactive oxygen species

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-18]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.1.5.1]

تولید آنتوسیانین نیز افزوده می‌شود. در واقع، بیوسنتز و تجمع آنتوسیانین از طریق فرآیندهای درونی در طی تمایززدایی یا فاکتورهای محیطی مثل نور تنظیم می‌شود (Gil et al. 2000, Jaakola et al. 2002, Kim et al. 2003, Ranazzotti et al. 2008).

مسیر بیوسنتز آنتوسیانین‌ها در بسیاری از گیاهان نظیر آرابیدوپسیس، ذرت، انگور، سیب، هلو و بلوبری و غیره شناسایی شده است (شکل۱). آنزیم فنیل‌آلانین لیاز[1] (*PAL*) دارای نقش اساسی و کلیدی در روند سنتز فلاونوئیدها می‌باشد و گزارشات بسیاری همبستگی بیان این ژن و افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی را تایید می‌کند. در طی مسیر، اثر پلیوتروپیک آنزیم سینامیت ۴-هیدروکسیلاز[2] (C4H)، تنظیم الگوی بیان ژن‌های درگیر در سنتز مشتقات فلاونوئیدها را به‌عهده دارد. هماهنگی سنتز مولکول‌های پلی‌فنلی، به‌سبب وجود عناصر *cis* در پروموتر ژن *C4H* می‌باشد و بدین ترتیب از سایر ژن‌ها متمایز می‌شود (Boudet et al. 2007). در ادامه، آنزیم چالکون سینتاز[3] (CHS) محصول حاصل از واکنش آنزیم C4H را در جهت تولید آنتوسیانین هدایت کرده و در بسیاری از گیاهان، نقش مهمی در تنظیم تولید رنگدانه ایفا می‌کند. مرحله بعد دی‌هیدروفلاونول ردوکتاز[4] (DFR) که آنزیم اختصاصی مسیر بیوسنتز آنتوسیانین‌هاست؛ تولید ترکیب بی‌رنگ لئکوسیانیدین را به عهده دارد. سپس آنزیم آنتوسیانین سینتاز[5](ANS)، ماده فوق را به ترکیب رنگی آنتوسیانیدین تبدیل می‌کند. در نهایت با اتصال یک مولکول گلوگز به آنتوسیانیدین توسط آنزیم UDP-گلوگز: فلانوئید ۳-O گلوکوزیل ترانسفراز[6] (UFGT)، ترکیب آنتوسیانین تولید می‌شود (Gil et al. 2000; Jaakola et al. 2002; Kim et al. 2003; Ranazzotti et al. 2008).

پژوهش‌های انجام شده در گیاهان انگور، سیب، توت فرنگی و گیلاس نشان می‌دهد که UDP D-گلوگز: فلاونوئید ۳-O گلوکوزیل ترانسفراز (*UFGT*)، آخرین آنزیم کلیدی دخیل در رنگ‌آمیزی میوه می‌باشد. در گیاه انگور ژن‌های ساختاری درگیر در مسیر بیوسنتز آنتوسیانین، به طور کامل شناسایی و جداسازی شده‌اند. در این مطالعات مشخص شده که براساس مرحله رشد، فقط بیان ژن *UFGT* همواره با رنگ میوه ارتباط دارد. تجزیه و تحلیل بیان ژن *UFGT* در ارقام پوست سفید و قرمز نشان داد که این ژن در هر دو رقم وجود دارد اما در رقم پوست سفید بیان نمی‌شود. همچنین بررسی بیان ژن‌های مسیر بیوسنتز آنتوسیانین در واریته‌های جهش‌یافته سیب پوست سفید نشان می‌دهد که به استثنا ژن *UFGT*، همه ژن‌ها بیان می‌شوند. اما در مقایسه بیان ژن‌های مسیر آنتوسیانین در پرتغال خونی و پرتغال معمولی، افزایش بیان در ژن *UFGT* به همراه ژن‌های *ANS* و *CHS* مشاهده شد. این مطلب دلیل مطابقت سطح بیان ژن‌های هدف و مجتوی رنگدانه‌های اندازه‌گیری شده، می‌باشد. در گیاه لیتچی چینی[7] نیز همبستگی مثبت و بالایی بین بیان ژن های *UFGT* و *DFR* و رنگ قرمز پوست میوه گزارش شده است.

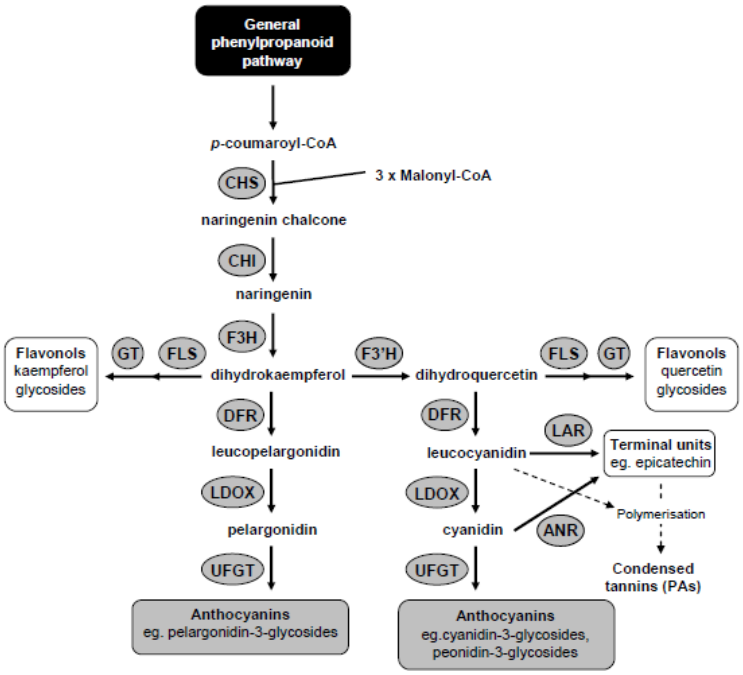
در حال حاضر ایران یکی از بزرگ‌ترین تولید کنندگان انار در دنیاست و دارای بیش از ۷۶۰ رقم انار خوراکی در اقلیم‌های مختلف با تنوع ژنتیکی گسترده در رنگ میوه می‌باشد. این تنوع می‌تواند برای تشخیص خصوصیات آنتی اکسیدانتی مطلوب انار بسیار مفید واقع شده و منبع ژنی برای مطالعات به‌نژادی این گیاه باشد. با توجه به محبوبیت انار بین مصرف کنندگان و با لحاظ کردن خصوصیات بیولوژیکی ارزشمند آن و همچنین اهمیت اقتصادی این میوه، نیاز به تحقیقات بیشتر به‌منظور شناسایی ژن‌های منحصر به فرد انار، محرز به‌نظر می‌رسد. لذا در مطالعه حاضر به جهت نقش کلیدی و مهم ژن *UFGT* در تعیین رنگ میوه گیاهان مختلف، ژن مورد نظر در انار شناسایی و جداسازی شده و بیان آن در سه رقم انار (پوست میوه صورتی، قرمز و سیاه) در دوره میوه‌دهی بررسی شد.

مواد و روش‌ها

سه رقم انار، پوست سیاه یزد (پوست سیاه)، شیرین شعباد شیراز (پوست صورتی) و ملس اصفهان (پوست قرمز) از مجموعه درخت انار در مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی اصفهان

[1] Phenylalanine ammonia-lyase
[2] Cinnamate 4-hydroxylase
[3] Chalcone synthase
[4] Dihydroflavonol reductase
[5] Anthocyanidin synthase
[6] UDP-glucose: flavonoid 3-O-glucosyltransferase
[7] *Litchi chinensis* Sonn

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-18]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.1.5.1]



شکل ۱- تصویر کلی مسیر بیوسنتز آنتوسیانین‌ها در گیاهان که منجر به تولید آنتوسیانین می‌شود. CHS) آنزیم چالکون سینتاز؛ F3H) آنزیم فلاونوئید ۳ هیدروکسیلاز؛ DFR) آنزیم دی‌هیدروفلاونول ردوکتاز؛ ANS) آنزیم آنتوسیانین سینتاز؛ UFGT) آنزیم UDP-گلوگز: فلانوئید ۳-O گلوکوزیل ترانسفراز.

جمع‌آوری شد. نمونه‌ها از چهار مرحله مختلف رشد و نمو انار شامل گل (مرحله ۱)، میوه‌های جوان (مرحله ۲)، میوه تقریبا بالغ (مرحله ۳) و میوه‌های رسیده (مرحله ۴) انتخاب شدند. طراحی آغازگرهای دجنریت به‌منظور شناسایی و جداسازی ژن UDP D- گلوگز: فلاونوئید ۳-O گلوکوزیل ترانسفراز (*UFGT*)، براساس شباهت سنجی دمین حفاظت شده این ژن در گیاهان انگور، هلو و غیره صورت پذیرفت (جدول۱). استخراج RNA کل از نمونه‌های جمع‌آوری شده توسط بافر Biozol (BioFlux, Japan) مطابق با ستورالعمل شرکت سازنده، انجام شد. حذف DNA، قبل از تهیه cDNA، توسط آنزیم DNase (DNase I, RNase-free/Thermo Scientific, Germany) صورت پذیرفت و سپس cDNA با استفاده از کیت سنتز cDNA (RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit/Thermo Scientific, Germany) طبق دستورالعمل شرکت سازنده سنتز 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 به‌عنوان ژن مرجع برای نرمال‌سازی نمونه‌ها استفاده شد. به منظور اطمینان از صحت 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 همسانه‌سازی (InsTAclone PCR Cloning Kit/Thermo Scientific, Germany) و پس از انتقال به باکتری *E. coli* سویه MC1061 توسط شرکت Bioneer (South Korea) توالی‌یابی شد. براساس توالی به‌دست آمده، بررسی شباهت سنجی ساختاری ژن مورد مطالعه با ساختار سه بعدی دیگر گیاهان موجود در پایگاه اطلاعات داده‌ها NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) و ExPASY (www.ExPASY.org) انجام شد. همچنین بررسی شبکه ژنی مسیر بیوسنتز آنتوسیانین در سایت ExPASY و تجزیه و تحلیل راه‌انداز ژن‌های تنظیم کننده مسیر آنتوسیانین در سایت Plantcare (http://bioinformatics.psb.ugent.be/ webtools/ plantcare/html) انجام شد.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-18]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.1.5.1]

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

آغازگرها	توالی آغازگر ('5-'3)	دمای اتصال (^{o}C)	تعداد چرخه
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

نتایج و بحث

ژن *UFGT* در بسیاری از گیاهان نظیر آرابیدوپسیس، انگور، سیب، هلو و غیره شناسایی و جداسازی شده است. وجه مشترک آنها، حضور دمین کاملا حفاظت شده خانواده UDP-گلوکوزیل ترانسفراز[1] در توالی ژن مورد مطالعه می باشد (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 (شکل۳). نتایج توالی‌یابی 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.

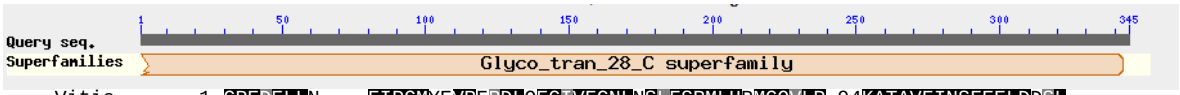
نتایج حاصل از بررسی بیان *PgUFGT* نشان داد که بیان ژن مورد نظر در مرحله گلدهی در سه رقم (پوست سیاه یزد، شیرین شعباد شیراز و ملس اصفهان) نسبتا بالا بوده است، اما در مرحله رسیدن میوه در پوست سیاه یزد به حداکثر خود رسید. برخلاف این رقم، بیان ژن *PgUFGT* در همه مراحل رشد میوه به جز گلدهی در رقم شیرین شعباد 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 (شکل۴-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 به‌طوری‌که درک اساس ژنتیکی تنوع رنگ پوست در میوه انار هنوز هم مبهم و پیچیده است. در این پژوهش ژن *PgUFGT* دخیل در مسیر بیوسنتز 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، تغییرسطح 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 بیوسنتز آنتوسیانین می‌باشد و نتایج دیگر پژوهشگران در بررسی این ژن‌ها در مراحل رشد گیاهان هلو (Tsuda et al. 2004)، سیب (Kim et al. 2003)، اطلسی (scacio-Valdés et al. 2011) و انگور (Ranazzotti et al. 2008) این مطلب را تایید می‌کند.

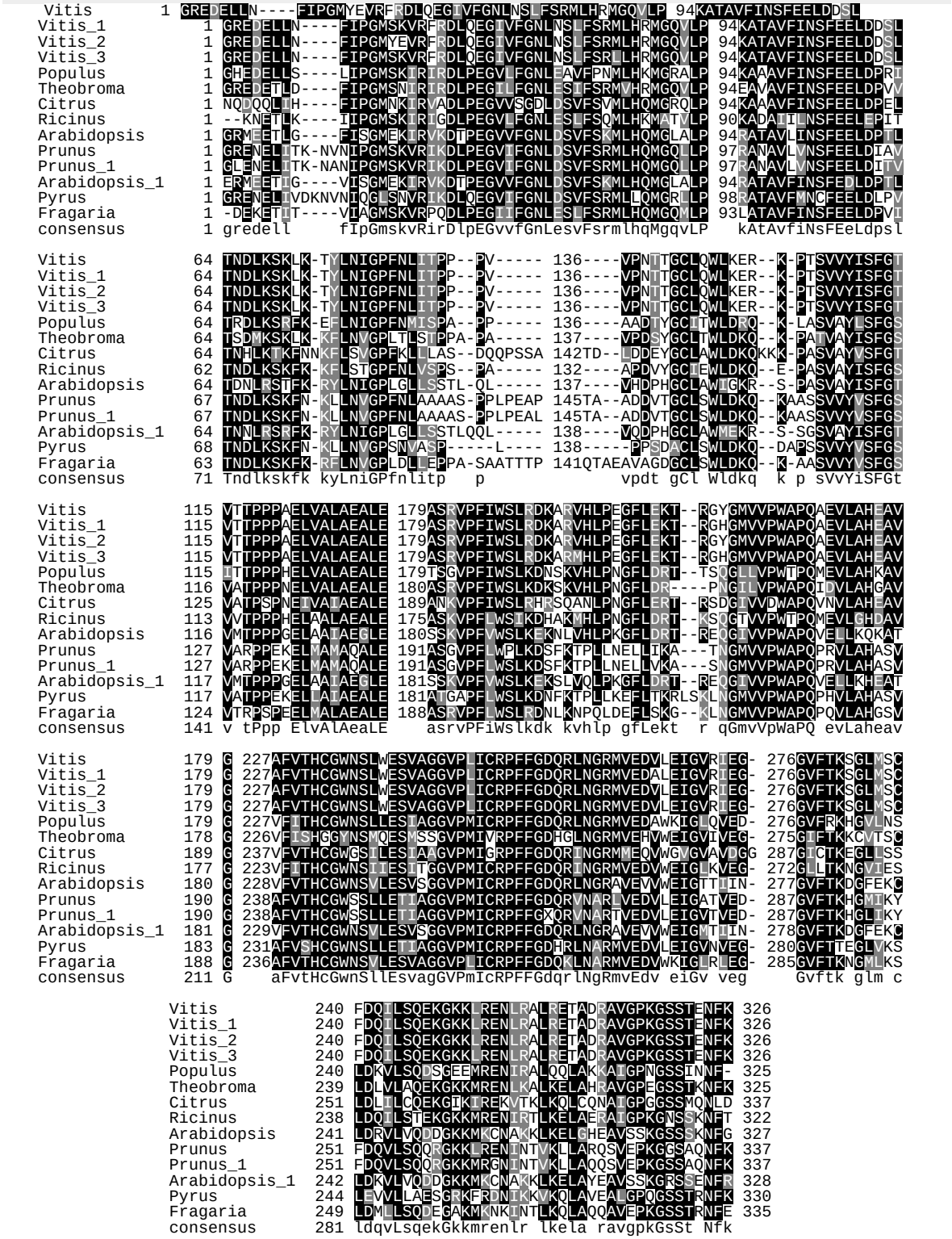
درک عملکرد پروتئین PgUFGT با توجه به شباهت‌سنجی ساختاری آن در پایگاه اطلاعات داده ها (NCBI)، میسر شد. نتایج حاصل از پیش‌بینی ساختار پروتئین مورد مطالعه نشان داد که پروتئین PgUFGT با ساختار سه بعدی پروتئین UDP–گلوگز: فلاونوئید گلوکوزیل ترانسفراز[2] در انگور دانه قرمز، دارای شباهت حدود ۵۲ درصد بود (شکل ۵). پروتئین VvGT1 با اتصال یک مولکول گلوکز به آنتوسیانیدین، مسئول تشکیل رنگ قرمز در دانه‌های انگور می‌باشد. ساختار سه بعدی VvGT1 این آنزیم با توجه به جایگاه فعال آن (بخش دهنده UDP- گلوکز و قسمت پذیرنده مولکول کامفرول) توسط روش NMR [3] ترسیم شده است است (شکل ۵) (Offen et al. 2006). لازم به ذکر است که

[1] UDP- glucosyltransferase supefamily

[2] UDP-glucose:flavonoid 3-O glycosyltransferase (VvGT1)
[3] Nuclear magnetic resonance

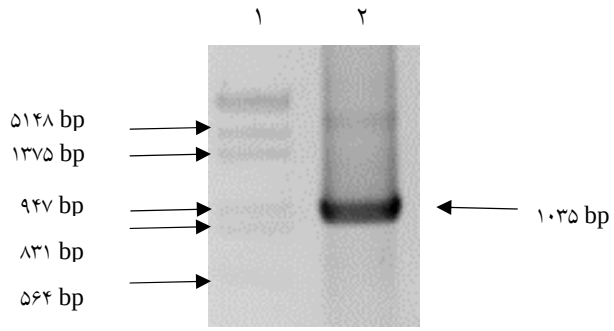
[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-18]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.1.5.1]





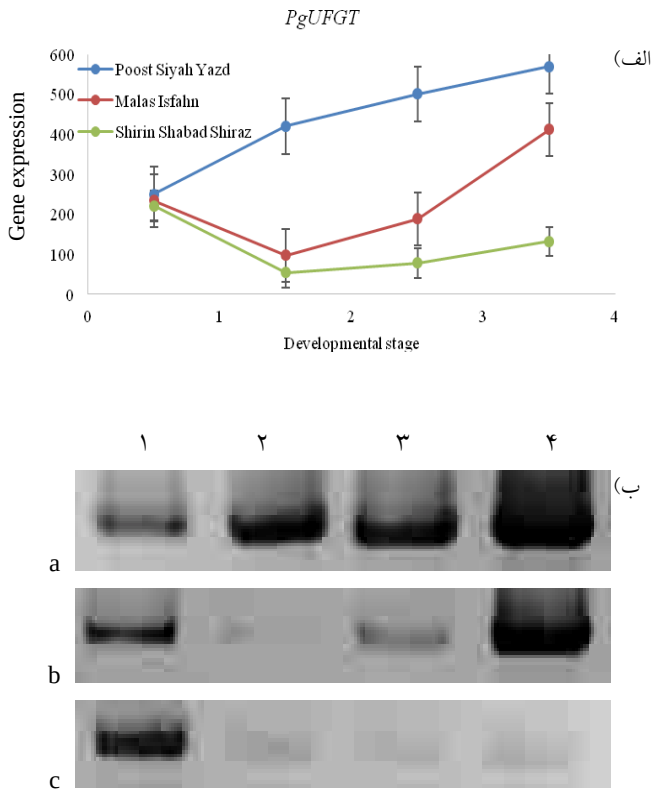
شکل ۲- نمایش دمین حفاظت شده در خانواده UDP - گلوکوزیل ترانسفراز (ژن *UFGT*) و شباهت سنجی آن در بسیاری از گیاهان نظیر انگور، کاکائو، هلو و آرابیدوپسیس وغیره

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-18]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.1.5.1]



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

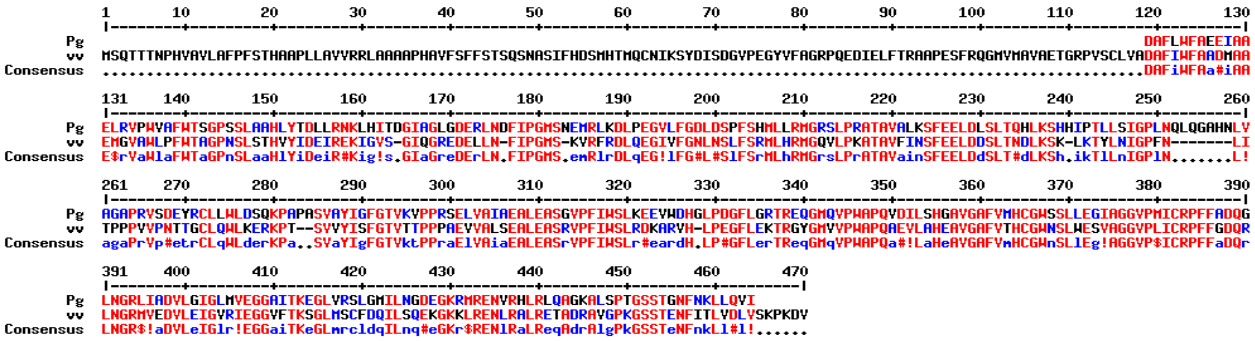
مولکول سیانیدین می‌تواند جایگزین کامفرول شود. ساختار سه بعدی VvGT1 نشان می‌دهد که در بخش دهنده شش اسید آمینه حفاظت شده شامل Thr19، Thr141، Thr280، His350، Asp374 و Gln375 و در قسمت پذیرنده ۴ اسید آمینه حفاظت شده Ser18، His 20، Gln84 و His 150 مسئول واکنش اتصال مولکول UDP- گلوکز به کامفرول و دیگر مولکول های پذیرنده می‌باشند (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 پیش بینی شده PgUFGT، اسید آمینه‌های فوق نیز به صورت حفاظت شده به صورت Thr23، His32، Thr176، His246، Asp270 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 کاملا حفاظت شده در جایگاه فعال، این احتمال را تقویت می‌کند. دانش امروز نشان داده که ساختار سه بعدی پروتئین در تعیین عملکرد آن نقش بسزایی ایفا می‌کند؛ لذا پروتئین PgUFGT در انار 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 ژن *PgUFGT* نشان داد که با افزایش بیان این ژن 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 ٤- بررسی بیان ژن *PgUFGT* در ارقام انار توسط RT-PCR. الف) نمایش کمی بیان ژن *PgUFGT* در ارقام انار و مراحل رشدی مختلف ۱) گلدهی؛ ۲) میوه ابتدای میوه دهی؛ ۳) اواسط میوه دهی؛ ٤) 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) گلدهی؛ ۲) میوه ابتدای میوه دهی؛ ۳) اواسط میوه دهی؛ ٤) 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

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-18]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.1.5.1]

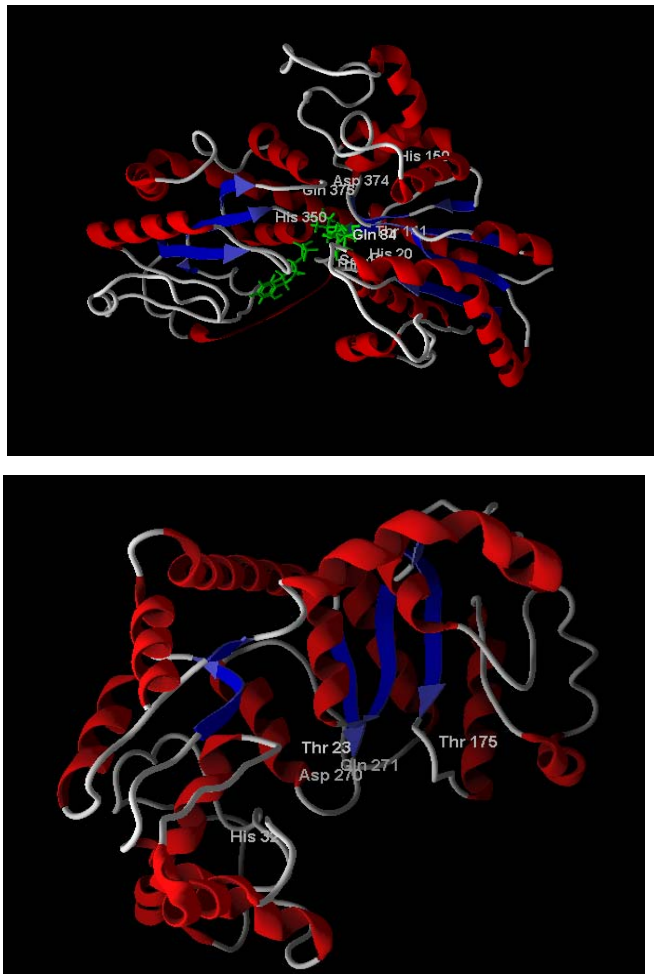


شکل ۵- شباهت سنجی پروتئین PgUFGT و پروتئین UDP–گلوگز: فلاونوئید گلوکوزیل ترانسفراز ، همچنین نمایش شباهت ۵۲ درصدی و حضور اسید آمینه‌های کاملا یکسان در جایگاه فعال هر دو آنزیم

جدول ۲- عناصر تنظیمی در راه‌انداز 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 بی‌هوازی
CGTCA-motif	CGTCA	عنصر تنظیمی پاسخ‌دهنده به متیل جاسمونات
TGACG-motif	TGACG	عنصر تنظیمی پاسخ‌دهنده به متیل جاسمونات
ABRE	CACGTG	عنصر تنظیمی پاسخ‌دهنده به آبسیزیک‌اسید
GAG-motif	GGAGATG	عنصر پاسخ‌دهنده به نور
Box 4	ATTAAT	قسمت حفاظت‌شده 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 راه‌انداز و ناحیه‌ی تقویت‌کننده
CAT-box	GCCACT	عنصر تنظیمی وابسته به بیان مریستم
G-Box	CACGTG	عنصر تنظیمی سیس پاسخ‌دهنده به نور
GATA-motif	GATAGGG	بخشی از عنصر پاسخ‌دهنده به نور
HSE	AGAAAATTCG	عنصر تنظیمی سیس پاسخ‌دهنده به تنش گرمایی
I-box	GATAGGG	بخشی از عنصر پاسخ‌دهنده به نور
Skn-1_motif	GTCAT	عنصر تنظیمی سیس مورد نیاز در بیان اندوسپرم
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 درشرایط تنش نور
MBS	TAACTG	جایگاه اتصال عامل تنظیم کننده MYB درشرایط تنش خشکی
TCA-element	GAGAAGAATA	عنصر تنظیمی سیس پاسخ‌دهنده به سالیسیلیک‌اسید
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

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-18]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.1.5.1]



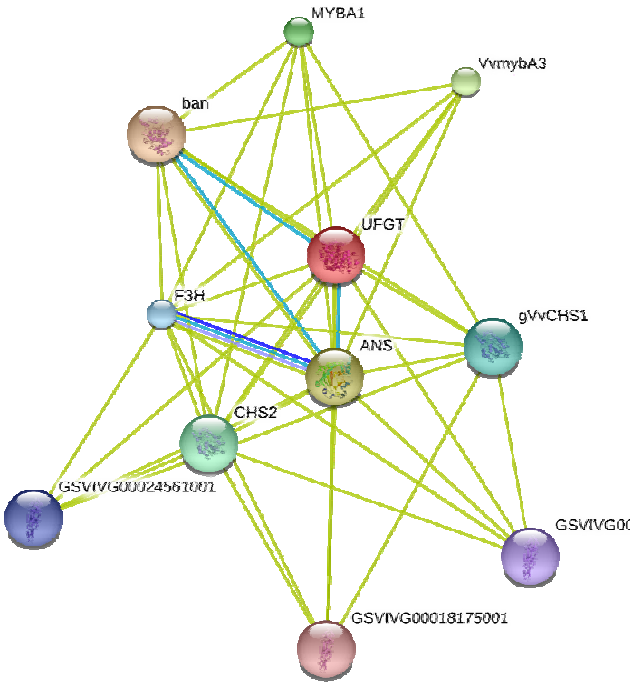
الف

ب

شکل ۶- الف) ساختار سه بعدی VvGT1 در بخش دهنده شش اسید آمینه حفاظت شده شامل Thr19، Thr141، Thr280، His350، Asp374 و Gln375 و در قسمت پذیرنده ۴ اسید آمینه حفاظت شده Ser18، His 20، Gln84 و His 150 مسئول واکنش اتصال مولکول UDP- گلوکز به کامفرول و دیگر مولکول های پذیرنده می‌باشند؛ ب) در ساختار سه بعدی پیش بینی شده PgUFGT، اسید آمینه‌های فوق نیز به صورت حفاظت شده به صورت Thr23، His32، Thr176، His246، Asp270 و Gln271 وجود دارند.

پاسخ، به یکپارچه‌سازی رشد، توسعه و سوخت و ساز گیاه که به نوبه خود به تکامل منجر شده و در نهایت به مکانیسم‌های مختلف برای تنظیم هموستاز سلولی، نیاز است. گلیکوزیلاسیون یکی از این مکانیسم‌ها بوده که توسط خانواده بزرگ چند ژنی گلیکوزیل ترانسفراز، قادر به تشخیص مولکول‌های کوچک نظیر هورمون‌ها، متابولیت ثانویه و سموم حاصل از تنش‌های زنده و غیر زنده می‌باشند. ژن *UFGT* یکی از اعضای این خانواده است که قادر به اتصال مولکول گلوگز به آنتوسیانیدین و تولید رنگدانه‌های آنتوسیانین می‌باشد. در واقع، تولید رنگ علاوه بر زیبایی گیاه، موجب درک تغییرات محیطی و انعطاف‌پذیری در پاسخ به شرایط تنش‌زا می‌شود. در این راستا همکاری چندین ژن در مسیر بیوسنتز آنتوسیانین‌ها این هدف را دنبال می‌کنند (Offen et al. 2006). مطالعه شبکه ژنی دخیل در مسیر سنتز آنتوسیانین‌ها در گیاه انگور نشان می‌دهد که ژن *VvUFGT* محصول ژن *VvANS* را به همراه یک مولکول گلوکز به آنتوسیانین تبدیل می‌کند. مطالعات گسترده در انگور و نمایش شبکه ژنی بیانگر حضور ژن‌های شناخته شده‌ای نظیر *VvCHS* و *VvF3H* نیز در این مجموعه می‌باشد. اما وجود دو ژن تنظیم کننده *VvMYBA1* و *VvMYBA3*

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-18]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.1.5.1]



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

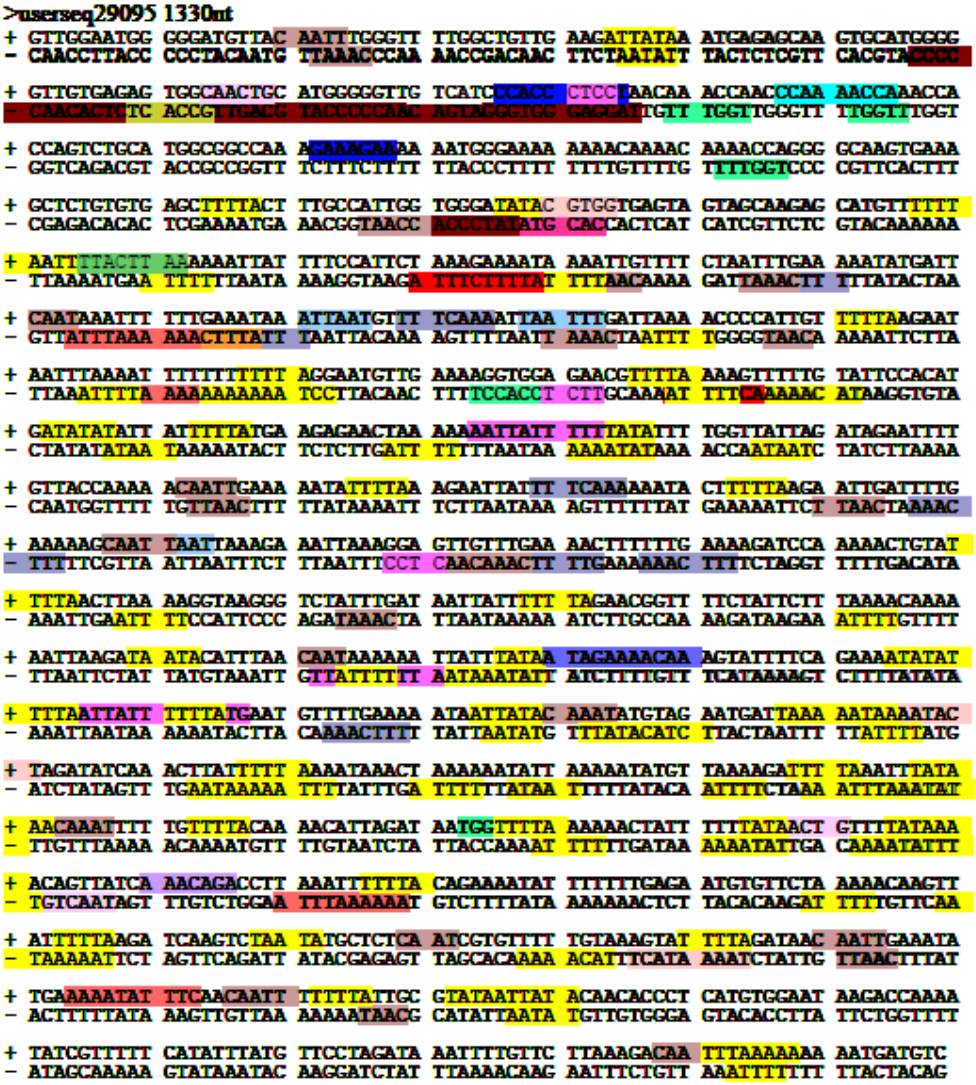
در شبکه حاضر، نشان می‌دهد که این مسیر با توجه به شرایط محیطی تنظیم می‌شود (شکل۷).

تجزیه و تحلیل راه‌انداز ژن *VvUFGT* توسط سایت PlantCARE نشان داد که ژن مورد مطالعه در ناحیه بالادست خود حاوی عناصر تنظیم کننده MBS (جایگاه 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. به‌علاوه، نتایج حاصل از اسکن سایت PlantCARE در مورد راه‌انداز ژن‌های *VvMYBA1* و *VvMYBA3* نیز نشان داد که چندین عناصر تنظیمی موجود در پروموتر 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 موتیف‌های تنظیم کننده متعددی در راه‌اندازهای مورد 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 موتیف‌های تنظیمی پاسخ دهنده به هورمون‌های گیاهی در پروموتر 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 پروموترهای 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

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-18]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.1.5.1]



شکل ۸- تجزیه و تحلیل راه‌انداز ژن *VvUFGT* و نمایش عناصر تنظیم کننده MBS (جایگاه اتصال پروتئین‌های تنظیم کننده MYB)

محیطی می‌باشد. بر اساس مطالعه حاضر، توجه به شرایط محیطی قابل رشد گیاهان تولید کننده آنتوسیانین نظیر انار و انگور بسیار حائز اهمیت می‌باشد. این مطلب به‌ویژه در تولید آنتوسیانین در کشت تعلیقی و فراهم آوردن عوامل محیطی موثر در جهت افزایش بیان ژن‌های سنتز کننده آنتوسیانین، مصادق بیشتری دارد. لذا به نظر می‌رسد که کنترل میزان تولید آنتوسیانین در گیاه بر اساس شناخت تاثیر شرایط محیطی امکان‌پذیر می‌باشد.

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.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-18]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.1.5.1]

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, Shajittha 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.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-18]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.1.5.1]