ژنتیک نوین
دوره پانزدهم ، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۹
صفحه ۱۷۰ - ۱۶۱

بررسی بیان ژن‌های *Chalcone Synthase* و *ABA-8′ Hydroxylase* مرتبط با زودرسی در انگور یاقوتی سیستان

Studying of Gene Expression *Chalcone Synthase* and *ABA-8′ Hydroxylase* Related to Early Ripening In Yaghooti Grape of Sistan

حمیدرضا جهانتیغ[۱]، عباسعلی امام‌جمعه[*۱]، محمود سلوکی[۱]، فروزان حیدری[۱]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، دانشیار، استاد، مربی، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، ایران

Jahantigh H[1], Emamjomeh A[*1], Solouki M[1], Heidari F[1]

1- MSc Graduated, Associated Professor, Professor, Lecturer, Department of Plant Breeding and Biotechnology (PBB), University of Zabol, Zabol, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: aliimamjomeh@uoz.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۸/۰۳/۲۳ - تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۲/۰۳)

چکیده

انگور یاقوتی سیستان، زودرس‌ترین انگور در ایران می‌باشد و هر ساله محصول آن در اواخر اردیبهشت و اوایل خرداد برداشت می‌شود. زودرس بودن انگور یاقوتی یک صفت مطلوب است. چرا که محصول، پیش از آغاز بادهای گرم و خشک ۱۲۰ روزه سیستان و گرمای شدید تابستان برداشت می‌شود. در این تحقیق الگوی بیانی ژن‌های *Chalcone Synthase* و *ABA-8′ Hydroxylase* به‌عنوان فاکتورهای رونویسی دخیل در فرآیند زودرسیدن انگور یاقوتی سیستان، با استفاده از نمونه‌های برگی ارقام زودرس (یاقوتی قرمز و یاقوتی سفید) و ارقام دیررس (فخری و چشم‌گاوی) و رقم شاهد میان‌رس سنگی در دو مرحله نموی خوشه انگور پر شدن حبه‌ها و رسیدگی حبه‌ها) با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در زمان واقعی مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج به‌دست آمده از تغییرات بیانی ژن‌های مورد مطالعه، برای هر دو ژن الگوی بیانی معنی‌داری را در ارقام زودرس نسبت به ارقام دیررس در مراحل نموی خوشه انگور نشان دادند. نتایج نشان دادند که ژن *ABA-8′ Hydroxylase* یک عامل رونویسی دخیل در زودرسیدن انگور یاقوتی سیستان می‌باشد و ژن *Chalcone Synthase* نقش مؤثر در فرآیند رسیدگی و تغییر رنگ حبه‌ها ایفا می‌نماید.

واژه‌های کلیدی

کالکون سنتاز
اسید آبسیزیک ′۸-هیدروکسیلاز
انگور
زودرسی
عوامل رونویسی
واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در زمان واقعی

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-13]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1399.15.2.4.7]

مقدمه

انگور یکی از محصولات باغی مهم در ایران و دنیا به شمار می‌آید. ایران از لحاظ تولید انگـور در مرتبـه هفتم قرار دارد. در حال حاضر انگور وسیع‌ترین دامنه گسترش در بین درختان خزان‌دار دنیا را دارد (Afrooze et al. 2009). طبق آمارنامه کشاورزی سال ۱۳۹٦ از مجموع ۳۸۰۸/۳ هکتار سطح زیر کشت انگور استان سیستان و بلوچستان (اعم از سطح بارور و غیربارور) ۳۱۸۷٤/۳ تن در هکتار محصول برداشت شد (Ahmadi et al. 2018). حدود ۷۰ درصد باغات انگور سیستان شامل رقم یاقوتی و بقیه از ارقام فخری، لعل، بی‌دانه، چشم گاوی و سنگی می‌شود. سابقهٔ کشت انگور در این منطقه به حدود ۵۰ سال می‌رسد. در طی این سال‌ها کشاورزان اقدام به کشت ارقام مختلف آن نموده‌اند که در بیست سال اخیر تولید انگور به‌خصوص انگور یاقوتی رشد چشمگیری داشته به‌طوری‌که در حال حاضر عمدهٔ سطح زیر کشت این محصول را به خود اختصاص داده و از عوامل مهم توسعهٔ این رقم، زودرسی و قیمت خوب آن در بازار مصرف می‌باشد (Halimi et al. 2013). انگور یاقوتی قرمز متعلق به گروه انگورهای بی‌دانه است که به بیماری‌ها و شرایط رشد در آب و هوای سیستان (بادهای گرم و خاک شور) مقاوم است (Allahdou et al. 2012). این رقم زودرس‌ترین انگور کشور بوده و حدود هفته اول خرداد قابل‌برداشت می‌باشد (Afrooze et al. 2009). پس از لحاظ اقتصادی برای مردم سیستان حائز اهمیت است. خوشه‌های این انگور فشرده و دارای حبه‌های کوچک است (Allahdou et al. 2012). رشد روزافزون جمعیت کره زمین منجر به تغییر کاربری اراضی، تخریب جنگل‌ها، افزایش فعالیت‌های کشاورزی و دامداری و تولید ضایعات جامد و مایع شده است. به‌تبع آن گسترش روزافزون فعالیت‌های صنعتی برای تأمین رفاه و نیازهای جمعیت رو به رشد، موجب شد تا پس از انقلاب صنعتی به‌تدریج تغییرات مشهودی در اقلیم کره زمین به‌وجود آید که بارزترین آن، افزایش متوسط دمای هوا، افزایش پدیده‌های حدی اقلیمی نظیر سیل، تگرگ، طوفان‌های حاره‌ای، امواج گرمایی، افزایش سطح آب دریا، ذوب شدن یخ‌های قطبی، خشک‌سالی و سایر تغییرات اقلیمی است (Stracke et al. 2001). باد و دمای بالای تابستان از عوامل محدودکننده کشاورزی سیستان به‌شمار می‌روند و باعث افزایش تعرق گیاهان شده که کاهش کیفیت و مرغوبیت و بازارپسندی انگور و افزایش هزینه‌های تولید را در بر خواهد داشت. ارقام زودرس نقش مفیدی در حفظ محصول نسبت به تنش‌های محیطی (حرارت، خشکی، باد) در تابستان ایفا می‌نمایند که موجب افزایش کیفیت محصول این رقم می‌شود (Fortes et al. 2011).

در تعریف کلاسیک رسیدن میوه به دو صورت کلیماکتریک[1] و غیر کلیماکتریک[2] تعریف شده است. میوه کلیماکتریک افزایش ناگهانی تنفس را در شروع رسیدن نشان می‌دهد که معمولاً با افزایش هورمون گازی اتیلن همراه است. در میوه غیر کلیماکتریک تنفس در طول رسیدن افزایش نمی‌یابد و اغلب برای تکمیل بلوغ نیاز به اتیلن ندارد (Fan et al. 2018). انگور (*Vitis vinifera* L.) میوه غیر کلیماکتریک می‌باشد که به‌عنوان میوه رسمی، کشمش خشکیده و برای شراب‌گیری[3] و عصاره‌گیری استفاده می‌شود. رشد انگور از یک منحنی سیگموئیدی دوگانه[4] پیروی می‌کند. به‌طوری‌که در مرحله اول اندازه حبه افزایشی سریع دارد. مرحله دوم فاز تأخیری[5] و مرحله سوم افزایش سریع دیگری در اندازه است، که همراه با تجمع قندها، کاهش میزان اسید، رنگ‌پذیری و رسیدن حبه‌ها می‌باشد. گسترش سلول‌های پریکارپ در فاز رسیدگی که دومین مرحله از منحنی رشدی انگور است رخ می‌دهد. در فاز رسیدگی انگور تغییرات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی مختلفی رخ می‌دهد. در شروع فاز رسیدگی یا تغییر رنگ[6] حبه‌ها افزایش تجمع قند، نرم شدن بافت، ساخت آنتوسیانین، متابولیسم اسیدهای آلی، تجمع ترکیبات عطر و طعم رخ می‌دهد (Coombe 1992).

در سال‌های اخیر پژوهش درباره پایه‌های مولکولی تنظیم رسیدگی افزایش پیدا کرده است. وضعیت آب، شرایط نور و دما ممکن است سبب تسریع، تأخیر یا تسهیل در رسیدگی شود (Kühn Weber 2014). رسیدگی میوه متاثر از عوامل مختلفی مانند تغییرات طبیعی محیط زیست شامل دما، آب، نور خورشید،

[1] Climacteric
[2] Non-climacteric
[3] Vinification
[4] Double sigmoid curve
[5] Lag phase
[6] Veraison

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-13]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1399.15.2.4.7]

بیماری‌ها، تومورهای گیاهی و تجمع گلوکز می‌باشد. همچنین هورمون‌های گیاهی به‌خصوص اتیلن و آبسزیک اسید نقش مهمی را در رشد میوه‌ها ایفا می‌کنند (Jia et al. 2016). آگاهی از میزان نیاز سرمایی یا تغییرات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی درونی گیاه به ما در مدیریت بهتر کشت انگور در مناطق گرم و نیمه‌گرم که جنبه‌های اقتصادی خاصی دارد، کمک ویژه‌ای می‌کند. به هر حال به‌دلیل زودرسی، نوبرانه بودن، کیفیت و درآمد بالا، تمایل به تولید و پرورش انگور در مناطق گرم افزایش یافته است (Corrales-Maldonado 2010).

فلاونوئیدها گروه خاصی از محصولات طبیعی پلی‌فنلی با ۱۵ کربن در گیاهان هستند که سه حلقه C , B , A اختصاصی آن‌ها، از پیش سازهای مشتق از فنیل پروپانوئید و استات تولید می‌شوند. این مواد اعمال فیزیولوژیکی و اکولوژیکی مختلفی در گیاهان را موجب می‌شوند کالکون سنتاز واکنش تبدیل یک مولکول P–کوماریل کوآنزیم A و سه مولکول مالونیل کوآنزیم A به نارینجین کالکون را کاتالیز می‌کند که نخستین مرحله در مسیر بیوسنتز فنیل پروپانوئید می‌باشد و تولید فلاونوئیدها را منجر می‌گردد (Yang et al. 2002). بیوسنتز فلاونوئیدها پیچیده و مراحل آنزیمی متعددی در آن درگیر می‌شوند. در مراحل اولیه سنتز فلاونوئیدها، فنیل آلانین مشتق از مسیر شیکمیک به وسیله آنزیم‌های مسیر فنیل پروپانوئیدی (فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL))، سینامات ٤ هیدروکسیلاز (C4H) و ٤– کومارات- کوانزیم آ لیگاز (4 CL) به کوماریل کوانزیم آ تبدیل می‌شود. کالکون سنتاز (CHS) اولین آنزیم سنتز فلاونوئید موجب ترکیب کوماریل کوانزیم آ با سه مولکول مالونیل کوانزیم آ حاصل از استیل کوانزیم آ برای تشکیل نارینجین می‌شود. سپس نارینجنین کالکون به‌وسیله کالکون ایزومراز (CHI) به نارینجنین تبدیل می‌شود. نارینجنین به وسیله گلیکوزیله شدن، آسیله شدن و متیله شدن سه حلقه خود به انواع دیگر تبدیل می‌شود (Mori et al. 2013). تنش‌های محیطی مثل نور، پرتوی فرابنفش، آسیب دیدگی و زخم، پاتوژن‌ها و عصاره‌های قارچی باعث القای و کاهش بیان آن می‌شوند (Kumar And Pandey 2013).

اسید آبسیزیک (ABA) یکی از هورمون‌های گیاهی مهم است که در پروسه‌های نموی مختلفی نقش ایفا می‌کند که از این میان نقش اسید آبسیزیک به‌عنوان هورمون عمومی تنش جالب توجه است (Gao et al. 2002). آبسیزیک اسید، یکی از مهم‌ترین تنظیم کننده‌های نمو گیاهی و پاسخ به تنش‌های محیطی می‌باشد (Wang et al. 2011). مسیرهای متنوعی برای کاتابولیسم ABA وجود دارد اما به‌نظر می‌رسد *ABA-8′ hydroxylase* مسیری غالب، برای غیرفعال کردن ABA به شکل مرحله‌ای است. کاتابولیسم ABA توسط ژن کاتالیزور-*ABA* Cytechrome P450 , *8′ hydroxylase* انجام می شود. ژن *CYP707A* در شرایط تنش‌های محیطی با افزایش تجمع ABA غیرفعال شده و با تخریب سریع ABA انباشته شده و بهبود آن در هنگام آبیاری مجددا فعال می‌شود (Umezawa et al. 2006). مسیر غالب هیدروکسیلینگ *ABA-8′ hydroxylase* است که گام محدود کننده سرعت در کاتابولیسم ABA می‌باشد هر سه فرم از ABA هیدروکسیلیکینگ را حفظ می‌کنند (Zhou et al. 2004).

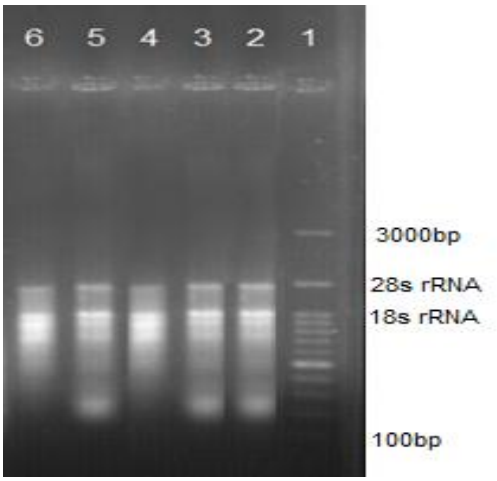
رقم یاقوتی سیستان زودرس ترین انگور کشور بوده و هفته اول خرداد قابل برداشت است. بنابراین بررسی عوامل زودرسی و فاکتورهای رونویسی این انگور اهمیت ویژه‌ای دارد. در این پژوهش ابتدا ژن‌های عوامل رونویسی دخیل در زودرسی انگور مورد بررسی قرار گرفتند، سپس دو ژن *Chalcone Synthase* و *ABA-8′ Hydroxylas* به‌عنوان فاکتورهای رونویسی و ژن *18S* به‌عنوان ژن خانه‌دار انتخاب شد و بیان این ژن‌ها در مراحل فیزیولوژیکی مختلف و در نمونه‌های برگی ارقام زودرس (یاقوتی قرمز و سفید) و دیررس (فخری و چشم گاوی) انگور منطقه سیستان بررسی شد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق، از بوته‌های انگور موجود در مرکز تحقیقات کشاورزی زهک استفاده شد. انتخاب نمونه از برگ، براساس تجربیات پیشین انجام شد (Boss et al. 1996; Walker et al. 2007; Wu et al. 2015b; Degu et al. 2019). نمونه‌برداری از برگ پنج رقم شامل: ارقام زودرس یاقوتی قرمز و سفید، رقم متوسط رس سنگی و ارقام دیررس فخری و چشم‌گاوی در دو مرحله نموی، حبه پرکنی و رسیدگی انجام شد. در هر مرحله نمونه‌های برگی در ۳ تکرار بیولوژیکی و از گره‌های مختلف

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-13]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1399.15.2.4.7]

روی شاخه‌های انگور جمع‌آوری شد. استخراج RNA کل از نمونه‌های برگی انگور با استفاده از کیت خریداری شده از شرکت دنا زیست آسیا و طبق روش پیشنهادی این شرکت انجام شد. به‌منظور تعیین کیفیت RNA استخراج‌شده از الکتروفورز ژل آگارز براساس روش Sambrook et al. (1989) استفاده (شکل ۱) و تعیین غلظت RNA Total با اسپکتوفتومتر انجام شد. میزان غلظت Total RNA استخراج‌شده برای مجموع نمونه‌های بررسی شده با دستگاه اسپکتوفتومتر حداقل و حداکثر برابر با ۱/۹۷ – ۱/۸۱ نانوگرم بر مایکرولیتر (ng/µl) رویت شد. با مراجعه به پایگاه داده‌های NCBI توالی نوکلئوتیدی ژن‌های مورد نظر جستجو شد. پس از جستجوی توالی نوکلئوتیدی ژن‌های مذکور، با استفاده از نرم‌افزار primer3 و در نظر گرفتن خصوصیات مطلوب برای استفاده در روش qRT-PCR آغازگرها طراحی شدند (جدول ۱). cDNA با استفاده از کیت خریداری شده از شرکت REXu کشور کره جنوبی و طبق روش توصیه شده توسط شرکت سازنده انجام شد. در زمان اجرای آزمایش‌ها به‌منظور جلوگیری از بروز خطا و نیز برای راحتی و سرعت عمل بیشتر، محلول پایه برای هر جفت آغازگر به‌صورت مجزا مطابق با جدول ۲ تهیه شد. با توجه به این که حجم کلی مخلوط برای واکنش برای یک نمونه ۲۰ میکرولیتر بود، میزان cDNA برای هر نمونه یک میکرولیتر و محلول پایه آغازگر ۱۹ در نظر گرفته شد. سپس تیوب‌ها در دستگاه ترموسایکلر قرار گرفتند. برنامه چرخه دمایی دستگاه مطابق با جدول ۳ برنامه‌ریزی شد.



شکل ۱- RNA استخراج شده

جدول ۱- اسامی ژن‌ها و توالی آغازگرهای مورد استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در زمان واقعی

نام ژن	توالی آغازگر	درصد CG	دمای اتصال	شماره دسترسی
Abscisic acid-8′ Hydroxylase	FOR AAAGGCACTA TGGGCAAGG REV GCAAACAGCA CTCCGATGA	۵۲/۶۳	۵۷/۷۱ ۵۸/۴۶	XM002282752.3
Chalcone Synthase	FOR ATGGTGGTGG TTGAAGTA REV GCTTGGTGA GTTGATAGTC	۴۴/۴۴ ۴۷/۳۷	۵۲/۷۸ ۶۰/۱۳	XM 019224647
18S	FOR GGGCATTCGTATTTCATA-GTCAGAG REV CGGTTCTTGATTAATGAA-AACATCCT	۴۴ ۳۴/۶	۶۱/۳ ۵۹/۵	X67238.1

جدول۲- مواد موردنیاز برای Real Time PCR

مواد مورد نیاز	غلظت پایه	مقدار (µl)
Eva Green qPCR Mix-Rox	۵x	۴
آغازگر رفت	۱۰Pmol/ul	۰/۵
آغازگر برگشت	۱۰Pmol/ul	۰/۵
cDNA	-	۱
آب مقطر دوبار استریل	-	۱۴
حجم نهایی		۲۰

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-13]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1399.15.2.4.7]

جدول ۳- برنامه دمایی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در زمان واقعی (RT-PCR)

مرحله	دما و زمان مورد استفاده
فعال‌سازی ابتدایی آنزیم	۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه
واسرشت شدن	۹۵درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۲ ثانیه
اتصال آغازگرها	۵۷/۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤٥ ثانیه
بسط ترکیبی	۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۲ ثانیه
منحنی ذوب	افزایش دما از ۳۳ درجه تا ۵۲ درجه هر ۵ ثانیه ۱درجه

تجزیه و تحلیل نتایج با شروع واکنش منحنی تکثیر رسم شده توسط دستگاه آغاز می‌شود و برای تجزیه داده‌ها از روش ΔCt استفاده شد. در این روش بین Ct های ژن کنترل داخلی و ژن مورد نظر تفاوت وجود دارد. بنابراین این تفاوت را در Ctهای ژن مورد نظر و ژن کنترل، اعمال کردیم و داده‌ها که همانCtها هستند را نرمال نمودیم. برای نرمال کردن داده‌ها Ct ژن مورد بررسی را در تک تک نمونه‌ها از Ct ژن کنترل داخلی همان نمونه تفریق کردیم. از آن‌جایی که داده‌های نرمال برای هر نمونه از تفریق Ct ژن مورد نظر از Ct ژن کنترل داخلی به‌دست آمده است داده نرمال شده را دلتا Ct (ΔCt) می‌نامیم.

ΔCt=Ct(ژن مورد نظر) - Ct (ژن کنترل داخلی)

ΔCt از نوع لگاریتمی برپایه ۲ می‌باشد (زیرا در real time هر سیکل محصول ما ۲ برابر می‌شود). بنابراین بایدΔCtها را به جای تقسیم کردن از هم تفریق نمود. پارامتر جدید را که از تفریق ΔCt نمونه مورد نظر از ΔCt نمونه شاهد به‌دست آمده است دلتا دلتا Ct (ΔΔCt) می‌نامیم.

ΔΔCt =Ct ΔCt (نمونه مورد نظر) – ΔCt (نمونه شاهد)

Ct، ΔCt و ΔΔCt بر اساس لگاریتم بر پایه ۲ هستند بنابراین آن‌ها را به حالت خطی درآوردیم، پس 2^(-ΔΔCt) بیانگرسطح بیان نسبی ژن بود:

The Relative gene expression (RGE) = 2^(-ΔΔCt)

در پایان تجزیه واریانس داده‌های به‌دست آمده نرم‌افزار SAS نسخه ۹/٤ انجام شد. مقایسه میانگین داده‌ها نیز به روش دانکن در سطح احتمال یک و پنج درصد انجام گرفت.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از مقایسه میانگین بر هم کنش ارقام و مراحل نموی برای بیان ژن *ABA-8′ Hydroxylase* نشان داد که بیشترین مقدار بیان ژن *ABA-8′ Hydroxylase* در مرحله پر شدن حبه‌ها مربوط به رقم یاقوتی سفید (۰/۰۸۱) و کمترین مقدار بیان نسبی این ژن در رقم یاقوتی قرمز (۰/۰۵۷) مشاهده شد. این در حالی است که در مرحله رسیدگی حبه‌ها، بیش‌ترین بیان نسبی ژن *ABA-8′ Hydroxylase* در رقم چشم‌گاوی (۰/۲۲۹) و کمترین مقدار بیان نسبی این ژن در رقم یاقوتی سفید (۰/۰۲٦) مشاهده شد (شکل۲).

بررسی نتایج میزان بیان نسبی ژن *ABA 8′-hydroxylase* حاکی از این است که بیان این ژن در ارقام (زودرس و دیررس)، مراحل نموی (پرشدن حبه‌ها و رسیدگی حبه‌ها) و همچنین اثر متقابل ارقام و مراحل نموی معنی‌دار است (جدول ٤). بدین صورت که تولید محصول در ارقام زودرس (یاقوتی قرمز و یاقوتی سفید) در اردیبهشت ماه با مکانیسم فرار از تنش و در ارقام دیررس (فخری و چشم گاوی) در شهریور ماه با مکانیسم تحمل تنش، نسبت به تنش‌های محیطی تابستانه حوضه سیستان (درجه حرارت بالای تابستان، خشکی و بادهای ۱۲۰ روزه سیستان) صورت می‌گیرد که با عدم حضور هورمون تنش (ABA) مطابق می‌باشد، این در حالیست که در ارقام دیررس چشم‌گاوی و فخری هورمون تنش (ABA) در مرحله پر شدن حبه‌ها (تیر و مرداد ماه)، همزمان با تنش های محیطی حوضه سیستان فعالیت داشته و بیان نسبی ژن *ABA-8′ Hydroxylase* کمترین میزان نسبی بیان را از خود نشان داده است، در مرحله رسیدگی حبه‌ها با گذراندن دوره تنش‌های محیطی تابستانه (درجه حرارت بالای تابستان، خشکی و بادهای ۱۲۰ روزه سیستان) و با مساعد شدن شرایط محیطی هورمون تنش (ABA) غیر فعال شده و بیان نسبی ژن *ABA-8′ Hydroxylase* بیشترین میزان نسبی بیان را داشته است، این امر تأییدگر ایفای نقش مؤثر ژن *ABA-8′ Hydroxylase* در القای هورون تنش (ABA) می‌باشد. در مرحله رسیدگی حبه‌ها بیشترین بیان نسبی ژن اسید آبسیزیک ′۸-هیدروکسیلاز در رقم

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-13]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1399.15.2.4.7]

چشم‌گاوی بوده است، بدین صورت که بیان نسبی هورون تنش (ABA) در مرحله پر شدن حبه‌ها در رقم چشم‌گاوی با تنش‌های محیطی تابستان (ماه‌های تیر و مرداد) صورت گرفته و پس از گذراندن دوره تنش (شهریور) مرحله رسیدگی حبه‌ها افزایش بیان نسبی ژن اسید آبسیزیک ′۸-هیدروکسیلاز در این رقم، موجب القای هورون تنش (ABA) شده است. بررسی میزان بیان نسبی ژن *ABA-8′ Hydroxylase* برای ارقام زودرس (یاقوتی قرمز و سفید) در مراحل پر شدن حبه‌ها و رسیدگی حبه‌ها به‌ترتیب یک بیان متوسط و ضعیف را از خود نشان داده است، با توجه به اینکه مکانیسم دفاعی در ارقام زودرس فرار از تنش می‌باشد، میزان بیان نسبی متوسط در مرحله پر شدن حبه‌ها، عدم حضور تنش‌های محیطی تابستانه حوضه سیستان (درجه حرارت بالای تابستان، خشکی و بادهای ۱۲۰ روزه سیستان) همراه با عدم فعالیت هورمون تنش (ABA) در فروردین ماه را تأیید می‌نماید، البته میزان بیان نسبی ضعیف در مرحله رسیدگی حبه‌ها بیانگر آغاز عمل هورمون تنش (ABA) در اواخر اردیبهشت ماه با توجه به آغاز دوره تنش، توسط تنش‌های محیطی تابستانه حوضه سیستان می‌باشد. در بین ارقام زودرس و دیررس تفاوت الگوی بیانی معنی‌داری در بیان ژن *ABA-8′ Hydroxylase* مشاهده می‌شود و این نکته حائز اهمیت است، همان‌طور که در شکل ۲ مشاهده شد در ارقام زودرس بیشترین میزان بیان ژن *ABA-8′ Hydroxylase* در مرحله پر شدن حبه‌ها می‌باشد در حالی که در ارقام دیررس مرحله رسیدگی حبه‌ها دارای بیشترین میزان بیان این ژن بوده است. با توجه به نقش *ABA-8′ Hydroxylase* در تخریب هورمون (ABA) و در نتیجه فرآیند رسیدگی حبه‌ها افزایش بیان آن در مرحله پر شدن حبه‌ها یکی از عوامل اصلی در زودرسی ارقام یاقوتی قرمز و سفید نسبت به ارقام فخری و چشم‌گاوی می‌باشد. بیان نسبی این ژن در ارقام دیررس (چشم‌گاوی و فخری) در مرحله رسیدگی حبه‌ها بیشترین میزان بیان را دارا بوده و افزایش بیان این ژن در مرحله رسیدگی حبه‌ها در ارقام دیررس تأییدی بر نقش این ژن در فرآیند رسیدگی میوه می‌باشد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت تفاوت زمان رسیدگی ارقام زودرس و دیررس انگور، در میزان بیان ژن *ABA-8′ Hydroxylase* نیست بلکه عامل اصلی تنش‌های محیطی حوضه سیستان می‌باشد که بیان ژن *ABA-8′ Hydroxylase* را تحت تأثیر قرار می‌دهد. به‌عبارت دیگر بیان زود هنگام ژن *ABA-8′ Hydroxylase* در ارقام زودرس (مرحله نموی پر شدن حبه‌ها) در تسریع فرآیند نموی رسیدگی حبه‌های انگور یاقوتی سیستان نقش کلیدی دارد.

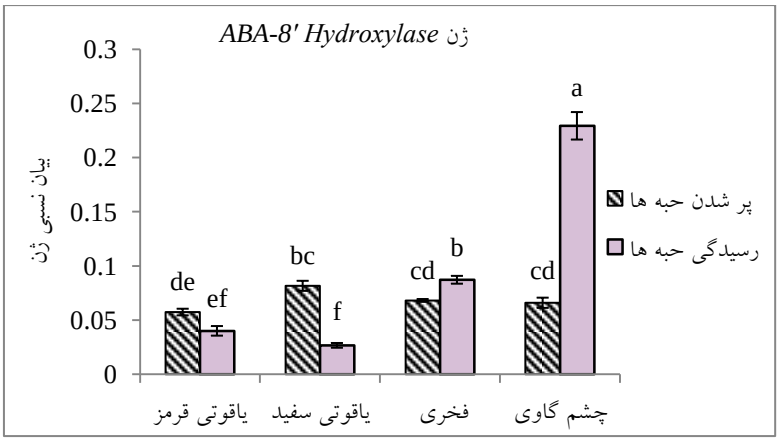
جدول ٤- جدول تجزیه واریانس ژن *ABA-8′ Hydroxylase*

منابع تغییرات		درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	ارزش F
رقم(A)		۳	۰/۰۳۷۲٦۳۳۹**	۰/۰۱۲٤۲۱۱۳**	۱۰۵/۱٤۸
خطا A (E_A)		۸	۰/۰۰۰۹٤۵۰٤	۰/۰۰۰۱۱۸۱۳	
مرحله نموی (B)		۱	۰/۰۰٤۵٤۷۵٦**	۰/۰۰٤۵٤۷۵٦**	٦۳/۳۱۲
مرحله نموی × رقم (A× B)		۳	۰/۰٤۰۹۹۳٦۵**	۰/۰۱۳٦٦٤۵۵**	۱۹۰/۲٤۱
خطا B (E_B)		۸	۰/۰۰۰۵۷٤٦۲	۰/۰۰۰۰۷۱۸۲۷۵	
	RB	۲	۰/۰۰۰۱۰۲۱۸	۰/۰۰۰۰۵۱۰۹	
	ABR	٦	۰/۰۰۰٤۷۲٤٤	۰/۰۰۰۰۷۸۷٤	
کل		۲۳	۰/۰۸٤۳۲٤۲٦		
ضریب تغییرات (CV)			۱۰/۸۱۷		

**: تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-13]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1399.15.2.4.7]



شکل ۲- میزان بیان نسبی ژن *ABA-8' Hydroxylase* در ارقام مختلف برای دو مرحله نموی پر شدن حبه‌ها و رسیدگی حبه‌ها

بدین صورت که ژن *ABA-8' Hydroxylase* قبل از دوره تنش فعال بوده و در ارقام دیررس پس از گذراندن دوره تنش و فعالیت در مرحله رسیدگی حبه‌ها نقش بسزایی ایفا می‌نموده است. در پژوهشی رقم والد Yinhong و دو رقم جهش یافته YH-20-2, (YH-20-1) با کمک پروفایل‌های دیجیتال بیان ژن برای شناسایی ژن‌های مرتبط با زودرسی، عطر و رنگ پوست مورد بررسی قرار گرفتند. به این صورت که از نمونه برگی کتابخانه ژنی تهیه شده و توالی‌یابی کتابخانه DEG با تکنیک Illumina/Hisseq انجام شد. نتایج بیان ۲۹۹۱ ژن مختلف در رقم (YH-20-1) و ۵۰۴۹ ژن مختلف در رقم (YH-20-2) نسبت به والد را نشان داده است. بعد از آن تجزیه و تحلیل کاربردی دو پایگاه داده GO و KEGG انجام شد که این تجزیه و تحلیل با مقایسه اطلاعات حاشیه‌نگاری GO و KEGG نشان داد که ژن زودرسی آبسزیک اسید-′۸ هیدروکسیلاز در YH-20-1 بیان بالایی دارد و یک ژن کلیدی در زودرسی انگور به‌شمار می‌رود (Wu et al. 2015a).

ژن *Chalcone Synthase* یک آنزیم کلیدی رسیدگی و تغییر رنگ میوه، بیان ژن‌های مؤثر در سنتز فلاونوئید سنتاز و تنظیم تولید رنگدانه‌ها می‌باشد. این ژن در بسیاری از گیاهان اولین آنزیم کلیدی دخیل در مسیر بیوشیمیایی ترکیبات فلاونوئیدی و تولید آنتوسیانین بوده و نقش مهمی در تولید رنگدانه های میوه ایفا می‌کند که میزان بیان این ژن به‌شدت تحت تأثیر تنش‌های محیطی قرار می‌گیرد. فلاونوئیدها از مهم‌ترین ترکیبات موجود در انگور می‌باشند و عمدتاً در پوست و بذر آن تجمع یافته و تعیین کننده رنگ، کیفیت و خواص دارویی انگور هستند (Bohm 1998; Bourgaud et al. 2001; Vermerris and Nicholson 2007; Kennedy 2008). نتایج تجزیه واریانس برای ژن *Chalcone synthase* حاکی از وجود تفاوت معنی‌دار در ارقام و مراحل نموی به‌ترتیب در سطح احتمال پنج و یک درصد می‌باشد (جدول ۵).

بیشترین میزان بیان ژن *Chalcone synthase* در مرحله نموی پرشدن حبه‌ها می‌باشد، با توجه به این امر که این ژن یک ژن کلیدی آغازگر سنتز فلاونوئیدها و سایر عوامل مؤثر در تولید رنگدانه‌ها می‌باشد بیان معنی‌دار این ژن در سطح مراحل نموی برای ارقام چشم‌گاوی و فخری و یاقوتی قرمز مطلوب می‌باشد. بیشترین مقدار بیان نسبی ژن کالکون سنتاز مربوط به رقم فخری در هر دو مرحله پر شدن حبه‌ها و رسیدگی حبه‌ها می‌باشد. بیان نسبی این ژن در رقم یاقوتی سفید، کمترین میزان بیان را نشان می‌دهد که این میزان بیان نسبی به‌دلیل عدم سنتز فلاونوئیدها و سایر عوامل تولید رنگدانه‌ها و رنگیزه در این رقم زودرس می‌باشد.

در مطالعه‌ای با هدف بررسی ژن‌های مرتبط با زودرسی در انگور، لاین Summer Black که دارای جهش جوانه[1] (SBBM) بود و Summer Black کنترل یا شاهد[2] (SBC) انتخاب شدند. تفاوت این دو نوع انگور در تاریخ رسیدگی آن‌ها بود. به‌طوری‌که میوه

[1] Summer Black Bud Mutation (SBBM)
[2] Summer Black Control (SBC)

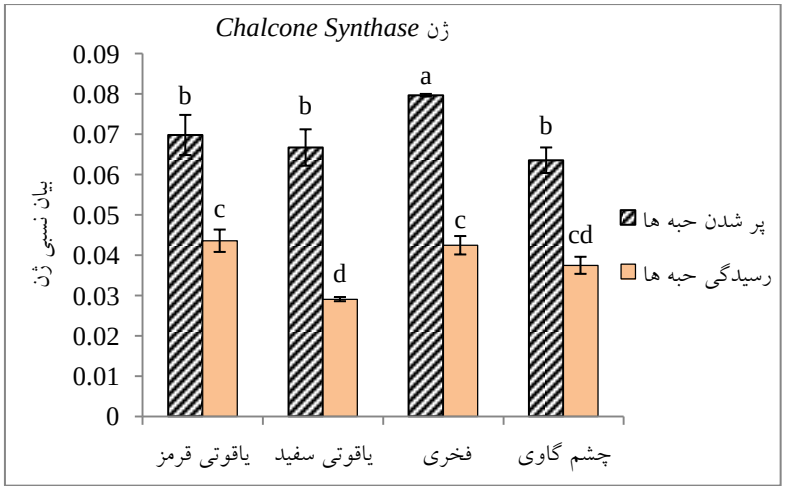
[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-13]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1399.15.2.4.7]

SBBM تقریباً یک هفته زودتر از SBC برداشت می‌گردید. در این مطالعه بعد از آنالیز چند شکلی تک نوکلئوتیدی (SNPs) و تغییرات ساختاری (SVs) بر روی ژنوم انگور در مرحله رسیدگی، تعداد ۱٦٦ یونی‌ژن همولوگ مربوط به مرحله رسیدگی و رنگ‌دهی در SBC و SBBM مشخص شد که از بین این یونی‌ژن‌ها، ۹۰ یونی‌ژن در رقم SBC و ۷٦ ژن یونی‌ژن در رقم SBBM نقشه‌یابی شدند. در این میان تفاوت بیان هشت ژن مرتبط با رسیدن و تغییر رنگ (*CHSY*، *3MAT*، *ERF5*، *ERF03*، *AL5L2*، *SEP1*، *PT106* و *NCED6*) توسط رونوشت‌برداری معکوس کمی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز[1] مورد بررسی قرار گرفت. در بین این ژن‌ها بیان ژن *NCED6* به ژن *NCED1*، که درگیر در بیوسنتز ABA در انگور است و نقشی در شروع تجمع آنتوسیانین دارد، وابسته است. نتایج این بررسی نشان داد که در مرحله تغییر رنگ بیان ژن‌های *CHSY*، *3MAT*، *ERF5*، *AL5L2*، *SEP1* و *PT106* افزایش و بیان ژن *SEP1* کاهش یافت همچنین بیان گردید که ژن *CHSY* مربوط به زودرسی انگور و دو ژن *ERF03* و *ERF5* در تنظیم شروع زودرسی در رقم SBBM نقش دارند (Xu et al. 2016).

[1] Quantitative Reverse Transcription PCR (qRT-PCR)

با توجه به معنی‌دار بودن بیان نسبی ژن *Chalcone Synthase* در دو مرحله نموی پرشدن حبه‌ها و رسیدگی حبه‌ها می‌توان بیان کرد که این ژن به‌عنوان یک ژن مؤثر در رسیدگی ایفای نقش نموده است. طبق مطالعه Xu et al. (2016) و اینکه *Chalcone Synthase* به‌عنوان یک ژن مؤثر در زودرسی معرفی شده است، انتظار می‌رفت بیان آن در ارقام زودرس بیشتر از ارقام دیررس باشد. همانگونه که مشاهده می‌شود (شکل ۳)، بیان ژن *Chalcone synthase* در رقم دیررس فخری تفاوت معنی‌داری را نسبت به دیگر ارقام نشان داد.

در پژوهشی دیگر Boss et al. (1996) جهت بررسی بیوسنتز آنتوسیانین در رقم شیراز *v.vinifera* از مرکز تحقیقات پژوهش‌های علمی و صنعتی استرالیای جنوبی طی ۱۰ هفته قبل از شروع گلدهی نمونه‌برداری داشتند. آن‌ها هفت ژن مؤثر در مسیر بیوسنتز آنتوسیانین فنیل آلانین آمونیا لیاز (*PAL*)، کالکون سنتاز (*CHS*)، کالکون ایزومراز (*CHI*)، فلاونون-۳-هیدروکسیلاز (*F3H*)، دی هیدرو فلاونول ٤ ردوکتاز (*DFR*)، لکو آنتوسیانیدین دی اکسیژناز (*LDOX*) و UDP-گلوکز-فلاونوئید ۳- O گلوکوزیل ترانسفراز (*UFGT*) را که ژن‌های مؤثر در رسیدگی به‌شمار می‌روند را مورد بررسی و شناسایی قرار دادند.



شکل۳- میزان بیان نسبی ژن *Chalcone Synthase* در ارقام مختلف برای دو مرحله نموی پر شدن حبه‌ها و رسیدگی حبه‌ها

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-13]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1399.15.2.4.7]

جدول ۵- جدول تجزیه واریانس ژن *Chalcone Synthase*

منابع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	ارزش F
رقم(A)	۳	۰/۰۰۰۶۳۹۶۵	۰/۰۰۰۲۱۳۲۲*	٦/٨٦٥
خطا A (E_A)	۸	۰/۰۰۰۲٤٨٤٥	۰/۰۰۰۰۳۱۰٥٦	
مرحله نموی (B)	۱	۰/۰۰٦۰٦٤۰۰	۰/۰۰٦۰٦٤**	۲٥٥/٦۳٥
مرحله نموی × رقم (A× B)	۳	۰/۰۰۰۱۹۰۳۰	۰/۰۰۰۱۹۰۳NS	۲/٦٧٤
خطا B (E_B)	۸	۰/۰۰۰۱۸۹۷۷	۰/۰۰۰۰۲۳۷۲۱۳	
RB	۲	۰/۰۰۰۰۷٦۷٥	۰/۰۰۰۰۳۸۳۷٥	
ABR	٦	۰/۰۰۰۱۱۳۰۲	۰/۰۰۰۰۱۸۸۳٦٦	
کل	۲۳	۰/۰۰۷۳۳۲۱۷		
ضریب تغییرات (CV)		۸/۰۳۳		

ns، * و **: به‌ترتیب تفاوت غیرمعنی‌دار، تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال پنج و یک درصد

در حبه‌های انگور چهار هفته پس از گلدهی تمام ژن‌ها غیر از *UFGT* بیان شده و به‌دنبال آن کاهش در این بیان را از هفته ششم تا هشتم پس از گلدهی دیدیم. ده هفته پس از گلدهی هم‌زمان با شروع سنتز آنتوسیانین بیان ژن‌های *CHS*، *CHI*، *F3H*، *DFR*، *LDOX* و *UFGT* افزایش یافت، که طبق وقایع مراحل رشدی انگور می‌باشد و نشان داد که شروع سنتز آنتوسیانین برای رسیدن پوست انگور همزمان و هماهنگ با افزایش در بیان تعدادی ژن در بیوسنتز مسیر آنتوسیانین است. بیان نسبی معنی‌دار ژن *Chalcone Synthase* در سطح مراحل نموی حبه‌پرکنی و رسیدگی حبه‌ها در مجموع ارقام زودرس و دیررس، تأییدگر نقش مؤثر این ژن در آغاز فرآیند رسیدگی و تغییر رنگ می‌باشد.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج بررسی الگوی بیان ژن *Chalcone Synthase* نشان‌دهنده افزایش بیان این ژن در مرحله پر شدن حبه‌ها و کاهش نسبی بیان آن در مرحله رسیدگی حبه‌ها بود. همچنین ژن *Chalcone Synthase* تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال پنج درصد را در میان ارقام زودرس و دیررس نشان داد. با توجه به نقش کلیدی این ژن در فرآیند زودرسی، انتظار می‌رفت بیان آن در ارقام زودرس بیشتر از ارقام دیررس باشد و یا همانند الگوی بیانی ژن *ABA-8′ Hydroxylase* آغاز فعالیت آن زودتر صورت گیرد تا در نتیجه سبب زودرسی محصول شود، اما مشاهده می‌شود بیشترین بیان این ژن در مرحله پرشدن حبه‌ها و در رقم فخری که یک رقم دیررس است رخ داده است. با توجه به اینکه صفت زودرسی در کنترل ژن‌های متعددی می‌باشد می‌توان نتیجه گرفت ژن *Chalcone Synthase* در فرآیند زودرسی انگور یاقوتی نقش اصلی را نداشته و به‌طور غیر مستقیم ایفای نقش نموده است و همچنین اینکه ژن *ABA-8′ Hydroxylase* یکی از ژن‌های کلیدی در فرآیند زودرسی انگور یاقوتی سیستان می‌باشد. نتیجه‌گیری دقیق‌تر نیازمند بررسی سایر ژن‌های درگیر در فرآیند زودرسی انگور یاقوتی سیستان می‌باشد.

سپاسگزاری

این پژوهش با استفاده از پژوهانه معاونت پژوهشی دانشگاه زابل با شماره UOZ-GR-9618-9 انجام شده است.

منابع

Afrooze F, Torkamani J, Najafi B, Moosavinik S (2009) Economic research on the production and marketing of Yaghouti grape in the Sistan region. Sixth Iranian Agriculture Economics Conference, karaj, Iranian Agricultural Economics Association, Agriculture Pardis (In Farsi).

Ahmadi k, Ebadzadeh HR, Hatami F, Hoseinpour R, Abdeshah H (2018) Agricultural Census 2017: Horticultural Products. Ministry of Agriculture Jahad 3:109-112.

Allahdou M, Sadegh A, Kouhkan SJJBBS (2012) Breeding of Sistan Yaghouti Grape using Clonal Selection. Journals of Biotechnology and Biomaterials S13: 004.

Bohm BA (1998) Introduction to flavonoids: Harwood Academic Publishers.

Boss PK, Davies C, Robinson SPJPP (1996) Analysis of the expression of anthocyanin pathway genes in

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-13]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1399.15.2.4.7]

developing *Vitis vinifera* L. cv Shiraz grape berries and the implications for pathway regulation. Plant Molecular Biology 111: 1059-1066.

Bourgaud F, Gravot A, Milesi S, Gontier EJPS (2001) Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. Plant science 161: 839-851.

Coombe B (1992) Research on development and ripening of the grape berry. American Journal of Enology and Viticuture 43:101-110.

Corrales-Maldonado C, Martinez-Tellez MA, Gardea AA, Orozco-Avitia A, Vargas-Arispuro IJAJABS (2010) Organic alternative for breaking dormancy in table grapes grown in hot regions. American Journal of Agricultural and Biological science 5: 143-147.

Degu A, Hochberg U, Wong DC, Alberti G, Lazarovitch N, Peterlunger E. Fait AJBPBb (2019) Swift metabolite changes and leaf shedding are milestones in the acclimation process of grapevine under prolonged water stress. BMC Plant Biology 19: 69.

Fan X, Zhao R, Wang Q, Liu C, Fang JJH (2018) Anthocyanin Composition and MybA-related Genotype in Kyoho Grape and Its Derivatives. HortScience 53: 1766-1771.

Fortes AM, Agudelo-Romero P, Silva MS, Ali K, Sousa L, Maltese F, Verpoorte RJBPB (2011) Transcript and metabolite analysis in Trincadeira cultivar reveals novel information regarding the dynamics of grape ripening. BMC Plant Biology 11: 149.

Gao YP, Bonham-Smith PC, Gusta LVJJOPP (2002) The role of peroxiredoxin antioxidant and calmodulin in ABA-primed seeds of *Brassica napus* exposed to abiotic stresses during germination. Journal of Plant Physiology 159: 951-958.

Halimi M, Moosavinik S, Asgharipoor M (2013) Research of Energy Efficiency and Economic Indicators in Grape production Systems in Sistan. Master of Science Thesis , University of Zabol, 32. (In Farsi).

Jia H, Zhang C, Pervaiz T, Zhao P, Liu Z, Wang B, Qian J (2016) Jasmonic acid involves in grape fruit ripening and resistant against Botrytis cinerea. Functional and integrative genomics 16: 79-94.

Kennedy JAJCEIA (2008) Grape and wine phenolics: Observations and recent findings. Ciencia Investigacion Agraria 35: 107-120.

Kühn Weber, NA (2014) Berry ripening: recently heard through the grapevine. Journal of Experimental Botany 65:4543-4559.

Kumar S, Pandey AKJTSWJ (2013) Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. The Scientific World Journal 2013(Article ID 162750): 16 pages.

Mori K, Lemaire-Chamley M, Asamizu E, Mizoguchi T, Ezura H, Rothan CJPB (2013) Comparative analysis of common genes involved in early fruit development in tomato and grape. Plant Biotechnology 30:295-300.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning: a laboratory manual: Cold spring harbor laboratory press.

Stracke R, Werber M, Weisshaar BJCOIPB (2001) The R2R3-MYB gene family in Arabidopsis thaliana. Current Opinion in Plant Biology 4: 447-456.

Umezawa T, Okamoto M, Kushiro T, Nambara E, Oono Y, Seki M, Shinozaki KJTPJ (2006) CYP707A3, a major ABA-8′ Hydroxylase involved in dehydration and rehydration response in Arabidopsis thaliana. The Plant Journal 46: 171-182.

Vermerris W, Nicholson R (2007) Phenolic compound biochemistry, Springer Publication.

Walker AR, Lee E, Bogs J, McDavid D A, Thomas MR, Robinson SPJTPJ (2007) White grapes arose through the mutation of two similar and adjacent regulatory genes. The Plant Journal 49: 772-785.

Wang L, Hua D, He J, Duan Y, Chen Z, Hong X, Gong ZJPG (2011) Auxin Response Factor2 (ARF2) and its regulated homeodomain gene HB33 mediate abscisic acid response in Arabidopsis. Plos Genetics 7: e1002172.

Wu Y, Fu T, Wang Z, Jiao C, Yang Z, Ali B, Zhou W (2015a) Differential gene expression analysis of early-ripening mutants of grape (*Vitis vinifera* L.). Scientia Horticulturae 194: 7-17.

Xu Y, Gao Z, Tao J, Jiang W, Zhang S, Wang Q, Qu S (2016) Genome-Wide Detection of SNP and SV Variations to Reveal Early Ripening-Related Genes in Grape. Plos one 11: e0147749.

Yang J, Huang J, Gu H, Zhong Y, Yang, ZJMB (2002) Duplication and adaptive evolution of the chalcone synthase genes of Dendranthema (Asteraceae). Molecular Biology and Evolution 19: 1752-1759.

Zhou R, Cutler AJ, Ambrose SJ, Galka MM, Nelson KM, Squires TM, Taylor DCJPP (2004) A new abscisic acid catabolic pathway. Plant Physiology 134: 361-369.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-13]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1399.15.2.4.7]