ژنتیک نوین
دوره هفدهم، شماره ۴، زمستان ۱۴۰۱
صفحه ۴۲۱-۴۱۳

بررسی تاثیر GABA روی خصوصیات بیوشیمیایی و بیان ژن‌های *CBF1-CBF4* در انگور تحت تنش سرما

The effect of GABA on biochemical properties and expression of *CBF1-CBF4* genes in grapes under cold stress

بهاره قربانی*[۱] و رقیه نجف زاده[۲]

۱- دانش آموخته‌ی دکتری باغبانی دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه
۲- استادیار گروه گیاهان دارویی مرکز آموزش عالی شهید باکری میاندوآب، دانشگاه ارومیه

Bahareh Ghorbani [1]* and Roghayeh Najafzadeh [2]

1- Ph.D in Horticulture, Faculty Agricultre and Natural Resources, Urmia University.
2- Assistant Professor, Department of Medicinal Plants, Shahid Bakeri Miandoab Higher Education Center, Urmia University

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی:ghorbani.bahareh@ymail.com

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۶/۱۹ - تاریخ پذیرش:۱۴۰۱/۸/۳)

چکیده

تنش سرما ازجمله تنش‌های ناگهانی بوده و خسارات زیادی بر محصولات کشاورزی وارد می‌آورد. گیاهان با وجود دارا بودن مکانیسم‌های تحمل تنش سرما باز قادر نیستند به میزان سرعت توسعه تنش در منطقه عمل نمایند. کاربرد ترکیبات هورمونی و شبه هورمونی می‌تواند تاحدودی از خسارات ناشی از سرما بکاهد، به این منظور عملکرد گاما آمینوبوتیریک اسید (GABA) بر روی خصوصیات بیوشیمیایی و بیان ژن‌های متحمل به سرما در نهال انگور مورد بررسی قرار گرفت. در این پژوهش برای کاهش تلفات تنش‌سرما از اسپری‌برگی GABA در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار و در ۳ غلظت (صفر (شاهد)، ۱۰، ۲۰ میلی‌مولار) بر روی قلمه‌های یکساله انگور، رقم ریش بابا (متحمل) و رقم یاقوتی (حساس) استفاده گردید، قلمه‌های تیمار شده به گروس چنبر با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد منتقل و پس از تحمل دوره سرما ۱۰ساعته در پنج مرحله سرمادهی (صفر (شاهد)، ۲، ۴، ۸ و ۱۰ ساعت) نمونه برداری صورت پذیرفت و در آزمایش اول شاخص‌های بیوشیمیایی از قبیل محتوای آنتی‌اکسیدانی کل (DPPH)، فنل کل و فعالیت آنزیم سوپراکسیددسموتاز مورد بررسی قرار گرفت، درآزمایش دوم نمونه‌های تیمار شده GABA با غلظت۲۰ میلی‌مولار در ۸ و۱۰ ساعت بعد از اعمال تنش در مقایسه با سایر تیمارها در هر دو رقم بیشترین اثر مثبت را به جهت مقابله با اثرات سوءسرما از خود نشان دادند لذا وارد بررسی مولکولی شده و بدین ترتیب بیان ژن‌های *CBF1*،*CBF2*،*CBF3* و*CBF4* دخیل در سرما با روش Real Time-PCR مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد GABA سبب افزایش سیگنالینگ گیاه و تولید ترکیبات آنتی‌اکسیدانی می‌شود و قادر است رادیکال‌های آزاد تولید شده طی تنش را مهار نماید. همچنین موجب تقویت سیگنالینگ درون گیاه شده و سطح بیان‌ژن مقاومت در انگور ۸ و۱۰ ساعت بعد از اعمال تنش سرما بالاتر برده است. عامل رونویسی *CBF2* بین ارقام تیمار شده با GABA در غلظت۲۰ میلی‌مولار بالاترین سطح بیان را دارا می‌باشد.

واژه‌های کلیدی

اتاقک رشد
آنتی اکسیدان
انگور
گاما آمینوبوتیریک اسید
CBF

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-31]

مقدمه

انگور با نام علمی (*Vitis vinifera*) جزء میوه‌های مناطق معتدله گرم می‌باشد و قادر نیست سرماهای شدید زمستان و سرمای دیررس بهاره را تحمل کند. دما در پراکنش جغرافیایی انگوربسیار مؤثر می‌باشند (Xiao et al. 2018). درجه حرارت‌های پایین و تا حدودی بالاتر از نقطه انجماد را سرمازدگی می‌نامند دمای پایین قادر منجر به خسارت شدید در درختان می‌شود و سن فیزیولوژیکی، میزان سطح به حجم گیاه، عناصر غذایی، بافت مورد تنش و مدت زمانی که سرما در منطقه می‌ماند همگی شدت خسارت را تحت تاثیر قرار می‌دهند (Rihan et al. 2017). هر اندازه خشبی شدن شاخه‌های جوان بیشتر باشد مقاومت آن‌ها در مقابل سرما نیز بیشتر خواهد بود (Xu et al. 2008). تنش‌های غیرزیستی علت اصلی از دست رفتن محصولات است و در میان تنش‌های محیطی خشکی شوری و دمای پایین اثرات مخربی روی رشد گیاهان دارند. دمای پایین و سرمازدگی در میان تنش های محیطی از اهمیت بیشتری برخوردا است چرا که در مدت زمان کوتاهی می‌تواند خسارت کلانی وارد آورد. ۹۳ درصد زمین های جهان تحت سرما هستند. وجود سرمای دیررس بهاره در بیشتر مناطق ونگرانی باغداران ما را بر آن داشت مطالعه‌ای جهت کاهش صدمات احتمالی سرما بر نهال های پرطرفدار انگور داشته باشیم و طی آن از روش‌های متعدد همچون اسپری برگی ترکیبات هورمونی و شبه‌هورمونی به جهت کنترل تنش بهره ببریم، از جمله این ترکیبات اسید آمینه غیرپروتئینی چون گاماآمینوبوتریک اسید (GABA) می‌باشد (Ghobadipour et al. 2015).

GABA در ساختارهای گیاهی از طریق مسیر شانت سنتز شده و در فرآیندهای فیزیولوژیکی مثل متعادل کردنpH ، ذخیره نیتروژن، نموگیاه، متابولیسم کربن، دفاع گیاه، تنظیم اسمزی و در انتقال سیگنالی دخالت دارد GABA .(Shelp et al. 2012) یکی از ترکیبات پیام‌رسان مورد توجه در بهبود تنش‌ها می‌باشد، مطالعات مختلف نشان می‌دهد که GABA در پاسخ به تنش‌های همچون سرما در چهاررقم گوجه‌فرنگی (Deewatthanawong et al. 2010) و اسفناج (Yoon et al. 2017) نقش دارد. همچنین مطالعات نشان داد GABA در کمتر از چند دقیقه در اثر صدمات مکانیکی و تنش سرما در گیاهان فعال می‌شود (Akcay et al. 2012). در مطالعاتی براثرمحلول پاشی GABA روی بوته توت¬فرنگی مشاهده شد که غلظت ۴۰ میلی‌مولار آن بهترین تاثیر را بر رشد و عملکرد و حتی انبارمانی میوه دارد (Ghobadipour et al. 2015).

همچنین کاربرد GABA برای افزایش عمر و کیفیت پس از برداشت محصول خیار (Malekzadeh et al. 2017) و هلو (Aghdam et al. 2015) تایید شده است. با توجه به پراکنش جغرافیایی کشت و کار در مناطق سردسیر بحث سرمازدگی در انگور اجتناب ناپذیر است لذا در این پژوهش به دنبال راهکاری برای بهبود تحمل به سرما در گیاه انگور و نیز کاهش اثرات سرما بوده‌ایم.

دستکاری ژن‌های رمزکنندهٔ پروتئین عملکردی، و ایجاد بحث‌های سازگاری امروزه بسیار اهمیت دارد و گاها ایجاد تحمل به تنش‌ها را به همراه خواهد داشتCBFs .(Century et al. 2008) (عناصر متصل شونده به تکرار C) در گیاهان می‌باشند. درآرابیدوبسیس ژن‌هایCBF1، CBF2 و CBF3 بر اثر تنش سرما میزان بیان بالایی نشان دادند ولی تنش خشکی و شوری چنین تأثیری را بر این ژن ها نشان نداده است (Liu et al. 1998). برخی ژن‌های AREB1/CBFs مانند VviDREB1 در نوعی انگور فرنگی (Wang et al. 2010) علاوه بر سرما تحت تنش‌های دیگر نیز هست، بلکه به شوری زیاد، خشکی و ABA خارجی نیز پاسخ می‌دهند. اما سنسور دقیق برای درک و دریافت دمای پایین هنوز ناشناخته است. تحقیقات مشخص کرده است که این سنسورها احتمالا در غشای سلولی واقعاند و بعد از دریافت علامت به صورت آبشاری آن را منتقل می‌کنند. وقتی گیاهان در معرض دمای پایین قرار می‌گیرند، تعدادی از ژن‌ها در آن‌ها القا می‌شود و محصولاتی تولید می‌کنند که یا بصورت مستقیم باعث ایجاد حفاظت در برابر تنش می‌شوند و یا بیان ژن‌های هدف را کنترل می‌کنند (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki 2000).

زمانی که گیاه در معرض تنش‌های غیرزنده قرار می‌گیرد، مجموعه ای از ژن‌ها با عملکردهای متفاوت القا یا خاموش می‌شوند. بررسی این ژن‌ها به فهم بیشتر مکانیسم تحمل استرس درگیاه کمک می‌کند(Lata and Prasad 2011). بیان ژن‌هایBAP1 نیز به عنوان ژن دخیل در سیگنالینگ سرما در گیاه

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-31]

انگور سبب سازگاری با سرما شده است (Ghorbani et al. 2020). علاوه بر این افزایش سطح هورمون آبسیزیک اسید تحت دمای پایین نیز بیان ژن CBF را افزایش می‌دهد (Kosova et al. 2012). CBF‌ها در درختان هلو و سیب در اثر تنش سرما بیان شده‌اند (Wisniewski et al. 2015). تیمار GABA با افزایش ظرفیت آنتی اکسیدانی می‌تواند اثرات مخرب را طی تنش سرمایی برطرف نماید همچنین قادر است فرآیند سیگنال‌دهی ژن‌های پاسخ دهنده به سرما را تقویت نماید بدین منظور پژوهشی طراحی واجرا گردید که طی آن بیان ژن‌های CBF1، CBF2، CBF3و CBF4 متاثر از GABA در دو رقم ریش بابا و یاقوتی تحت تنش سرما مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

به منظور مطالعه اثر محلول‌پاشی برگی GABA روی خصوصیات بیوشیمیایی و بیان ژن‌های *CBF1*،*CBF2*، *CBF3* و*CBF4* در انگور تحت تنش سرما پژوهشی در گلخانه دانشگاه میاندوآب انجام پذیرفت. برای انجام آزمایش روی نهال یکساله انگور رقم ریش بابا و یاقوتی (نجاتیان، ۱۳۹۲) در مرحله ۵ الی ۸ برگی تحت محلول‌پاشی GABA در سه غلظت صفر (شاهد)، ۱۰، ۲۰ میلی‌مولار در یک نوبت قرار گرفتند. بعد از یک هفته نهال‌های تیمار شده با GABA تحت دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در پنج زمان سرمادهی صفر (تیمار GABA دریافت کرده اما تحت سرما نبوده است)، ۲، ۴، ۸ و ۱۰ ساعت قرار داده شدند (Erdal, 2012) و نمونه‌برداری از برگ‌های جوان صورت پذیرفت. این مطالعه در قالب طرح کاملا تصادفی در سه تکرار اجرا شد و تجزیه آماری و مقایسه میانگین‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۱و۵ درصد و با نرم افزار SAS (Ver. 9.4) انجام گرفت.

برای قسمت مولکولی استخراج RNA از روش ترایزول استفاده شد. چهار آغازگر انتخاب شدند (Karimi et al. 2015). غلظت RNA با استفاده از دستگاه نانودراپ برای هر نمونه اندازه‌گیری شد. خلوص RNA نیز از طریق نسبت ۲۶۰/۲۸۰ و ۲۶۰/۲۳۰ تعیین گردید. برای ساخت cDNA از روش پیشنهادی شرکت فرمنتاز برای تمامی نمونه‌ها استفاده شد. اولین رشته cDNA با کمک آغازگر الیگودی تی (۲۰–۱۸ نوکلئوتید) ساخته شد. مقدار ۵ میکرولیتر ازRNA تیمار شده با DNase با ۰/۵ میکروگرم آغازگر الیگودی تی مخلوط شد و حجم محلول با استفاده از آب DEPC به ۱۱ میکرولیتر رسانده شد. مخلوط حاصل به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و پس از آن به سرعت روی یخ، سرد شد. سپس ۴ میکرولیتر بافر واکنش و ۲ میکرولیتر دی اکسی نوکلئوتری فسفات با غلظت ۱۰ میکرومول و ۲ واحد آنزیم RNase inhibitor به هر تیوب افزوده شد و حجم محلول با آب DEPC به ۱۹ میکرولیتر رسیده و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. بعد از آن۱ میکرولیتر Revert Aid TMM-MuL V Reverse transcriptase به محلول فوق اضافه شده و پس از مخلوط شدن به مدت یک ساعت در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس به منظور غیر فعال سازی واکنش، تیوب‌ها به مدت ۱۰دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. به منظور انجام واکنش ریل تایم پی سی آر غلظت هر آغازگر رفت و برگشت هر کدام ۲ میکرولیتر به همراه ۸ میکرولیتر آب، به اضافه ۶ میکرولیترسایبرگرین برای سنجش میزان بیان ژن در دستگاه ریل تایم استفاده شد ۴ نانوگرم از cDNA به منزله‌ی الگو در هر واکنش استفاده گردید. ژن رفرنس در این آزمایش ژن EF1α بوده است (جدول۱). در این پژوهش برای آزمایش پی سی آر کمی از دستگاه Real time PCR مدل AB Applied Biosystems/Step one استفاده شد. آنالیزداده‌ها بیان ژن با استفاده ازروش ارزیابی نسبی صورت پذیرفت (Livak and Schmittgen 2001). محاسبه کارایی تکثیرآغازگرهای واکنش با استفاده ازروش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ انجام شد، آنالیزداده‌های حاصل ازReal Time PCR براساس چرخه آستانه بدست آمده برای ژن‌های هدف و مرجع انجام گرفت. تفاضل میانگین Ct ژن مرجع از میانگین Ct ژن هدف به‌عنوان شاخص ΔCt برای هردوگروه تست و کنترل محاسبه گردید. همچنین تفاضل Ct های گروه تست و کنترل به‌منظور محاسبه شاخصΔΔCt به‌کارگرفته شد.

در ارزیابی آنتی‌اکسیدان کل به روش DPPH ، ابتدا ۵۰ میکرولیتر عصاره آماده شده را با ۹۵۰ میکرولیتر DPPH مخلوط کرده و بعد از ۳۰ دقیقه توسط دستگاه اسپکتروفتومتر با طول موج ۵۱۷ نانومتر قرائت و در فرمول زیر جاگذاری شد:

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-31]

$$\%DPPHsc = \frac{(Abs\ control)_{t=30\ min} - (Abs\ sample)_{t=30\ min}}{(Abs\ control)_{t=30\ min}} * 100$$

Abs sample میزان جذب DPPH در حضور نمونه و Abs control جذب DPPH بدون عصاره می‌باشد (Navarro et al. 2006).

برای ارزیابی فنل کل طبق روش Slinkard and Singleton (۱۹۷۷) عمل شد و نهایتاً نمونه‌ها در طول موج ۷۶۵ نانومتر با اسپکتوفوتومتر قرائت گردید، نتایج با رسم منحنی استاندارد اسیدگالیک به‌دست آمد.

فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز بر اساس روش(۱۹۷۷) Giannopolitis et al اندازه‌گیری شد. نهایتاً نمونه‌ها در طول موج ۵۶۰ نانومتر موجب ۵۰ درصد ممانعت احیای NBT شد.

جدول۱- توالی و اندازهٔ قطعات تکثیری آغازگرهای انگور برای استفاده در آزمایش پی سی آر کمّی (Karimi et al. 2015)

Anealing temperature (◦C)	Amplicon size	Primer sequences	Gene
59	142 bp	F: AGAGAAGGTTGGAGATGGTTC R: CAGGTGGAGTAAGGAGCAAAC	*CBF1*
59	125 bp	F: CTGCTTCTTCCGACTCTC R: GCACTTCACTCACCCATTTGTT	*CBF2*
59	131 bp	F:AAGTGCGGGATCCCAAAACC R: GGAGTCGGGGAAATTGAGC	*CBF3*
59	128 bp	F: ACCCTCACCCGCTCGTATG R: CCGCGTCTCCCGAAACTT	*CBF4*
60	84 bp	F:CGGGCAAGAGATACCTCAAT R:AGAGCCTCTCCCTCAAAAGG	EF1α

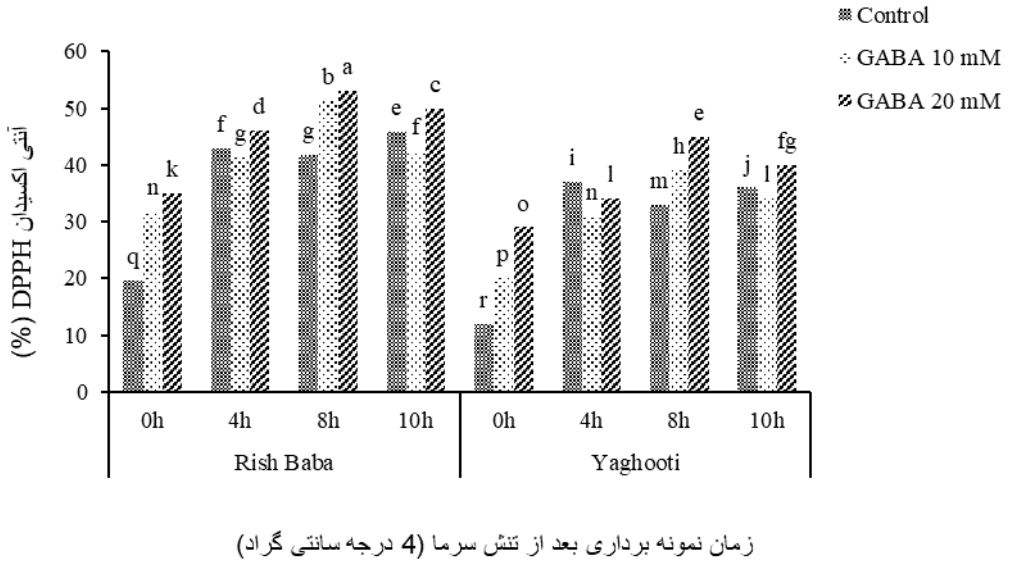
نتایج و بحث

میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی (DPPH): همانطورکه نتایج نشان داد، میوه‌های تیمار شده با ۲۰ میلی‌مولار ترکیب GABA در رقم ریش بابا بیشترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی را نسبت به رقم یاقوتی در ۸ ساعت بعد از اعمال تنش دارا بودند (شکل۱). ترکیبات آنتی‌اکسیدانی قادرند گیاه انگور را در برابر تنش نور بالا، سرما و اکسیداتیو محافظت نمایند (Petridis 2016). سرمای زیر۱۰درجه سانتی‌گراد برای انگور محدودیت‌های فتوسنتزی به همراه می‌آورد و گیاه برای مقابله با این محدودیت‌ها سطح فلاونوئید به عنوان ترکیبات آنتی‌اکسیدانی بالا می‌برد (Hao et al. 2018). اثر غیرمستقیم GABA بر افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی ثابت شده است این افزایش ظرفیت ناشی از تاثیر ژن‌های افزاینده مقاومت به سرما بوده است و از این طریق GABA قادر است گونه‌های اکسیژن فعال را تحت تنش حذف نماید (Liu et al. 2011). همچنین در این رابطه نتایج محققین نشان داده که محلول‌پاشی نهال مرکبات با ۱۰میلی‌مولار GABA هفت روز پس از تیمار سطح آمینواسید و نیز ترکیبات آنتی‌اکسیدانی را درگیاهان بالا برده و از شدت تنش می‌کاهد (Hijaz et al. 2018). همچنین میتوان علت افزایش این ترکیبات در اثر تیمار GABA را به دلیل تأثیر GABA بر ترکیبات کربنی و نیتروژن دار باشد که خود اساس تشکیل متابولیت‌های ثانویه می‌باشند توجیح نمود.

میزان فنل‌کل: همانطورکه نتایج نشان داد، میوه‌های تیمار شده با ۲۰ میلی‌مولار ترکیب GABA بیشترین میزان ترکیبات فنلی را ۱۰ ساعت بعد از اعمال تنش در رقم ریش بابا دیده شده است و کمترین میزان را شاهد رقم یاقوتی دارا بوده است (شکل ۲). ترکیبات فنلی در گیاهان نقش اساسی در توسعه و انتقال سیگنال تحت تنش دارند، استرس سرما سبب تجمع ترکیبات فنولیک درگیاهان می‌گردد و در واقع سرما سبب افزایش ترکیبات فنلی و پلی‌فنل‌ها شده که این ترکیبات طی پاسخ به تنش‌ها به گیاهان

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-31]

کمک شایانی می‌کنند (Cheynier et al. 2013). فنل‌ها در بافت گیاهی به عنوان یک شاخص خوب برای پیش بینی میزان تحمل به تنش‌های غیر زنده در گیاهان شناخته می‌شود (Naikoo et al. 2019). محققان بر این باورند که تنش سرما قادر است ترکیبات



شکل۱- اثرا تیمار GABA روی میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی نهال یکساله انگور رقم ریش بابا و یاقوتی تحت تنش سرما. میانگین‌ها دارای حرف مشابه می‌باشند از نظر آماری اختلاف معنی‌داری در سطح ۱و۵ درصد آزمون چند دامنه‌ای دانکن ندارد.

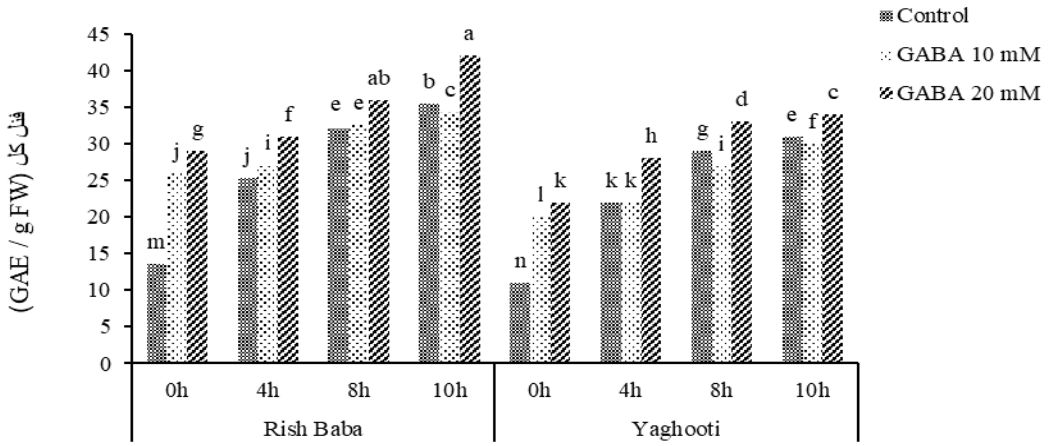
فنلی را در برگ انگور بالا ببرد. همچنین تحت دمای کم میزان ترکیبات فنلی نسبت به شاهد در برگ‌های انگور افزایش می‌یابد (Amarowicz et al. 2009). زمانی که گیاه در معرض تنش‌های غیرزنده قرار می‌گیرد، مجموعه ای از ژن‌ها با عملکردهای متفاوت القا یا خاموش می‌شوند محصول این فرآیند با انتقال سیگنال و بیان ژن‌های پاسخگو به تنش و افزایش ترکیبات ضد تنشی همچون ترکیبات فنلی می‌باشد(Krol et al. 2014). در این پژوهش دیده شد اثر کاربرد GABA با توجه به ساختار ضداکسایشی این ترکیبات قابل توجیه در بهبود مقاومت به سرما داشته است.

میزان فعالیت آنزیم سوپراکسیددسموتاز: همانطورکه نتایج نشان داد، میوه‌های تیمار شده با ۲۰ میلی‌مولار ترکیب GABA اسید بیشترین میزان ترکیبات فنلی در ساعت ۸ و ۱۰ بعد از نمونه‌برداری در رقم ریش بابا دیده شده است و کمترین میزان فعالیت آنزیم به نمونه‌های شاهد رقم یاقوتی تعلق دارد (شکل۳). سوپر اکسید دسموتازها آنزیم‌هایی هستند که در تمام پیکره گیاهان، سیتوسول، واکوئل، کلروپلاست و فضای آپوپلاست وجود دارند و دارای نقش مهمی در سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی می‌باشند. تیمار GABA قادر است با افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی اثرات مخرب را طی تنش سرمایی برطرف نماید (Yang et al. 2011). کاربرد GABA سبب افزایش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در گلابی می‌گردد (Fu et al. 2017). همچنین کاربرد GABA سبب افزایش ظرفیت فتوسنتزی و سطح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی تحت تنش سرما شده است و کاهش رادیکال آزاد را در گیاه برنج به همراه دارد (Jia et al. 2017). کاربرد GABA به صورت محلول‌پاشی برگی می‌تواند با ارتقا سطح فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی تا حدودی در کاهش خسارت‌های ناشی از تنش سرما نقش داشته باشد (Ghorbani et al. 2020). نتایج ما نیز نشان داد GABA قادر است رادیکال‌های آزاد را خنثی نموده و سیستم آنتی‌اکسیدانی را فعال نگه دارد. علاوه بر نقش متابولیکی، GABA به عنوان یک سیگنال‌دهی درون زا عمل

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-31]

می‌کند و در بیان ژن‌های متحمل به سرما دخالت دارد (Carillo 2018).

تأثیرGABA بر بیان ژن‌های CBF1 تا CBF4: بر اساس نتایج دیده



شکل۲- اثرا تیمار GABA روی میزان محتوای فنل‌کل نهال یکساله انگور رقم ریش بابا و یاقوتی تحت تنش سرما. میانگین‌ها دارای حرف مشابه می‌باشند از نظر آماری اختلاف معنی‌داری در سطح ۱و۵ درصد آزمون چند دامنه‌ای دانکن ندارد.

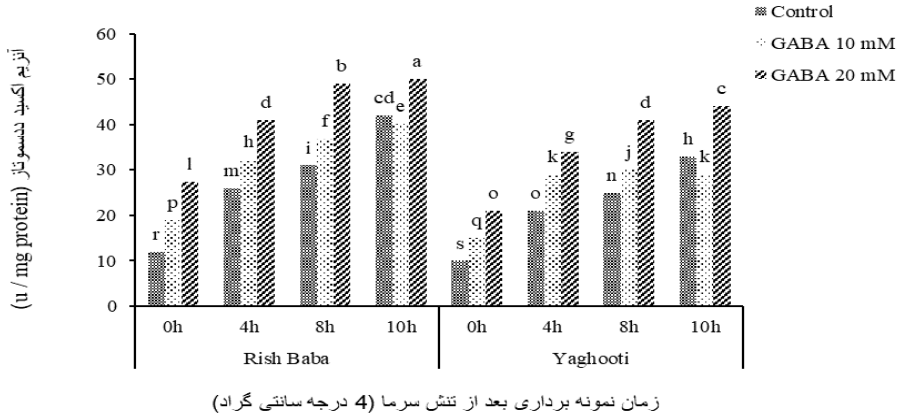
شده است که اثرات دو جانبه رقم در زمان در ژن *CBF* با سطح احتمال ۱٪ دارای اختلاف معنی دار می‌باشد. میزان بیان نسبی در ژن *CBF1* در ساعت ۴ و ۸ نمونه برداری بالاترین سطح را نسبت به نمونه شاهد داشته است. همچنین بیان نسبی در ژن *CBF2* در ۸ ساعت بعد نمونه برداری بیشترین سطح را دارا بود داشتند. بیان نسبی در ژن *CBF3* همواره روندی افزایشی در هر دو رقم دارا بود اما میزان بیان در ریش بابا بیش از یاقوتی بوده است. بیان نسبی در ژن *CBF4* در ۸ ساعت بعد نمونه‌برداری در رقم ریش بابا بیشترین سطح را دارا بود داشتند. طور کلی رقم متحمل ریش بابا نسبت به رقم حساس یاقوتی بیشترین سطح بیان را در هر چهار ژن دارا بوده و نیز بالاترین سطح مقاومت را نشان داده است (شکل۴). در پژوهشی محققین بیان داشتند بیان ژن‌های سرما در جوانه‌های انگور سبب بهبود فرآیند سازگاری به سرما می‌شود (Rubio and Perez 2019). همچنین در انگور عملکرد سایر ژن‌های مرتبط با سرما همانند *CBF* (Li et al. 2013)، *ICE* (Li et al. 2014)، *ERF* (Sun et al. 2016) و *GRAS* (Yuan et al. 2016) بررسی شده‌اند، به طور کلی نتایج این تحقیقات نشان داد ساختارهای متابولیتی و مولکولی همزمان تحت تاثیر سرما قرار می‌گیرند. تحقیقات Takuhara et al. (2011) نشان داد *CBF* بعد از ۴ ساعت اعمال دمای ۴ درجه در برگ و ساقه گیاه انگور القاء می‌شود. در گوجه فرنگی نیز رونوشت‌های ژن Le*CBF*1 به سرعت در پاسخ به سرما تجمع پیدا کردند (Jaglo et al. 2001). نتایج نشان داد که بیان ژن *CBF*1 در فاصله‌ی کوتاهی بعد ازاعمال تنش آغاز شد و تا حدود ۸ ساعت بعد از آن ادامه داشت و بعد از ۴۹ ساعت بیان این ژن بسیار کاهش یافت (Xiao et al. 2006). در مطالعه بر روی آرابیدوبسیس‌های تراریخت، تنش سرمای ۱درجه ی سانتی‌گراد سبب افزایش بیان ژن *CBF*1در ساعت‌های اولیه شد. همچنین آرابیدوبسیس‌هایی که به منزله‌ی ارقام مقاوم در نظر گرفته شده بودند نسبت به آرابیدوبسیس‌های

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-31]

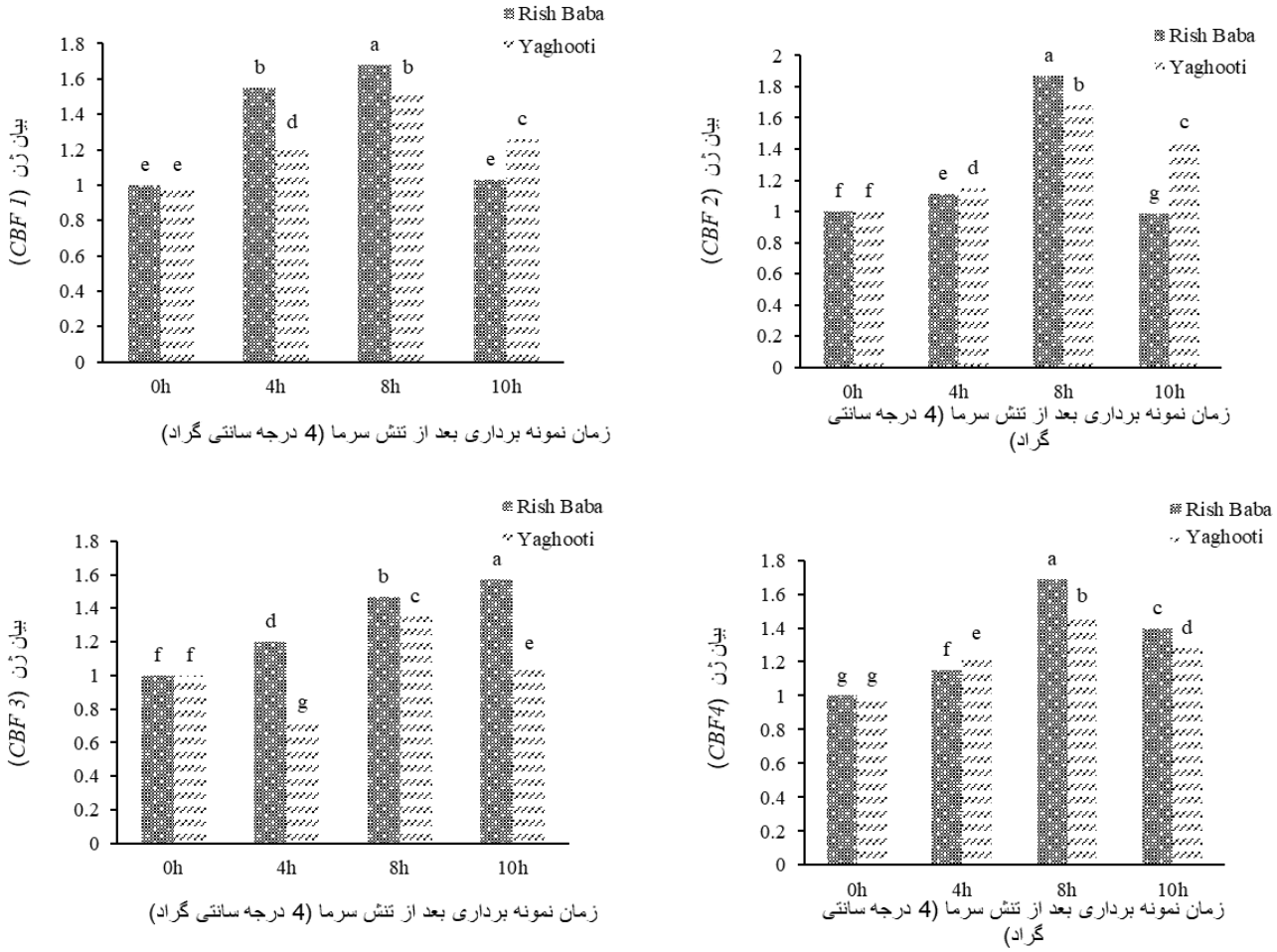
شاهد بیان بالایی را برای این ژن نشان دادند(Mckhann et al. 2008).

نتیجه گیری کلی

به طور کلی دیده شد که کاربر GABA در غلظت ۲۰ میلی‌مولار سبب ارتقا سطح تولید و فعالیت ترکیبات آنتی‌اکسیدانی شده و



شکل۳- اثرا تیمار GABA روی میزان فعالیت آنزیم سوپراکسیددسموتاز نهال یکساله انگور رقم ریش بابا و یاقوتی تحت تنش سرما. میانگین‌ها دارای حرف مشابه می‌باشند از نظر آماری اختلاف معنی‌داری در سطح ۱و۵ درصد آزمون چند دامنه‌ای دانکن ندارد.



شکل۴- اثرا تیمار ۲۰میلی‌مولار GABA روی میزان بیان ژن‌های *CBF1*،*CBF2*، *CBF3* و *CBF4* دررقم ریش بابا و یاقوتی تحت تنش سرما. میانگین‌ها دارای حرف مشابه می‌باشند از نظر آماری اختلاف معنی‌داری در سطح ۱و ۵ درصد آزمون چند دامنه‌ای دانکن ندارد.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-31]

افزایش مقاومت در برابر تنش سرما را منجر می‌شود، همچنین GABA با نقش سیگنال‌دهی که درگیاهان به عهده دارد قادر است با دریافت اولین سیگنال‌های تنشی القا و خاموشی ژن‌های عملکردی مقاومت به سرما همچون *CBF*ها را تحت تاثیر قرار داده و دیده شد بعد از گذشت ۸ ساعت از اعمال تنش میزان بیان ژن‌های مقاوم به سرما در بیشترین سطح بیان خود بوده‌اند.

منابع

Aghdam MS, Naderi R, Sarchesmeh MA, Babalar M (2015) Amelioration of postharvest chilling injury in Anthurium cut flowers by gamma-aminobutyric acid (GABA) treatments. Postharvest Biology and Technology. 110:70-76.

Akcay N, Bor M, Karabudak T, Ozdemir F, Turkan I (2012) Contribution of Gamma amino butyric acid (GABA) to salt stress responses of Nicotiana sylvestris CMSII mutant and wild type plants. Journal of plant physiology. 169:452-458.

Amarowicz R, Weidner S (2009) Biological activity of grapevine phenolic compounds. In: Roubelakis-Angelakis KA (ed) Grapevine molecular physiology and biotechnology. 2nd edn. Springer. New York. pp 389-405.

Carillo P (2018) GABA Shunt in Durum Wheat. Frontiers in Plant Science. 9:100.

Century K, Reuber TL, Ratcliffe OJ (2008) Regulating the regulators: the future prospects for transcription-factor-based agricultural biotechnology products. Plant Physiology. 147:20-29.

Cheynier V, Comte G, Davies KM, Lattanzio V, Martens S (2013) Plant phenolics: Recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. Plant Physiology. Biochemistry 72:1-20.

Deewatthanawong R, Rowell P, Watkins C (2010) γ-Aminobutyric acid (GABA) metabolism in CO_2 treated tomatoes. Postharvest Biology and Technology. 57:97-105.

Erdal S (2012) Androsterone-induced molecular and physiological changes in maize seedlings in response to chilling stress. Plant Physiology and Biology. 57:1-7.

Fu D, Sun Y, Yu C, Zheng X, Yu T, Lu H (2017) Comparison of the effects of three types of aminobutyric acids on the control of Penicillium expansum infection in pear fruit. Journal of the Science of Food and Agriculture. 97:1497-1501.

Giannopolitis CN, Ries SK (1977) Superoxide dismutase. I. Occurrence in higher plants. Plant Physiology. 59:309-314.

Ghobadipour Z, Ghaderi N, Javadi T (2015) The effect of osmotic stress and external application of gamma aminobutyric acid on morphological and physiological characteristics of Queen Eliza strawberry cultivar. Master Thesis. University of Kurdistan .124 pages (In Farsi).

Ghorbani B, Hassanpour H, Jafari M (2020) The effect of application of gamma aminobutyric acid (GABA) foliar application on biochemical and physiological changes of grapes in cold stress Iranian Journal of Horticultural Science and Technology. 21 (In Farsi).

Ghorbani B, Hassanpour H, Jafari M (2021) Effect of GABA on *BAP1* gene expression under cold stress in commercial grape cultivars. 12th Iranian Congress of Horticultural Sciences. Rafsanjan, 14-17 September. Page 164. (In Farsi).

Hao X, Wang B, Wang L, Zeng J, Yang Y, Wang X (2018) Comprehensive transcriptome analysis revealscommon and specific genes and pathways involved in cold acclimation and cold stress in tea plant leaves. Scientia Horticulturae. 240:354-368.

Hijaz F, Nehela, Y, Killiny N (2018) Application of gamma-aminobutyric acid increased the level of phytohormones in Citrus sinensis. Planta. 248: 909-918.

Jaglo KR, Kleff S, Amundsen KL, Zhang X, Haake V, Zhang JZ, Deits T, Thomashow MF (2001) Components of the Arabidopsis C-repeat/dehydration-responsive element binding factor cold-response pathway are conserved in Brassica napus and other plant species. Plant Physiology. 127:910-917.

Jia Y, Zou D, Wang J, Sha H, Liu H, Inayat MA, Zhao H (2017) Effects of γ-aminobutyric acid, glutamic acid, and calcium chloride on rice (*Oryza sativa* L.) under cold stress during the early vegetative stage. Journal of Plant Growth Regulation. 36: 240-253.

Karimi Alavijeh M, Ebadi A, Mousavi A, Islamic AR (2015) Quantitative comparison of *CBF*1 and *CBF*4 gene expression under cold stress in grape cultivars *Vitis vinifera* (L), Shahroudi and *Vitis riparia*. Iranian Journal of Horticultural Sciences. 64:373-374 (In Farsi).

Kosova K, Prasil IT, Vitamvas P, Dobrev P, Motyka V, Flokova K, Novak O, Tureckova V, Rolcik J, Pesek B (2012) Complex phytohormone responses during the cold acclimation of two wheat cultivars differing in cold tolerance, winter Samanta and spring Sandra. Journal of Plant Physiology. 169:567-576.

Krol A, Amarowicz R, Weidner S (2014) Changes in the composition of phenolic compounds and antioxidant properties of grapevine roots and leaves (*Vitis vinifera* L.) under continuous of long-term drought stress. Acta Physiologiae Plantarum 36:1491-1499.

Lata C, Prasad M (2011) Role of *DREB*s in regulation of abiotic stress responses in plants. Journal of Experimental Botany 62:4731-4748.

Li J, Wang L, Zhu W, Wang N, Xin H, Li S (2014) Characterization of two *VvICE1* genes isolated from 'Muscat Hamburg' grapevine and their effect on the

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-31]

tolerance to abiotic stresses. Scientia Horticulturae. 11:63-77.
Li J, Wang N, Xin H, Li S (2013) Overexpression of Va*CBF*4, a transcription factor from Vitis amurensis, improves cold tolerance accompanying increased resistance to drought and salinity in *Arabidopsis*. Plant Molecular Biology Reporter. 31:1518-1528.
Liu C, Zhao L, Yu G (2011) The dominant glutamic acid metabolic flux to produce gamma-amino butyric acid over proline in Nicotiana tabacum leaves under water stress relates to its significant role in antioxidant activity. Journal of Integrative Plant Biology. 53:608-618.
Liu Q, Kasuga M, Sakuma Y, Abe H, Miura S, Goda H (1998) Two transcription factors, *DREB1* and *DREB2*, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. Plant Cell. 10:391-406.
Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-ΔΔCt method. Methods. 25:402-408.
Malekzadeh P, Kosravi-Nejad F, Hatamnia AA (2017) Impact of postharvest exogenous γ-aminobutyric acid treatment on cucumber fruits in response to chilling tolerance. Physiology and Molecular Biology of Plants. 23:827-836.
Mckhann HI, Gery C, Berard A, Leveque S, Zuther E, Hincha D, Mita SD, Brunel D, Teole E (2008) Natural variation in *CBF* gene sequence, gene expression and freezing tolerance in the Versailles core collection of Arabidopsis thaliana. BMC Plant Biology. 8:1-18.
Naikoo MI, Dar MI, Raghib F, Jaleel H, Ahmad B, Raina A, Khan FA, Naushin F (2019) Role and Regulation of Plants Phenolics in Abiotic Stress Tolerance: An Overview. In Plant Signaling Molecules; Elsevier: AmstERDam, the Netherlands. pp.157-168.
Navarro JM, Flores P, Garrido C, Martínez V (2006) Changes in the contents of antioxidants compounds in pepper fruits at different ripening stages, as affected by salinity. Food Chemistry. 96:66-73.
Najatian MA (2014) Comparison of cold tolerance in some grape cultivars of Iran and Europe. Journal of Production and Processing of Crop and Horticultural Products. 157-170: 3(In Farsi).
Petridis A, Doll L, Nichelmann W, Bilger S, Mock HP (2016) *Arabidopsis thaliana* G2-like flavonoid regulator and brassinosteroid enhanced expression 1 are low-temperature regulators of flavonoid accumulation. New Phytologist. 211:912-925.
Rihan HZ, Al-Issawi M, Fuller MP (2017) Advances in physiological and molecular aspects of cold tolerance, Journal of Plant Interactions. 12:143-157.
Rubio S, Perez FJ (2019) ABA and its signaling pathway are involved in the cold acclimation and deacclimation of grapevine buds. Scientia Horticulturae. 256: 65-85.
Shelp BJ, Bozzo G, Trobacher C, Zarei A, Deyman K, Brikis C (2012) Hypothesis/review: Contribution of putrescine to 4-aminobutyrate (GABA) production in response to abiotic stress. Plant Science. 193:130-135.
Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2000) Molecular responses to dehydration and low temperature: Differences and cross-talk between two stress signaling pathways. Current opinion in plant biology. 3:217-223.
Slinkard K, Singleton VL (1977) Total phenol analysis Automatin and comparison with manual methods. American Journal of Enology and Viticulture. 28:49-55.
Sun X, Zhu Z, Zhang L, Fang L, Zhang J, Wang Q, Li S, Liang Z, Xin H (2019) Overexpression of ethylene response factors *VaERF080* and *VaERF087* from Vitis amurensis enhances cold tolerance in *Arabidopsis*. Scientia Horticulturae. 243:320-326.
Takuhara Y, Kobayashi M, Suzuki S (2011) Low-temperature-induced transcription factors in grapevine enhance cold tolerance in transgenic *Arabidopsis* plants. Journal of Plant Physiology. 168:967-975.
Wang QJ, Xu KY, Tong ZG, Wang SH, Gao ZH, Zhang JY (2010) Characterization of a new dehydration responsive element binding factor in central arctic cowberry. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 101:211-21.
Wisniewski M, Neuner G, Gusta LV (2015) The use of high-resolution infrared thermography (HRIT) for the study of ice nucleation and propagation in plants. Journal of Visualized Experiments. 99:52-70.
Xiao H, Siddiqua M, Braybrook S, Nassuth A (2006) Three grape *CBF/DREB1* genes respond to low temperature, drought and abscisic acid. Plant Cell Environ. 29:1410-1421.
Xiao Z, Liao S, Rogiers V, Sadras S, Tyerman S (2018) Effect of water stress and elevated temperature on hypoxia and cell death in the mesocarp of Shiraz berries. Australian Journal of Grape and Wine Research. 20:487-497.
Xu W, Rosenow D, Nguyen T (2008) Stay green trait in grain sorghum: relationship between visual rating and leaf chlorophyll concentration. Plant Breeding. 119:365-367.
Yang A, Cao S, Cai Y, Zheng Y (2011) γ-Aminobutyric acid treatment reduces chilling injury and activates the defence response of peach fruit. Food Chemistry. 129:1619-1622.
Yoon YE, Kuppusamy S, Cho KM, Kim PJ, Kwack YB, Lee YB (2017) Influence of cold stress on contents of soluble sugars, vitamin C and free amino acids including gamma-aminobutyric acid (GABA) in spinach (*Spinacia oleracea*). Food Chemistry. 215:185-92.
Yuan Y (2016) Overexpression of *VaPAT1*, a *GRAS* transcription factor from *Vitis amurensis*, confers abiotic stress tolerance in *Arabidopsis*. Plant Cell Reports. 35:655-666

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-31]