

بررسی بیان ژن‌های *ABA-8' Hydroxylase* و *Chalcone Synthase* 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 H¹, Emamjomeh A^{*1}, Solouki M¹, Heidari F¹

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 نمو خوشه انگور پر شدن حبه‌ها و رسیدگی حبه‌ها) با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز 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 نمو 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 پلیمرز در زمان واقعی

مقدمه

انگور یکی از محصولات باغی مهم در ایران و دنیا به شمار می‌آید. ایران از لحاظ تولید انگور در مرتبه 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 ۱۳۹۶ از مجموع ۳۸۰۸/۳ هکتار سطح زیر کشت انگور استان سیستان و بلوچستان (اعم از سطح بارور و غیربارور) ۳۱۸۷۴/۳ 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. سابقه 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 عمده سطح زیر کشت این محصول را به خود اختصاص داده و از عوامل مهم توسعه 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 قابل برداشت 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^۱ و غیر کلیماکتریک^۲ 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^۳ و عصاره‌گیری استفاده می‌شود. رشد انگور از یک منحنی سیگموئیدی دوگانه^۴ پیروی می‌کند. به‌طوری‌که در مرحله اول اندازه حبه افزایشی سریع دارد. مرحله دوم فاز تأخیری^۵ 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^۶ 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 متأثر 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

نقش اسید آبسزیک به عنوان هورمون عمومی تنش جالب توجه است (Gao et al. 2002). آبسزیک 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 به نظر می‌رسد *ABA-8' hydroxylase* مسیری غالب، برای غیرفعال کردن ABA به شکل مرحله‌ای است. کاتابولیسم ABA توسط ژن کاتالیزور-ABA, Cytochrome P450, *ABA-8' hydroxylase* انجام می‌شود. 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 مجدداً 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 هیدروکسیلینگ 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' Hydroxylase* به عنوان فاکتورهای رونویسی و ژن *18S* به عنوان 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

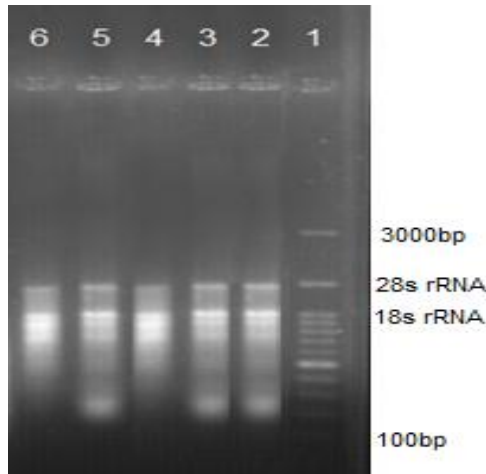
در این تحقیق، از بوته‌های انگور موجود در مرکز تحقیقات کشاورزی زهک استفاده شد. انتخاب نمونه از برگ، براساس تجربیات پیشین انجام شد (Boss et al. 1996; Walker et al. 2007; Wu et al. 2015b; Degu et al. 2019). نمونه‌برداری از برگ پنج رقم شامل: ارقام زودرس یاقوتی قرمز و سفید، رقم متوسط رس سنگی و ارقام دیررس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

بیماری‌ها، تومورهای گیاهی و تجمع گلوکز می‌باشد. همچنین هورمون‌های گیاهی به خصوص 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 به دلیل 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 A, B, C اختصاصی آن‌ها، از پیش سازهای مشتق از فنیل پروپانوید 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 پروپانوید 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 پروپانویدی (فنیل آلانین آمونیالاز (PAL)، سینامات ۴ هیدروکسیلاز (C4H) و ۴-کومارات- کوآنزیم آ لیگاز (CL 4) به کوماریل کوآنزیم آ تبدیل می‌شود. کالکون سنتاز (CHS) اولین آنزیم سنتز فلاونوئید موجب ترکیب کوماریل کوآنزیم آ با سه مولکول مالونیل کوآنزیم آ حاصل از استیل کوآنزیم آ برای تشکیل نارینجین می‌شود. سپس نارینجین کالکون به وسیله کالکون ایزومراز (CHI) به نارینجین تبدیل می‌شود. نارینجین به وسیله گلیکوزیل 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 آبسزیک (ABA) یکی از هورمون‌های گیاهی مهم است که در پروسه‌های نموی مختلفی نقش ایفا می‌کند که از این میان

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

روی شاخه‌های انگور جمع‌آوری شد. استخراج RNA کل از نمونه‌های برگ انگور با استفاده از کیت خریداری شده از شرکت دنا زیست آسیا و طبق روش پیشنهادی این شرکت انجام شد. به منظور تعیین کیفیت RNA استخراج شده از الکتروفورز ژل آغاز براساس روش Sambrook et al. (1989) استفاده (شکل ۱) و تعیین غلظت RNA Total با اسپکتوفتومتر انجام شد. میزان غلظت Total RNA استخراج شده برای مجموع نمونه‌های بررسی شده با دستگاه اسپکتوفتومتر حداقل و حداکثر برابر با ۱/۹۷ - ۱/۸۱ نانوگرم بر میکرولیتر (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 به منظور جلوگیری از بروز خطا و نیز برای راحتی و سرعت عمل بیشتر، محلول پایه برای هر جفت آغازگر به صورت مجزا مطابق با جدول ۲ تهیه شد. با توجه به این

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

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

جدول ۲- مواد مورد نیاز برای Real Time PCR

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

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

مرحله	دما و زمان مورد استفاده
فعال‌سازی ابتدایی آنزیم	۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه
واسرشت شدن	۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۲ ثانیه
اتصال آغازگرها	۵۷/۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه
بسط ترکیبی	۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۲ ثانیه
منحني ذوب	افزایش دما از ۳۳ درجه تا ۵۲ درجه هر ۵ ثانیه ۱ درجه

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 Ct های ژن مورد نظر و ژن کنترل، اعمال کردیم و داده‌ها که همان Ct ها 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 به دست آمده است داده نرمال شده را دلتا Ct (ΔCt) می‌نامیم.

(ژن کنترل داخلی) - Ct (ژن مورد نظر) $\Delta Ct = Ct$

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

$\Delta\Delta Ct = Ct\Delta Ct$ (نمونه مورد نظر) - ΔCt (نمونه شاهد)

Ct ، ΔCt و $\Delta\Delta Ct$ بر اساس لگاریتم بر پایه ۲ هستند بنابراین آن‌ها را به حالت خطی درآوردیم، پس $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ بیانگر سطح بیان نسبی ژن بود:

The Relative gene expression (RGE) = $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$

در پایان تجزیه واریانس داده‌های به دست آمده نرم افزار SAS نسخه ۹/۴ 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 نمو 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 چشم‌گاو (۰/۲۲۹) و کمترین مقدار بیان نسبی این ژن در رقم یاقوتی سفید (۰/۰۲۶) مشاهده شد (شکل ۲).

بررسی نتایج میزان بیان نسبی ژن *ABA 8'-hydroxylase* حاکی از این است که بیان این ژن در ارقام (زودرس و دیررس)، مراحل نمو (پر شدن حبه‌ها و رسیدگی حبه‌ها) و همچنین اثر متقابل ارقام و مراحل نمو معنی‌دار است (جدول ۴). 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 چشم‌گاو) 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 چشم‌گاو و فخری هورمون تنش (*ABA*) در مرحله پر شدن حبه‌ها (تیر و مرداد ماه)، همزمان با تنش‌های 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 آسبیزیک ۸-هیدروکسیلاز در رقم

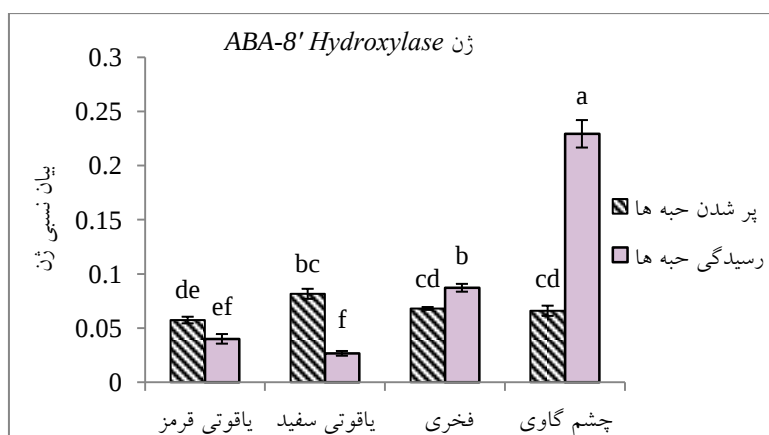
چشم‌گاو بوده است، بدین صورت که بیان نسبی هورون تنش (ABA) در مرحله پر شدن حبه‌ها در رقم چشم‌گاو با تنش‌های محیطی تابستان (ماه‌های تیر و مرداد) صورت گرفته و پس از گذراندن دوره تنش (شهریور) مرحله رسیدگی حبه‌ها افزایش بیان نسبی ژن اسید آسازیک ۸'-هیدروکسیلاز در این رقم، موجب القای هورون تنش (ABA) شده است. بررسی میزان بیان نسبی ژن *ABA-8' Hydroxylase* برای ارقام زودرس (یا قوتی قرمز و سفید) در مراحل پر شدن حبه‌ها و رسیدگی حبه‌ها به ترتیب 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 یا قوتی قرمز و سفید نسبت به ارقام فخری و چشم‌گاو می‌باشد. بیان نسبی این ژن در ارقام دیررس (چشم‌گاو 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. به عبارت دیگر بیان زود هنگام ژن *ABA-8' Hydroxylase* در ارقام زودرس (مرحله نموی پر شدن حبه‌ها) در تسریع فرآیند نموی رسیدگی حبه‌های انگور یا قوتی سیستان نقش کلیدی دارد.

جدول ۴- جدول تجزیه واریانس ژن *ABA-8' Hydroxylase*

منابع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	ارزش F
رقم (A)	۳	۰/۰۳۷۲۶۳۳۹**	۰/۰۱۲۴۲۱۱۳**	۱۰۵/۱۴۸
خطا A (E_A)	۸	۰/۰۰۰۹۴۵۰۴	۰/۰۰۰۱۱۸۱۳	
مرحله نموی (B)	۱	۰/۰۰۴۵۴۷۵۶**	۰/۰۰۴۵۴۷۵۶**	۶۳/۳۱۲
مرحله نموی × رقم ($A \times B$)	۳	۰/۰۴۰۹۹۳۶۵**	۰/۰۱۳۶۶۴۵۵**	۱۹۰/۲۴۱
خطا B (E_B)	۸	۰/۰۰۰۵۷۴۶۲	۰/۰۰۰۰۷۱۸۲۷۵	
RB	۲	۰/۰۰۰۱۰۲۱۸	۰/۰۰۰۰۵۱۰۹	
ABR	۶	۰/۰۰۰۴۷۲۴۴	۰/۰۰۰۰۷۸۷۴	
کل	۲۳	۰/۰۸۴۳۴۲۶		
ضریب تغییرات (CV)		۱۰/۸۱۷		

** : تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد



شکل ۲- میزان بیان نسبی ژن *ABA-8' Hydroxylase* در ارقام مختلف

برای دو مرحله نمو پر شدن حبه‌ها و رسیدگی حبه‌ها

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 نمو به ترتیب در سطح احتمال پنج و یک درصد می‌باشد (جدول ۵).

بیشترین میزان بیان ژن *Chalcone synthase* در مرحله نمو پر شدن حبه‌ها می‌باشد، با توجه به این امر که این ژن یک کلیدی آغازگر سنتز فلاونوئیدها و سایر عوامل مؤثر در تولید رنگدانه‌ها می‌باشد بیان معنی‌دار این ژن در سطح مراحل نمو 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 به دلیل 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^۱ (SBBM) بود و Summer Black کنترل یا شاهد^۲ (SBC) انتخاب شدند. تفاوت این دو نوع انگور در تاریخ رسیدگی آن‌ها بود. به‌طوری‌که میوه

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-20-1، YH-20-2 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/HiSeq 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 رنگدانه‌های میوه ایفا می‌کند که میزان بیان این ژن به شدت تحت تأثیر تنش‌های محیطی قرار می‌گیرد. فلاونوئیدها از مهم‌ترین ترکیبات موجود در انگور

^۱ Summer Black Bud Mutation (SBBM)

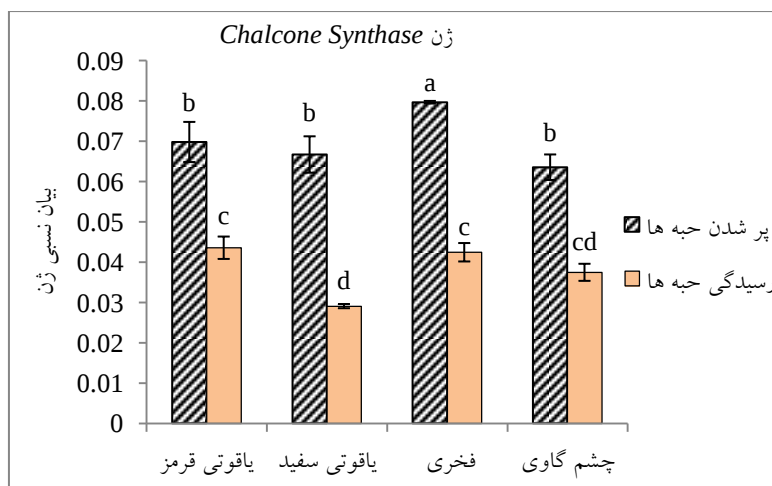
^۲ Summer Black Control (SBC)

با توجه به معنی‌دار بودن بیان نسبی ژن *Chalcone Synthase* در دو مرحله نمو پر شدن 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 *Synthase Chalcone* 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 *synthase Chalcone* 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*)، دی‌هیدرو فلاونول ۴ ردوکتاز (*DFR*)، لکو آنتوسیانیدین دی اکسیژناز (*LDOX*) و UDP-گلوکوز-فلاونوئید ۳-O-گلوکوزیل ترانسفراز (*UFGT*) را که ژن‌های مؤثر در رسیدگی به‌شمار می‌روند را مورد بررسی و شناسایی قرار دادند.

SBBM تقریباً یک هفته زودتر از SBC برداشت می‌گردد. در این مطالعه بعد از آنالیز چند شکلی تک نوکلئوتیدی (SNPs) و تغییرات ساختاری (SVs) بر روی ژنوم انگور در مرحله رسیدگی، تعداد ۱۶۶ یونی‌ژن همولوگ مربوط به مرحله رسیدگی و رنگ‌دهی در SBBM و SBC مشخص شد که از بین این یونی‌ژن‌ها، ۹۰ یونی‌ژن در رقم SBC و ۷۶ 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 پلیمرز^۱ 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* و *SEP1* افزایش و بیان ژن *SEP1* کاهش یافت همچنین بیان گردید که ژن *CHSY* مربوط به زودرسی انگور و دو ژن *ERF5* و *ERF03* در تنظیم شروع زودرسی در رقم SBBM نقش دارند (Xu et al. 2016).

¹ Quantitative Reverse Transcription PCR (qRT-PCR)



شکل ۳- میزان بیان نسبی ژن *Chalcone Synthase* در ارقام مختلف برای دو مرحله نمو پر شدن حبه‌ها و رسیدگی حبه‌ها

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*	۶/۸۶۵
خطا A (E_A)	۸	۰/۰۰۰۲۴۸۴۵	۰/۰۰۰۳۱۰۵۶	
مرحله نموی (B)	۱	۰/۰۰۰۶۰۶۴۰۰	۰/۰۰۰۶۰۶۴**	۲۵۵/۶۳۵
مرحله نموی $\times$ رقم ($A \times B$)	۳	۰/۰۰۰۱۹۰۳۰	۰/۰۰۰۱۹۰۳ ^{NS}	۲/۶۷۴
خطا B (E_B)	۸	۰/۰۰۰۱۸۹۷۷	۰/۰۰۰۲۳۷۲۱۳	
RB	۲	۰/۰۰۰۰۷۶۷۵	۰/۰۰۰۰۳۸۳۷۵	
ABR	۶	۰/۰۰۰۱۱۳۰۲	۰/۰۰۰۰۱۸۸۳۶۶	
کل	۲۳	۰/۰۰۷۳۳۲۱۷		
ضریب تغییرات (CV)		۸/۰۳۳		

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

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.

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 *Synthase* در *Chalcone* 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 *Synthase* *Chalcone* تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال پنج درصد را در میان ارقام زودرس و دیررس نشان داد. با توجه به نقش کلیدی

منابع

Afrooz 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, Abdeslah H (2018) Agricultural Census 2017:

Horticultural Products. Ministry of Agriculture Jihad 3:109-112.

Allahdou M, Sadegh A, Kouhkan SJBBS (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 SPJP (1996) Analysis of the expression of anthocyanin pathway genes in

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 Viticulture* 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.