





دانشکده مهندسی کشاورزی
گروه زراعت و اصلاح نباتات

ساخت سازه خاموش سازی ژن *SrUGT74G1* در مسیر بیوسنتز استویوزاید در
گیاه استویا ربائودیانا

نگارنده: فاطمه شجاعت رفسنجانی

اساتید راهنما:
دکتر ناصر فرخی
دکتر حسین عسکری

استاد مشاور:
دکتر شاهرخ قرنچیک

پایان نامه ارشد جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد

شهریور ۱۳۹۷

دانشگاه صنعتی شاهرود

دانشکده مهندسی کشاورزی

گروه زراعت و اصلاح نباتات

پایان نامه کارشناسی ارشد خانم فاطمه شجاعت رفسنجانی

تحت عنوان:

ساخت سازه خاموش سازی ژن *SrUGT74G1* در مسیر بیوسنتز

استویوزاید در گیاه *استویا رباتودیانا*

در تاریخ ۱۳۹۷/۶/۱۸ توسط کمیته تخصصی زیر جهت اخذ مدرک کارشناسی ارشد

مورد ارزیابی و با درجه مورد پذیرش قرار گرفت.

| امضاء | اساتید مشاور | امضاء | اساتید راهنما |
|-------|-------------------|-------|-----------------|
| | دکتر شاهرخ قرنجیک | | دکتر ناصر فرخی |
| - | - | | دکتر حسین عسکری |

| امضاء | نماینده تحصیلات تکمیلی | امضاء | اساتید داور |
|-------|------------------------|-------|----------------------|
| | دکتر یاسر صفری | | دکتر پرویز حیدری |
| | | | دکتر مهدیه پارسائیان |

تقدیم به مهربانانی که:

لذت دانستن، جرات خواستن، عظمت رسیدن و تمام تجربه‌های یکتا و زیبای زندگی‌م مدیون حضور سبز آنهاست،
تقدیم به خانواده ام و همراه‌ترینم.

نهایت سپاس و قدردانی ام نشانه استادان و فریب‌نگارانی که این حقیر را بر سر خوان دانش و فضیلت خود نشانند؛ به ویژه استادان راه‌نمای ارجمندم، استاد کران سنگم جناب آقای دکتر ناصر فرخی که راه‌نمایی این پایان نامه را پذیرفته و همواره خود را ریزه خوار علم و اخلاق ایشان می‌دانم و دیگر استاد راه‌نمای دانشورم جناب آقای دکتر حسین عسکری که همواره با تقبل زحمت این پایان نامه، با صبر و شکیبایی بسیار مرا بین الطاف و رهنمودهای خود نمودند و استاد مشاور ارجمندم جناب آقای دکتر شاهرخ قریب‌جیک که زحمت مشاوره این رساله را بر عهده گرفتند.

تعهد نامه

اینجانب فاطمه شجاعت رفسنجانی دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی کشاورزی دانشکده مهندسی کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود نویسنده پایان نامه ساخت سازه خاموش سازی ژن *SrUGT74G1* در مسیر بیوسنتز استویوزاید در گیاه *استویا ربائودیانا* تحت راهنمایی دکتر ناصر فرخی متعهد می شوم .

- تحقیقات در این پایان نامه توسط اینجانب انجام شده است و از صحت و اصالت برخوردار است .
- در استفاده از نتایج پژوهشهای محققان دیگر به مرجع مورد استفاده استناد شده است .
- مطالب مندرج در پایان نامه تاکنون توسط خود یا فرد دیگری برای دریافت هیچ نوع مدرک یا امتیازی در هیچ جا ارائه نشده است .
- کلیه حقوق معنوی این اثر متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می باشد و مقالات مستخرج با نام « دانشگاه صنعتی شاهرود » و یا « Shahrood University of Technology » به چاپ خواهد رسید .
- حقوق معنوی تمام افرادی که در به دست آمدن نتایج اصلی پایان نامه تأثیرگذار بوده اند در مقالات مستخرج از پایان نامه رعایت می گردد.
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه ، در مواردی که از موجود زنده (یا بافتهای آنها) استفاده شده است ضوابط و اصول اخلاقی رعایت شده است .
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه، در مواردی که به حوزه اطلاعات شخصی افراد دسترسی یافته یا استفاده شده است اصل رازداری ، ضوابط و اصول اخلاق انسانی رعایت شده است.

تاریخ ۹۷/۶/۱۸

امضای دانشجو

مالکیت نتایج و حق نشر

- کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج ، کتاب ، برنامه های رایانه ای ، نرم افزار ها و تجهیزات ساخته شده است) متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می باشد . این مطلب باید به نحو مقتضی در تولیدات علمی مربوطه ذکر شود .
- استفاده از اطلاعات و نتایج موجود در پایان نامه بدون ذکر مرجع مجاز نمی باشد.

چکیده:

ژن *srUGT74G* کد کنندهی آنزیم UDP- glycosyltransferase74G1، یک آنزیم کلیدی در مسیر بیوسنتز گلیکوزایدهای استویول در برگ گیاه *استویا رباتودیانا* بر تونی می باشد که با گلیکوزیلاسیون کربن شماره ی ۱۹ مولکول استویول بیوزاید، استویول و استویول مونوزاید و تولید استویوزاید، مونوگلوکوزاید و ربوزوزاید در سنتر استویوزاید نقش دارد. استویوزاید با تشکیل ۵-۱۰ درصد از وزن برگ خشک گیاه استویا اصلی ترین جزء از قندهای استویا و دارای نقش مهم در کیفیت چشائی مجموع قندهای استویول می باشد. تلخی پس از چشیدن استویوزاید مانع از گسترش کاربرد قندهای استویول شده است و موجب آن شد که این قند نیاز به فرآوری داشته باشد. بدین منظور کاهش میزان بیان استویوزاید از طریق خاموشی پس از رونویسی ژن کد کنندهی آنزیم UGT74G1 با طراحی و ساخت سازه های مناسب ایجاد کنندهی *ihpRNA* برای بررسی عملکرد آن در کیفیت چشائی قند استویا در نظر گرفته شد. از روی ناحیهی اگزون ژن *srUGT74G1* قطعه ای به طول ۱۱۰ جفت باز انتخاب و پرایمرهای اختصاصی دارای جایگاه برش *KpnI* و *EcoRI* جهت قرار گیری قطعه به صورت هم جهت (رشته سنس) و همچنین *XbaI* و *BamHI* برای جهت گیری قطعه به صورت معکوس وارونه (رشته آنتی سنس) در حامل خاموش کنندهی *pHANNIBAL* طراحی شد. با انجام واکنش زنجیره ای پلیمراز آشیانه ای قطعه سنس و آنتی سنس تکثیر شد و در وکتور *pTG19-T* همسانه سازی شد. بعد از توالی یابی و تائید صحت ژن کلون شده، قطعه سنس و آنتی سنس در پلاسمید *pHANNIBAL* کلون شدند.

کلیدواژه: خاموشی ژن، *استویا رباتودیانا*، *RNA* مداخله گر، سنس، آنتی سنس، *pHANNIBAL*.

لیست مقالات :

- ۱- مقاله "طراحی سازه جهت خاموش سازی ژن *srUGT74G1* در گیاه استویا ربائودیانا"،
دومین همایش بین‌المللی و دهمین همایش ملی بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران، ۶-۷
شهریور ماه ۱۳۹۶.

فهرست مطالب

| | |
|---|----|
| فصل اول _ مقدمه و مرور منابع | ۱ |
| ۱-۱. گیاه استویا | ۴ |
| ۱-۱-۱. گیاهشناسی استویا | ۶ |
| ۲-۱. اهمیت استویا | ۹ |
| ۱-۲-۱. ترکیب‌های شیمیایی اصلی | ۹ |
| ۲-۲-۱. سایر ترکیبات مفید | ۱۲ |
| ۳-۱. ویژگی‌های پزشکی و درمانی گلیکوزیدهای استویا | ۱۲ |
| ۴-۱. مزایا و معایب استویوزاید نسبت به سایر شیرین‌کننده‌ها | ۱۶ |
| ۵-۱. استحصال صنعتی قند استویا | ۱۸ |
| ۶-۱. مسیر بیوسنتز استویوزاید | ۲۰ |
| ۷-۱. خاموشی ژن | ۲۶ |
| ۱-۷-۱. خاموشی ژن در سطح رونویسی | ۲۶ |
| ۲-۷-۱. خاموشی ژن در سطح پس از رونویسی | ۲۷ |
| ۸-۱. microRNA و نقش آن در خاموشی ژن | ۳۶ |
| ۱-۸-۱. تفاوت مسیر miRNA و siRNA | ۳۷ |
| ۹-۱. هدف از طرح مورد نظر و ضرورت انجام آن | ۳۹ |
| فصل دوم _ مواد و روش‌ها | ۴۱ |
| ۱-۲. مطالعات بیوانفورماتیکی و طراحی آغازگرها | ۴۲ |
| ۲-۲. مواد مورد استفاده در این پژوهش | ۴۳ |

- ۳-۲. استخراج RNA از بافت برگ گیاه *استویا ریابودیانا* ۴۴
- ۳-۲. بررسی کمیت و کیفیت RNA ۴۵
- ۱-۳-۲. سنجش کمیت RNA با استفاده از روش‌های اسپکتروفتومتری ۴۵
- ۲-۳-۲. سنجش کیفیت RNA استخراج شده با استفاده از الکتروفورز افقی روی ژل آگارز ۴۵
- ۴-۲. واکنش نسخه برداری معکوس ۴۶
- ۵-۲. واکنش زنجیرهای پلیمراز آشیانه‌ای دودمایی ۴۷
- ۶-۲. تخلیص قطعه سنس و آنتی سنس از ژل آگارز ۵۰
- ۷-۲. اتصال قطعه‌های تخلیص شده در حامل همسانه سازی pTG19-T ۵۰
- ۸-۲. انتقال پلاسمید به باکتری‌های *E. coli* سویه DH5 α ۵۰
- ۱۰-۲. تائید حضور قطعه در کلنی‌های ترانسفرم شده از طریق کلنی PCR ۵۲
- ۱۱-۲. استخراج پلاسمیدهای نو ترکیب از باکتری‌های ترانسفرم شده ۵۳
- ۱۲-۲. بررسی کیفیت و کمیت پلاسمید ۵۴
- ۱۳-۲. هضم آنزیمی پلاسمید pTG19-T حاوی قطعه سنس و آنتی سنس ۵۵
- ۱۴-۲. همسانه سازی قطعات سنس و آنتی سنس در پلاسمید pHANNIBAL خطی شده ۵۵
- ۱۵-۲. ساخت RNAi با ادغام قطعه آنتی سنس در پلاسمید pHANNIBAL حاوی سنس ۵۶
- ۱۶-۲. هضم آنزیمی پلاسمید حاوی هر دو قطعه سنس و آنتی سنس با آنزیم *XbaI* و *EcoRI* ۵۸
- ۱۷-۲. تهیه استوک گلیسرول ۱۵٪ برای باکتری‌های حاوی سازه RNAi ۵۸
- فصل سوم _ نتایج ۵۹
- ۱-۳. طراحی سازه‌ی RNAi ۶۰
- ۲-۳. استخراج Total RNA ۶۰
- ۱-۲-۳. آنالیز کیفیت RNA استخراج شده با ژل الکتروفورز ۶۰

- ۳-۲-۲. سنجش کمیت RNA با استفاده از روش‌های اسپکتروفوتومتری ۶۱
- ۳-۳. ارزیابی قطعه سنس و آنتی‌سنس با واکنش PCR در الکتروفورز افقی ژل آگارز ۶۱
- ۳-۴. تأیید همسانه‌سازی قطعه سنس و آنتی‌سنس در ناقل کلونیتگ با روش هضم آنزیمی T/A ۶۲
- ۳-۴-۴. تأیید همسانه‌سازی و صحت ترادف نوکلئوتیدی قطعه‌ی سنس و آنتی‌سنس به‌وسیله‌ی توالی‌یابی در حامل T/A ۶۳
- ۳-۶. ساخت کاست RNAi طراحی شده با برش و انتقال قطعه آنتی‌سنس به پلاسمید pHANNIBAL ۶۵
- ۳-۶-۱. انتقال قطعه سنس به ناقل خاموشگر pHANNIBAL ۶۵
- ۳-۶-۳. نتیجه‌ی برش آنزیمی حامل pHANNIBAL حاوی قطعه آنتی‌سنس با آنزیم BamHI و XbaI ۶۷
- ۳-۷. هضم آنزیمی حامل pHANNIBL حاوی قطعه سنس و آنتی‌سنس با آنزیم‌های برشی XbaI و EcoRI ۶۸
- ۳-۸. پیشنهادات ۷۰
- فصل چهارم _ منابع ۷۱

فهرست شکل‌ها

- شکل ۱-۱. تصویر گیاه استویا ۷
- شکل ۱-۲. تصویر بذره‌های گیاه استویا ۹
- شکل ۱-۳. ساختمان کلی گلیکوزیدهای استویا ۱۰
- شکل ۱-۴. مسیر اصلی و فرعی بیوسنتز گلیکوزیدهای استویول ۲۵
- شکل ۱-۵. تصویر فرآیند خاموشی ژن پس از رونویسی از ژن ۳۴
- شکل ۱-۶. مکانیسم‌های خاموشی ژن در فرآیند siRNA و miRNA ۳۹
- شکل ۱-۲. ناقل pHANNIBAL و موقعیت سایت‌های برشی روی آن. ۴۲
- شکل ۲-۲. تصویر شماتیک روش Nested PCR ۴۸
- شکل ۲-۳. تصویر شماتیک روش Touchdown PCR ۴۸
- شکل ۳-۱. استخراج RNA از برگ استویا ۶۱
- شکل ۳-۲. نتیجه‌ی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز ۶۲
- شکل ۳-۳. الگوی الکتروفورزی محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای تکثیر قطعه سنس و آنتی سنس و هضم آنزیمی پلاسمید pTG19-T حاوی قطعه سنس و آنتی سنس ۶۴
- شکل ۳-۴. هم‌ردیفی نتیجه توالی یابی ناقل T/A حامل قطعه سنس در سایت NCBI ۶۴
- شکل ۳-۵. هم‌ردیفی نتیجه توالی یابی ناقل T/A حامل قطعه آنتی سنس در سایت NCBI ۶۴
- شکل ۳-۶. نتیجه‌ی هضم آنزیمی پلاسمید pHANNIBAL به منظور ایجاد جایگاه مناسب برای قرار گیری قطعه سنس و حصول قطعه سنس با برش وکتور T/A ۶۵
- شکل ۳-۷. نتیجه‌ی برش آنزیمی pHANNIBAL و تأیید حضور قطعه سنس ۶۶
- شکل ۳-۸. نتیجه‌ی هضم آنزیمی pHANNIBAL در بردارنده‌ی سنس و دریافت قطعه آنتی سنس با برش وکتور T/A ۶۷

شکل ۳-۹. هضم آنزیمی باکتری‌های تراریخت با پلاسمید pHANNIBAL دارای قطعه آنتی‌سنس با

آنزیم‌های *XbaI* و *BamHI* ۶۸

شکل ۳-۱۰. نتیجه‌ی هضم آنزیمی پلاسمی pHANNIBAL حاوی قطعه سنس و آنتی‌سنس و تأیید

حضور کاست RNAi ۶۹

فهرست جدول‌ها

- جدول ۱-۱. فرمول شیمیایی استویوزاید و مشتقات مربوط با آن ۱۱
- جدول ۱-۲. محتوای شیمیایی و معدنی در برگ خشک استویا ۱۳
- جدول ۱-۲. ترادف آغازگرها و دمای اتصال ۴۳



فصل اول

مقدمه و مرور منابع

با توجه به افزایش جمعیت و بالا رفتن سطح آگاهی، یکی از مشکلات عمده جامعه امروز تامین منابع غذایی مناسب و سالم می‌باشد. در این راستا یافتن منابع غذایی جایگزین، بهبود فناوری‌های موجود و ارائه فناوری‌های نوین، اجتناب ناپذیر به نظر می‌رسد. هم‌چنین با توجه به اهمیت مواد غذایی از لحاظ تامین سلامت جامعه، استانداردهای بسیار دقیقی در خصوص تولید و عرضه این مواد در سراسر جهان تدوین شده و مورد اجرا قرار گرفته است. امروزه با پیشرفت صنایع غذایی، فرآوری بسیاری از نوشیدنی‌ها و مواد خوراکی مستلزم استفاده از افزودنی‌ها و مکمل‌های غذایی مناسب می‌باشد.

یکی از افزودنی‌های رایج در صنایع غذایی انواع شیرین‌کننده‌ها می‌باشد. شیرین‌کننده‌ها از افزودنی‌های پرکاربرد در صنایع غذایی هستند که امروزه انواع مختلف آن‌ها بسته به نیاز در تولید مواد غذایی استفاده می‌شود. شکر به عنوان یک تشدیدکننده طعم، علاوه بر بهبود رنگ با کم کردن فعالیت آبی به عنوان یک نگهدارنده در صنایع غذایی نیز عمل می‌کند، بنابراین در جایگزینی آن با سایر شیرین‌کننده‌ها باید دقت بیشتری به عمل آید. سایر شیرین‌کننده‌ها امروزه اغلب به صورت مخلوط، مصرف می‌شوند تا طعم و مزه دلخواه به دست آید و نیاز بیماران به غذاهای رژیمی و بدون قند با طعم و مزه مناسب، به خوبی برطرف گردد. به دلایل اقتصادی و تکنولوژیکی و همچنین ارتباط با برخی مشکلات سلامتی نظیر فشار خون، بیماری‌های قلبی، فساد دندان، چاقی و افزایش سطح گلوکز و انسولین خون که به ویژه برای افراد دیابتی مضر است، پژوهش‌های روزافزونی جهت یافتن جایگزینی مناسب برای ساکارز در دست انجام است (فتولکس، ۱۹۹۷).

افراد دیابتی از مهم‌ترین گروه‌های در معرض خطر هستند به گونه‌ای که بیماری این افراد از شایع‌ترین اختلالات متابولیکی بوده و به عنوان چهارمین علت مرگ و میر در جوامع غربی به‌شمار می‌رود. در ایران بیش از ۴ درصد افراد جامعه مبتلا به بیماری دیابت هستند که از این تعداد ۸۵ تا ۹۰ درصد بزرگسال و بقیه کودکان است.

شیرین کننده‌های ساکارین، سیکلامات، آسپارتام، گلایکریزین به عنوان جایگزینی برای شکر مورد آزمون قرار گرفتند، بعضاً عوارض خطرناکی برای آن‌ها گزارش گردید. نتیجه این آزمایش‌ها حاکی از آن بود که آسپارتام از طریق تولید فنیل آلانین به عنوان یک متابولیت عمده در طی متابولیسم خود، احتمال بیماری فنیل کتونوریا را افزایش می‌دهد. همچنین ساکارین منجر به سرطان مثانه در حیوانات آزمایشگاهی گردید و سیکلامات با تولید متابولیت سمی سیکلوهگزامین برای قلب و بیضه‌ها مضر بود (کیم و کینگ‌هو، ۲۰۰۲). این افزایش آگاهی عمومی در مورد زیان‌هایی که شکر به سلامت وارد می‌کند، منجر به افزایش تمایل به استفاده از شیرین کننده‌های طبیعی کم‌کالری یا بدون کالری استخراج شده از گیاهان گشته است.

یکی از گونه‌های گیاهی که حاوی شیرین کننده‌های طبیعی می‌باشد، استویا (*Stevia rebaudiana* Bertoni) است که در بسیاری از کشورها از جمله ژاپن، برزیل، چین، کره و کشورهای اروپایی مورد استقبال جدی قرار گرفته است. قند استویا با شاخص قندی^۱ صفر، کالری‌زا نمی‌باشد (آته و همکاران، ۲۰۰۸؛ کرویر، ۲۰۰۹؛ سئیم، ۲۰۱۰، پوری و همکاران، ۲۰۱۰) و بدون اثرات غیر سمی بر سلامت انسان می‌تواند جایگزینی مناسب برای شیرین کننده‌های مصنوعی مانند آسپارتام، ساکارین و سیکلامات باشد (کاردلو و همکاران، ۱۹۹۹؛ کلوس و همکاران، ۲۰۰۸). استویا گیاهی است که برگ‌های آن حاوی مقدار زیادی ترکیبات شیرین گلیکوزایدی بدون کالری است (سایمون و همکاران، ۲۰۰۳).

قندهای استویول گروهی از قندهای دای‌ترین هستند که در برگ‌های گیاه وجود دارد. این قندها به‌طور گسترده در حوزه‌های صنایع غذایی، نوشیدنی و داروسازی استفاده می‌شوند (هوآنگا و دای، ۲۰۱۰) و به‌علت شیرینی فوق‌العاده زیاد، غیر سمی و طبیعی بودن و همچنین فقدان انرژی‌زائی، بعد از گلوکز و ساکارز به‌عنوان "منبع سوم شیرین کننده در جهان" شناخته می‌شوند. در حال حاضر از قندهای استویول به‌عنوان شیرین کننده‌های غیرانرژی‌زا در غذا و نوشابه در اغلب کشورهای دنیا به‌ویژه برای افراد دیابتی

۱. Glycemic index

و افراد چاق استفاده می‌گردد (کاراکوستاس و همکاران، ۲۰۰۸؛ مالکی و همکاران، ۲۰۰۸). قندهای استویول شامل یک هسته ی استویول گلیکون مشترک و انواع متفاوت (تعداد و نوع) از قندهای متصل شده به کربن ۱۳ و ۱۹ است. استویوزاید^۱ (۶۰-۷۰ درصد)، ریبودیوزاید^۲ (۱۵ تا ۲۰ درصد) و ریبودیوزاید^۳ (کمتر از ۱۰ درصد) قندهای استویول را تشکیل می‌دهند که بیش از ۹۰ درصد کیفیت چشائی قندهای استویول را تشکیل می‌دهند، این قندها دارای درجه‌های متفاوتی از شیرین‌کنندگی هستند. ریبودیوزاید A بالاترین کیفیت چشائی و شیرین‌کنندگی را داشته و بیشتر از دو شیرین‌کننده دیگر مورد پسند می‌باشد. درحالی‌که طعم تلخ پس از چشیدن قند استویوزاید، مانع از گسترش کاربرد قندهای استویول در حدگسترده شده است. در حوزه‌ی داروسازی نشان داده شد که استویوزاید و ریبودیوزاید A اثر مفیدی بر سلامت مبتلایان به دیابت نوع دو و کاهش فشارخون و تقویت سیستم ایمنی دارند (جریجرسنس و همکاران، ۲۰۰۳؛ چپسنس و همکاران، ۲۰۰۴).

بنابراین با توجه به کاربردهای گسترده‌ی قندهای استویول به‌عنوان افزودنی غذائی و انواع فعالیت‌های زیستی، پیدا کردن روشی ساده و مقرون به‌صرفه جهت تولید قندهای استویول با کیفیت طعمی بهتر کانون توجه صنعت قند استویول است.

۱-۱. گیاه استویا

استویا با نام علمی *Stevia rebaudiana* Bertoni بومی منطقه کوهستانی آمامبی واقع در مرز برزیل و پاراگوئه و در آن مناطق به گیاه برگ عسلی معروف است. متعلق به خانواده‌ی کاسنی (Asteraceae) یا مرکبان علفی (Compositae) است. تاریخچه‌ی استفاده از برگ‌های استویا توسط بومیان منطقه آمامبی به بیش از ۱۵۰۰ سال قبل باز می‌گردد. این گیاه از قرن‌ها پیش برای شیرین کردن چای توسط بومیان

۱. Stevioside

۲. Rebaudioside A

۳. Rebaudioside C

آمریکای جنوبی استفاده شده است (کاتایاما و همکاران، ۱۹۷۶)، برگ استویا برای صدها سال توسط هندی‌ها با نام بومی Ra'a He'e به عنوان شیرین کننده در چای سبز آنها در طب یا به‌عنوان میان وعده استفاده شده است.

پتروس ژاکوبوس استووس، گیاهشناس و پزشک اسپانیایی نخستین غیربومی بود که این گیاه را مورد پژوهش قرارداد، نام غیربومی استویا را از نام او گرفتند و برای اولین بار در سال ۱۸۸۸ گیاهشناس سوئسی، موازیز سانتیاگو برتونی در تحقیقات خود در جنوب پاراگوئه‌ی کنونی از طریق سرخپوستان پاراگوئه به خواص این گیاه پی برده بود و این گیاه و طعم شیرین آن را با جزئیات توصیف کرد، پس از انتشار اولین توضیحات گیاهشناسی این گیاه مورد توجه اروپائیان قرار گرفت. استویا به دلیل شیرین بودن برگ‌ها به نام‌های برگ عسلی، گیاه شیرین، علف شیرین پاراگوئه و علف شیرین معروف است. این گیاه، ابتدا *Eupatorium rebaudianum* Bert. نامیده شد اما مجدد به افتخار استووس و برتونی و هم‌چنین "ریبادی"، اولین شیمیدانی که ویژگی‌های شیمیایی عصاره استویا را مورد مطالعه قرار دادند مجدد نامگذاری شد (یاداو و همکاران، ۲۰۱۱). بذرهاى استویا در سال ۱۹۴۲ به انگلستان فرستاده شد اما تلاش برای تولید آن شکست خورد.

اولین بار کشت رسمی و تجاری این گیاه در سال ۱۹۶۴ در پاراگوئه انجام شد (کاتایاما و همکاران، ۱۹۷۶). تولیدکنندگان اصلی استویا در کشورهای ژاپن، چین، تایوان، تایلند، کره، برزیل، پاراگوئه، آمریکا، آرژانتین، مالزی می‌باشند و تقریباً همه کشورهای آمریکای جنوبی برای استفاده دارویی و غذایی از آن استفاده می‌کنند (یاداوو همکاران، ۲۰۱۲؛ برنلد و روسا، ۱۹۹۲؛ احمد و همکاران، ۱۹۹۲؛ سامن و همکاران، ۲۰۰۸).

در سال ۱۹۳۱ دو شیمیدان فرانسوی به نام‌های بریدل و لایولا با استخراج ترکیب کریستالی بسیار شیرین به رنگ سفید از برگ‌های این گیاه، قادر به جداسازی گلیکوزیدهای ایجادکننده‌ی طعم شیرین استویا شدند. این ترکیب‌ها ۲۵۰ تا ۳۰۰ بار شیرین‌تر از ساکاروز هستند و مقاوم به حرارت و اسید و

باز و غیر قابل تخمیر توسط آنزیم‌های میکروبی و تبدیل به اسیدها و گازها و الکل‌ها هستند (براندل ۲۰۰۴؛ عبدالعاطف، ۲۰۱۲). پس از آن ساختار دقیق آگلیکان و گلیکوزید در سال ۱۹۵۵ منتشر شد. با شروع جنگ جهانی دوم، استویا توسط کشور بریتانیا در طی جیره بندی شکر، برای جبران کمبود مواد غذایی کشت شد. تا قرن چهاردهم، شکر جزء اصلی مواد غذایی بود اما بدون شک به علت مقدار زیاد کالری، مشکلات پزشکی زیادی ایجاد می‌کرد. از این رو تولید شیرین کننده‌های طبیعی یا مصنوعی جایگزین با هدف کمترین کالری و بیشترین شیرینی مورد بررسی قرار گرفت.

۱-۱-۱. گیاهشناسی استویا

استویا گیاهی علفی، چند ساله، کوتاه قد بومی منطقه کوهستانی آمامبی واقع در مرز برزیل و پاراگوئه است. جنس استویا با تنوع زیاد در تعداد کروموزوم دارای ۲۳۰ گونه می‌باشد که مهمترین گونه‌های آن شامل لمونی، میکرانتا، آواتا، سراتا، پلومورا، ربادیانا، سالی سیفوریا است. از میان ۲۳۰ گونه شناخته شده از این جنس، تنها *Stevia rebaudiana* دارای اسانس شیرین کنندگی می‌باشد (کینگ‌هورن و سوئه-جارتو، ۱۹۸۵؛ استیوا و همکاران، ۲۰۰۴). تعداد کروموزوم *S. rebaudiana*، $2n=22$ که قبلا توسط فردریکو و همکاران در سال ۱۹۹۶ و مونتیرو و همکاران (۱۹۸۰ و ۱۹۸۲) گزارش شده بود (یادا و همکاران، ۲۰۱۱) اما بعضا گونه‌های پلی‌پلوئید نیز در این گیاه مشاهده شده است (پانده و گوپتا، ۲۰۱۳). جایگاه استویا در طبقه‌بندی جانداران به صورت زیر می‌باشد (یادا و همکاران، ۲۰۱۱):

Domain: Eukaryota

Kingdom: Plantae

Subkingdom: Tracheobionta

Superdivision: Spermatophyta

Order: Asterales

Family: Asteraceae

Tribe: Eupatorieae

Genus: *Stevia*

Species: *rebaudiana*

استویا گیاهی چندساله با سیستم ریشه‌ای منشعب فیبری و سطحی است. ریشه‌ها از سایر قسمت‌ها گل‌یکوزید کمتری دارند. ساقه‌های این گیاه افراشته، یک‌ساله، علفی تا نیمه چوبی و ترد و شکننده هستند. ساقه‌ها دارای کرک‌های بسیار ظریف می‌باشند (آذر پور و همکاران، ۱۳۹۲؛ اسماعیلی، ۱۳۹۴؛ قاهری و همکاران، ۱۳۹۴). گل‌آذین، خوشه‌های باز با گل‌های کوچک ۲۲ تا ۲۹ میلی‌متری به رنگ سفید هستند و دارای هر دو اندام نر و ماده می‌باشند (شکل ۱-۱). گل‌ها دارای پنج پرچم هستند که گرده‌های آن به شدت آلرژی‌زا می‌باشند (گتمولر و چینگ، ۱۹۹۹). گل‌های استویا خود ناسازگار بوده و احتمالاً توسط حشرات گرده‌افشانی می‌شوند (چالاپاتی و همکاران، ۱۹۹۷). میزان خودگشنی در استویا بین صفر تا نیم درصد گزارش شده است در حالی که میزان دگرگشنی بین ۰/۷ تا ۶۸/۷ درصد است که این مسئله وجود سیستم خود ناسازگاری را در این گیاه تأیید می‌کند (کاتایاما و همکاران، ۱۹۶۷؛ مایتی و پورهیت، ۲۰۰۸).

برگ‌های استویا کوچک و بیضی‌شکل، ساده و اغلب دندانه‌دار هستند و با آرایش متقابل روی ساقه قرار



شکل ۱-۱. تصویر گیاه استویا (flower-). <http://wildeherb.com/wp-content/uploads/2014/12/stevia->

closeup-300x179.jpg. 2018/06/18

دارند. برگ‌ها دارای کرک‌های سفیدرنگ سطحی هستند. این برگ‌ها نسبتاً فاقد دمبرگ یا دارای دمبرگی به طول ۳ تا ۴ میلی‌متر و طعم شیرین هستند. شکل برگ‌های استویا به‌طور گسترده بسته به شرایط

خاک، نوع آبیاری، کیفیت نور خورشید، آب‌وهوای منطقه متغیر است (آذر پور و همکاران، ۱۳۹۲؛ مایتی و پوروهیت، ۱۹۷۶).

بذرها یا میوه‌های استویا درون فندقه‌های باریک استوانه‌ای-دوکی به طول ۳ میلی‌متر قرار می‌گیرند (شکل ۱-۲). فندقه‌ها شیاردار (پنج شیار) است. بذرها به وسیله باد پخش می‌شوند (گوتمولر و شینگ، ۱۹۹۹)، دانه‌های بارور تیره‌رنگ و دانه‌های نابارور معمولاً رنگ‌پریده هستند (فیلیپ و لوکاس ۱۹۷۱؛ آذر پور و همکاران، ۱۳۹۲). قوه‌ی نامیه‌ی بذرهای استویا ضعیف بوده و از درصد جوانه‌زنی پایینی برخوردار هستند (لستر، ۱۹۹۹) و دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد برای جوانه زنی بذر مطلوب گزارش شده‌است (گوتمولر و شینگ، ۱۹۹۹).

گیاه بالغ حدود ۱۸۰-۶۵ سانتی‌متر ارتفاع دارد. این گیاه در خاک حاصلخیز و ترجیحاً شنی به خوبی رشد می‌کند. موقعیت گرم و آفتابی و آب‌وهوای نیمه گرمسیری-مرطوب با دمای بالای ۴۳-۲۱ درجه سانتی‌گراد با میانگین دمای سالانه‌ی ۲۴ درجه سانتی‌گراد (هاکسلی، ۱۹۲۲) و میانگین ۱۳۷۵ میلی‌متر بارندگی (شاک، ۱۹۸۲؛ سومیدا، ۱۹۷۳) در سال رشد می‌کند. استویا گیاهی روزکوتاه است و آغاز گل-دهی آن در نیم‌کره جنوبی در ماه‌های ژانویه تا مارس برابر با ماه‌های سپتامبر تا دسامبر در نیم‌کره شمالی رخ می‌دهد (رامش و همکاران، ۲۰۰۶؛ جانا سکزلاپور و همکاران، ۲۰۱۳).

واریته‌های مختلف استویا تنوع زیادی در واکنش به طول روز، از ۱ تا ۲۴ ساعت نشان می‌دهند (چاپالاتی و همکاران، ۱۹۹۷). در ایران این گیاه در ماه اردیبهشت تا خرداد کشت می‌شود. برداشت برگ‌های استویا معمولاً در ماه میلادی اوت مصادف با مرداد ماه آغاز و پیش از اولین یخ‌زدگی به پایان می‌رسد. محتوای استویوزایدی که منبع اصلی شیرینی در برگ‌های استویا است قبل از گلدهی گیاه به حداکثری می‌رسد (براندل و همکاران، ۱۹۹۲). بر این اساس، میزان محصول برداشتی به‌طور سالانه حدود ۱۲-۱۴ تن در هکتار در برداشت اول تا حدود ۲-۳ تن در هکتار در اواخر پائیز است. تنها برگ‌های سبز و سالم استویا

دارای مواد خام اولیه مناسب برای پردازش محصولات مختلف به میزان بیشتر هستند. تولید گیاه از طریق بذر، نشاکاری، قلمه، کشت بافت انجام می‌شود.



شکل ۱-۲. تصویری از بذرهای گیاه استویا (<http://wildeherb.com/wp-content/uploads/2014/12/stevia-flower-closeup-300x179.jpg>)
2018/06/10

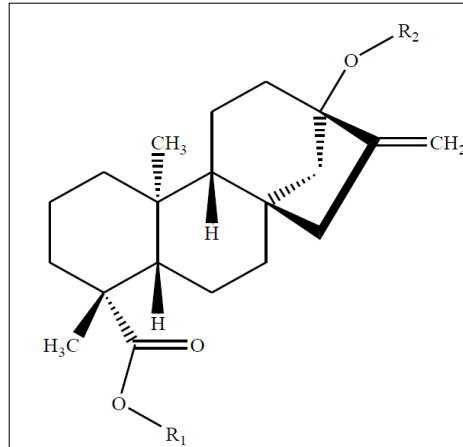
۲-۱. اهمیت استویا

۱-۲-۱. ترکیب‌های شیمیایی اصلی

ترکیبات شیرین‌کننده‌ی استویا تحت عنوان گلیکوزیدهای استویول^۱ نامیده می‌شود و دامنه غلظت گلیکوزیدهای استویول با توجه به ژنوتیپ و شرایط رشدی ۴ تا ۲۰ درصد وزن خشک برگ‌ها را تشکیل می‌دهد (کنلی، ۲۰۰۲؛ استارات و همکاران، ۲۰۱۲). تاکنون بیش از ۳۵ گلیکوزید استویول در استویا ریئودیانا شناسایی شده است (کئون و جئونس، ۲۰۱۳؛ اسپینوزا و همکاران، ۲۰۱۴). استویا ریئودیانا و استویا فلبوفیلا از خانواده کاسنی و تنها گونه‌ی غیر استویا رویوس چینگی از خانواده‌ی رزاسه تنها گونه‌های تولید کننده‌ی گلیکوزیدهای استویول می‌باشند (تاناکا و همکاران، ۱۹۸۱). مهمترین گلیکوزیدهای استویول موجود در شیره‌ی استخراجی از گیاه استویا که در نهایت قند استویا را تشکیل

۱. Steviol glycosides (SG)

می دهند عبارتند از: ، استویوزاید (بر تونی، ۱۹۰۵؛ ۱۹۱۸)، ربائودیوزاید A, B, C, F، استویول مونوزاید^۱، استویول بیوزاید^۲ و دولکوزاید A^۳ (جنونس، ۲۰۰۳). علاوه بر ترکیبات فوق ربائودیوزاید Q, I, M, D, E, G (1,3-stevioside) سایر گلیکوزیدهای استویول موجود در برگ های استویا می باشند که مسیر تولید آنها شناسایی شده است و حدود ۰/۴-۰/۵ درصد از وزن برگ خشک استویا را شامل می شوند (اوسلان و همکاران، ۲۰۱۶). این ترکیبات مشتقات گلیکوزیده شده ی استویول تتراسایکلیک دی ترپن هستند (شکل ۱-۳) و به وسیله ی مسیر بیوسنتز گلیکوزیدهای استویول در سیتوزول برگ استویا سنتز می شوند. فرمول ساختاری گلیکوزیدهای استویول و مقایسه شیرینی آنها با ساکاروز مورد مطالعه قرار گرفت (کرامر و ایکان، ۱۹۸۶؛ جنونس، ۲۰۰۳). این ترکیبات در ساختار شیمیایی خود دارای یک اسکلت شیمیایی یکسان از ترکیب استویول هستند و تفاوت در گروه های جانبی R₁ و R₂ متصل به کربن در موقعیت ۱۳ و ۱۹ این ترکیب باعث ایجاد انواع گلیکوزیدهای استویول و تنوع در پتانسیل شیرین کنندگی هر یک از



شکل ۱-۳. ساختمان کلی گلیکوزیدهای استویا. R₁ و R₂ ترکیباتی منشعب از گلوکز یا سایر قندهای منوساکاریدی که منجر به تولید انواع گلیکوزیدهای استویول و تنوع در پتانسیل شیرین کنندگی هر یک از گلیکوزیدها می گردد.

۱. Steviolmonoside
۲. Steviolbioside
۳. Dulcoside A

گلیکوزیدها می‌شود. فرمول شیمیایی استویوزاید و سایر گلیکوزایدهای استویا در جدول ۱-۱ گردآوری شد.

جدول ۱-۱- فرمول شیمیایی استویوزاید و مشتقات مربوط با آن و مقایسه شیرینی این ترکیبات در مقایسه با محلول ۴ درصدی شکر ساکاروز (کرامر و ایکان، ۱۹۸۶؛ جئونس، ۲۰۰۳)

| شدت شیرینی | گروه جانبی ۲ | گروه جانبی ۱ | فرمول شیمیایی | گلیکوزیدهای استویول |
|------------|--|---|---|---------------------|
| ۳۰۰ | $\beta\text{-Glc-}\beta\text{-Glc}(2\rightarrow 1)$ | $\beta\text{-Glc}$ | $\text{C}_{38}\text{H}_{60}\text{O}_{18}$ | استویوزاید |
| ۱۰۰-۱۲۵ | $\beta\text{-Glc-}\beta\text{-Glc}(2\rightarrow 1)$ | H | $\text{C}_{32}\text{H}_{50}\text{O}_{13}$ | استویول بیوزاید |
| ۲۵۰-۴۵۰ | $\beta\text{-Glc-}\beta\text{-Glc}(2\rightarrow 1)$ | $\beta\text{-Glc}$ | $\text{C}_{44}\text{H}_{70}\text{O}_{23}$ | ربائودیوزاید A |
| | | | | |
| ۳۰۰-۳۵۰ | $\beta\text{-Glc}(3\rightarrow 1)$ | H | $\text{C}_{38}\text{H}_{60}\text{O}_{18}$ | ربائودیوزاید B |
| | $\beta\text{-Glc-}\beta\text{-Glc}(2\rightarrow 1)$ | | | |
| | | | | |
| ۵۰-۱۵۰ | $\beta\text{-Glc}(3\rightarrow 1)$ | $\beta\text{-Glc}$ | $\text{C}_{44}\text{H}_{70}\text{O}_{22}$ | ربائودیوزاید C |
| | $\beta\text{-Glc-}\beta\text{-Glc}(2\rightarrow 1)$ | | | |
| | | | | |
| ۲۵۰-۴۵۰ | $\beta\text{-Glc-}\beta\text{-Glc}(2\rightarrow 1)$ | $\beta\text{-Glc-}\beta\text{-Glc}(2\rightarrow 1)$ | $\text{C}_{50}\text{H}_{80}\text{O}_{28}$ | ربائودیوزاید D |
| | $\beta\text{-Glc}(3\rightarrow 1)$ | | | |
| ۱۵۰-۳۰۰ | $\beta\text{-Glc-}\beta\text{-Glc}(2\rightarrow 1)$ | $\beta\text{-Glc-}\beta\text{-Glc}(2\rightarrow 1)$ | $\text{C}_{44}\text{H}_{70}\text{O}_{23}$ | ربائودیوزاید E |
| ۵۰-۱۲۰ | $\beta\text{-Glc-}\alpha\text{-Rha}(2\rightarrow 1)$ | $\beta\text{-Glc}$ | $\text{C}_{38}\text{H}_{60}\text{O}_{17}$ | دولکوزاید A |

glc = glucose; rha = rhamnose; xyl = xylose; H=hydrogen

بررسی‌های دانشمندان نشان می‌دهد که گروه‌های R_1 و R_2 ترکیباتی منشعب از گلوکز یا سایر قندهای منوساکاریدی می‌باشند (داکومی و همکاران، ۲۰۰۵). استویوزید (۵-۱۰ درصد از وزن برگ خشک)، ربودیوزاید A (۲-۴ درصد از وزن برگ خشک) و ربودیوزاید C (کمتر از ۲ درصد از وزن برگ خشک) از

اجزای اصلی قندهای استویول بوده که بیش از ۹۰ درصد کیفیت چشائی قندهای استویول را تشکیل می دهند (کینگهورن و سوئه جارتو، ۱۹۸۵؛ فیلیپس ۱۹۸۷).

۱-۲-۲. سایر ترکیبات مفید

ابوعرب و همکاران (۲۰۱۰) اعلام کردند که پس از استخراج متابولیت های ثانویه مانند استویوزید، برگ خشک شده منبعی ارزشمند از اسیدهای آمینه ضروری می باشد. علاوه بر این بالا بودن محتوای پروتئینی گیاه با قابلیت افزایش ظرفیت نگهداری آب آن را به عنصری مهم در صنعت غذایی تبدیل کرده است (ساویتا و همکاران، ۲۰۰۴). برگ های گیاه حاوی ترکیبات روغنی فرار، استرول ها، تری ترپنوئیدها، فلاوونوئیدها، کومارین و دی ترپن های غیر گلیکوزیدی هستند و الکل های آروماتیک و شش ترکیب دیگر با خاصیت متعادل سازی انسولین می باشد (مادان و همکاران، ۲۰۱۰؛ لمون مونداکا و همکاران، ۲۰۱۲). با استناد به متون نویسندگان دیگر، نتایج حاصل از آنالیزها در طی سال های ۲۰۰۶ تا ۲۰۱۱ در جدول ۱-۲ گردآوری شد. عصاره ی خام متانولی و عصاره استیل استات غنی از فلاونوئید می باشد که به علت خاصیت آنتی اکسیدانی از آسیب اکسیداتیو به DNA پیشگیری می کند (چانتا و همکاران، ۲۰۰۷).

۱-۳. ویژگی های پزشکی و درمانی گلیکوزیدهای استویا

برگ های استویا دارای درصد بالایی از قندهای دایترپنی است که بدن انسان قادر به شکستن این قندها نیست و در نتیجه این قندها جذب خون نمی شوند و تاثیری در میزان قند خون ندارند. در لوله ی گوارش، ریباودیوزاید ها به استویول ها متابولیزه می شوند. گلوکز آزاد شده در فرایند، به مصرف باکتری های راست روده می رسد و به جریان خون وارد نمی شود. استویول بیشتر از این دستخوش هضم نمی شود و از دستگاه گوارش خارج می گردد. این در حالی است که این قندها بر خلاف قندهای کم

جدول ۱-۲. محتوای شیمیایی و معدنی در برگ خشک استویا (بر حسب گرم در ۱۰۰ گرم برگ خشک).

| ترکیبات منبع | روی | منیزیم | آهن | پتاسیم | کلسیم | فیبر | چربی | پروتئین | کربوهیدرات |
|----------------------------|------|--------|------|--------|-------|------|------|---------|------------|
| تدهانی (۲۰۰۶) | ۶/۳۹ | - | ۳۶/۳ | ۲۱۵۰ | ۱۵۵۰ | - | ۴/۳۴ | ۲۰/۴ | ۳۵/۲ |
| گویال و همکاران (۲۰۰۹) | ۱/۵ | ۳۴۹ | ۳/۹ | ۱۷۸۰ | ۵۴۴ | ۱۵/۲ | ۱/۹ | ۱۱/۲ | - |
| کاوشیک و همکاران (۲۰۱۰) | - | - | ۳۱/۱ | ۸۳۹ | ۷۲۲ | - | ۲/۷ | ۱۲ | - |
| میشرا و همکاران (۲۰۱۰) | ۱/۵ | ۳۴۹ | ۵۵/۳ | ۱۸۰۰ | ۴۶۴/۴ | ۱۸ | ۳ | ۱۰ | ۵۲ |
| سریو (۲۰۱۰) | - | ۵۰۰ | ۳/۹ | ۱۸۰۰ | ۶۰۰ | ۱۵ | ۵/۶ | ۱۱/۲ | ۵۳ |
| ابوعرب و همکاران (۲۰۱۰) | ۱/۲۶ | ۳/۲۶ | ۵/۸۹ | ۲۱/۱۵ | ۱۷/۷ | ۱۵/۵ | ۳/۷۳ | ۱۱/۴ | ۶۱/۹ |
| آته و همکاران (۲۰۱۱) | ۲۰ | ۲/۴ | ۳۶۶ | ۱۷/۳ | ۸/۲ | ۶/۸ | ۲/۶ | ۱۶ | - |

کالری مصنوعی (شیمیایی)، کاملاً بی خطر، غیر سمی و غیر جهش‌زا هستند و بدون داشتن کالری بیش از ۳۰۰ بارشیرین‌تر از ساکاروز (شکر معمولی) هستند. با جایگزینی قند برگ گیاه استویا به جای قند نیشکر و چغندر قند، می‌توان از بروز انواع بیماری‌های ناشی از مصرف قند به ویژه دیابت نوع II پیشگیری کرد. استویوزید در حفظ سطح قند خون، با افزایش مصرف گلوکز موثر گزارش شده است. همچنین استویوزید با کاهش بیان ژن کدکننده‌ی آنزیم فسفوانول پیروات کربوکسیلاز (PEPCK)، آنزیم تنظیم‌کننده‌ی فرآیند گلوکونئوژنز و اختلال در فرآیند گلوکوژنز تولید گلوکز را کاهش می‌دهد. اما هر دو این فرآیندها وابسته به دُز استویوزید هستند (چن و همکاران، ۲۰۰۵). گلیکوزیدهای استویول با عمل مستقیم روی سلول‌های پانکراس، بدون تغییر فعالیت کانال k^+_{ATP} و سطح AMP ترشح انسولین را

افزایش می‌دهند (کوری و همکاران، ۱۹۸۶؛ مگجی و همکاران، ۲۰۰۵؛ قاهری، ۱۳۹۴). در این راستا، نقش استویوزید مورد مطالعه قرار گرفت و مشاهده شد که نه تنها مصرف قند استویا ترشح سلول‌های آلفا ایجاد شده توسط اسیدهای چرب را متعادل می‌سازد بلکه اغلب فعالیت ژن‌های متابولیسم اسیدچرب‌ها را که شامل اکسیداسیون و تبدیل و انهدام ژن است را تنظیم می‌کند، در نتیجه به‌عنوان یک عامل ضد دیابت بسیار قوی پیشنهاد شد (هانگ و همکاران، ۲۰۰۶).

یکی از جنبه‌های منفی مصرف شکر معمولی مربوط به نقش آن در رشد میکروارگانیسم‌ها در دهان و فساد و صدمه به دندان‌ها به‌خصوص در کودکان است. به‌منظور حفظ سلامت دهان و دندان، استفاده از شیرین‌کننده‌های طبیعی بهترین راهکار است. آزمایش‌ها مشخص کرد که شکر استویا قابل‌استفاده و تخمیر شدن توسط میکروارگانیسم‌ها نیست (جنونس، ۲۰۰۳). هم‌چنین آزمایشی در زمینه‌ی مقایسه‌ی درجه پوسیدگی دندان در اثر مصرف یک گروه ساکاروزی و گروه شیرین‌کننده‌ی استویا روی حیوانات انجام گرفت. در نتیجه‌ی این آزمایش عصاره استویوزیدی استویا توانایی بالاتر در کاهش رشد باکتری را دارد (ماتسوکوب و تاکازو، ۲۰۰۶).

استویول و آنالوگ‌های آن براساس نقش خود برای درمان عفونت‌های اسهالی بررسی شدند. در نتیجه‌ی این تحقیقات استویول و آنالوگ‌های مختلف آن به‌طور موثر برای مهار سیستمیک فیبروز (CFTR) گزارش شدند؛ دی‌هیدرواستویول^۱ برای مهار این تنظیم‌کننده‌ها از طریق هدف قرار دادن کانال‌های کلر مورد استفاده قرار گرفتند و از دست رفتن مایع روده را کاهش داد (چاتسوتیپانگ و موآن پراسات، ۲۰۰۹). در چین و برزیل چای استویا به‌عنوان محرک اشتها و کنترل‌کننده‌ی وزن و هضم‌کننده‌ی غذا استفاده می‌شود (سینگ و روآ، ۲۰۰۵).

ایزواستویول در برابر آسیب میوکارد ناشی از ischemia-reperfusion موثر شناخته شده است. به این صورت که Ischemia-reperfusion با کاهش عملکرد Systolic-diastolic بطن چپ قلب، فعالیت آنزیم‌های لاکتات دهیدروژناز و کراتین کیناز را در جریان عروق سرخرگی افزایش می‌دهد و سبب تغییرات هیستوپاتولوژیک در میوکارد و میتوکندری می‌شوند. نتیجه های ناشی از مطالعات آزمایشگاهی در این رابطه، نشان دهنده‌ی توانایی ایزواستویول در تضعیف این تغییرات پاتولوژیک بوده است (ژانگ و زئو، ۲۰۰۴-۲۰۰۶).

استفاده از استویا می‌تواند میل به خوردن غذاهای چرب را کاهش دهد. کنترل اشتها از دیگر عوامل تاثیر گذار استویا است (تایلر، ۲۰۰۵). برخی افراد معتقدند که مصرف استویا ۱۵ تا ۲۰ دقیقه پیش از وعده غذایی میزان گرسنگی آن‌ها را کاهش می‌دهد. در خوراکی‌هایی با کالری و چربی زیاد مانند ماست و سس سویا (امزد و همکاران، ۲۰۱۰)، آب نبات و غذاهای دریایی (گویال و همکاران، ۲۰۱۰)، ترشی‌ها (کویاما و همکاران، ۲۰۰۳) پاستیل و شیرینی‌ها، عامل اصلی چاقی هستند. استفاده از استویا به عنوان شیرین کننده در این قبیل محصولات و یا به عنوان یک نوشیدنی و میان وعده‌ی شیرین می‌تواند باعث کاهش وزن و یا کنترل افزایش وزن شود.

در یک مطالعه ضد توموری، استویوزاید رشد تومور TPAinduct در سرطان پوست موش را کند کرده است (ناکامورا و همکاران، ۱۹۹۵). همچنین گلیکوزیدهای استویول برای درمان بیماری‌ها و جراحات پوستی، اگزمای پوستی، آماس پوست و بریدگی‌های کوچک و مهار التهاب پوستی ناشی از 12-O- tetra-decanoylphorbol-13-acetate استفاده شده است (یاسوکاوا و همکاران، ۲۰۰۲). عصاره برگ‌های استویا حاوی مواد ضدتوموی هستند. ترکیبات استویوزاید، آگلیکون‌ها، استویول و ایزواستویول و متابولیت‌های آن‌ها و مواد پلی فنولیک در برگ استویا، از رشد تومور جلوگیری می‌کنند (اکیهیسا و همکاران، ۲۰۰۴). همچنین اثبات فعالیت ضد میکروبی و ضد قارچی در عصاره‌ی برگ استویا توسط

بونکوان و همکاران (۲۰۰۶) و تحدانی و همکاران (۲۰۰۷) به اثبات رسیده است (تدهانی و سوبه‌اش، ۲۰۰۷).

۱-۴. مزایا و معایب استویوزاید نسبت به سایر شیرین‌کننده‌ها

از نظر سرعت بروز و رسیدن به حداکثر طعم شیرین پس از قرار گرفتن ماده شیرین‌کننده در دهان، شکر استویا حالتی نزدیک به ساکاروز دارد و در مقایسه با شیرین‌کننده‌هایی مانند گلیسیپریزین شیرین‌ترین بیان در زمان کوتاه‌تری حداکثر شدت شیرینی خود را بروز می‌دهد. بالابودن شدت شیرینی شکر سبب می‌شود که با مصرف اندکی از آن در غذا، شیرینی قابل قبولی حاصل شود، در نتیجه مقدار مصرف ماده شیرین‌کننده مذکور کم شده و فضای کمتری جهت انبارداری نیاز دارد که از نظر اقتصادی با صرفه است. این شیرین‌کننده از پایداری مناسبی در محلول‌های اسیدی و بازی با توجه به دمای محیط برخوردار است به طوری که استویوزید در pH حدود ۷ به مدت یک ساعت حرارت ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد پایدار است اما در pH کمتر از ۳ یا بالاتر از ۹، حرارت تا حدی آن را تجزیه می‌کند و موادی مانند گلوکز و استویول ایجاد می‌شود (کینگهورم و سوئه جارتو، ۱۹۸۵؛ ابوعرب و همکاران، ۲۰۱۰). شکر استویای تجاری با غلظت یک درصد یا کمتر از حلالیت بالایی در ترکیبات با پایه‌ی آب و الکی برخوردار است اما در بنزن و کلروفرم و دیگر حلال‌های غیرقطبی نامحلول است (آنونیموس، ۱۹۹۶).

حالت سمیت و داشتن اثر نامطلوب بر سلامتی انسان در مورد شکر استویا گزارش نشده است (هوتاپه‌آ و همکاران، ۱۹۹۹). برخلاف ساکاروز و قندهای حاصل از آن یعنی گلوکز و فروکتوز که از طریق فرآیند قهوه‌ای شدن سبب تغییر رنگ غذا می‌شوند، شکر استویا در شرایط عادی به ندرت چنین واکنشی را بروز می‌دهد و رنگ آن در پخت و پز تیره نمی‌شود و طعم و رنگ و مزه غذا را افزایش می‌دهد. استویوزاید با وزن مولکولی ۸۰۴ (آنونیموس، ۱۹۹۶) و سایر ترکیبات موجود در شکر استویا به علت خاصیت اسمزی کم مانع از ایجاد چروکیدگی در شوری‌ها و غذاهای کنسروی می‌شود.

نکته‌ی منفی در مورد طعم شکر استویا وجود دارد، شکر استویا با وجود قدرت شیرین‌کنندگی زیاد، پس از مصرف و چشیده شدن، کمی طعم تلخی را در دهان باقی می‌گذارد و گاهی تحت تاثیر سایر افزودنی‌های موجود در مواد غذایی این طعم تلخ تشدید می‌شود. تلخی استویوزاید به دو گیرنده‌ی طعم تلخ در دهان، hTAS2R4 و hTAS2R14 مرتبط دانسته شد (هلفریش و همکاران، ۲۰۱۲). حسگرهای مزه‌ی تلخ در زبان، با آگلیکون‌ها واکنش می‌دهند. الگوی گلیکوزیلاسیون استویول نقش بسیار مهمی در حفظ شیرینی و همچنین مزه استویوزاید دارد به طوری‌که انشعاب بیشتر زنجیره‌های قندی استویول سبب افزایش شیرینی است (پراکاش و همکاران، ۲۰۰۸) این در حالی است که استویوزاید در مقایسه با سایر گلیکوزیدهای استویول مانند Rebaudioside M که دارای ۶ مولکول گلوکز می‌باشد، دارای ۳ مولکول گلوکز در ساختار خود می‌باشد (بروخوف و همکاران، ۲۰۱۲). کاهش پیوند دوگانه‌ی اگزوسیکلک در موقعیت کربن ۱۳ به طور چشم‌گیری کاهش شیرینی را سبب می‌شود (هلفریش و همکاران، ۲۰۱۲). بر این اساس گلیکوزیدهای استویول دارای درجه‌های متفاوتی از شیرین‌کنندگی می‌باشند، استویوزاید از نظر میزان (داکومی و همکاران، ۲۰۰۵) و ربائودیوزاید A از نظر شیرینی (بهروزی و همکاران، ۲۰۱۳) بر بقیه ترکیبات غالب هستند اما تلخی پس از چشیدن در آن‌ها گزارش شده است. ربائودیوزاید C با جایگزینی رامنوز به جای گلوکز در کربن ۱۳، ۳۰ برابر شیرین‌تر از ساکاروز است. ربائودیوزاید D با ۵ گلیکوزیلاسیون و ربائودیوزاید M با ۶ گلیکوزیلاسیون در ساختار خود و ترکیبات مشتق شده از این ترکیبات ۳۵۰ برابر شیرین‌تر از ساکاروز می‌باشند در حالی‌که تلخی طولانی مدت آن‌ها کاهش یافته است (پراکاش و همکاران، ۲۰۱۴). به کمک آزمایش‌های چشایی در غلظت‌های بالا ربائودیوزاید D نسبت به سایر گلیکوزیدها به مراتب تلخی کمتری دارد (آلن و همکاران، ۲۰۱۳). از سوی دیگر ربائودیوزاید M با شدت شیرینی بالا، طعم مزه‌ی یکنواخت و کاهش قابل توجه تلخی پس از چشیدن در مقایسه با ربائودیوزاید A و سایر گلیکوزیدهای استویول مشخص شده است (پراکاش و همکاران، ۲۰۱۴). آنزیم UGT76G1 توسط اولسان و همکاران (۲۰۱۶) به منظور بهبود عملکرد در

تولید گلیکوزیدهای استویولی دلخواه در مخمر ساکارومایسس سرویزیه^۱ با تمرکز ویژه بر تولید Reb D و Reb M به دلیل شیرینی و خواص ارگانولپتیک آنها، جهش یافته بود. منابع هیدروکربن در نمو گیاه از جوانه زدن تا بلوغ، از اهمیت ویژه ای برخوردارند. در تحقیقی در سال ۹۶ اثر غلظت های مختلف منابع کربن (ساکارز، مالتوز و گلوکز در غلظت 50، ۱۰۰، ۱۵۰ میلی مولار) بر الگوی بیان ژن و تولید گلیکوزیدهای استویول و همچنین بررسی اثرات آن بر فاکتورهای رشدی استویا در شرایط کشت بافت مورد مطالعه قرار گرفت. بر اساس نتایج بدست آمده، تمام صفات مورفولوژیک اندازه گیری شده در گیاهان رشد یافته تحت تیمار ساکارز ۱۰۰ میلی مولار بیشترین مقدار خود را داشتند. با استفاده از روش RT-PCR بیشترین بیان ژن های کدکننده ی KS و UGT85C2، UGT76G1، UGT74G به ترتیب در محیط های حاوی مالتوز ۵۰، گلوکز ۵۰، مالتوز ۱۰۰، ساکاروز ۱۵۰ میلی مولار رخ داد. بیان ژن های مورد مطالعه در بافت کالوس نسبت به بافت برگ افزایش معنی داری نشان داد، در نتیجه کالوس رشد یافته از ریزنمونه ساقه استویا می توانند منبع خوبی برای به دست آوردن میزان قابل قبولی از گلیکوزیدهای استویول باشد. بیشترین میزان قند در تیمار مالتوز ۱۰۰ میلی مولار مشاهده شد. در نتیجه غلظت مالتوز ۱۰۰ میلی مولار به عنوان غلظت بهینه برای تولید استویوزاید و ربائودیوزاید گزارش شد (قربانی، ۱۳۹۶).

۱-۵. استحصال صنعتی قند استویا

در حال حاضر روش های متعددی جهت استخراج گلیکوزیدهای استویول توسط محققین با استفاده از تکنیک های مختلف مورد ارزیابی قرار گرفته است که شامل استخراج توسط سیستم های دوفازی آبی با کولین کلرید (بیک و همکاران، ۲۰۱۶)، استخراج فاز جامد (آندرادریا و همکاران، ۲۰۱۶)، استخراج به کمک ریزموج (اوزترک و همکاران، ۲۰۱۵)، ماسراسیون و استفاده از حلال های مختلف (لورنزو و

۱. *Saccharomyces cerevisiae*

همکاران، ۲۰۱۴)، استخراج به کمک امواج فراصوت (پوری و همکاران، ۲۰۱۳)، استخراج به کمک سیال فوق بحرانی (ارکوکوک و همکاران، ۲۰۰۹)، استخراج مایع تحت فشار (تئو و همکاران، ۲۰۰۹) استخراج به وسیله مایع داغ (پل و همکاران، ۲۰۰۷)، و روش تعویض یون (ویس و همکاران، ۲۰۰۱)، استخراج توسط غشای یونی (استریندر و همکاران، ۱۹۹۱)، استخراج به کمک آنزیم (فو و چیانگ، ۱۹۹۰) می‌باشد.

حداکثر محتوای گلیکوزیدها در برگ در طول تشکیل گل و پس از آن به تدریج کاهش می‌یابد پس بهترین زمان برداشت مناسب برای حداکثر استحصال قند از برگ‌ها قبل از گل‌دهی می‌باشد. پس از برداشت خشک کردن برگ‌ها در ۸۰-۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۸ ساعت به طور قابل توجه بر حفظ کیفیت شیرین کننده‌های استویا کمک می‌کند (زلابور و همکاران، ۲۰۱۳). برای استخراج شیرین کننده‌ها برگ خشک شده‌ی گیاه به فرآیند استخراج آبی وارد می‌شود. به طور اجمالی در روش‌های کلاسیک عمل عصاره‌گیری با افزودن آب و کلسیم روی برگ خشک شده به مدت ۲۰ ساعت در دمای معمولی محیط صورت می‌گیرد. مواد ته نشین شده عصاره‌ی حاصل در این مرحله می‌باشند. در چند مرحله به مواد ته نشین آب اضافه می‌شود و مجدد عصاره‌گیری می‌شود. در نهایت به عصاره مواد کمک صافی اضافه شده و از ستون تصفیه کننده عبور داده می‌شوند. عصاره‌ی تصفیه شده در مرحله بعد تحت خلاء و در دمای ۵۰-۴۶ درجه سانتی‌گراد تغلیظ می‌شود. در مرحله بعدی برای متبلورسازی (کریستالیزیشن) بر روی عصاره‌ی غلیظ الکل اضافه شده و به مدت ۲ ساعت در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شود. در نهایت برای افزایش تمیزی و خلوص کریستال‌های شیرین کننده‌ی به دست آمده توسط حلال‌ها (معمولاً اتانول یا متانول) مرحله به مرحله از یکدیگر جدا می‌شوند. فرآیند استخراج ترکیبات شیرین کننده از استویا به روش ستون‌های استخراج مایع - مایع در دماهای صفر تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد و خالص سازی با صافی‌های نانو و فرآیندهای غشایی چند مرحله‌ای با تغلیظ شیرین کننده‌های گلیکوزیدی توسط شورای ملی تحقیقات کانادا به کار گرفته شده

است. هم‌چنین ترکیبات تلخ مزه در فرآیند استخراج با غشای نانوفیلتراسیون از کنسانتره شیرین‌کننده شستشو داده شد که سبب بهبود ویژگی‌های طعمی قند استویا است (سهرابی، ۱۳۸۷). در تعدادی از فرآیندهای منتخب از جداسازی کروماتوگرافی بوسیله حلال‌های استخراج‌کننده استفاده می‌شود. استخراج شیرین‌کننده‌ها با روش اولتراسونیک توسط لیو و همکاران (۲۰۱۰) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج افزایش ۱/۵ برابری عملکرد استخراج را در مقایسه با روش‌های کلاسیک گزارش کرد و میزان رب‌آئودیوزاید A استخراج شده بیشتر از میزان استخراج شده‌ی این ترکیب در روش کلاسیک بود. هم‌چنین کوتسترا و هورمن (۲۰۱۷) به یک مقایسه علمی بین دو روش استخراج با آب اسیدی از استویا تازه برداشت شده و استخراج با آب داغ از گیاه خشک شده استویا بر اساس استانداردهای صنعتی پرداختند. بر اساس این مقایسه خلوص نهایی گلیکوزیدهای استویول استخراجی برای هر دو روش مشابه و قابل توجه می‌باشد به طوری که میزان استخراج در روش استخراج با آب اسیدی ۸۰/۶ درصد و در روش استخراج با آب داغ ۸۵/۴ درصد است.

۱-۶. مسیر بیوسنتز استویوزاید

بیوسنتز گلیکوزیدهای استویول در کلروپلاست برگ *Stevia rebaudiana* رخ می‌دهد اما هنوز تصویری کامل از چگونگی این مسیر مشخص نشده است. بافت‌های گیاهی بدون کلروفیل (ریشه و بخش‌های پائینی ساقه) فاقد و یا حاوی مقدار جزئی از گلیکوزیدهای استویول می‌باشند (براندل و همکاران، ۱۹۹۲؛ سینگ و روآ، ۲۰۰۵؛ براز و همکاران، ۲۰۱۱). بعد از گل‌دهی سطح گلوکز کاهش می‌یابد (پل و همکاران، ۲۰۰۷). مطالعه‌ی این مسیر به دلیل مطالعات کم در سطح ژنتیکی (ریچمن و همکاران، ۱۹۹۹) و ارتباط این مسیر با مسیر بیوسنتز جیبرلین (براندل و تلمر، ۲۰۰۷) که دارای نقش مهم در توسعه و رشد گیاه است، حائز اهمیت است. این مسیر زیرلایه‌ای از مسیر بیوسنتز 4-Methylerythritol-phosphate (MEP) می‌باشد که اغلب منجر به تولید جیبرلین می‌شود.

در مسیر بیوسنتزی گلیکوزیدهای استویول، پانزده ژن فعالیت دارند، که برخی ژن‌های اختصاصی این مسیر در گیاه استویا هستند. مسیر بیوسنتز گلیکوزیدهای استویول دارای ۵ مرحله‌ی اختصاصی می‌باشند.

در اولین مرحله با فعالیت آنزیم کائورونیک اسید هیدروکسیلاز^۱ موجود در غشای شبکه آندوپلاسمی مولکول کائورونیک اسید^۲ به عنوان پیش ماده در شبکه آندوپلاسمی هیدروکسیل شده و تولید استویول می‌کند (براندل و تلمر، ۲۰۰۷). آنزیم KAH یک هتروترمر ۳۹ کیلودالتونی از زیرواحدهای پروتئینی است که با فروکتوز بی‌فسفات آلدولاز (FBPA) با وزن مولکولی ۳۷ کیلودالتون شباهت دارد (کیم و همکاران، ۱۹۹۶؛ جنونس، ۲۰۰۳). فروکتوز بی‌فسفات آلدولاز آنزیم کلیدی در تحمل فروکتوز می‌باشد و نقص در عملکرد این آنزیم سبب بیماری عدم تحمل ارثی فروکتوز می‌شود.

استویول تولیدی به سیتوزول گیاهی وارد می‌شود. به طور کلی عمده فعالیت‌های این مسیر در سیتوزول برگ انجام می‌شوند (کومار یاداو و گولریا، ۲۰۱۲). چهار مرحله باقی مانده با فعالیت آنزیم‌های یوریدین-دی‌فسفات گلیکوزیل ترانسفراز^۳ کاتالیز می‌شود. آنزیم‌های UGT یک مولکول قندی را از اهداکننده فعال به یک مولکول پذیرنده انتقال می‌دهند. در واقع سلول‌ها به منظور تشکیل ساختارهای قندی پیچیده موجود در سطح خود، به آنزیم گلیکوزیل ترانسفراز وابسته هستند تا ساختارهای قندی تکی و واحد را به یکدیگر یا لیپید و پروتئین‌ها متصل کنند. مولکول‌های هیدروکسیل شده مثل قندها گیرنده هستند (وانگ و هو، ۲۰۰۹). این آنزیم‌ها برخلاف همولوگ خود در پستانداران که در غشای شبکه آندوپلاسمی حضور دارند، در گیاه در دستگاه گلژی یافت شده‌اند (آکنین و همکاران، ۲۰۰۵). به کمک

۱. Kauronoic acid hydroxylase (KAH)

۲. Kaurene acid

۳. Uridine DiPhosphate-glycosyltransferases (UGTs)

مطالعات GFP و رسوب سلولی و میکروسکوپی جایگاه سه آنزیم از چهار آنزیم گلیکوزیل ترانسفراز در دستگاه گلژی مشخص شده است (هومفری و همکاران، ۲۰۰۶).

در گام دوم در این مسیر، آنزیم UGT85C2 با افزودن یک مولکول گلوکز به کربن ۱۳ از مولکول استویول منجر به کاتالیز آن به استویول مونوزاید می‌شود. در سومین مرحله از مسیر، استویول مونوزاید به فرم استویول بیوزاید گلیکوزیده می‌شود. نقش عملکردی آنزیم UGT در این مرحله هنوز مشخص نشده است و در حال حاضر از طریق کلونینگ حدود ۶۵۰۰ شناسه توالی رونویسی شده^۱ برای ژن کننده‌ی این آنزیم تولید و ۹ کاندیدای ژنی برای کد کردن آنزیم UGT در مرحله سوم تعیین شده است. این ژن‌ها بر اساس شباهت توالی‌های ژنی با توالی سایر آنزیم‌های گلیکوزیل ترانسفراز انتخاب شده‌اند. در گام چهارم از مسیر بیوسنتز، تحت فعالیت آنزیم UGT74G1، با گلیکوزیل‌سیون کربن ۱۹ متعلق به گروه کربوکسیل استویول بیوزاید، استویوزاید سنتز می‌شود (ریچمن و همکاران، ۲۰۰۵) و در نهایت در نتیجه‌ی گلیکوزیل‌سیون کربن ۱۳ استویوزاید توسط آنزیم UGT76G1، ربائودیوزاید A تولید می‌شود. هم‌چنین طی آزمایشی ربائودیوزاید به‌عنوان یک سوبسترا انتخاب شد و در نتیجه آزمایش هیچ محصولی حاصل نشد و مشخص شد که تولید این محصول گام نهایی در مسیر بیوسنتز گلیکوزیدهای استویول می‌باشد (هومفری و همکاران، ۲۰۰۶). پس از کشف مسیر اصلی بیوسنتز گلیکوزیدهای استویول، با شناسایی و خالص‌سازی روبوزواید^۲ از استویا گزارش‌های جدید از احتمال دخالت این ترکیب در بیوسنتز گلیکوزیدهای استویول بیان شد و در نتیجه تجزیه و تحلیل‌های آزمایشگاهی شاخه‌های جانبی متفاوت در کنار مسیر اصلی برای بیوسنتز گلیکوزیدهای استویول معرفی شد. در نتیجه‌ی آزمایش اولسان و همکاران (۲۰۱۶) مشخص شد که محصول‌های Reb M و Reb D در مسیر خطی از استویول تشکیل نمی‌شوند.

۱. expressed sequence tags(ESTs)

۲. rubusoside

همانطور که در شکل ۱-۳ مشاهده می‌شود در اولین مسیر فرعی شناخته شده، آنزیم UGT74G1 استویول را به 19-O-β-glycopyranosyl steviol کاتالیز می‌کند. این ترکیب متعاقبا با فعالیت آنزیم UGT76G1 تولید استویوزاید و ربوزوزاید را افزایش می‌دهد، اما هنوز آنزیم‌های تنظیم کننده‌ی این عمل ناشناخته است. در دومین مسیر جانبی بیوسنتز گلیکوزیدها (شکل ۱-۳ مسیرها به صورت I و II نشان داده شده است) با اثر آنزیم UGT74G1 استویول مونوزاید در مسیر اصلی به ربوزوزاید تبدیل شده و متعاقب آن با فعالیت گلیکوزیلاسیون آنزیم UGT76G1 برای سوستر استویوزاید تولید می‌شود. نحوه‌ی متابولیزه شدن ربوزوزاید به استویوزاید و آنزیم‌های موثر در این عمل هنوز شناخته نشده است (ریچمن و همکاران، ۲۰۰۵). ربوزوزاید و 19-O-B-glycopyranosyl steviol متابولیت‌های حدواسط در مسیر جانبی سنتز گلیکوزیدهای استویول می‌باشند. با این حال جایگاه این دو در مسیر هنوز قطعی نشده است (اولسن و همکاران، ۲۰۱۶).

در نهایت گلیکوزیدهای استویول از سیتوزول به درون واکوئل تجمع می‌یابند، هرچند مکانیزم انتقال آن‌ها به درون واکوئل مشخص نشده است (براندل و تلمر، ۲۰۰۷). مسیرهای تردد درون سلولی برای فیتوکمیکال‌ها (مواد شیمیایی که فقط در گیاهان تولید می‌شوند) با وزن مولکولی کم به طور کلی ضعیف است اما شواهدی در رابطه با تردد این مولکول‌ها به صورت وابسته به وزیکول گزارش شده است (گرتولد، ۲۰۰۴)، برای مثال در سورگوم، آنتوسیانین‌های ضد قارچ در ساختارهای وزیکولی کوچک مشتق شده از غشای گلژی مشاهده شده‌اند که با واکوئل مرکزی ادغام می‌شوند (سیندر و نیکولاس، ۱۹۹۰). به منظور شناسایی مکانیسم حامل و شناسایی نوع انتقال دهنده درگیر در جذب گلیکوزیدهای استویول نیاز است که تجمع واکوئلی در استویا مورد بررسی قرار گیرد. براندل و تلمر (۲۰۰۷). ژن‌های کاندیدا به‌طور هترولوگ برای ارزیابی فعالیت و خصوصیات ناقلین در حال بررسی هستند.

به دلیل فقدان اطلاعات ژنومی از مسیرهای بیوسنتز گلیکوزیدهای استویول آزمایشی با هدف مطالعه-ی کامل‌تر و دقیق‌تر بر عملکرد و مکانیک مسیر بیوسنتز گلیکوزیدهای استویول توسط گولریا و یاداو

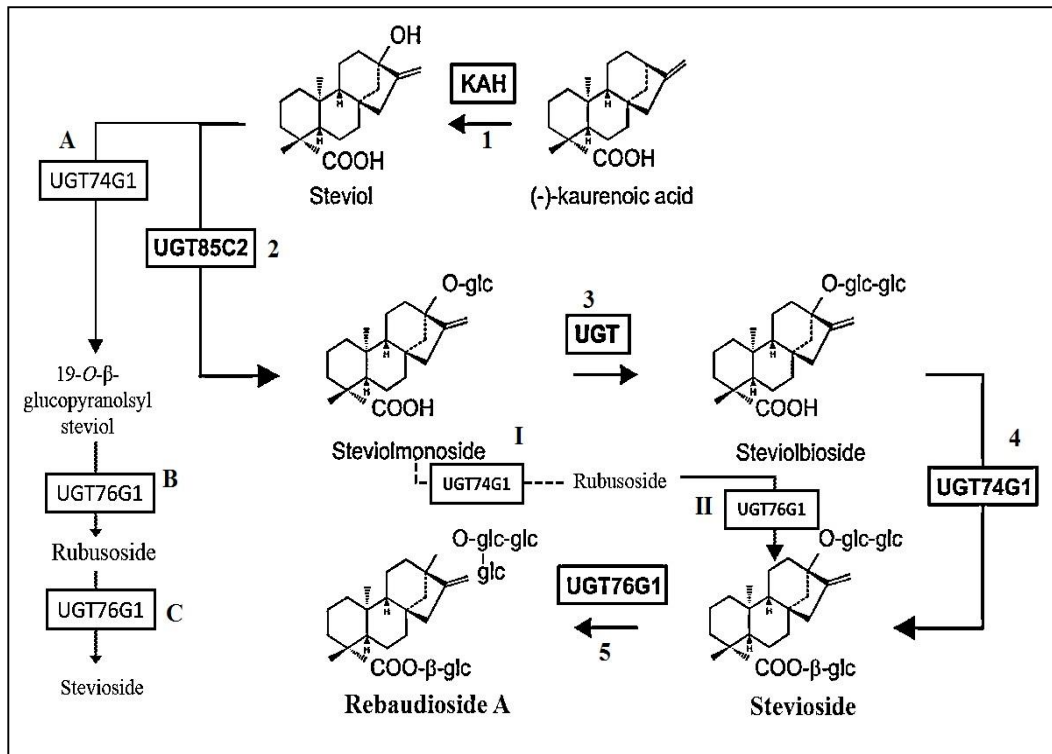
(۲۰۱۳) انجام گرفت، در این آزمایش از روش خاموش سازی موقت ژن بوسیله آگروباکتریم^۱ استفاده شد و طی آن ژن های *SrUGT76G1*، *SrUGT74G1*، *SrUGT85C2*، *SrKA13H* کد کننده ی آنزیم های *UGT76G1*، *UGT74G1*، *UGT85C2*، *KA13H* در مسیر بیوسنتز گلیکوزیدهای استویول خاموش شدند و تاثیر این آنزیم ها در میزان تجمع گلیکوزیدهای استویول بررسی شد. مهار آنزیم ها سبب کاهش سطح تجمع گلیکوزیدهای استویول شد. با این حال کاهش محتوای گلیکوزیدهای استویول با استفاده از روش خاموش سازی موقت ژن ها در مسیر بیشتر از ۶۰٪ گزارش نشد.

در شبکه گلیکوزیلاسیون گلیکوزیدهای استویول که منجر به تولید ربائودیوزاید D و M می گردد، *UGT76G1* آنزیمی چند عملکردی است که هشت واکنش مختلف را در این مسیر کاتالیز می کند که تنها چهار واکنش منجر به تولید ربائودیوزاید D و M می گردد. اولسان و همکاران (۲۰۱۶) با بهینه سازی هدفمند *UGT76G1* بر اساس شناسایی اسیدهای آمینه اصلی هدف در جایگاه سوبسترا، کاهش تجمع محصولات جانبی ناخواسته و افزایش انباشت ربائودیوزاید D و M را گزارش کردند.

آنزیم *UGT74G1* آنزیمی است که با گلیکوزیلاسیون گروه کربوکسیلیک اسید در کرین ۱۹ گلیکوزیدها منجر به شکل گیری یک استر می شود که پنج واکنش مختلف را در مسیر بیوسنتز گلیکوزیدهای استویا کاتالیز می کند که سه واکنش منجر به تولید استویوزاید می گرد و دو واکنش دیگر منجر به تولید محصولات جانبی ناخواسته می شود. در نتیجه با توجه به تلخی پس از چشیدن استویوزاید کاهش عملکرد آنزیم کلیدی *UGT74G1* که دارای نقش مهم در تولید استویوزاید است، کاهش تولید

۱. Agrobacterium Mediated Transient Gene Silencing (AMTS)

استویوزاید و افزایش تولید محصولات جانبی در کنار سایر گلیکوزیدها یک گام قابل توجه به سمت بهبود عملکرد طعم این قند است. خاموش سازی ژن یک روشی کارآمد و مفید برای بررسی عملکرد یا کاهش بیان یک ژن می‌باشد



شکل ۱-۴. مسیر اصلی و فرعی بیوسنتز گلیکوزیدهای استویول در *Stevia rebaudiana Bertoni*: در مسیر اصلی که شامل مراحل ۱، ۲، ۳، ۴، ۵ می‌باشد، پیش‌ماده این مسیر با نام کارئونیک اسید با فعالیت آنزیم KA13H به استویول تبدیل شد. استویول با فعالیت آنزیم‌های یوریدین-دی-فسفات گلیکوزیل ترانسفراز انواع گلیکوزیدهای استویول را تولید می‌کند. تولید استویوزاید در مرحله چهارم این مسیر با گلیکوزیل‌لاسیون کربن ۱۹ استویول بیوزاید توسط آنزیم UGT74G1 رخ می‌دهد. در شاخه‌ی جانبی بیوسنتز گلیکوزیدها دو مسیر وجود دارد در مسیر اول که شامل مراحل A، B، C است، در ابتدا آنزیم UGT74G1 با گلیکوزیل‌لاسیون استویول منجر به تولید 19-O-β-glycopyranosyl steviol شد. این ترکیب توسط آنزیم UGT76G1 به روبوزاید گلیکوزیل‌لاسه شده، و در مرحله C سوپسترای روبوزواید مجدد تحت آنزیم UGT76G1 به استویوزاید کاتالیز می‌شود. در دومین مسیر فرعی (شامل I، II است) استویول مونوزاید تولید شده در مسیر اصلی به‌عنوان پیش‌ماده مصرف می‌شود، این ترکیب توسط آنزیم UGT74G1 به روبوزاید کاتالیز می‌شود سپس با گلیکوزیل‌لاسیون روبوزواید توسط آنزیم UGT74G1 استویوزاید تولید می‌شود. اما هنوز آنزیم‌های تنظیم‌کننده‌ی این عمل شناخته‌نشده است. روبوزواید و 19-O-b-glycopyranosyl steviol متابولیت‌های حدواسط در مسیرهای جایگزین سنتز استویول گلیکوزیدها می‌باشند. با این حال جایگاهشان در مسیر هنوز قطعی نشده است. (کومار و همکاران، ۲۰۱۱؛ گولریا و یاداو، ۲۰۱۳)

۱-۷. خاموشی ژن

خاموشی ژن به پدیده کاهش یا توقف بیان یک ژن اطلاق می‌شود در واقع یک مکانیسم تنظیم بیان ژن و تدبیر دفاعی سلول‌های زنده علیه توالی‌های DNA پارازیت از قبیل ترانسپوزون‌ها و رتروترانسپوزون‌ها، رتروپوزون‌ها و توالی‌های DNA و RNA از ویروس‌ها می‌باشد. براساس مطالعات کووتر و همکاران (۱۹۹۴) خاموشی بسته به سطحی که در آن رخ می‌دهد به دو گروه خاموشی ژن در سطح رونویسی و خاموشی ژن در سطح پس از رونویسی تقسیم می‌شود. متیلاسیون DNA و خاموشی-سازی در سطح نسخه برداری بطور عمده مسئول حفظ تغییرات حاصل از جابه جایی‌ها می‌باشد. اما خاموشی‌سازی در سطح پس از نسخه برداری حفاظت اضافی را بر علیه ناپایداری ژنومی ایجاد شده توسط ترانسپوزون‌ها فراهم می‌کند.

۱-۷-۱. خاموشی ژن در سطح رونویسی

همه موجودات دارای ژن‌هایی می‌باشند که پس از ترجمه بیان می‌شوند و خصوصیات خاصی را به موجود می‌دهند. اما این ژن‌ها ممکن است به دلایل مختلفی بیان نشوند. برای مثال در دوران جنینی هزاران ژن با هدف ارتقاء تکامل جنینی رونویسی و بیان می‌شود، این ژن‌ها در همه سلول‌های بدن وجود دارد اما در بزرگسالان خاموش هستند (وایس، ۲۰۰۳).

خاموشی ژن در سطح مولکول DNA که موجب کاهش تولید RNA و یا عدم تولید آن می‌شود، خاموشی ژن در مرحله‌ی رونویسی نامیده می‌شود، عوامل ایجاد کننده این خاموشی عبارت از متیلاسیون ناحیه پروموتور DNA، فوق حساس شدن DNaseI و تغییر ساختار کروماتین است و این پدیده به علت قرارگیری DNA در هسته، در این مکان صورت می‌گیرد (مانداهار، ۱۹۹۹). در این نوع از خاموشی آنزیم‌های خاصی کروماتین را در محل‌های مشخص استیله، فسفریله و متیله می‌کنند و به این ترتیب کروماتین به یک ساختار گره‌وار و پیچ‌خورده کروماتینی تبدیل می‌شود به عبارت دیگر DNA اطراف پروتئین هیستونی قرار می‌گیرد و گروه‌های آمینی پروتئین‌های هیستونی در محل هتروکروماتین

داستیل^۱ می‌شوند در نهایت آنزیم RNA پلیمراز قادر به تشخیص آن نیست و رونویسی از آن مشکل می‌شود.

متیلاسیون DNA در نواحی خاص از DNA که بیشتر شامل توالی‌های CG در پروموتور هستند توسط آنزیم DNA متیل ترانسفراز صورت می‌گیرد (آگراوال و همکاران، ۲۰۰۳). اگر متیلاسیون در قسمت پروموتور ژن صورت گیرد، رونویسی از ژن انجام نمی‌شود اما اگر متیلاسیون در چهارچوب روخوانی باز ژن (ORF) صورت بگیرد در این حالت رونویسی از ژن انجام می‌گیرد اما در محل متیلاسیون و هتروکروماتین شدن DNA، ادامه فعالیت RNA پلیمراز متوقف می‌شود و RNA ناقص از سامانه‌ی رونویسی جدا شده که باعث فعال شدن سامانه RNA پلیمراز وابسته به RNA می‌شود و به تشکیل RNA دورشته‌ای می‌انجامد که به RNA نوکلئازها حساس است و در مراحل بعدی تجزیه می‌شود. مشخص شده است که این پدیده بیشتر در محل سنترومر و تلومر که نواحی با توالی نوکلئوتیدی تکرار شده است صورت می‌گیرد. به علت مشابهت بین این توالی‌های تکراری، DNA در این محل چین می‌خورد تا نواحی مشابه کنار هم قرار گیرند. در چنین شرایطی برای پایدار ماندن DNA، آنزیم‌های متیلاز باعث متیلاسیون سیتوزن در توالی‌های 5'-GC-3' و 5'-GNC-3' می‌شود. در نهایت DNA به شکل هتروکروماتین در می‌آید و غیر فعال می‌شود (مایر، ۱۹۹۵).

۱-۷-۲. خاموشی ژن در سطح پس از رونویسی

خاموشی پس از رونویسی در واقع فرآیند خاموشی RNA است و اولین بار در گیاهان کشف شد. در اواخر دهه‌ی ۱۹۸۰ دانشمندان با مطالعه گیاهان و قارچ‌ها دریافتند برهم‌کنش توالی‌های همولوگ DNA و RNA ممکن است منجر به خاموشی ژن‌ها شود.

۱. Deacetylated histones

فرآیند خاموشی ژن به طور اتفاقی برای اولین بار در سال ۱۹۹۰ در خلال تحقیقی برای تولید گل‌های اطلسی تراریخت کشف شد، در این آزمایش جاگانسون و ناپولی سعی داشتند با افزایش بیان ژن کدکننده‌ی آنزیم سنتز کننده‌ی چالکون سنتتاز (آنزیم کلیدی در تولید رنگدانه آنتوسیاتین) تحت یک پروموتور قوی، میزان رنگ ارغوانی گلبرگ‌های گیاه اطلسی^۱ را افزایش دهند. ولی به‌طور غیرمنتظره سطح بخش‌های سفید رنگ در گلبرگ‌ها افزایش یافت. این پدیده نشان دهنده‌ی بیان پایین و یا عدم بیان ژن داخلی و ترانسژن می‌باشد؛ اما مشاهده هسته‌های جداسازی شده حاکی از نسخه برداری خوب از ژن‌ها بود، بنابراین حدس زده شد که خاموشی آن‌ها باید در سطح پس از رونویسی اتفاق افتاده باشد و اصطلاح هم‌مهاری^۲ به معنای مهار هم زمان ترانسژن و ژن داخلی برای این پدیده بکار گرفته شد (جورجنس، ۱۹۹۰). بعدها مشخص شد در گیاه اطلسی تراریخت، وجود یک توالی مکمل بین ناحیه‌ای نزدیک به انتهای ۳' ژن *chsa* و ناحیه‌ی غیرترجمه‌شونده این mRNA باعث ایجاد ساختاری دو رشته‌ای و شروع روند خاموشی پس از رونویسی ژن شده است. در مطالعه‌ی ماکینو و رامونو (۱۹۹۲) بر روی قارچ *Neurospora crassa*، پدیده‌ی مشابهی در این قارچ مشاهده شد که پدیده مذکور فرونشانی^۳ نامیده شد. فایر و همکاران (۱۹۹۸) رشته‌ی سنس و آنتی‌سنس را به صورت همزمان به بدن نماتد *Caenorhabditis elegans* وارد کردند و مشاهده کردند اثر بازدارندگی نسبت به زمانی که هر رشته به صورت منفرد به بدن کرم وارد می‌شود به مراتب بیشتر است. ملو و فایر برای روشن کردن این احتمال به سرکوب ژن پلی‌گالاکتوروناز، مسئول رسیدن میوه گوجه فرنگی پرداختند. در این آزمایش رشته سنس و آنتی‌سنس را خالص سازی کرده و اثرات خاموش سازی آن‌ها بررسی شد که بیان داشت معرفی یا وارد کردن رشته‌های سنس و آنتی‌سنس خالص سازی شده در مقایسه با دو رشته‌ای RNA به میزان

۱. petunia

۲. Co-suppression

۳. Quelling

۱۰ تا ۱۰۰ اثرات مهاری کمتری نشان می‌دهند. برای اولین بار نام این پدیده، خاموشی ژن (RNAi) یا RNA مداخله‌گر گذاشته شد (فایر و همکاران، ۱۹۹۸؛ رانکین، ۲۰۱۵). پس از آن در سایر موجودات مانند مگس سرکه، متازوآ، پارامسیون، پستانداران و مهره‌داران، ماهی‌ها و تریپانوزوما بروسی هم دیده شد (گراوال و همکاران، ۲۰۰۳). این خاموشی در گیاهان با نام خاموشی در سطح پس از رونویسی، در قارچ‌ها با نام فرونشانی Quelling و در حیوانات به نام RNA مداخله‌گر یا RNAi (RNA interference) شناخته می‌شود که پدیده‌ای اپی‌ژنتیکی است و به صورت غیرقابل پیش‌بینی به ارث می‌رسد. سه نوع خاموشی RNA با مسیرهای متمایز در گیاهان و حیوانات گزارش شده است که عبارت از مسیر RNAهای کوچک تداخلی (siRNA)^۱، مسیرهای microRNA و مسیرهای متیلاسیون DNA است. مسیر RNAهای کوچک تداخلی به وسیله‌ی RNAهای دورشته‌ای القاء می‌شوند و در دفاع ضدویروسی و ترانسپوزونی نقش دارد. MicroRNAها کمی کوچکتر (۲۳ نوکلئوتیدی) هستند و با فعالیت نوکلئازی دایسر روی ساختارهای tRNA ایجاد می‌شوند و تنظیم موقتی بیان ژن‌ها را در گیاهان و حیوانات سبب می‌شود (وانگ و متزلاف، ۲۰۰۵) و مسیر متیلاسیون DNA راه سوم خاموشی ژن است.

عملکرد بسیار اختصاصی پدیده‌ی خاموشی ژن پس از رونویسی در خاموش کردن یک ژن خاص با توالی خاص، کارایی بسیار بالا، امکان انتقال خاموشی ژن به نسل بعد و قابلیت کاربرد در مراحل پیشرفته رشد هم‌چون سرطان، از جمله مزایای استفاده از این روش است (فایر و همکاران، ۱۹۹۸؛ فایر، ۲۰۰۷؛ یزدی و همکاران، ۲۰۰۹؛ رضوی و همکاران، ۲۰۱۲؛ ویتروپ و لیبرمن، ۲۰۱۵). از این پدیده برای تعیین عملکرد ژن یا مسیرهای شیمیایی (تیسکورنیا و همکاران، ۲۰۰۳)، درمان بیماری‌های ویروسی (رادکریشنان و همکاران، ۲۰۰۴)، سرطان و بیماری‌های عصبی (محمدی و همکاران، ۲۰۱۱)، و در کشاورزی برای تولید واریته‌های گیاهی مقاوم به بیماری‌ها (جئو و همکاران، ۲۰۱۵) و در حشره

۱. Small Interfering RNA

شناسی پزشکی به منظور خاموشی ژن‌های خاص در حشرات ناقل برای کنترل آن‌ها و کاهش مصرف سموم استفاده می‌شود (مارتینزو همکاران، ۲۰۱۲؛ دیوساتور و همکاران، ۲۰۱۳).

۱-۲-۷-۱. ترکیبات خاموشی ژن

برای شناخت اصول خاموشی ژن دانشمندان از روش‌های ژنتیکی و بیوشیمیایی استفاده کردند. مطالعات توالی‌یابی و غربالگری ژنتیکی در گیاه آرابیدوپسیس، جلبک کلامیدوموناس رینهاردی، قارچ نوروپورا و نماتود *C. elegans* جهش یافته موجب شناسایی و اثبات پروتئین‌ها و آنزیم‌های اساسی درگیر در فرآیند خاموشی ژن شد. برخی از این اجزاء فقط به عنوان آغازگر شناخته شدند در حالی که بقیه به عنوان تاثیر گذار، تکثیرکننده و انتقال شونده در سیستم خاموشی ژن عمل می‌کنند. برخی از عوامل شناخته شده در ادامه معرفی می‌شوند.

حضور مولکول‌های RNA دورشته‌ای^۱ بلند جهت شروع فرآیند تداخل RNA مهم و حیاتی می‌باشد. مولکول‌های dsRNA از طریق لوکوس‌های ژنی بازآرایی شده‌ی قابل رونویسی، نسخه‌برداری ژن‌های دارای پروموتورهای همگرا^۲، تزریق ترانسژن‌های با توالی تکراری معکوس^۳ که ابتدا در هسته‌ی سلول به صورت مولکول‌های RNA دورشته‌ای سنجاق سری^۴ نسخه برداری شده و پس از ورود به سیتوزول به dsRNA تبدیل می‌شوند، نسخه برداری از روی عناصر قابل انتقال هم‌چون ترانسپوزون‌ها، برخی ویروس‌های حاوی RNA و حتی حاوی DNA تامین می‌شوند.

RNAهای مداخله‌گر کوچک دورشته‌ای^۵ القاکننده‌ی اصلی PTGS است. توالی‌های ۲۱-۲۵ نوکلئوتیدی حاصل تجزیه RNAهای دورشته‌ای بلند هستند که در سیتوپلاسم تجمع می‌یابند. وجود این مولکول‌ها

-
۱. Double strand RNAs
 ۲. Converging promoters
 ۳. Inverted repeat transgenes
 ۴. Hairpin dsRNA
 ۵. small interfering RNA

اولین بار در گیاهان مشاهده شد. همیلتون (۱۹۹۹) با مطالعه بر روی ترانسژن های القاء کننده PTGS^۱ در گوجه فرنگی که با ژن *aco* تراریخت شده بودند، تجمع RNAهای کوچک از *aco* با طول ۲۵ نوکلوتید را مشاهده کرد. در این مطالعه RNAهای ۲۱ تا ۲۳ نوکلئوتیدی دارای همولوژی با ژن مذکور سنتز شده و به درون سلول وارد شدند که باعث شکستن mRNA مشابه گردید و نقش RNA کوچک مشخص شد. همچنین در مگس سرکه که در آن خاموشی ژن با انتقال دو رشته خارجی بلند القاء شده بود، شناسایی شد (آگراوال و همکاران، ۲۰۰۳). هر رشته از RNAهای کوچک تداخلی یک گروه فسفات در انتهای ۵' و یک گروه هیدروکسیل در انتهای ۳' و ۲ تا ۳ نوکلئوتید اضافی به صورت آویز (overhang) در انتهای ۳' دارد. خاموشی ژن بوسیلهی سنتز مصنوعی و انتقال RNAهای کوچک در بسیاری از گیاهان و بی مهرگان و برخی مهره داران دیده شده است (آگراوال و همکاران، ۲۰۰۳).

برن استین و همکاران (۲۰۰۱) آنزیمی شبه RNaseIII با توانایی تولید قطعات ۲۲ نوکلئوتیدی شبیه به محصولات تولید شده در RNAi را از مگس سرکه جداسازی کردند و ضرورت حضور و فعالیت این آنزیم را برای شروع RNAi اعلام کردند. مکانیسم عملکرد آنزیمی و اندونوکلازی دایسر اثبات شد (آرگاوال و همکاران، ۲۰۰۳؛ پیکفورد و کوجونی، ۲۰۰۳) و به علت توانایی برش RNAهای بلند دورشته‌ای به RNAهای کوچک دورشته‌ای کوچک و یکسان ۲۱ تا ۲۴ نوکلئوتیدی که RNAهای مداخله‌گر کوچک نامیده می‌شوند این آنزیم دایسر نامیده شده است. مطالعات کریستالوگرافی نشان دادند که این مولکول شبیه حرف L با سر، بدنه و پایه می‌باشد (شکل ۱-۴). در بخش سر دومائین PAZ قرار دارد، در بدنه ی مولکول دومائین RNase III (RNase IIIa و RNase IIIb) قرار دارد. دومائین هلیکاز با انتهای آمینی در پایه ی مولکول دایسر قرار می‌گیرد و آخرین دومائین دایسر، دومائین متصل شونده به dsRNA^۲ است.

۱. Post Transcriptional Gene Silencing

۲. dsRNA binding

کمپلکس القاکننده‌ی خاموشی (RISC)^۱ ترکیبی ریبوتوکلوپروتئینی با وزن ۵۰۰ کیلودالتون است. برخی از اجزای این کمپلکس عبارتند از پروتئین‌های متصل شونده به RNA که با اتصال به RNAهای کوچک تداخلی به واسطه‌ی رشته‌ی آنتی‌سنس آن به سمت توالی مشابه بر روی mRNA هدایت می‌شود و با بخش نوکلئازی خود منجر به تخریب mRNA هدف می‌گردد. پروتئین‌های درون غشایی (Transmembrane protein) بخشی از کمپلکس RISC را تشکیل می‌دهند که به عنوان گیرنده جهت انتشار سیستمیک RNAهای کوچک مداخله‌گر که سیگنال‌های خاموشی است، عمل می‌کنند. اجزای دقیق این کمپلکس به‌طور کامل شناخته نشده است اما برخی از اجزا شامل (۱) پروتئین‌های متصل شونده به RNA^۲، (۲) هلیکاز که سبب باز شدن دو رشته siRNA از هم می‌شود، (۳) RNA پلیمراز وابسته به RNA، (۴) پروتئین‌های درون غشایی^۳ که در انتشار سیستمیک سیگنال‌های خاموشی ژن که همان siRNA هستند از یک سلول به سلول دیگر نقش دارند، (۵) پروتئین‌های نوکلئازی تجزیه کننده‌ی RNA می‌باشند.

مولکول RNA پلیمراز وابسته به RNA^۴ نقشی مهم در تقویت خاموشی ژن و تکثیر RNA دورشته‌ای دارد. این آنزیم RNAهای کوتاه و mRNA را به‌عنوان الگو و رشته‌ی آنتی‌سنس از RNAهای کوچک دورشته را به‌عنوان پرایمر برگزیده، پس از ورود رشته آنتی‌سنس به مجموعه RNA پلیمراز وابسته به RNA با فعال شدن این مجموعه در حضور ATP، با فعالیت پلی‌مرازی روی مولکول mRNA مشابه باعث تکثیر mRNA دو رشته‌ای لازم برای تقویت فرآیند خاموشی می‌شود که به این رخداد اصطلاحاً واکنش هضمی زنجیره‌ای پلیمراز گفته می‌شود.

۱. RNA- Induced silencing complex

۲. RNA binding proteins

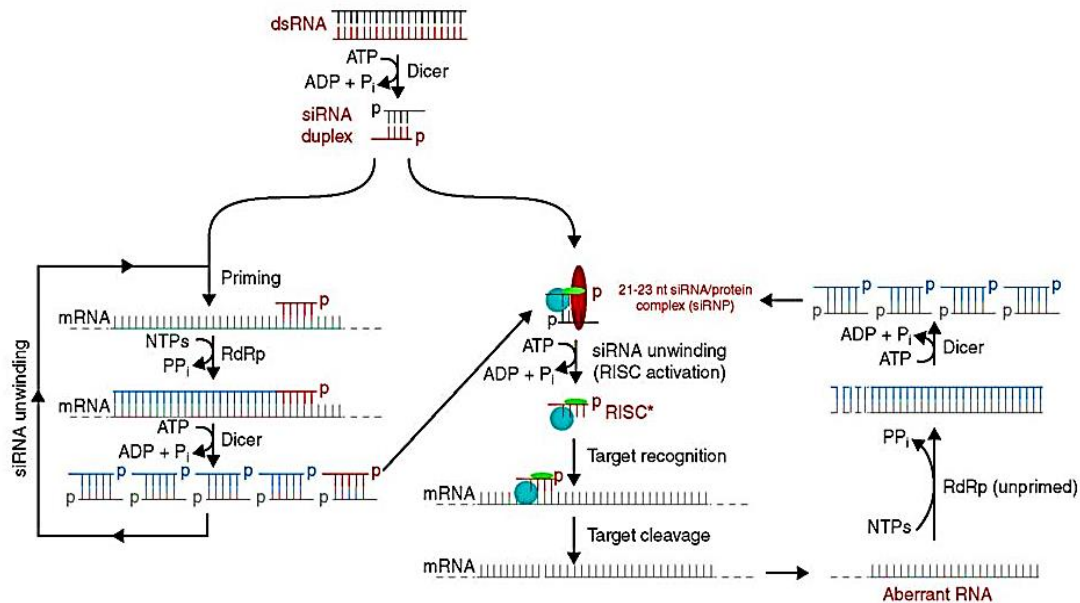
۳. Transmembrane proteins

۴. RNA dependent RNA polymerase

۱-۷-۲-۲. مکانیسم خاموشی پس از رونویسی ژن

همانطور که در شکل ۱-۴ مشاهده می‌شود، در اولین مرحله از این مکانیسم RNA های دورشته ای وارد شده توسط پروتئین هایی به نام Effector Protein شناسایی و با آنها باند می‌شوند. این عمل فعالیت آنزیم‌های دایسر را تسهیل می‌کند. مولکول دایسر با فعالیت اندونوکلازی خود RNA های دورشته‌ای بلند را به RNA های کوچک دورشته‌ای ۲۱ تا ۲۵ نوکلئوتیدی به نام RNA های کوچک داخلی تقسیم می‌کند و در مرحله بعد با قرارگیری مولکول‌های siRNA به‌عنوان سیگنال‌های خاموشی بر روی اجزای کمپلکس‌های القاکننده خاموشی باعث فعال شدن این کمپلکس می‌شود. در این هنگام پس از فعالیت هلیکازی کمپلکس و جداسدن دو رشته در نتیجه‌ی فعالیت کاتالیکی کمپلکس RISC توسط تعدادی از پروتئین‌های خانواده‌ی آرگونات، تنها یک رشته که مکمل رشته mRNA هدف می‌باشد بر روی RISC باقی می‌ماند که به این رشته اصطلاحاً رشته راهنما یا Antisense گفته می‌شود. عامل انتخاب و استفاده از رشته‌ی آنتی‌سنس در کمپلکس خاموش گر مشخص نشده است. رشته راهنما که مقاومت ترمودینامیکی انتهای ۵' آن کمتر است همراه با کمپلکس RISC باعث خاموشی mRNA هدف می‌شود (لوئیشنر و همکاران، ۲۰۰۷). این اتصال علاوه بر جلوگیری از ترجمه با ایجاد یک برش در ساختار mRNA در فاصله ۱۰ نوکلئوتیدی از انتهای ۵' مولکول siRNA متصل شده به mRNA توسط پروتئین‌های آرگونات موجود در کمپلکس RISC سبب می‌شود انتهای ۳' محافظت نشده که باعث ناپایداری ساختار mRNA و تجزیه آن می‌شود. توانایی برش mRNA در این کمپلکس به siRNP (small interfering ribonucleo protein) نسبت داده شده است. همزمان با آن رشته‌های آنتی‌سنس تک رشته جدا شده از کمپلکس RISC و mRNA تک رشته به عنوان پرایمر و الگو برای تکثیر دو رشته‌ای به کمک مجموعه RNA پلی‌مراز وابسته به RNA با مصرف ATP استفاده می‌شوند و این RNA دو رشته‌ای مجدد توسط دایسر تجزیه می‌شود.

همچنین در یک مسیر جانبی رشته mRNA شکسته شده با ورود به مجموعه‌ی RNA پلی‌مراز وابسته به RNA و سنتز رشته مکمل mRNA دو رشته می‌شود. این mRNA های دورشته‌ای وارد مسیر RNAi شده و توسط دایسر به siRNA تجزیه می‌شوند. مراحل کامل این فرآیند و پرایمر آن هنوز شناسایی نشده است. هر دو فرآیندها باعث تقویت خاموش سازی ژن می‌شوند. در گیاهان خاموشی به صورت



شکل ۱- ۵. تصویر فرآیند خاموشی پس از رونویسی از ژن. القاگر اصلی فرآیند مولکول RNA دو رشته‌ای است که سبب فعال شدن کمپلکس خاموشی می‌شود. در گام اول مولکول دایسر به RNA دورشته‌ای ترانسکریپت متصل و آن را به RNA های کوچک ۲۱ تا ۲۵ نوکلئوتیدی برش می‌دهد و در مرحله دوم رشته آنتی‌سنس (مکمل mRNA) ابه عنوان راهنما توسط پروتئین ساختاری آرگونات در کمپلکس RISC انتخاب و در این کمپلکس باقی می‌ماند و موجب اتصال رشته آنتی‌سنس به mRNA مکمل می‌شود و سپس توسط پروتئین‌های نوکلئازی موجود در این کمپلکس mRNA تجزیه و شکسته می‌شود. همزمان با آن رشته‌های آنتی‌سنس تک رشته جدا شده از کمپلکس RISC و همچنین mRNA شکسته شده یا تک رشته‌ی mRNA هدف به عنوان پرایمر و الگو برای تکثیر مکمل mRNA و ایجاد مجدد RNA دو رشته‌ای استفاده می‌شوند و این RNA دو رشته‌ای مجدد توسط دایسر تجزیه می‌شود و باعث تقویت فرآیند خاموشی می‌شود (هوتوانگر و دزآمور، ۲۰۰۲).

سیستمیک در سراسر گیاه انتقال می‌یابد. انتقال خاموشی از یک سلول به سلول دیگر از طریق پلاسمودسماتا و در نواحی دورتر توسط آوند آبکش انجام می‌گیرد. این خاموشی سیستمیک راهی دفاعی برای جلوگیری از پخش آلودگی ویروس از راه بافت آوندی گیاه است (ویسلی و همکاران، ۲۰۰۱). ثابت شده است که RNA های کوچک دورشته‌ای دارای نقش مهم‌تری در پخش سیگنال‌های

خاموشی هستند. این مولکول‌ها با اتصال به پروتئین‌های غشائی که از اجزای کمپلکس RISC است در میان پلاسمودسماتا و سوراخ‌های کوچک هسته و آوندها حرکت می‌کند (وایس، ۲۰۰۳) و سیگنال خاموشی از گیاه پایه به گیاه پیوندی منتقل می‌شود.

مشخصه عمومی PTGS در همه موجودات کاهش اختصاصی سطح mRNA ژن داخلی و ژن مشابه وارد شده می‌باشد. در واقع بیشتر پدیده های PTGS با استفاده از خاصیت کاهش فعالیت ژن داخلی شناسایی شده است. در این رخداد در صورت استفاده از سنس، رشته داخل ژنوم قرار می‌گیرد و پس از نسخه‌برداری رشته آنتی‌سنس مکمل mRNA را تولید می‌کند، اما در صورت استفاده از آنتی‌سنس این رشته مستقیماً با mRNA مکمل خود جفت می‌شود.

با مطالعه PTGS در گیاهان شواهدی بدست آمد که نشانگر نقش داشتن RNA های کوچک در فرایند RNAi بودند. همچنین بیان ساختارهای سنس و آنتی‌سنس با دو پروموتور متفاوت در یک گیاه باعث القای خاموشی پس از رونویسی با فراوانی زیاد می‌گردد. یکی از ساختارهایی که باعث ایجاد فراوانی بسیار بالایی در PTGS می‌شود، ساختارهای خود مکمل می‌باشد. این ساختارها از توالی ژن مورد نظر بصورت تکراری (سنس و آنتی سنس) با اینترون یا بدون اینترون تشکیل شده است که می‌تواند توسط پلاسمید به میزبان مورد نظر انتقال یابد.

تحقیقات نشان داده است که در ساختارهای خودمکمل، توالی‌هایی که در ناحیه سنجاق سری (hairpin -RNA) قرار می‌گیرند در خاموش کردن مستقیم ژن مورد نظر دخالت دارند و ژن‌های دارای توالی‌های همسان با توالی خود را خاموش می‌نمایند. با استفاده از سازه‌های حاوی ژن‌های گزارش‌گر محققان نشان دادند که تشکیل ساختمان دو رشته ای RNA به‌ویژه شکل سنجاق سری تحریک PTGS را ۶۰-۱۰۰٪ افزایش می‌دهد. از سوی دیگر جایگزینی توالی اینترونی به صورت حذفی حلقه‌ای بین دو بازوی سازه (رشته سنس و آنتی‌سنس) باعث افزایش عملکرد پدیده PTGS تا حدود ۱۰۰ درصد شد (وارشا و وسلی، ۲۰۰۱).

۱-۸. microRNA و نقش آن در خاموشی ژن

آنالیزهای اخیر ترانس کریپتوم نشان داده است که علاوه بر ژن‌های کد کننده پروتئین تعدادی RNA هم رونویسی می‌شود که هرگز به پروتئین ترجمه نمی‌شوند. مولکول‌های میکرو RNA یا همان miRNA گروه بزرگی از RNAهای کوچک تک رشته‌ای ۲۱-۲۲ نوکلئوتیدی هستند که هرگز به پروتئین ترجمه نمی‌شوند و در تنظیم موقتی بیان ژن‌های یوکاریوتی نقش دارند (وانگ و مترلاف، ۲۰۰۵). miRNA از اجزای کلیدی تنظیم بیان ژن در گیاهان و جانوران هستند که طی تکامل حفظ شده اند و تنظیم بیان ژن را در مرحله بعد از رونویسی انجام می‌دهند. تنظیم و کاهش بیان ژن توسط miRNA از طریق القای تجزیه mRNAهای هدف یا از طریق عدم ترجمه mRNA هدف انجام می‌گیرد. میکروRNA (miR) دارای کاربرهای متنوع می‌باشد. مکانیزم تشکیل این دسته از خاموش کننده‌ها اندکی پیچیده است. عملکرد این دسته از مولکول‌ها به صورت نسبی است. علاوه بر گیاهان، حیوانات و برخی از رده‌های ویروسی دارای ژن کدکننده miR هستند. مکانیزم عمل miRها با siRNA مقداری متفاوت است بدین صورت که این مولکول در برخی نواحی سبب ناپایدار شدن RNA میزبان می‌شود و با قرارگیری بر روی بخش polyA بر روی ناحیه تنظیمی تاثیر می‌گذارد. فرآیند miR دارای پروسه‌ی طولانی می‌باشد. بخشی از DNA مسئول ساخت microRNA است. در این روند هم انواع مختلفی آنزیم وجود دارد که در نهایت به RNA کامل و بالغ منجر خواهند شد. در گام نخست از DNA یک ساختار موسوم به premiR ساخته می‌شود که طی فرآیندی به ساختارهای سنجاق سری کوتاه (stem loop) مشابه با hairpin RNA دارای cap و polyA تبدیل می‌شود. سپس یک کمپلکس پروتئینی به نام کمپلکس پردازش میکروRNA میکروRNA اولیه را پردازش می‌کند. این کمپلکس دارای یک آنزیم نوکلئازی از خانواده RNaseIII به نام دورشا و یک پروتئین متصل شونده به RNA به نام پاشا است (لی، ۱۹۹۳). پس از پردازش محصول ایجاد شده طی مکانیزمی به وسیله‌ی پروتئین exportin5 از هسته خارج شده و وارد

سیتوپلاسم می‌شود. مولکول‌های miRNA بالغ در بخش‌هایی مکمل یک یا تعداد بیشتری mRNA هستند. در داخل سیتوپلاسم آنزیم دایسر سبب کوتاه شدن miR و قطع بخش حلقوی ابتدای آن می‌شود و محصول حاصل به صورت نسبی به کمپلکس القاگر خاموشی وابسته به miRNA^۱ اتصال پیدا می‌کند. تنها یک رشته از دو رشته microRNA بالغ توسط پروتئین آرگونات از پروتئین‌های ساختاری RISC به عنوان رشته راهنما انتخاب می‌شود و رشته miRNA راهنما به mRNA مکمل خود جفت می‌شود و منجر به تخریب mRNA توسط پروتئین‌های نوکلئازی آرگونات از اعضای فعال ترکیب RISC می‌شود.

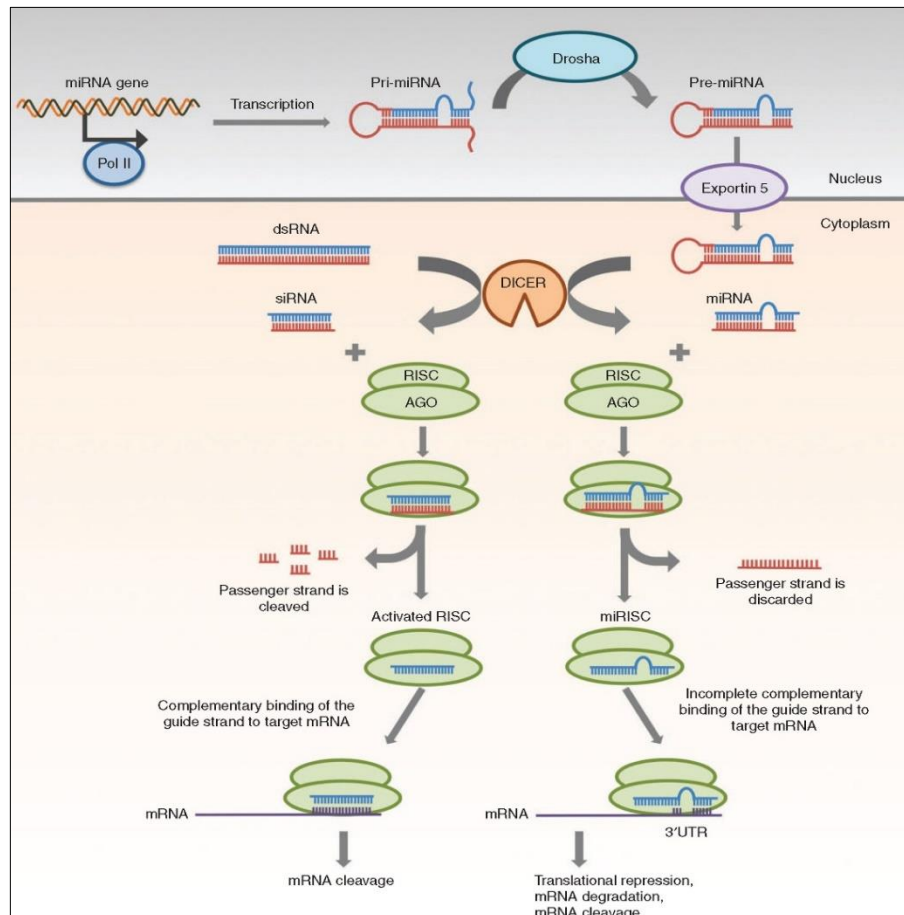
پروتئین آرگونات یک بخش کاتالیتیک از ترکیب RISC است که به قطعه‌های RNAهای مداخله‌گر کوچک متصل می‌شود و دارای فعالیت اندونوکلئازی بر روی mRNA مکمل با siRNA است. این پروتئین مسئول انتخاب رشته راهنما از RNAهای کوچک مداخله‌گر دو رشته است. مراحل شکل‌گیری و نحوه‌ی عمل microRNA و تفاوت مسیر خاموش‌سازی ژن توسط miRNA با siRNA در شکل ۱-۶ مشاهده می‌شود.

۱-۸-۱. تفاوت مسیر miRNA و siRNA

miRNA، RNA غیر کدکننده‌ای است که توسط ژن‌های خاص کد می‌شوند در حالی که برای siRNA هیچ ژن اختصاصی وجود ندارد و به جای آن با تجزیه‌ی یک RNA دورشته‌ای خارجی مثل RNA ویروسی تولید می‌شود و به فرم فعال ترانسپوزوم رونویسی شده و وارد ژنوم می‌شود. siRNA کاملاً مکمل mRNA هدف خود می‌باشد در حالی که miRNA نیاز به حداقل رابطه مکملی جهت شناسایی mRNA هدف خود دارند. miRNAها مولکول‌های RNA کوتاه هستند که با اتصال به 3'-UTR و مهار ترجمه باعث خاموش‌سازی بیان ژن می‌شود و نیاز به برقراری رابطه مکمل با mRNA هدف خود

۱. miRNA Induced Silencing Complex(miRISC)

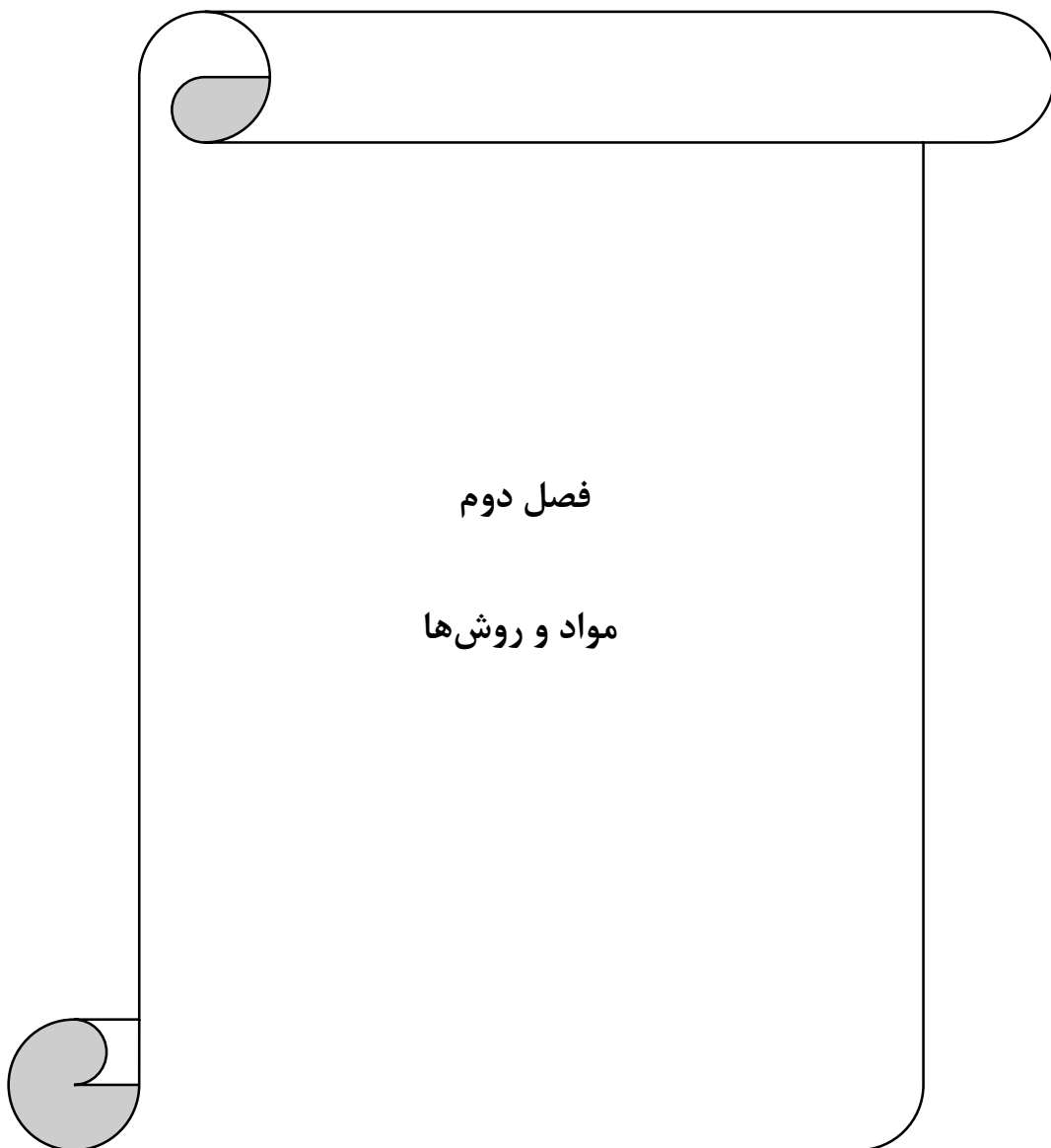
ندارند درحالی که در siRNA، رابطه مکملی بین mRNA و siRNA باعث هدایت به تجزیه شدن می شود. در هر دو این مسیرها تشکیل کمپلکس RISC ضروری است. miRNA ابتدا به صورت ساختار سنجاق سری رونویسی شده است و در بالغ شدن miRNAها کمپلکس دایسر شرکت دارند (دیوید بالکامب، ۲۰۰۴).



شکل ۱-۶. مکانیسم‌های خاموشی ژن siRNA و miRNA. در مسیر siRNA: RNA دورشته‌ای بلند بوسیله‌ی آنزیم دایسر به مولکول‌های RNA مداخله‌گر کوچک تقسیم می‌شوند که به درون کمپلکس RISC وارد می‌شود. آرگونوات از کمپلکس RISC با جدا کردن رشته‌ی سنس و انتخاب رشته راهنما باعث هدایت کمپلکس به سوی mRNA هدف می‌شود. اتصال کامل بین رشته راهنمای RNAهای کوچک مداخله‌گر و mRNA هدف منجر به برش mRNA می‌شود. در مسیر miRNA: رونویسی از ژن miRNA بوسیله‌ی پلی‌مراز II در هسته منجر به شکل‌گیری miRNA نابالغ اولیه می‌شود که توسط اکسپورتین ۵ به سیتوزول انتقال داده می‌شود و توسط دایسر به مولکول‌های miRNA پردازش می‌شود. پس از قرارگیری miRNA روی کمپلکس RISC به کمک پروتئین آرگونوات رشته‌ی غیر راهنما دور انداخته شده و miRISC بوسیله‌ی رشته‌ی راهنمای باقی مانده به رشته‌ی mRNA هدف به صورت نسبی متصل می‌شود. mRNA هدف از طریق سرکوب ترجمه، تضعیف یا برش مهار می‌شود (کی‌وی لام و همکاران، ۲۰۱۵).

۱-۹. هدف از طرح مورد نظر و ضرورت انجام آن

با توجه به جایگاه ویژه گیاه استویا در ابعاد کشاورزی و اقتصادی لزوم انجام اقدامات لازم برای افزایش کیفیت طعم و عملکرد این محصول توصیه می‌گردد. به منظور تحقق این هدف، کاهش عامل ایجاد کننده‌ی طعم تلخ پس از چشیدن قند گیاه استویا لازم است. از آنجایی که تا کنون هیچ تحقیق مولکولی با هدف کاهش تلخ‌کنندگی این قند انجام نگرفته است، خاموشی ژن می‌تواند گام مهمی در تحقق این هدف باشد. از طرف دیگر با توجه به توسعه روز افزون کشت استویا در کنار سایر محصولات کشاورزی، مطالعه و بررسی امکان بهبود کیفیت طعم شیرین قند استویا ضروری است. بنابراین هدف از این تحقیق، ساخت کاست خاموش‌گر RNAi برای ژن *srUGT74G1* کدکننده‌ی آنزیم کلیدی UGT74G1 در مسیر بیوسنتز استویوزاید است. تا در پژوهش‌های آتی میزان تجمع قندی و کیفیت چشائی قند بررسی شود. به نظر می‌رسد احتمالاً این فرآیند مسیری مهم برای خاموشی ژن مورد نظر و گامی مهم برای تولید گیاه استویا با انباشت کمتر استویوزاید با هدف بهبود کیفیت قند استویا باشد. این تحقیق می‌تواند به عنوان پیشرفتی در زمینه‌ی مطالعه‌ی مولکولی گیاه و مهم‌تر از آن بهبود کیفی و کمی قند استویا با قابلیت انجام در مقیاس بزرگ و صنعتی باشد.

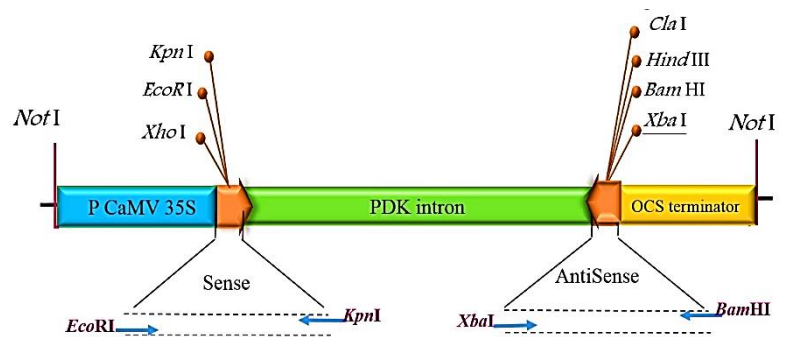


فصل دوم

مواد و روش‌ها

۲-۱. مطالعات بیوانفورماتیکی و طراحی آغازگرها

توالی کامل cDNA ژن کد کننده آنزیم UGT74G1 از NCBI به شماره دسترسی GenBank: AY345982.1 استخراج گردید. قطعه‌ای متناسب با هدف انتخاب شد و توالی منتخب ژن شامل بازهای ۸۵۰ تا ۹۵۹ به طول ۱۱۰ جفت باز بود. در ادامه ساخت سازه‌ی ژنی با استفاده از تکرار معکوس این قطعات به صورت هم‌جهت و مخالف جهت درون ناقل انجام شد. آغازگرهای طراحی شده برای تکثیر قطعه‌های سنس و آنتی‌سنس و همچنین اتصال آن‌ها به ناقل، به ترتیب شامل حدود ۱۹ نوکلئوتید از انتها یا ابتدای قطعه‌ی انتخاب شده و سایت آنزیم‌های برشی (تعیین کننده‌ی جهت و محل قرار گرفتن قطعه در ناقل است) و چهار باز برحسب نوع آنزیم برشی برای بیشترین کارایی آنزیم است. عدم حضور توالی‌هایی که موجب متیلاسیون جایگاه برش آنزیم برشی خواهد شد در نظر گرفته شد. برای تهیه‌ی سازه‌ی خاموش کننده از ناقل pHANNIBAL به شماره دسترسی GenBank: AJ311872.1 استفاده شد (شکل ۲-۱).



شکل ۲-۱. ناقل pHANNIBAL و موقعیت سایت‌های برشی روی آن.

روش Touchdown-nested PCR برای تکثیر دقیق و اختصاصی سازه‌ی ژنی مدنظر قرار گرفت، بدین منظور ابتدا یک جفت آغازگر برای طول کامل ژن تعریف گردید و سپس به منظور تکثیر قطعه ژن ۱۱۰ جفت نوکلئوتیدی انتخابی به عنوان رشته‌ی سنس به صورت هم‌سو در ناقل خاموش کننده‌ی pHANNIBAL (شکل ۲-۱)، سایت برشی آنزیم‌های *EcoRI* (آغازگر پیشرو) و *KpnI* (آغازگر پسرو) در انتهای ناحیه ۵' آغازگرها و همچنین جهت اتصال قطعه آنتی‌سنس به صورت معکوس و وارونه

(ناهم‌سو) در ناقل خاموش‌سازی، سایت برشی آنزیم *Xba1* (آغازگر پیشرو) و *BamHI* (آغازگر پسرو) در انتهای ناحیه ۵' طراحی و استفاده شدند (جدول ۱-۲). آغازگرها در سایت NEBcutter و نرم افزار SnappGene بررسی گردید و توسط شرکت بایونیر کره جنوبی سنتز شد.

جدول ۱-۲. ترادف آغازگرها و دمای اتصال

| آغازگر | آنزیم برشی | دمای اتصال (°C) | ترادف آغازگر ۵' → ۳' |
|------------------|---------------|--------------------------------|-------------------------------------|
| F _{AY} | - | ۶۱ | ATGGCGGAACAACAAAAGATCA AG |
| R _{AY} | - | ۶۱ | TTAAGCCTTAATTAGCTCACTTA CAAA |
| F _s | <i>EcoRI</i> | دمای اولیه: ۵۴ دمای دوم: ۵۷ | TCCGGAATTCCTGGTGAAACATG GACCCA |
| R _s | <i>KpnI</i> | دمای اولیه: ۵۴ دمای دوم: ۵۷ | ACGGGGTACCTCTGGGAGCTTTC CCTCTTCT |
| F _{ant} | <i>XbaI</i> | دمای اولیه: ۵۴ دمای دوم: ۵۷ | ATCCTCTAGATGGGAGCTTTCCC TCTTCT |
| R _{ant} | <i>BamHI</i> | دمای اولیه: ۵۴ دمای دوم: ۵۷ | TGCGGGATCCCTGGTGAAACATG GACCCGA |

زیر توالی سایت برشی آنزیم‌ها خط کشیده شده است. دمای اولیه، دمای اتصال آغازگر بدون لنگر و دمای دوم، دمای اتصال آغازگر با توالی لنگر می‌باشد.

۲-۲. مواد مورد استفاده در این پژوهش

در این پژوهش از گیاه *Stevia rebaudiana* موجود در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده مهندسی انرژی و فناوری‌های نوین، دانشگاه شهید بهشتی استفاده شد. در طی این تحقیق، محلول TRIzol™ Reagent، آنزیم لیگاز (T4 DNA Ligase)، بافر بارگذاری و نشانگرهای وزن مولکولی از شرکت ترموفیشر ساینتیفیک (والتام، آمریکا) خریداری شد. کیت Easy™ cDNA Synthesis Kit از شرکت پارس طوس (مشهد، ایران) مورد استفاده قرار گرفت. مستر میکس واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

(MasterMix ready to use 2X)، اتیدیوم بروماید، ایزوپروپیل *D-B* تیوگالاکتوپیرانوزید (IPTG)^۱ و محلول ۵- برم-۳-کلرو-اتیدولیل *D-B* گالاکتوزید (X-Gal)^۲ و حامل همسانه سازی pTG19-T ساخت شرکت ویوانتیس (مالزی) از شرکت سیناکلون (کرج، ایران) خریداری شد. کیت تخلیص محصول PCR از کمپانی GENE ALL (کره)، پودر آگارز، کلسیم کلرید (CaCl₂) و LB و آگار محصول شرکت مرک، آلمان تهیه شد. آنزیم‌های برشی *BamHI*, *XbaI*, *KpnI*, *EcoRI* محصول کمپانی جنا بیوساینس (آلمان) از شرکت تکاپوزیست (تهران) خریداری گردید. پلاسمید خاموشی pHANNIBAL از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری (کرج، ایران) و باکتری *E. coli* سویه‌ی DH5α از آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده مهندسی انرژی و فناوری‌های نوین دانشگاه شهید بهشتی فراهم آمد.

۲-۳. استخراج RNA از بافت برگ گیاه استویا ربائودیانا

جهت استخراج ۰/۱ گرم از بافت برگ گیاه با استفاده از هاون، در ازت مایع کاملاً کوبیده شد تا بافت برگ به صورت پودر سفید رنگی شود. پس از تبخیر ازت و پیش از گرم شدن بافت برگ کوبیده شده، ۱ ml از محصول ترايزول به برگ‌های کاملاً پودر شده اضافه شد و بافت در محلول به خوبی کوبیده شد. نمونه به درون ویال ۲ml منتقل و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. به هر تیوب ۱ ml ۰/۲ کلروفرم اضافه کرده و نمونه‌ها برای ۲ دقیقه در دمای محیط انکوبه شد. تیوب به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ °C با سرعت ۱۲۰۰۰xg سانتریفیوژ شد. بدون برهم زدن رسوب، مایع رویی به دست آمده که حاوی RNA است به آرامی به درون یک تیوب دیگر انتقال داده شد. ۰/۵ ml ایزوپروپانول سرد به فاز آبی افزوده شد و نمونه برای ۳۰ دقیقه درون فریزر -۲۰- انکوبه شد. سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ °C با سرعت ۱۲۰۰۰xg سانتریفیوژ شد. در این مرحله RNA کل به صورت یک رسوب ژل

۱. Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside

۲. 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-D-galactoside

مانند سفیدرنگ در انتهای تیوب ته‌نشین خواهد شد. فاز رویی دور ریخته شد و رسوب RNA با ۱ ml اتانول ۷۵٪ شستشو داده شد و به مدت ۱۰ دقیقه در $12000 \times g$ در دمای $4^{\circ}C$ سانتریفیوژ شد. فاز رویی نمونه دور ریخته شد و تیوب در دمای محیط به مدت ۵ دقیقه انکوبه شد تا رسوب RNA به‌طور نسبی خشک شود. در مرحله آخر به هر تیوب ۳۰ μl DEPS Water اضافه شد و رسوب RNA با چند ضربه بسیار آرام به‌طور کامل در آن حل شد.

۲-۳. بررسی کمیت و کیفیت RNA

۲-۳-۱. سنجش کمیت RNA با استفاده از روش‌های اسپکتروفوتومتری

تعیین غلظت توسط دستگاه نانودراپ امکان دقیق سنجش غلظت و کیفیت RNA استخراج‌شده را فراهم می‌کند. دستگاه نانودراپ یک اسپکتروفوتومتر با طیف نوری کامل (۶۵۰-۲۲۰ نانومتر) است. غلظت نمونه با تعیین جذب در طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر محاسبه گردید. محاسبه OD_{260}/OD_{280} بیانگر میزان خلوص RNA استخراج‌شده است. این نسبت باید بین ۱/۸ تا ۲ باشد، اگر بالاتر از ۲ باشد نشان‌دهنده‌ی آلودگی به DNA است. علاوه بر نسبت فوق، نسبت OD_{260}/OD_{230} نیز به عنوان معیاری جهت برآورد میزان آلودگی به پروتئین و املاح باقیمانده از پروتکل استخراج است چنانچه این نسبت کمتر از ۱/۸ به دست آید، احتمال وجود آلودگی با پروتئین و ترکیبات آروماتیک نظیر فنل وجود دارد. در این‌گونه موارد تخلیص دوباره نمونه توصیه می‌شود.

۲-۳-۲. سنجش کیفیت RNA استخراج‌شده با استفاده از الکتروفورز افقی روی ژل آگارز

۲-۳-۱. روش تهیه بافر (TBE (Tris-borate-EDTA

برای تهیه یک لیتر 1x TBE، $10/78$ گرم تریس‌بیس به همراه $0/74$ گرم اتیلن دی آمین تترا استیک و ارلن بر روی گرماساز قرار داده شد. بعد از حل شدن کامل مواد، $5/5$ گرم بوریک اسید در ۴۰۰

میلی لیتر آب دو بار تقطیر حل شد و به محتویات ارلن افزوده گردید تا ۱۰۰۰ میلی لیتر 1x TBE حاصل شود.

۲-۳-۲. آماده سازی ژل آگارز ۱/۶٪

به منظور مهار فعالیت RNaseها، تانک الکتروفورز به مدت ۳۰ دقیقه با محلول هیدروکسید پتاسیم (سود) ۰/۴N شستشو داده شد. ۱/۶ گرم از پودر آگارز توزین و در ۱۰۰ میلی لیتر از بافر 0.5x TBE با استفاده از حرارت حل شد. پس از مدتی کوتاه و سرد شدن محلول با افزودن اتیدیوم بروماید، مایع به درون قالب حاوی شانه ریخته شد. سپس بافر 0.5x TBE به مقداری که حدود ۲ میلی متر روی سطح ژل را بپوشاند، به درون تانک اضافه گردید. میزان ۳ μ l از RNA استخراجی همراه با ۱ μ l از بافر بارگذاری (ترکیبی متشکل از رنگ متیلن بلو، لیکوید گرین، زایلین سیانول، گلیسرول، تریس HCL، ساکاروز، EDTA که به منظور تسهیل در فرونشینی نمونه ها درون چاهک ها استفاده می شود) و به چاهک های ژل الکتروفورز اضافه شد. پس از ریختن نمونه ها در چاهک ها ولتاژی به اندازه ی ۱۰۰ ولت حدود ۴۵ دقیقه به ژل اعمال گردید. پس از اتمام زمان لازم، جریان الکتریکی قطع و ژل برای مشاهده ی باندها به دستگاه آشکارساز ترانسلومینومتر UV انتقال داده شد و توسط دستگاه تصویربردار ژل، عکس برداری انجام شد.

۲-۴. واکنش نسخه برداری معکوس

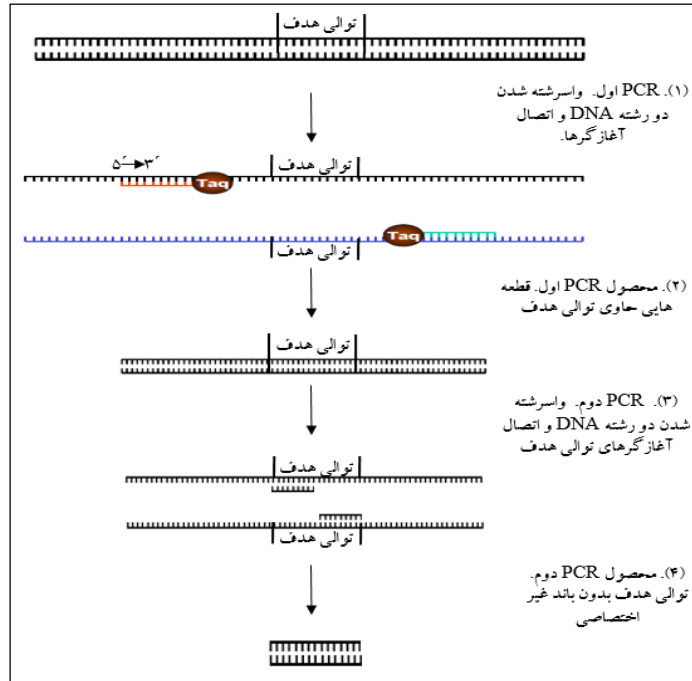
در این واکنش RNA به عنوان الگو به کمک آنزیم نسخه برداری معکوس^۱ منجر به تولید دی.ان.ای. مکمل (cDNA) می شود. این cDNA وارد سیکل های حرارتی PCR شده و تکثیر می گردد (سینگ، ۱۹۹۸). برای سنتز cDNA از کیت Easy™ cDNA Synthesis Kit استفاده شد. بر اساس پروتکل شرکت سازنده در مرحله اول مخلوط واکنش با حجم نهایی ۱۰ μ l شامل ۱ μ l پرایمر Oligo dT با غلظت نهایی ۵۰ میکرومولار، ۳ μ l RNA کل، ۶ μ l آب عاری از RNase درون تیوب آماده شد. تیوب برای ۵

۱. Reverse Transcriptase

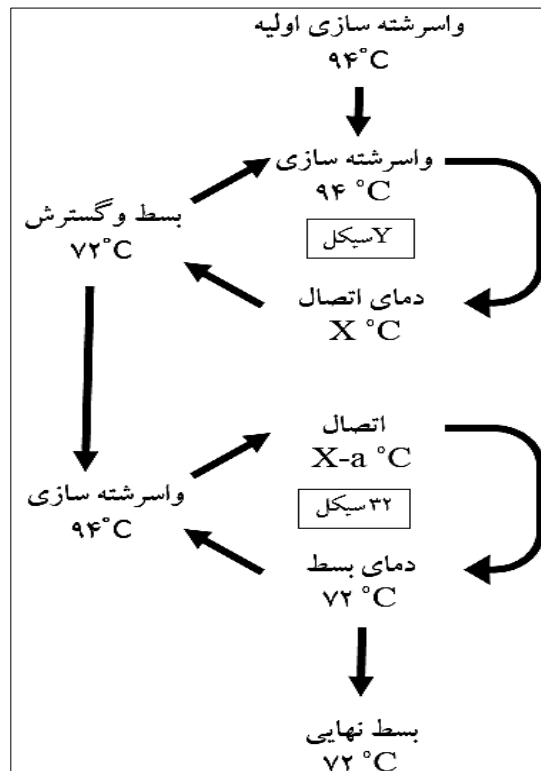
دقیقه در دمای 65°C قرار داده شد و سپس به روی یخ منتقل شد. در مرحله سوم $10\ \mu\text{l}$ آنزیم RT Premix (2x) به تیوب افزوده شد و پس از مخلوط کردن مواد با استفاده از سمپلر، جهت انجام واکنش سنتز cDNA، برنامه زیر در دستگاه ترموسایکلر اجرا شد: 25°C به مدت ۱۰ دقیقه، 50°C به مدت ۶۰ دقیقه، 70°C به مدت ۱۰ دقیقه. cDNAهای سنتز شده به سرعت به فریزر منفی 20°C انتقال داده شدند.

۵-۲. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز آشیانه‌ای دودمایی

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز آشیانه‌ای (Nested PCR) روشی است که در آن از دو جفت آغازگر برای تکثیر توالی مورد نظر استفاده می‌شود (شکل ۲-۲). در ابتدا جفت اول آغازگرها ناحیه‌ای در بردارنده‌ی توالی هدف را تکثیر می‌کنند و سپس جفت دوم از آغازگرها ناحیه‌ی مورد نظر را تکثیر می‌کند. روش دیگری از PCR که با هدف افزایش اختصاصیت واکنش توسعه یافته است، روش Touchdown PCR است که در این روش برخلاف برنامه PCR معمولی که از یک دمای اتصال برای تکثیر استفاده می‌شود، در این روش محدوده‌ای از درجه حرارت‌های اتصال استفاده می‌شود (شکل ۲-۳). در این واکنش اتصال پرایمر به الگو و تولید محصول کاملاً اختصاصی و دقیق است. در این پروژه به منظور افزایش دقت در تکثیر رشته‌ی سنس و آنتی سنس از واکنش زنجیره‌ای آشیانه‌ای چند دمایی (Touchdown Nested PCR) استفاده شد.



شکل ۲-۲. تصویر شماتیک روش Nested PCR و تکثیر توالی هدف بدون باند غیر اختصاصی .



شکل ۲-۲. تصویر شماتیک روش Touchdown PCR.

با آغازگر پسروری کل ژن و آغازگر پیشروی رشته سنس و آنتی سنس PCR انجام گرفت. هر مخلوط واکنش با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱μl نمونه cDNA، ۱μl آغازگر پیشرو با غلظت ۱۰ میکرومولار، ۱ μl آغازگر پسروری با غلظت ۱۰ میکرومولار، ۱۲/۵μl مسترمیکس PCR و ۱/۵μl دی‌متیل سولفوکسید و ۸μl آب مقطر استریل نانوپیور بود. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در دستگاه ترموسایکلر با شرایط دمایی یک سیکل ۱۰ دقیقه‌ای در دمای ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به منظور واسرشته‌سازی^۱ و فعال شدن آنزیم Taq DNA Polymerase و به دنبال آن ۳۵ سیکل شامل ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد (واسرشته سازی)، ۳۰ ثانیه در دمای ۵۷ درجه‌ی سانتی‌گراد (اتصال)، ۲۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد (گسترش) و یک سیکل ۱۰ دقیقه‌ای در ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد انجام شد.

محصول این PCR به نسبت ۱:۱۰۰ رقیق شد و به‌عنوان الگو برای دومین واکنش زنجیره‌ای پلیمرز آشیانه‌ای دودمایی استفاده شد. مخلوط PCR برای تکثیر دو قطعه سنس و آنتی‌سنس با حجم نهایی ۲۵μl شامل ۱ μl الگو، ۱ μl آغازگر پیشرو با غلظت ۱۰ μM، ۱ μl آغازگر پسروری با غلظت ۱۰ μM، ۱۲/۵μl مسترمیکس PCR و ۱/۵μl دی‌متیل سولفوکسید و ۸ μl آب مقطر استریل نانوپیور در تیوب روی یخ آماده گردید. واکنش در دستگاه ترموسایکلر با شرایط دمایی یک سیکل ۱۰ دقیقه‌ای در دمای ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به منظور واسرشته‌سازی^۲ اولیه و فعال شدن آنزیم و به دنبال آن ۲ سیکل شامل ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد (واسرشته سازی)، ۳۰ ثانیه در دمای ۵۴ درجه‌ی سانتی‌گراد (اتصال)، ۲۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد (گسترش) و ۳۳ سیکل شامل ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد (واسرشته سازی)، ۳۰ ثانیه در دمای ۵۷ درجه‌ی سانتی‌گراد (اتصال)، ۲۰ ثانیه در

۱. Denaturation

۲. Denaturation

دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد (گسترش) و یک سیکل ۱۰ دقیقه‌ای در ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد انجام گرفت.

۲-۶. تخلیص قطعه سنس و آنتی‌سنس از ژل آگارز

در همسانه سازی قطعه‌های سنس و آنتی‌سنس تخلیص و بازیابی محصول PCR با استفاده از کیت تخلیص محصول PCR ساخت کمپانی GENE ALL بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت. غلظت محصول بازیابی شده با استفاده از نشانگر وزنی 50bp روی ژل آگارز ۲٪ به‌طور تخمینی برآورد شد.

۲-۷. اتصال قطعه‌های تخلیص شده در حامل همسانه سازی pTG19-T

جهت انجام همسانه سازی قطعه‌ی سنس و هم‌چنین آنتی‌سنس از پلاسمید pTG19-T استفاده گردید. طبق دستورالعمل شرکت سازنده، نسبت بهینه بین محصول PCR به پلاسمید ۳ به ۱ است. مخلوط لیگاسیون برای هر کدام از قطعه‌ها به‌طور جداگانه با حجم نهایی ۱۰ μl شامل ۱ μl پلاسمید pTG19-T، ۴ μl محصول PCR، ۲ μl بافر ۱۰x، ۱ μl آنزیم T4 DNA Ligase و ۲ μl آب دیونیزه در یک میکرو تیوب بر روی یخ آماده شد و برای یک ساعت در دمای ۲۲°C و برای ۱۶ ساعت در دمای ۱۶°C انکوبه شد.

۲-۸. انتقال پلاسمید به باکتری‌های *E. coli* سویه DH5α

برای تراریختگی باکتری‌های میزبان ابتدا این باکتری‌های میزبان برای پذیرش پلاسمید خارجی آماده شد و پس از آن پلاسمید با روش شوک حرارتی به میزبان انتقال داده شد. یک کلنی از باکتری کشت داده‌شده بر روی محیط LB جامد را درون ۵ میلی‌لیتر محیط کشت LB مایع (اتوکلاو شده در داخل فالكون) کشت داده شد و مدت ۱۶ ساعت در داخل انکوباتور شیکردار در

دمای °C ۳۷ با سرعت ۱۸۰ دور در دقیقه^۱ انکوبه شد. پس از این مدت باکتری‌های کشت داده شده در کنار شعله به ۵۰ میلی لیتر محیط LB اتوکلاو شده اضافه شد و نمونه‌ها به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در انکوباتور شیکردار با سرعت ۲۰۰ rpm انکوبه شد و پس از رسیدن به فاز لگاریتمی رشد^۲ OD محیط کشت حاوی باکتری در طول موج ۶۰۰ nm خوانده شد (OD مناسب در محدوده‌ی ۰/۶-۰/۳ است) و محیط حاوی باکتری درون دو فالكون تقسیم شد و به منظور سرد شدن اولیه نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه بر روی یخ قرار گرفت. در مرحله بعد باکتری‌ها با استفاده از سانتریفیوژ به مدت ۱۵ دقیقه در دمای °C ۴ با سرعت ۳۰۰۰ rpm رسوب داده شدند. پس از انجام سانتریفیوژ مایع رویی بیرون ریخته شد و به رسوب باکتری ۲۵ ml کلرید کلسیم ۰/۱ مولار کاملاً سرد اضافه شد و با عمل پایپتینگ خیلی آرام رسوب در محلول حل شد و نمونه‌ها به مدت یک ساعت بر روی یخ قرار گرفت. فالكون‌ها همانند مرحله قبل سانتریفیوژ شدند و مجدداً در کنار شعله مایع رویی دور ریخته شد و به هر فالكون ۱ ml کلسیم کلراید ۰/۱ مولار ۱۵ درصد گیسرول اضافه شد و پس از هموژن کردن، مخلوط را در حجم‌های ۱۰۰ µl در تیوب‌های ۱/۵ ml توزیع و در دمای ۷۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد.

سلول‌های مستعد به منظور خروج از یخ‌زدگی به مدت ۱۰ دقیقه بر روی یخ قرار گرفت، سپس ۱۰ µl از محصول لیگاسیون در کنار شعله به ۱۰۰ µl سلول مستعد اضافه شد و پس از زدن چند ضربه آرام انگشت به تیوب (به منظور مخلوط شدن) میکروتیوب‌ها به مدت ۴۵ دقیقه مجدد بر روی یخ قرار گرفت. به منظور ایجاد شوک حرارتی نمونه‌ها به مدت ۹۰ ثانیه داخل حمام آب گرم با دمای ۴۲ درجه سانتی گراد قرار داده شد و بلافاصله پس از گذشت زمان مورد نظر به مدت ۵ دقیقه بر روی یخ قرار

۱. Revolutions per minute

۲. Optical density

گرفت. سپس در کنار شعله میزان ۶۰۰ ml محیط مایع لوریا برتونی^۱ اتوکلاو شده به تیوب‌ها افزوده شد. سلول‌های باکتری ترانسفرم شده به مدت یک ساعت ونیم در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور شیکردار قرار داده شد. در کنار شعله نمونه ترانسفورماسیون شده بر روی پلیت‌های حاوی محیط جامد LB به همراه ۵۰ ng / μ l آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین، ۰/۱ مولار محلول ایزوپروپیل D - β تیوگالاکتوپیرانوزید (IPTG) و ۰/۱ مولار محلول ۵ برمو-۳-کلرو-تیدولیل D - β گالاکتوزید (X-Gal) توزیع و پتری‌ها به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شد.

حامل pTG19-T انتخاب‌شده علاوه بر ایجاد مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین، به خاطر عمل آنزیم بتاگالاکتوزیداز امکان غربالگری آبی-سفید را فراهم می‌کند. انتظار می‌رود باکتری‌های دریافت‌کننده محصول لیگاسیون همگی بر روی محیط LB حاوی آمپی‌سیلین و IPTG و X-Gal تولید پرگنه‌های سفیدرنگ کنند. بنابراین پس از انکوبه کردن محیط‌های کشت حاوی باکتری‌های ترانسفرم شده به مدت ۱۶ ساعت، محیط‌های کشت به مدت ۱ ساعت جهت تفکیک کامل پرگنه‌های سفید و آبی در یخچال قرار داده‌شد. کلنی‌های سفیدرنگ تولیدی (حاوی پلاسمید نوترکیب) به صورت خطی در محیط کشت جامد و مایع LB جدید دارای آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین به صورت شبانه کشت داده شدند.

۲-۱۰. تأیید حضور قطعه در کلنی‌های ترانسفرم شده از طریق کلنی PCR

به منظور تأیید حضور قطعه سنس و آنتی‌سنس در کلنی‌ها، با استفاده از پرایمرهای رشته سنس و همچنین پرایمرهای آنتی‌سنس به طور جداگانه واکنش PCR انجام گرفت. بنابراین مخلوط واکنش شامل یک تک کلنی سفید، ۱ μ l آغازگر با غلظت ۱۰ μ M، ۱۲/۵ μ l مسترمیکس PCR و ۱/۵ μ l دی‌متیل سولفوکسید و ۸ μ l آب مقطر استریل نانوپور در تیوب روی یخ آماده شد. واکنش در دستگاه ترموسایکلر

۱. Luria-Bertani (LB) broth

با شرایط دمایی یک سیکل ۱۰ دقیقه‌ای در دمای ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به منظور واسرشته‌سازی اولیه و فعال شدن آنزیم و به دنبال آن ۲ سیکل شامل ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد (واسرشته سازی)، ۳۰ ثانیه در دمای ۵۴ درجه سانتی‌گراد (اتصال)، ۲۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد (گسترش) و ۳۳ سیکل شامل ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد (واسرشته سازی)، ۳۰ ثانیه در دمای ۵۷ درجه سانتی‌گراد (اتصال)، ۲۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد (گسترش) و یک سیکل ۱۰ دقیقه‌ای در ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. سپس جهت بررسی و ارزیابی نتیجه‌ی PCR، محصول PCR بر روی ژل آگارز ۲٪ مورد بررسی قرار گرفت و پس از تشخیص کلنی‌های دربردارنده‌ی قطعه سنس و آنتی‌سنس، جهت استخراج پلاسمید یک کلنی از آن‌ها در ۵ ml محیط LB مایع دارای آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین کشت داده شد و به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۳۷ °C در داخل انکوباتور شیکردار با سرعت ۲۲۵ rpm گرمخانه گذاری شد.

۲-۱۱. استخراج پلاسمیدهای نو ترکیب از باکتری‌های ترانسفرم شده

استخراج پلاسمید باکتریایی به روش لیز قلیایی توسط سمبروک و همکاران (۱۹۸۹) ارائه شد و با اندکی تغییرات انجام گرفت: ۲ ml از محیط کشت شبانه باکتری نو ترکیب به میکرو تیوب انتقال داده شد و سپس به مدت ۱ دقیقه در سرعت بالا رسوب داده شد. مایع رویی را دور ریخته و میکرو تیوب را به صورت وارونه بر روی دستمال کاغذی قرار داده تا رسوب حاصل کاملاً خشک گردد. مقدار ۲۰۰ میکرو لیتر از محلول شماره یک (شامل ۰/۲۹۷ gr گلوکز ۵۰ mM، ۰/۱۱۸ gr تریس HCL و ۰/۱۱۲ gr پودر EDTA است که با افزودن آب در حجم نهایی ۳۰ ml آماده شد) به میکرو تیوب‌ها اضافه شد و پس از ورتکس، به مدت ۱۰ دقیقه در دمای محیط قرار داده شد. ۳۰۰ μl از محلول تازه آماده شده ۰/۲ N سدیم هیدروکسید و سدیم دی‌دوسیل سولفات ۰/۱۰٪ به میکرو تیوب‌ها اضافه شد و با چرخش بسیار آرام میکرو تیوب محلول یکنواخت شد. محلول قبل را با افزودن ۳۰۰ μl استات پتاسیم ۳ مولار (pH: ۴/۸) سرد خنثی شد و پس از چندین مرتبه چرخش آرام، میکرو تیوب‌ها برای ۱۰ دقیقه در ۲۰- قرار داده

شدند. پس از گذشت این مدت زمان میکرو تیوب‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در سرعت بالا در دمای محیط سانتریفیوژ شد و مایع رونشین به میکرو تیوب‌های جدید انتقال داده شد و برابر حجم مایع رویی به هر میکرو تیوب ایزوپروپانول سرد اضافه شد و تیوب‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در فریزر ۲۰- قرار داده شد. به مدت ۱۵ دقیقه در سرعت بالا در دمای محیط سانتریفیوژ شد و محلول رویی خارج و رسوب با ۱ ml اتانول ۷۰ درصد شستشو داده شد. میکرو تیوب‌ها به مدت ۵ دقیقه در سرعت بالا سانتریفیوژ شد. پس از آن اتانول دور ریخته شد و به جهت خشک کردن کامل رسوب میکرو تیوب‌ها به مدت ۵ دقیقه در دستگاه concentrator قرار گرفت. در انتها به رسوب باقیمانده میزان ۲۵ μ l آب دو بار تقطیر اضافه شد و برای حذف RNA، ۱ μ l از آنزیم RNase به تیوب‌ها انتقال داده شد و تیوب‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آبگرم در دمای ۳۷ °C انکوبه شد.

۱۲-۲. بررسی کیفیت و کمیت پلاسمید

جهت بررسی پلاسمید استخراج شده از الکتروفورز ژل آگارز ۱٪ استفاده شد. مقدار ۱ μ l از نمونه پلاسمید استخراجی همراه با ۱ μ l از بافر بارگذاری به داخل چاهک‌های ژل منتقل و الکتروفورز شد. مشاهده‌ی ژل توسط دستگاه آشکارساز ترانسلومینومتر UV انجام شد. در شرایط ایده آل الگوی سه بانندی مشاهده شده در نتیجه استخراج پلاسمید مربوط به اشکال مختلف پلاسمید مانند سوپرکویل^۱، خطی^۲ و حلقوی^۳ است. نتیجه با استفاده از نشانگر وزنی 1kb به طور تخمینی برآورد شد.

۱. Supercoiled

۲. Nicked

۳. Open Circle

۲-۱۳. هضم آنزیمی پلاسمید pTG19-T حاوی قطعه سنس و آنتی سنس

جهت حصول اطمینان از حضور قطعه سنس و آنتی سنس، پس از استخراج پلاسمید از کلنی‌هایی که در غربالگری PCR دارای باند موردنظر بودند، هضم آنزیمی با آنزیم‌های *EcoRI* و *KpnI* برای قطعه سنس و با آنزیم‌های *XbaI* و *BamHI* برای قطعه آنتی سنس انجام گرفت، بدین منظور مخلوط هضم آنزیمی با حجم نهایی ۱۰ μl شامل ۵ μl پلاسمید، ۲ μl یونیورسال بافر ۱۰x، ۰/۵ μl از هر آنزیم برشی و ۲ μl آب مقطر آماده شد و برای یک ساعت و نیم در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در حمام آبگرم گرمخانه گذاری شد.

۲-۱۴. همسانه‌سازی قطعات سنس و آنتی سنس در پلاسمید pHANNIBAL

خطی شده

به منظور انتقال قطعه سنس به درون پلاسمید pHANNIBAL، به طور کلی ابتدا با روش هضم آنزیمی قطعه سنس از پلاسمید pTG19-T حامل این قطعه جدا و در pHANNIBAL خطی شده انتقال داده شد. هضم آنزیمی پلاسمید pTG19-T دربردارنده‌ی قطعه‌ی سنس و پلاسمید خاموش‌کننده‌ی pHANNIBAL به منظور ایجاد جایگاه مناسب برای قرارگیری قطعه سنس در pHANNIBAL، با آنزیم *EcoRI* و *KpnI* انجام گرفت. مخلوط هضم آنزیمی پلاسمید pTG19-T دربردارنده‌ی قطعه‌ی سنس با حجم نهایی ۳۰ ml شامل ۱۵ μl پلاسمید و ۶ μl یونیورسال بافر ۱۰x و ۱/۵ μl از هر آنزیم و ۶ μl آب مقطر و مخلوط هضم آنزیمی پلاسمید pHANNIBAL با حجم نهایی ۲۰ μl شامل ۶ μl پلاسمید pHANNIBAL، ۲ μl یونیورسال بافر ۱۰x، ۰/۵ μl از هر آنزیم برشی و ۱۱ μl آب مقطر آماده شدند و مخلوط‌ها برای ۳ ساعت در دمای ۳۷°C در حمام آبگرم گرمخانه گذاری شد. سپس تمام محتوای هضم آنزیمی روی ژل آگارز ۱٪ برده شدند و پس از تائید خطی بودن و کتورخاموشی و طول قطعه سنس، قطعه از روی ژل آگارز بریده شدند و با استفاده از کیت تخلیص محصول PCR مطابق با دستور شرکت سازنده تخلیص شدند.

مخلوط لیگاسیون با حجم نهایی ۲۰ μl شامل ۱ μl پلاسمید pHANNIBAL خطی شده، ۴ μl قطعه سنس تخلیص شده، ۲ μl بافر ۱۰x لیگاسیون، ۱ μl آنزیم T4 DNA Ligase و ۱۲ μl آب مقطر دیونیزه آماده شد و ۱۶ ساعت در دمای ۱۶°C گرمخانه گذاری شد.

فرآیند انتقال مخلوط لیگاسیون به باکتری *E. coli* مستعد به روش شوک حرارتی انجام گرفت. روز بعد کلنی‌های سفید موجود در پلیت LB آگار حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین در محیط مایع LB حاوی ۵۰ ng/μl به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در انکوباتور شیکردار قرار گرفت. روز بعد استخراج پلاسمید به روش لیز قلیایی انجام گرفت.

هضم آنزیمی پلاسمیدها با آنزیم‌های برشی *EcoRI* و *KpnI* جهت تأیید حضور قطعه درج‌شده انجام گرفت. مخلوط واکنش با حجم نهایی ۱۰ μl شامل ۳ μl پلاسمید pHANNIBAL، ۱ μl یونیورسال بافر ۱۰x، ۰/۵ μl از هر آنزیم برشی *EcoRI* و *KpnI* و ۵ μl آب مقطر روی یخ آماده شد و مخلوطها برای ۳ ساعت در دمای ۳۷°C در حمام آبگرم گرمخانه گذاری شد. نتیجه‌ی هضم آنزیمی روی ژل آگارز ۱٪ مورد بررسی قرار گرفت.

۲-۱۵. ساخت RNAi با ادغام قطعه آنتی‌سنس در پلاسمید pHANNIBAL

حاوی سنس

در این مرحله به منظور قرارگیری قطعه آنتی‌سنس در پلاسمید خاموش‌کننده و ساخت سازه‌ی RNAi، باید در ابتدا قطعه آنتی‌سنس از پلاسمید pTG19-T جداسازی شود و قطعه آنتی‌سنس بریده شده از ژل آگارز تخلیص و در نهایت در پلاسمید pHANNIBAL خطی شده‌ی حاوی سنس قرار گیرد. هضم آنزیمی پلاسمید pTG19-T حاوی آنتی‌سنس و پلاسمید pHANNIBAL حاوی سنس به منظور ایجاد جایگاه مناسب برای قرارگیری قطعه آنتی‌سنس در pHANNIBAL با آنزیم *BamHI* و انجام گرفت. مخلوط هضم آنزیمی برای پلاسمید pTG19-T در بردارنده‌ی قطعه‌ی آنتی‌سنس با حجم نهایی ۳۰ ml شامل ۱۵ μl پلاسمید و ۶ μl بافر تانگو ۱۰x و ۱/۵ μl از آنزیم *BamHI* و *XbaI* و

۶ μl آب مقطر آماده شد. برای واکنش خطی شدن پلاسمید pHANNIBAL مخلوطی با حجم نهایی ۲۰ μl شامل ۶ μl پلاسمید pHANNIBAL حاوی سنس، ۲ μl بافر تانگو $10\times$ ، ۰/۵ μl از آنزیم برشی *XbaI* و *BamHI* و ۱۱ μl آب مقطر آماده شد. مخلوط‌های هضم آنزیمی برای ۳ ساعت در دمای 37°C در حمام آبگرم گرمخانه گذاری شد. سپس تمام محتوای هضم آنزیمی روی ژل آگارز ۱٪ برده شد و پس از تائید خطی بودن وکتور خاموشی و طول قطعه آنتی‌سنس، قطعه‌ها از روی ژل آگارز بریده و با استفاده از کیت تخلیص محصول PCR مطابق با دستور شرکت سازنده تخلیص شدند.

مخلوط لیگاسیون با حجم نهایی ۲۰ μl شامل ۱ μl پلاسمید pHANNIBAL خطی شده‌ی حاوی سنس، ۴ μl قطعه آنتی‌سنس تخلیص شده، ۲ μl بافر $10\times$ لیگاسیون، ۱ μl آنزیم T4 DNA Ligase و ۱۲ μl آب مقطر دیونیزه در یک میکرو تیوب بر روی یخ آماده شد و ۱۶ ساعت در دمای 16°C گرمخانه گذاری شد.

فرآیند انتقال مخلوط لیگاسیون به باکتری *E. coli* مستعد به روش شوک حرارتی انجام گرفت. روز بعد کلنی‌های سفید موجود در پلیت LB آگار حاوی آمپی‌سیلین در محیط مایع LB حاوی ۵۰ ng/ μl به مدت ۱۶ ساعت در دمای 37°C درجه سانتی گراد در انکوباتور شیکردار قرار گرفت. روز بعد استخراج پلاسمید به روش لیز قلیایی انجام گرفت.

هضم آنزیمی پلاسمیدها با آنزیم‌های برشی *XbaI* و *BamHI* جهت تائید حضور قطعه‌ی آنتی‌سنس درج‌شده انجام گرفت. مخلوط واکنش با حجم نهایی ۱۰ μl شامل ۳ μl پلاسمید pHANNIBAL، ۱ بافر تانگو $10\times$ ، ۰/۵ μl از آنزیم برشی *XbaI* و *BamHI* و ۵ μl آب مقطر روی یخ آماده شد و مخلوط‌ها برای ۳ ساعت در دمای 37°C در حمام آبگرم گرمخانه گذاری شد. نتیجه‌ی هضم آنزیمی روی ژل آگارز ۱٪ مورد بررسی قرار گرفت.

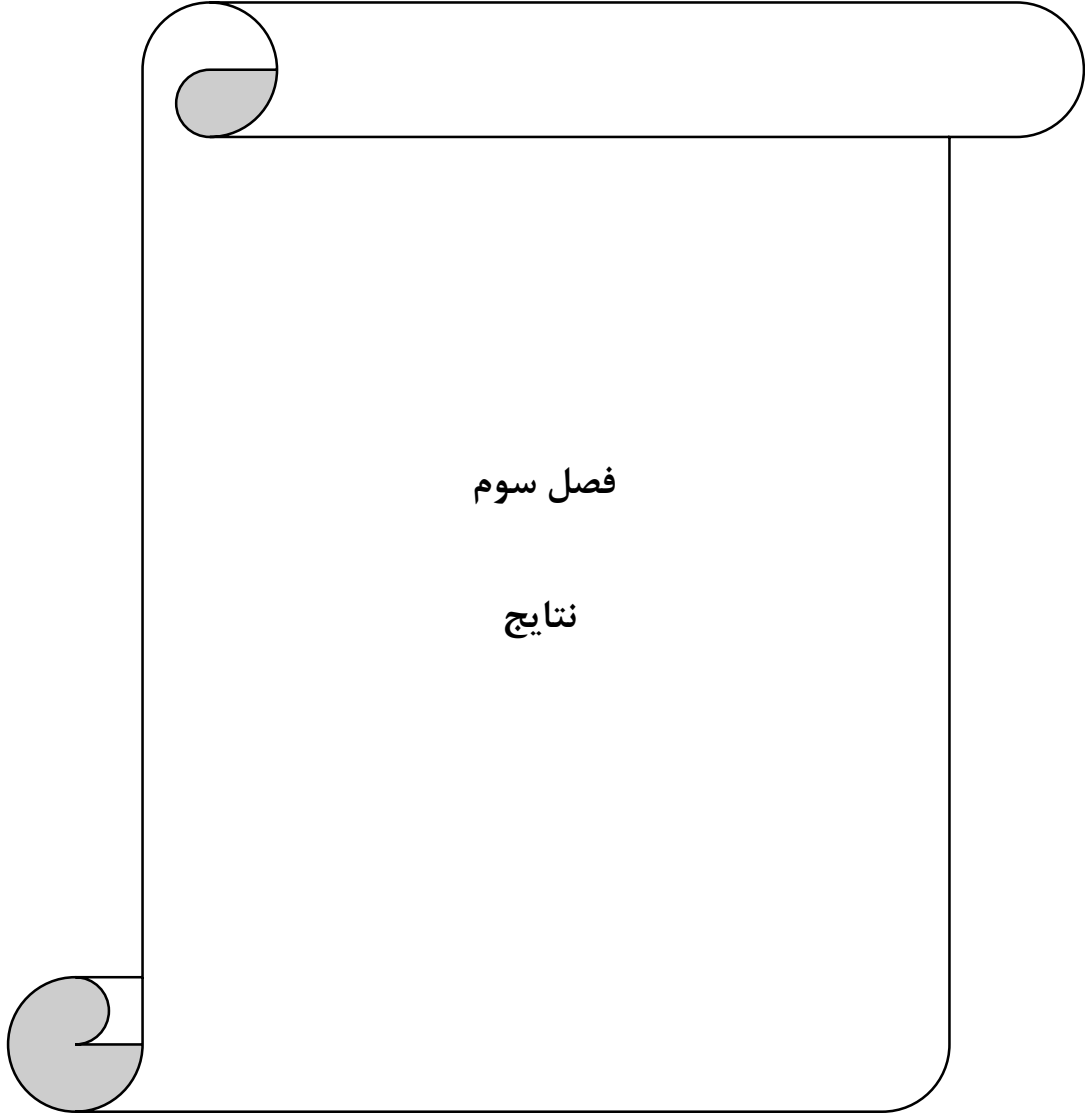
۲-۱۶- هضم آنزیمی پلاسمید حاوی هر دو قطعه سنس و آنتی سنس با آنزیم

XbaI و *EcoRI*

به منظور اطمینان از صحت سازه‌ی RNAi یک هضم آنزیمی توسط آنزیم‌های *XbaI* و *EcoRI* قرار گرفته در بالادست و پائین دست سازه انجام گرفت. پس از آن تمام محصول هضم آنزیمی به چاهک‌های ژل الکتروفورز اضافه شد. مخلوط واکنش با حجم نهایی ۱۰ μl شامل ۳ μl پلاسمید pHANNIBAL، ۱ μl بافر تانگو ۱۰X، ۰/۵ μl از آنزیم برشی *XbaI* و ۰/۵ μl از آنزیم برشی *EcoRI* و ۵ μl آب مقطر روی یخ آماده شد و مخلوط‌ها برای ۳ ساعت در دمای ۳۷°C در حمام آبگرم گرمخانه گذاری شد. نتیجه‌ی هضم آنزیمی روی ژل آگارز ۱٪ مورد بررسی قرار گرفت.

۲-۱۷- تهیه استوک گلیسرول ۱۵٪ برای باکتری‌های حاوی سازه RNAi

برای حفظ و نگهداری طولانی مدت باکتری‌ها از روش انجماد باکتری در گلیسرول در دمای منفی ۷۰ درجه استفاده می‌شود. یک پرگنه از باکتری حاوی سازه‌ی RNAi در محیط LB مایع دارای آنتی بیوتیک آمپی سیلین (۵۰ ng/μl) برای ۱۶ ساعت در شیکر انکوباتور با دور ۲۲۵ rpm گرمخانه گذاری شد. روز بعد ۷۰۰ μl محیط کشت حاوی باکتری‌های کشت شبانه با ۳۰۰ μl گلیسرول ۵۰٪ اتوکلاو شده درون میکروتیوب ۱/۵ آماده شدند. درب ویال‌ها با پارافیلیم بسته شد و ویال‌ها برای هموژن شدن مخلوط ورتکس شدند و به منظور انجماد سریع مخلوط میکروتیوب‌ها برای چند ثانیه در نیتروژن مایع قرار گرفتند و بلافاصله به فریزر منفی ۷۰ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند.



فصل سوم

نتایج

۳-۱. طراحی سازه‌ی RNAi

برای تهیه‌ی سازه‌ی خاموش‌کننده از ناقل pHANNIBAL استفاده شد. توالی کامل ژن کد کننده‌ی آنزیم UGT74G1 از NCBI به شماره دسترسی GenBank: AY345982.1 استخراج گردید. یک توالی ژنی شامل بازهای ۸۵۰ تا ۹۵۹ به طول ۱۱۰ جفت باز به عنوان الگوی تکثیر سنس و آنتی‌سنس پس از بررسی در سایت NEBcutter (<http://nc2.neb.com/NEBcutter2>) و تأیید عدم وجود جایگاه برش انتخاب گردید و بر این اساس به منظور تکثیر قطعه ژن انتخابی به عنوان رشته‌ی سنس به صورت هم‌سو در ناقل خاموش‌کننده جایگاه برشی آنزیم‌های *EcoRI* (آغازگر پیشرو) و *KpnI* (آغازگر پسرو) در انتهای ناحیه ۵' آغازگرها و همچنین جهت اتصال قطعه آنتی‌سنس به صورت معکوس و وارونه (ناهم‌سو) در ناقل خاموش‌سازی، سایت برشی آنزیم *XbaI* (آغازگر پیشرو) و *BamHI* (آغازگر پسرو) در انتهای ناحیه ۵' آغازگرها تعریف گردید و عدم وجود متیلاسیون در جایگاه برش با برنامه‌ی SnappGene تأیید شد.

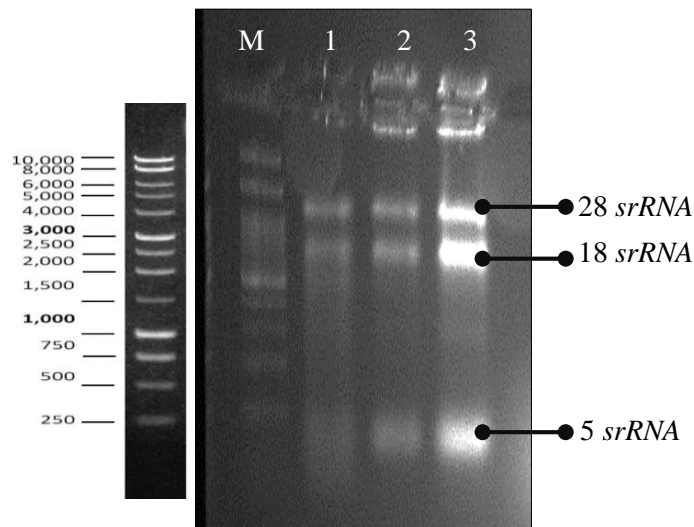
۳-۲. استخراج Total RNA

نتیجه استخراج آر.ان.ای کل از برگ گیاه *استویا رباتودیانا* جهت استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز معکوس (RT-PCR) با استفاده از بافر TRIzol™ Reagent نشان داد که محصولی با کیفیت مطلوب و مناسب تولید شده است (شکل ۳-۱).

۳-۲-۱. آنالیز کیفیت RNA استخراج شده با ژل الکتروفورز

به منظور بررسی کیفی RNA، مقدار ۱ میکروگرم (۳ μl) از نمونه RNA استخراجی با ۱ μl از بافر بارگذاری مخلوط و توسط الکتروفورز افقی روی ژل آگارز ۱/۶٪ مورد بررسی قرار گرفت. مشاهده ژل در

دستگاه آشکارساز ترانسلومینومتر UV انجام گرفت و تحت نور فرابنفش سه ناحیه 28 srRNA و 18 srRNA و در قسمت انتهایی ژل نیز باند سبک تر 5.8srRNA قابل مشاهده بود و توسط دستگاه تصویربردار ژل، عکس برداری انجام شد. باندهای 18 srRNA و 28 srRNA مرتبط با RNA ریبوزومی به عنوان شاخص کیفیت RNA استخراج شده مدنظر قرار گرفت (شکل ۳-۱).



شکل ۳-۱. استخراج RNA از برگ استویا بر روی ژل آگارز ۱/۶٪.

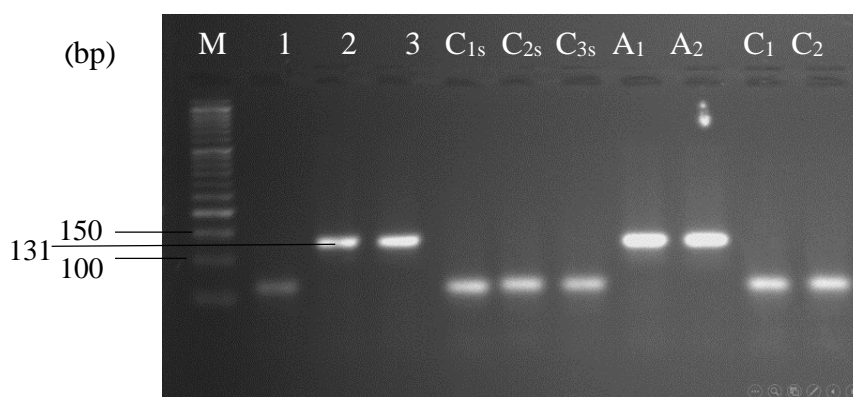
۳-۲-۲. سنجش کمیت RNA با استفاده از روش های اسپکتروفوتومتری

تعیین غلظت توسط دستگاه نانودراپ امکان دقیق سنجش غلظت و کیفیت RNA استخراج شده را فراهم کرد. یک میکرو لیتر از RNA استخراج شده مستقیماً روی پروب دستگاه بارگذاری شد. میزان غلظت توسط دستگاه ۲۸۷ ng/μl خوانده شد. نسبت OD₂₆₀ به OD₂₈₀ مقدار ۱/۹ محاسبه شد که بیانگر خلوص مطلوب RNA استخراج شده بود.

۳-۳. ارزیابی قطعه سنس و آنتی سنس با واکنش PCR در الکتروفورز افقی ژل آگارز

آزمون واکنش زنجیره ای پلیمرز با استفاده از جفت آغازگرهای طراحی شده برای قطعه سنس و آنتی

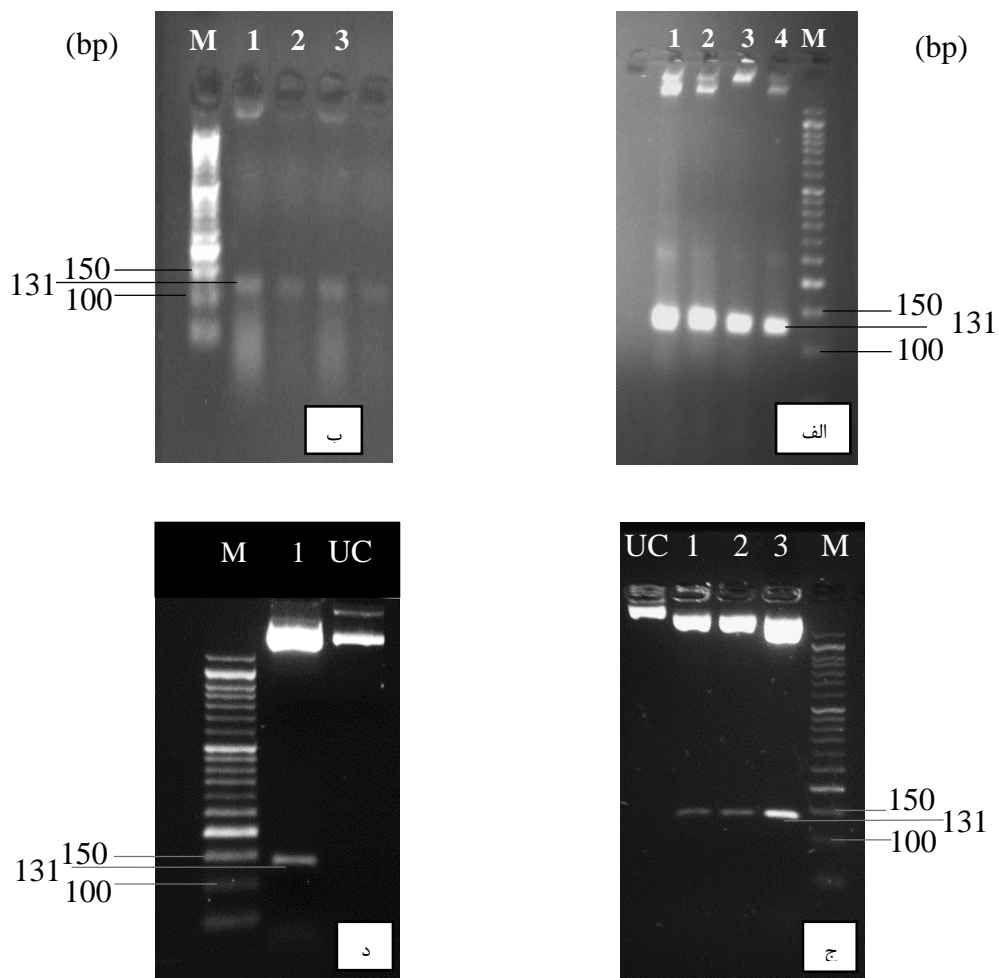
سنس انجام گردید. در این مرحله قطعه‌ای به طول ۱۳۱ bp تکثیر گردید که مطابق با اندازه مورد انتظار ما برای قطعه سنس و آنتی‌سنس بود. پس از پایان واکنش تکثیر، مقدار ۵µl از نمونه بر روی ژل آگارز ۲ درصد برده شد تا کیفیت قطعات ژنی پس از تکثیر مورد ارزیابی قرار گیرد. باند مورد انتظار ۱۳۱ bp در تصویر ۲-۴ مشاهده می‌گردد. از آنجاکه علاوه بر باند مورد نظر هیچ باند اضافی در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز تکثیر نشده بود، تنها بازیابی مستقیم محصول PCR انجام گرفت.



شکل ۳-۲. نتیجه‌ی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز. M: مارکر. نمونه ۲ و ۳ قطعه سنس و نمونه A1 و A2 قطعه آنتی‌سنس تکثیر شده. چاهک C1s, C2s, C3s و C1 و C2 نمونه‌های کنترل منفی حاوی باند پرایمر دایمر.

۳-۴. تأیید همسانه‌سازی قطعه سنس و آنتی‌سنس درون ناقل کلونیتگ با روش هضم آنزیمی T/A

از تک کلون‌های انتخابی کشت شده بر روی محیط آمپی‌سیلین استخراج پلاسمید انجام شد و روی نمونه‌های استخراج شده برای سنس و آنتی‌سنس به ترتیب عمل هضم آنزیمی صورت گرفت. در نتیجه هضم آنزیمی همانطور که در شکل ۴-۵ و ۴-۶ مشاهده می‌شود قطعاتی به طول ۱۳۱ جفت باز حاصل گردید که صحت همسانه‌سازی را تأیید کرد.



شکل ۳-۳. الف) الگوی الکتروفورزی محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای تکثیر قطعه سنس. ب) الگوی الکتروفورزی محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای تکثیر قطعه آنتی سنس. ج) و د) الگوی الکتروفورزی حاصل از هضم آنزیمی پلاسمید pTG19-T حاوی قطعه سنس و آنتی سنس. M: ماکر ۵۰ جفت بازی. UC: پلاسمید بدون برش.

۳-۴-۴. تایید همسانه سازی و صحت ترادف نوکلئوتیدی قطعه‌ی سنس و آنتی سنس به وسیله‌ی توالی‌یابی در حامل T/A

نمونه‌هایی که حضور قطعه سنس و آنتی سنس در آن‌ها دیده شده بود برای تایید نهایی، به منظور توالی‌یابی به شرکت تکاپوزیست فرستاده شد و نتیجه توالی‌یابی با تشابه ۹۸ درصدی با قطعه ژن

انتخابی از *srUTG74G1* صحت قطعه سنس (شکل ۴-۷) و آنتی سنس (۴-۸) تکثیر یافته را تأیید کرد.

Stevia rebaudiana UDP-glycosyltransferase 74G1 mRNA, complete cds
Sequence ID: [AY345982.1](#) Length: 1555 Number of Matches: 1

Range 1: 849 to 933 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Prev

| Score | Expect | Identities | Gaps | Strand |
|--------------|--|------------|----------|------------|
| 145 bits(78) | 2e-31 | 83/85(98%) | 2/85(2%) | Plus/Minus |
| Query 6 | TTTGAT-A-CCACAAGAAGTTGACATCACTATCTATTAAGCCCGTGTGATTTCTCCAC | 63 | | |
| Sbjct 933 | TTTGATAACCCACAAGAAGTTGACATCACTATCTATTAAGCCCGTGTGATTTCTCCAC | 874 | | |
| Query 64 | TTGTTTCGGGTCATGTTTCACCCAGG | 88 | | |
| Sbjct 873 | TTGTTTCGGGTCATGTTTCACCCAGG | 849 | | |

شکل ۳-۵. هم‌ردیفی نتیجه توالی یابی ناقل کلونینگ T/A حامل قطعه آنتی سنس در سایت NCBI

Stevia rebaudiana UDP-glycosyltransferase 74G1 mRNA, complete cds
Sequence ID: [AY345982.1](#) Length: 1555 Number of Matches: 1

Range 1: 870 to 959 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Prev

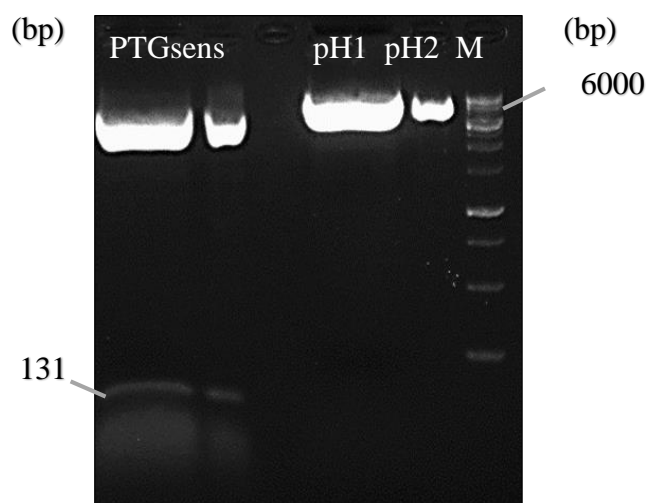
| Score | Expect | Identities | Gaps | Strand |
|--------------|---|------------|----------|-----------|
| 143 bits(77) | 6e-31 | 86/90(96%) | 2/90(2%) | Plus/Plus |
| Query 1 | ACAGGTGGGAG-AATCACACGGGCTTT-ATAGATAGTGATGTCAACTTCTTGTGGGTTAT | 58 | | |
| Sbjct 870 | ACAAGTGGAAAGAAATCACACGGGCTTTAATAGATAGTGATGTCAACTTCTTGTGGGTTAT | 929 | | |
| Query 59 | CAAACATAAAGAAGAGGGAAAGCTCCAGAG | 88 | | |
| Sbjct 930 | CAAACATAAAGAAGAGGGAAAGCTCCAGAG | 959 | | |

شکل ۳-۵. هم‌ردیفی نتیجه توالی یابی ناقل کلونینگ T/A حامل قطعه سنس در سایت NCBI

۳-۶. ساخت کاست RNAi طراحی شده با برش و انتقال قطعه آنتی‌سنس به پلاسمید pHANNIBAL حاوی قطعه سنس

۳-۶-۱. انتقال قطعه سنس به ناقل خاموش‌گر pHANNIBAL

ابتدا هضم آنزیمی برای پلاسمید نو ترکیب T/A در بردارنده‌ی قطعه‌ی سنس و پلاسمید pHANNIBAL به منظور ایجاد جایگاه مناسب برای قرار گیری قطعه سنس صورت گرفت. سپس تمام مخلوط حاصل از هضم آنزیمی نمونه‌ها از روی ژل آگارز ۱ درصد خالص‌سازی شد. اتصال قطعه ژن هدف به ناقل pHANNIBAL توسط آنزیم T4 DNA Ligase انجام شد و محصول اتصال به روش CaCl_2 به درون



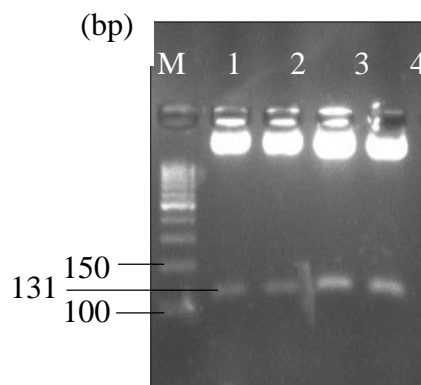
شکل ۳-۶. نتیجه‌ی هضم آنزیمی پلاسمید خاموش‌کننده‌ی pHANNIBAL به منظور ایجاد جایگاه مناسب برای قرار گیری قطعه سنس و حصول قطعه سنس با برش وکتور T/A. M: مارکر. PH1 و PH2: نمونه پلاسمید خاموش‌کننده برش خورده به طول ۵۸۸۰ bp. PTGsens: نمونه برش خورده‌ی حامل T/A کلونینگ و حصول قطعه سنس با طول ۱۳۱ bp.

باکتری مستعد *E. coli* سویه DH5a منتقل شد. باکتری‌های ترانسفرم شده بر روی محیط LB آگار حاوی ۵۰ ng/μl آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین توزیع شد و پتری‌دیش‌ها برای ۱۶ ساعت در دمای ۳۷ °C در انکوباتور گرمخانه گذاری شد. روز بعد پرگنه‌های سفیدرنگی بصورت تک کلون دیده شدند.

۳-۶-۱-۲. نتیجه‌ی برش آنزیمی حامل pHANNIBAL حاوی قطعه سنس با آنزیم *EcoRI*

و *KpnI*

از پرگنه‌هایی که در روش کلنی PCR دارای باند قوی تری بودند استخراج پلاسمید انجام گرفت و برای نمونه‌های استخراج شده عمل هضم آنزیمی با آنزیم‌های برشی *KpnI* و *EcoRI* صورت گرفت. در نتیجه هضم آنزیمی همانطور که در شکل ۴-۱۰ مشاهده می‌شود قطعاتی به طول ۱۳۱ جفت باز مطابق با طول قطعه سنس حاصل گردید که صحت همسانه‌سازی را تأیید کرد.



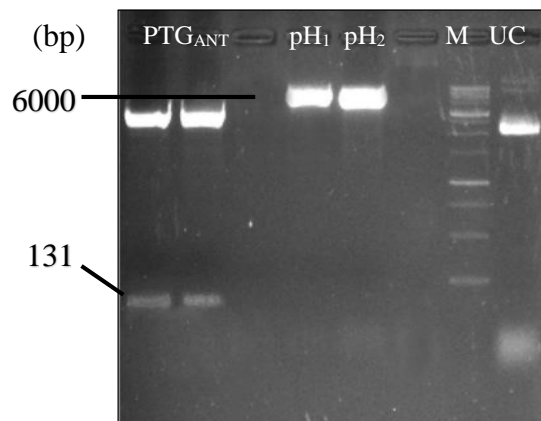
شکل ۳-۷. نتیجه‌ی برش آنزیمی حامل pHANNIBAL و
تأیید حضور قطعه سنس. M : مارکر ۱۰۰bp. چاهک ۱، ۲، ۳، ۴:
نمونه برش خورده‌ی حامل pHANNIBAL و حصول قطعه‌ی
سنس ۱۳۱ bp.

۳-۶-۲. انتقال قطعه آنتی‌سنس به ناقل خاموش گر pHANNIBAL حاوی سنس

اتصال قطعه آنتی‌سنس درون حامل pHANNIBAL حاوی سنس با هضم آنزیمی پلاسمید نو ترکیب T/A حاوی قطعه‌ی آنتی‌سنس و پلاسمید pHANNIBAL در بردارنده‌ی سنس جهت ایجاد جایگاه مناسب برای قرارگیری قطعه آنتی‌سنس در پلاسمید pHANNIBAL با آنزیم‌های برشی *BamHI* و *XbaI* انجام گرفت. کل مخلوط هضم آنزیمی نمونه‌ها روی ژل آگارز ۱ درصد ارائه شد. سپس قطعه آنتی‌سنس ۱۳۱ bp حاصل از هضم آنزیمی پلاسمید T/A و پلاسمید خاموش گر خطی شده (شکل ۳-۱۱) با طول ۶۰۱۱ bp از روی ژل آگارز بریده شد. اتصال قطعه ژن هدف به ناقل pHANNIBAL

توسط آنزیم T4 DNA Ligase انجام شد و محصول اتصال به روش CaCl_2 به درون باکتری مستعد *E. coli* سویه DH5a منتقل شد. باکتری‌های ترانسفرم شده بر روی محیط LB آگار حاوی $50 \text{ ng}/\mu\text{l}$ آمپی‌سیلین توزیع شد و پتری‌دیش‌ها برای ۱۶ ساعت در دمای 37°C در انکوباتور گرمخانه گذاری شد. روز بعد پرگنه‌های سفیدرنگی مخلوط از باکتری‌ها بصورت تک کلون دیده شدند.

۳-۶-۳- نتیجه‌ی برش آنزیمی حامل pHANNIBAL حاوی قطعه آنتی‌سنس با آنزیم *XbaI* و *BamHI*



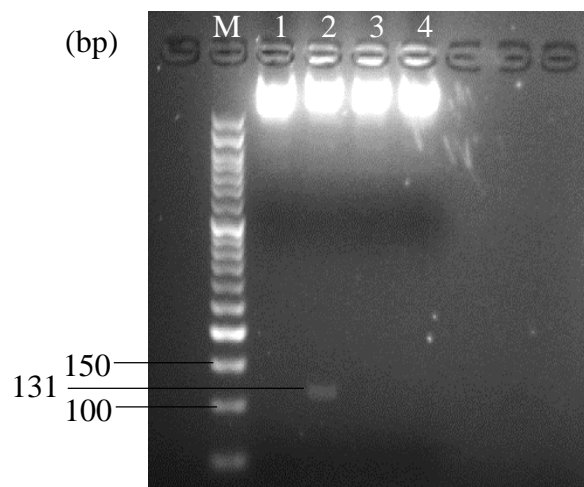
شکل ۳-۸. نتیجه‌ی هضم آنزیمی پلاسمید pHANNIBAL دربردارنده‌ی سنس و دریافت قطعه آنتی‌سنس با برش وکتور T/A. M: مارکر. PH1 و PH2: نمونه پلاسمید خاموش‌کننده برش خورده حاوی سنس. PTGANT: نمونه برش خورده‌ی حامل T/A کلونینگ و حصول قطعه آنتی‌سنس ۱۳۱ bp. UC: پلاسمید خاموش‌کننده بدون برش.

پس از انتقال محصول درون باکتری‌های مستعد، پس از ۱۶ ساعت تک کلون‌های رشد کرده بر روی محیط آمپی‌سیلین انتخاب شدند و پس از کشت ۱۶ ساعت پرگنه‌ها در محیط مایع LB حاوی آمپی-سیلین استخراج پلاسمید انجام شد. پس از آن به منظور غربالگری و تشخیص باکتری دربردارنده‌ی حامل pHANNIBAL دریافت‌کننده‌ی قطعه آنتی‌سنس برای نمونه ناقل‌های استخراج شده با آنزیم‌های *XbaI* و *BamHI* هضم آنزیمی انجام گرفت. در نتیجه هضم آنزیمی همانطور که در شکل ۳-۱۲ مشاهده

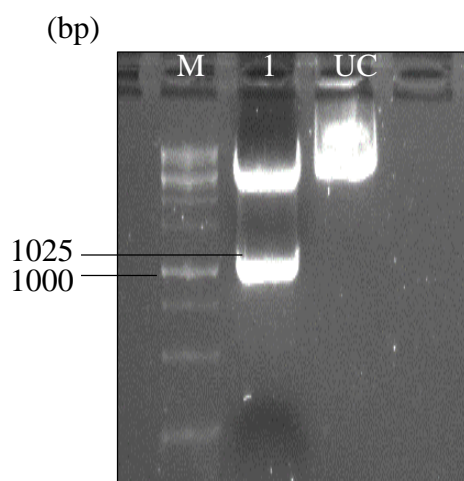
می‌شود تنها در یک کلنی قطعه‌ای به طول ۱۳۱ جفت باز حاصل گردید که صحت همسانه‌سازی را تأیید کرد.

۳-۷- هضم آنزیمی حامل pHANNIBL حاوی قطعه سنس و آنتی‌سنس با آنزیم‌های برشی *EcoRI* و *XbaI*

به منظور تأیید همسانه‌سازی قطعه سنس و آنتی‌سنس و سازه RNAi (شامل سنس و اینترون و آنتی‌سنس) در حامل خاموشی pHANNIBAL نمونه‌ی چاهک شماره ۲ با آنزیم‌های برشی *XbaI* و *EcoRI* هضم شد. در نتیجه هضم آنزیمی همانطور که در شکل ۳-۱۳ مشاهده می‌شود یک قطعه‌ی ۱۰۲۵ جفت بازی حاصل گردید که صحت همسانه‌سازی را مطابق با طول سازه‌ی RNAi طراحی شده تأیید کرد.



شکل ۳-۹. غربالگری به روش هضم آنزیمی برای شناسایی باکتری‌های تراریخت با پلاسمید pHANNIBAL دارای قطعه آنتی‌سنس با آنزیم‌های *BamHI* و *XbaI*: M. مارکر. ۱ و ۲ و ۳ و ۴: نمونه پلاسمید pHANNIBAL برش خورده و مشاهده‌ی قطعه آنتی‌سنس در چاهک دوم در طول ۱۳۱ جفت بازی.

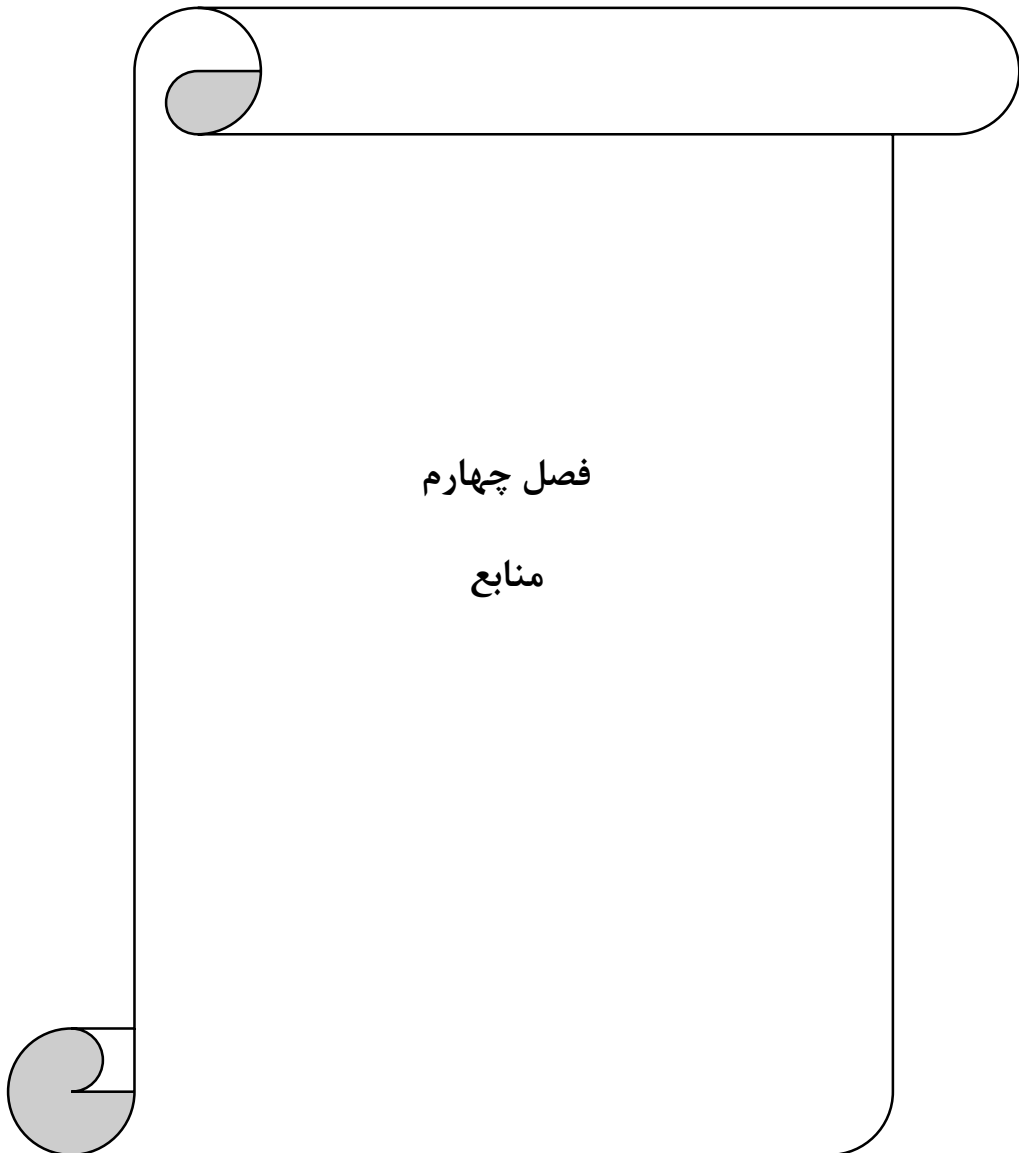


شکل ۳-۱۰. نتیجه‌ی هضم آنزیمی پلاسمید pHANNIBAL حاوی قطعه سنس و آنتی‌سنس و تائید حضور کاست RNAi. M: مارکر ۱۰Kb. چاهک ۱: هضم آنزیمی حامل pHANNIBAL با آنزیم *XbaI* و *EcoRI* و تائید همسانه‌سازی کاست خاموشی RNAi. چاهک UC: پلاسمید بدون برش.

در صورت انتقال سازه‌ی RNA مداخله‌گر به گیاه و قرار گرفتن سازه در ژنوم گیاه انتظار می‌رود از طریق تجزیه رشته‌های mRNA قبل از مرحله‌ی ترجمه آن به پروتئین شاهد کاهش تولید استویوزاید باشیم. سازه‌ی RNAi ساخته‌شده است و آماده‌ی انتقال به گیاه است. در واقع این تحقیق به‌عنوان اولین گام و پایه‌ای برای یافتن راهکار مناسب جهت بهبود کیفیت قند گیاه استویا است. بنابراین در گام بعدی نیاز به یافتن بهترین روش برای انتقال سازه به گیاه و بررسی میزان بیان ژن *srUGT74G* پس از انتقال در گیاه است. در صورتی که میزان بیان ژن مطابق با انتظار کاهش یابد در گام بعدی نیاز به کشت درون شیشه‌ای گیاه است. از آنجا که بذر گیاه استویا دارای قوه‌ی نامیه‌ی بسیار پائینی بوده و هم‌چنین برای تولید گیاه کامل‌تر از کشت درون شیشه‌ای استفاده می‌شود، باید به بررسی بهترین شرایط از نظر تولید متابولیت‌های ثانویه برای کشت درون شیشه‌ای گیاه استویا پرداخت.

۳-۸. پیشنهادات

- با توجه به نتیجه‌های به دست آمده از این تحقیق پیشنهادهای ذیل ارائه می‌گردد:
- انتقال سازه‌ی RNA مداخله‌گر به درون گیاه استویا.
 - به منظور بررسی تغییرات بیان ژن *srUGT74G1* در دوره‌های رشدی متفاوت گیاه استویا در مسیر بیوسنتز گلیکوزیدهای استویول از روش Real Time-PCR استفاده شود.
 - بررسی تغییرات بیان سایر ژن‌های کلیدی در مسیر بیوسنتز گلیکوزیدهای استویول در گیاه با سازه‌ی RNAi در مسیر بیوسنتز گلیکوزیدهای با روش‌های Real Time-PCR.
 - انجام یک آزمایش GC-mass برای اندازه‌گیری میزان متابولیت‌های ثانویه و اندازه‌گیری کل محتوای گلیکوزیدهای استویول در گیاه استویا دارای سازه‌ی خاموشگر.
 - تأثیر عوامل مختلف در محیط کشت بافت بر تغییرات بیان ژن *srUGT74G1* در گیاه دارای سازه‌ی RNA مداخله‌گر با هدف یافتن گیاهی با کم‌ترین استویوزاید باید مورد بررسی قرار گیرد.
 - با توجه به آن که تاکنون هیچ بیماری و آفت خسارت‌زایی برای استویا گزارش نشده است، بررسی تأثیر فرآیند خاموشی ژن بر متابولیت‌های بازدارنده‌ی آفت (به خصوص تأثیر بازدارنده بر تغذیه شته‌ها) در گیاه استویا باید مورد توجه قرار گیرد.
 - با توجه به توسعه‌ی کشت استویا در نقاط مختلف کشور، بررسی تأثیر فرآیند خاموشی ژن در خصوصیات فیزیولوژیکی و میزان محصول و عملکرد امری ضروری و لازم است.
 - ایجاد یک سرمایه‌گذاری برای تجاری‌سازی کشت گیاه استویا با کمترین میزان استویوزاید و بیشترین طعم شیرین‌کنندگی.
 - سرمایه‌گذاری کلان برای استحصال و تولید قند طبیعی بدون کالری با حداکثر شیرین‌کنندگی.



فصل چهارم

منابع

۱. ابوالقاسم_بیک، ط. (۱۳۹۴). پایان نامه ارشد: خالص سازی قند گیاه استویا با استفاده از سیستم دوفازی آبی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهر قدس.
۲. استکی، م.، باقری، ح.، تاج سعید، ن.، شمس، ا.، و دانشمند وزیری، م. (۱۳۹۳). استویا بهترین و مفیدترین جایگزین شکر، نشریه کشاورزی و دامپروری، شماره ۱۰۹۷، ص ۳۸-۳۹.
۳. آقابیک، س.، احمدی_گل_سفیدی، م.، و سلیمانی، م. (۱۳۹۶). استخراج کیفی و کمی استویوزاید از گیاه دارویی *Stevia rebaudiana* Bertoni با استفاده از روش فاز جامد قالب مولکولی، اکوفیتوشیمی گیاهان دارویی، ۲، دوره ۱۸، ص ۸۵-۹۷.
۴. راوری، ذ.، جلالی، م.، و راوری، م. (۱۳۹۱). خاموشی ژن با استفاده از آر.ان.ا. مداخله گر، دوازدهمین کنگره ژنتیک ایران، ایران.
۵. غفوری، ا.، و محمدآبادی، م. (۱۳۸۷). نقش RNA در خاموشی ژن در گیاهان، ژنتیک در هزاره سوم، ۴، ۶، ص ۱۵۲۴-۱۵۱۷.
۶. فلاحی، ش.، روانشاد، م.، کنارکوهی، ع.، قنبری، ر.، و حاجی عبدالباقی، م. (۱۳۸۸). ارزیابی روش Touchdown Nested PCR برای جلوگیری از اتصالات غیر اختصاصی و افزایش اختصاصیت در تکثیر ژنی ویروس‌های نقص ایمنی انسان و هپاتیت جی، مجله /رمغان دانش، شماره ۴، دوره ۱۴، ص ۲۲-۱۳.
۷. قربانی، ط. (۱۳۹۶). پایان نامه ارشد: مطالعه بیان برخی ژن‌های مسیر بیوسنتزی استویول گلایکوزیدی تحت تاثیر نوع و مقدار منبع هیدرات کربن در شرایط درون شیشه‌ای در گیاه استویا، پردیس کشاورزی، منابع طبیعی، دانشگاه رازی.
۸. قلی زاده، ف. (۱۳۹۰). خاموشی ژن‌ها و بیوتکنولوژی، تازه های بیوتکنولوژی سلولی-مولکولی، دوره ۲، شماره ۵، ص ۶۷-۷۳.
۹. محمدی، ح.، مرادی، م.، صادقی، م.، مرادی، ح.، قدیمی، ح. (۱۳۸۹). نقش RNAهای غیرکدشونده در تنظیم بیان ژن و بیماری، ژنتیک در هزاره سوم، دوره ۸، شماره ۴، ص ۲۱۹۰-۲۲۰۲.

10. Abdalbasit, M., & Yang, R. (2014). Physico-chemical Assessment and Rebaudioside A. Productively of Natural Sweeteners (*Stevia Rebaudiana* Bertoni), *Journal of Food and Nutrition Research*, 5, 2, pp 209-214.

11. Abdullatee, f. R. & Osman, M. (2012). Studies on effects of pruning on vegetative traits in *Stevia rebaudiana* Bertoni (Compositae) , *International Journal of Biology*, 1, 4, pp 146.
12. Ahmed, B., & Hossain, M. (2011). A Review on natural sweetener plant-Stevia having medicinal and commercial importance, *Agronomski glasnik*, 1, 73, pp 75-91.
13. Allen, A. L., McGeary, J. E., & Hayes, J. E. (2013). Rebaudioside A and rebaudioside D bitterness do not covary with acesulfame-K bitterness or polymorphisms in *TAS2R9* and *TAS2R31*, *Chemosens Percept*, 6, pp 109–117.
14. Amal, A. A., & Ceunen, S. (2011). UDP-dependent glycosyltransferases involved in the biosynthesis of steviol glycosides, *Journal of Plant Physiology*, 168, pp1136–114.
15. Atteh, O., Onagbesan, O. M., Tona, K. (2008). Evaluation of supplementary stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) leaves and stevioside in broiler diets: effects on feed intake, nutrient metabolism, blood parameters and growth performance, *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 92, pp 640-649.
16. Baulcombe, D. (2004). RNA silencing in plants, *Nature*, 431, pp 356 363.
17. Baulcombe, D. (2005). RNA silencing, *Current Biology*, 3, 12, pp 82-84.
18. Baulcombe, D., & Zamore, P. (2010). Welcome to Silence, *Silence*, 1, 1.
19. Brandle, J. E., Starratt, A., & Gijzen, M. (1998). *Stevia rebaudiana*: Its agricultural, biological and chemical properties, *Can. J. Plant Sci*, 78, pp 527–536.
20. Brandle, J. E., & Telmer, P. G. (2007). Steviol glycoside biosynthesis, *Phytochemistry*, 68, pp 1855–1863.
21. Boonkaewwan, C., Toskulkao, C., & Vongsakul, M. (2006). Anti-inflammatory and immunomodulatory activities of stevioside and its metabolite steviol on THP-1 cells, *Agricultural and Food Chemistry*, 54, 3, pp 785-789.
22. Carakostas, M. C., Curry, L. L., Boileau, A. C. (2008). Overview: the history, technical function and safety of rebaudioside A, a naturally occurring steviol glycoside, for use in food and beverages, *Food and Chemical Toxicology*, doi: 10.1016/j.fct.2008.05.003

23. Carakostas, M., & Prakash, I. (2012). Steviol glycosides In *Alternative Sweeteners*, Revised and Expanded, O'Brien Nabors L, Marcel Dekker, New York, NY, USA, pp159–180.
24. Catalan, C., & Joseph-Nathan, P. (1998). The History of Genus *Stevia* (Asteraceae), *The New York Botanical Garden*, 83, 22, pp229-279.
25. Ceunen, S., & Geuns, J. M. C. (2013). Steviol glycosides: chemical diversity, metabolism, and function, *J Nat Prod*, 76, pp1201–28.
26. Crammer, B., & Ikan, R. (1987). Progress in the chemistry and properties of the rebaudiosides, *Developments in Sweeteners*, 3, pp 45-64.
27. Diosa-Toro, M. Urcuqui-Inchima, S., & Smit, J. M. (2013). Arthropod-borne flaviviruses and RNA interference. Seeking new approaches for antiviral therapy, *Adv Virus Res*, 85, pp 91-111.
28. DuBois, G., & Stephenson, R. (1985). Diterpenoid sweeteners. Synthesis and sensory evaluation of stevioside analogs with improved organoleptic properties, *Journal of Medicinal Chemistry*, 1, 28, pp 93-98.
29. Elbashir, S. M., Lendeckel, W., & Tuschl, T. (2001). RNA interference is mediated by 21 and 22 nucleotide RNAs, *Genes and Development*, 15, pp 188-200.
30. Espinoza, M. I., Vincken, J., & Sanders, M. (2014). Identification, quantification, and sensory characterization of steviol glycosides from differently processed *stevia rebaudiana* commercial extracts, *J Agric Food Chem*, 62, pp 11797–804.
31. Fagard, M., Boutet, S., & Morel, J., (2000). AGO1, QDE-2, and RDE-1 are related proteins required for post-transcriptional gene silencing in plants, quelling in fungi, and RNA interference in animals, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, pp 11650-11654.
32. Fire, A. (2007). Gene silencing by double-stranded RNA, *Cell Death Differ*, 12, 14, pp1998-2012.
33. Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., Mello, C. C., (1998). Potent and specific genetic interference by doublestranded RNA in *Caenorhabditis elegans*, *Nature*, 391, pp 806-811
34. Frederico, A., Rusa, P., marin-morales, M., Ruas, C., & Nakajima, J. (1996). Chromosome studies in some *Stevia* cav. (compsitae) species from southern Brazil, *Brazilian Journal of Genetics*, 19, 4, pp 605-609.
35. Geuns, J. M., & Buyse, J. (2006). Identification of steviol glucuronide in human urine, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 7, 54, pp 2794–8.

36. Goyal, S. K., & Goyal, R. K. (2009). Stevia (*Stevia rebaudiana*) a bio-sweetener: a review, *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 1, 61, pp 1-10.
37. Gregersen, S., Jeppesen, P., Holst, J., & Hermansen, K. (2004). Antihyperglycemic effects of stevioside in type 2 diabetic subjects, *Metabolism*, 1, 53, pp 73-76.
38. Guleria, P., & Yadav, S. k. (2014). Overexpression of a glycosyltransferase gene *SrUGT74G1* from Stevia improved growth and yield of transgenic Arabidopsis by catechin accumulation, *Molecular Biology Reports*, 41, pp 1741–1752.
39. Guleria, P., & Yadav, S. k. (2013). Agrobacterium Mediated Transient Gene Silencing (AMTS) in *Stevia rebaudiana*: Insights into Steviol Glycoside Biosynthesis Pathway, *plos one*, 9, 8, p7473.
40. Guo, C., Li, L., Wang, X., & Liang, C. (2015). Alterations in SiRNA and MiRNA Expression Profiles Detected by Deep Sequencing of Transgenic Rice with SiRNA-Mediated Viral Resistance, *PloS one*, 1, 10, pp 116-175.
41. Gupta, E., Purwar, S., Sundaram, S., & Rai, G. K. (2013). Nutritional and therapeutic values of *Stevia rebaudiana*: A review, *Journal of Medicinal Plants Research*, 76, 7, pp. 3343-3353.
42. Gupta, E., Purwar, S., and Sundaram, S., & Rai, G. K. (2013). Nutritional and therapeutic values of *Stevia rebaudiana*: A review, *Journal of Medicinal Plants Research*, 46, 7, pp 3343-3353.
43. Hamilton, A. J., Brown, S., Yuanhai, H., Ishizuka, M., & Lowe, A. (1998). A transgene with repeated DNA causes high frequency, post-transcriptional suppression of ACC-oxidase gene expression in tomato, *Plant J.* 15, pp 737-746
44. Hammond, S. M., Berstein, E., Beach, D., & Hannon. J. (2000). An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells, *Nature*, 404, pp 293-296.
45. Hammond, S., Caudy, A., & Hannon, G. (2001). Post-translational gene silencing by double stranded RNA, *Nature*, 2, pp 110-119.
46. Hardman, R. (2002). **Stevia**, Taylor & Francis Inc, Taylor & Francis, New York, USA.
47. Humphrey, T. V., Richman, A. S., Menassa, R., & Brandle, J. E. (2006). Spatial organisation of four enzymes from *Stevia rebaudiana* that are involved in steviol glycoside synthesis, *Plant Mol. Biol.* 61, pp 47–62.
48. Hutvágner, G., & Zamore, P. D. (2002). RNAi: nature abhors a double-strand, *Elsevier*, 2, 12, pp 225-32.

49. Jain, P., Kachhwaha, S., Kothari, S. L. (2014). Biotechnology and Metabolic Engineering of *Stevia rebaudiana* Bertoni: perspective and possibilities, *International Journal of Life science and Pharma Research*, 3, 3, pp 1-23.
50. Kaushik, R., Pradeep, N., Vamshi, V., Geetha, M., & Usha, A. (2010). Nutrient composition of cultivated stevia leaves and the influence of polyphenols and plant pigments on sensory and antioxidant properties of leaf extracts, *Journal Food Science Technology*, 1, 47, pp27-33
51. Kim, N. C., & Kinghorn, A. D. (2002). Highly sweet compounds of plant origin, *Archives of Pharmacal Research*, 6, 25, pp 725-746.
52. Kinghorn, A. D., Wu, C. D., & Soejarto, D. D. (2001). Stevioside in *Alternative Sweeteners*, Revised and Expanded, O'Brien Nabors L & Marcel Dekker, New York, NY, USA, pp167–183.
53. Kumar, S., & Guleria, P. (2012). Steviol Glycosides from Stevia: Biosynthesis Pathway Review and their Application in Foodsand Medicine, *Food Science and Nutrition*, 52, pp 988–998
54. Kumar, H., Kaul, K., Bajpai-Gupta, S., Kaul, K., & Kumar, S. (2011). A comprehensive analysis of fifteen genes of steviol glycosides biosynthesis pathway in *Stevia rebaudiana* (Bertoni), *Gene*, 37055, 4, pp 9.
55. Leuschner, P. J., & Ameres, S. L. (2006). Cleavage of the siRNA passenger strand during RISC assembly in human cellsggoo, *EMBO Rep*, 3, 7, pp 314-20.
56. Lopez-Martinez, G., Meuti, M., & Denlinger, D. L. (2012). Rehydration driven RNAi: A novel approach for effectively delivering dsRNA to mosquito larvae, *J Med Entomol*, 1, 49, pp 215-218.
57. Lulin, M., Yi, S., Aizhong, C., Zengjun, Q., Liping, X., Peidu, C., Dajun, L., & Xiu-e, W. (2010). Molecular cloning and characterization of an up-regulated UDP-glucosyltransferase gene induced by DON from *Triticum aestivum* L.cv. Wangshuibai, *Molecular Biology Reports*, 37, pp 785–795.
58. Madhav, H., Bhasker, S., & Chinnamma, M., (2013). Functional and structural variation of uridine diphosphate glycosyltransferase (UGT) gene of *Stevia rebaudiana* UGTSr involved in the synthesis of rebaudioside A, *Elsevier*, 63, pp 245-253
59. Mayer, P. (1995). Understanding and controlling transgene expression, *Elsevier science*, 322, 13, pp 17.

60. Modi, A., Litoriya, N., & Prajapati, V. (2014). Transcriptional Profiling of Genes Involved in Steviol Glycoside Biosynthesis in *Stevia rebaudiana* Bertoni during Plant Hardening, *DEVELOPMENTAL DYNAMICS*, 243, pp 1067–1073.
61. Modi, R., & Raj, S. (2013). Analysis of Differentially Expressed Genes Involved in Stevioside Biosynthesis in Cultures of *Stevia Rebaudiana* Bertoni Treated with Steviol as an Immediate Precursor, *Journal of Plant Growth Regulation*, 4, 32, pp 681-944.
62. Moons, N., Borggraeve, W. D., & Dehaen, W. (2012). Stevioside and Steviol as Starting Materials in Organic Synthesis, *Current Organic Chemistry*, 16, pp 1986-1995.
63. Napoli, C., Lemieux, C., & Jorgensen R. (1990). Introduction of chimeric chalcone synthase gene into *Petunia* results in reversible cosuppression of homologous genes in trans, *Plant Cell*, 2, pp 279-289.
64. Olsson, K., & Carlsen, S. (2016). Microbial production of next-generation stevia sweeteners, *Microb Cell Fact*, 15, p 207.
65. Pande, S.S., & Gupta P. (2013). Plant tissue culture of *Stevia rebaudiana* (Bertoni): A review, *J. Pharmacog. Phytother*, 1, 5, pp 26-33.
66. Philippaert, K., & Pironet, A. (2017). Steviol glycosides enhance pancreatic beta-cell function and taste sensation by potentiation of TRPM5 channel activity, *Nature Communications*. 8, pp 14733.
67. Philippe, R., Mey, M., Anderson, J., & Ajikumar, P. (2014). Biotechnological production of natural zero-calorie sweeteners, *Current Opinion in Biotechnology*, 26, pp155–161.
68. Prakash, I., Markosyan, A., & Bunders, c. (2014). Development of Next Generation Stevia Sweetener: Rebaudioside M, *Foods*, 3, pp 162-175.
69. Preuss, S., & Pikaard, C. (2003). **Targeted gene silencing in plants using RNA interference**, David Engelke, Washington University at Saint Louis, pp 23-36.
70. Radhakrishnan, S. K., Layden, T. J., & Gartel, A. L. (2004). RNA interference as a new strategy against viral hepatitis, *Virology* 2, 323, pp173-181.
71. Ramesh, K., & Singh, V. (2006). Cultivation of *Stevia* [*Stevia rebaudiana* Bertoni]: A Comprehensive Review, *Advances in Agronomy*, 512, 89, pp 138-177.

72. Rao, A. B., George, S. A., & Alavala, S. (2015). Metal Salts Assisted Enzyme-Based Extraction of Stevioside from the Leaves of *Stevia rebaudiana* Bertoni, *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 6, pp 734-743.
73. Rao, G., & Rao, P. (2014). Antioxidant Activity of Stevia (*Stevia rebaudiana*L.) Leaf Powder and a Commercial Stevioside Powder, *Food Pharm.Sci*, 2, pp 32-38.
74. Renwick, A. G., & Tarka, S. M. (2008). Microbial hydrolysis of Steviol glycosides, *Food and Chemical Toxicology*, 7, pp 70-4.
75. Richman, A. S., & Gijzen, M., Starratt, A. N., Yang, Z., & Brandle, J. E. (1999). Diterpene synthesis in *Stevia rebaudiana*: recruitment and up-regulation of key enzymes from the gibberellin biosynthetic pathway, *The Plant Journal*, 4, 19, pp 411-421.
76. Saifi, M., Nasrullah, N., Ahmad, M., Ali, A., Khan, J. A., & Abdin M. Z. (2015). In silico analysis and expression profiling of miRNAs targeting genes of steviol glycosides biosynthetic pathway and their relationship with steviol glycosides content in different tissues of *Stevia rebaudiana*, *Plant Physiology and Biochemistry*, 94 , pp 57-64.
77. Savita, S.M., & Sheela, K. (2004). *Stevia rebaudiana* – A Functional Component for Food Industry, *Journal of Human Ecology*, 4, 15, pp 261-264.
78. Shivanna, N., Naika, M., Khanum, F., & Kaul, V. (2013). Antioxidant, anti-diabetic and renal protective properties of *Stevia rebaudiana*, *Journal of Diabetes and Its Complications*, 27, pp 103–113.
79. Singh, S. D., & Rao, G. P. (2005). Stevia: the herbal sugar of 21st century, *Sugar Tech*, 1, 7, pp 17-24.
80. Soejarto, D., & Compadre, C. (1984). A Phytochemical Screening Procedure for Sweet Ent- Kaurene Glycosides in the Genus *Stevia*, *Journal of Natural Products*, 3, 47, pp 439-444.
81. Song, M., & Rossi, j. j. (2017), Molecular mechanisms of Dicer: endonuclease and enzymatic activity, *Biochemical Journal*, 474, pp 1603–1618.
82. Tadhan, M., & Subhash, R. (2007). In vitro antimicrobial activity of *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 1, 5, pp 557-560.
83. Tanaka. T., Kohda, H., Tanaka, O., & Chen, F. (1981). Rubusoside (b-D-glucosyl ester of 13 O-b-D-glucosyl-steviol), a sweet principle of *Rubus chingii* hu (Rosaceae), *Agric. Biol. Chem*, 45, pp 2165–2166.

84. Tiscornia, G., & Singer, O. (2003). A general method for gene knockdown in mice by using lentiviral vectors expressing small interfering RNA, *Proc Natl Acad Sci USA*, 4, 100, pp1844-48.
85. Upreti, M., Dubois, G., & Prakash, I. (2012). Synthetic Study on the Relationship between Structure and Sweet Taste Properties of Steviol Glycosides, *Molecules*, 17, pp 4186-4196.
86. Wang, M. B., & Metzloff, M. (2005). RNA silencing and antiviral defense in plants, *Curr opin plant boil*, 8, pp 1-7.
87. Waterhouse, P., & Helliwell, C. (2003). Exploring plant genomes by RNA-induced gene silencing, *Nature*, 4, 29-38.
88. Waterhouse, P., & Helliwell, C. A. (2003). Exploring plant genomes by RNA-induced gene silencing, *Nat Rev*, 4, pp 29–38.
89. Wesley, V., Helliwell, C., Smith, N., Wang, M., Rouse, D., Liu, Q., Gooding, P., Singh, S., Abbott, D., Stoutjesdijk, P., Robinson, S., Gleave, A., Green, A., & Waterhouse, P. (2001). Construct design for efficient, effective and highthroughput gene silencing in plants, *The Plant Journal*, 6, 27, pp 581-590.
90. Westhof, E., Bindreif, A., Schön, A., Hartmann, R. K., Kambhampati, D., Westermeier, R., Naven, T., Gjerde, D. T., Hanna, C. P., Hornby, D., & Westermeier, R. (2005). **RNA Interference in Practice: Principles, Basics, and Methods for Gene Silencing in *C. elegans*, *Drosophila*, and Mammals**, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
91. Wittrup, A., & Lieberman, J. (2015). Knocking down disease a progress report on siRNA therapeutics, *Nat Rev Genet*, 9, 16, pp 543-552.
92. Woelwer-Rieck, U., Lankes, C., Wawrz, A., & Wüst, M. (2010). Improved HPLC method for the evaluation of the major steviol glycosides in leaves of *Stevia rebaudiana*, *European Food Research and Technology*, 4, 231, pp 581-588.
93. Yadav, K., Singh, S., Dhyani, D., & Ahuja, P. S. (2011). A review on the improvement of Stevia [*Stevia rebaudiana* (Bertoni)], *Canadian Journal of Plant Science*, 91, pp 1_27.
94. Žlabur, J.S., Voca, S., Dobricevic, N., Jezek, D., Boslikjkov, J.T., & Brncic, M. (2013). *Stevia rebaudiana* Bertoni - A Review of Nutritional and Biochemical Properties of Natural Sweetener, *Agriculturae Conspectus Scientificus*, 1, 78, pp 25-30.

Abstract:

Cloning of an RNAi construct to silence *SrUGT74G1* gene involved in stevioside biosynthesis in *Stevia rebaudiana*

The UDP-glycosyltransferase^{74G1} enzyme that is being coded by *SrUGT74G1* involves in steviol glycosides (SGs) biosynthesis in *Stevia rebaudiana* Bertoni. The corresponding enzyme catalyzes the synthesis of tri-glucosylated 1, 2-stevioside by glycosylating steviol biocide at C-19 position. It plays an indirect role in the production of steviol-13-O-monoglucoside and rubusoside as byproducts with the glycosylation of steviol and steviol monoside. Stevioside (5-10% of leaf dry weight) is the most abundant SGs present in *Stevia rebaudiana* leads to a bitter taste. In order to improve the quality of the stevia sugar flavor, the reduction of the expression of stevioside by *srUGT74G1* gene silencing was considered. For RNAi construct preparation, primers corresponding to partial fragment of size 110 bp of this gene were designed. The forward and reverse primers were supplemented at 5'-end with the restriction site *EcoRI* and *KpnI* to generate fragments in sense orientation. Similarly, in order to generate antisense fragment, the restriction sites of *XbaI* and *BamHI* were added to forward and reverse primers at 5'-end. Total RNA was extracted from the *Stevia* leaf tissue and the cDNA was synthesized. Nested polymerase chain reaction was used to amplify sense and anti-sense fragments and their sequences were confirmed in pTG19-T. Both fragments were excised from pTG19-T and cloned in pHANNIBAL.

Keyword: pHANNIBAL, silencing gene, sense strand, Antisense strand, *Stevia rebaudiana*.



Shahrood University of Technology

Faculty of Agriculture

M.Sc. Thesis in Agricultural Biotechnology

**Cloning of an RNAi construct to silence *SrUGT74G1* gene involved
in stevioside biosynthesis in *Stevia rebaudiana***

By:

Fatemeh Shojaat rafsanjani

Supervisors:

Dr. Naser Farrokhi

Dr. Hossein Askari

Advisor:

Dr. Shahrokh Gharanjik

September 2018