بررسی تأثیر GABA بر بیان ژن BAP1 تحت تنش سرما در ارقام تجاری انگور

بهاره قربانی[۱*]، حمید حسن‌پور[۲]، مراد جعفری[۳]

[۱] ترتیب دانش‌آموخته‌ی دکتری باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه

[۲] دانشیار گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه

[۳] دانشیار گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه

نویسنده مسئول: *ghorbani.bahareh@ymail.com*

چکیده

سرمازدگی از مهم‌ترین تنش‌های محیطی و مؤثر در فرآیند رشد و تکامل گیاهان و تولید محصولات باغی و زراعی بوده و تأثیر شدیدی بر رشد و نمو و بقای گیاهان دارد. تنش سرما اثر متفاوتی روی رشد گیاهان، فعالیت‌های فتوسنتزی، تخریب غشاهای سلولی دارد و حتی باعث مرگ سلول در گیاهان می‌شود. کاربرد ترکیبات هورمونی و شبه هورمونی می‌تواند تا حدودی از خسارات ناشی از سرما بکاهد. به این منظور پژوهشی بر عملکرد گاما آمینوبوتیریک اسید (GABA) روی برخی خصوصیات بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی انگورهای تجاری رقم بیدانه سفید و رقم حسینی تحت تنش سرما صورت پذیرفت. این پژوهش در قالب طرح کامل تصادفی در سه تکرار بوده و تأثیر محلول‌پاشی GABA ۶۰ میلی‌مولار بر روی ارقام‌تجاری انگور تحت تنش سرما موردبررسی قرار گرفت، طی آن نهال‌های تیمار شده با GABA در اتاقک رشد با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و در شش مرحله صفر، ۱، ۳، ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت نمونه‌برداری از برگ‌های جوان و توسعه‌یافته صورت پذیرفت. در این پژوهش بیان عامل رونویسی BAP1 بین ارقام تیمار شده با GABA در غلظت۶۰ میلی‌مولار موردبررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از روش کمی Reel Time-PCR نشان داد سطح بیان ژن مقاومت در انگور رقم بیدانه سفید در زمان‌های ۶ و۱۲ ساعت بعد از اعمال تنش سرما بالاتر رفته و این بیانگر این است که GABA قادر است تا حدودی سیگنالینگ درون گیاه را تقویت نموده و بیان ژن‌های مقاومت را تحت تأثیر قرار دهد.

واژه‌های کلیدی: اتاقک رشد، انگور، بیان ژن، عامل رونویسی BAP1

مقدمه

تنش‌های محیطی علت اصلی از دست رفتن محصولات و کاهش عملکردی بیش از ۵۰ درصد محصولات در سراسر جهان هستند. صدمه سرما یکی از علل اساسی تلفات در گیاهان و از مهم‌ترین عوامل محدودکننده کشت آن‌ها در مناطق مختلف دنیا می‌باشد، به‌طوری‌که از کل زمین‌های قابل‌کشت دنیا فقط۱۰ درصد فاقد تنش سرمایی هستند (Rihan *et al*., 2017). قرارگیری گیاهان در بازه دمایی بین۰ تا ۱۰ درجه سانتی‌گراد سرمازدگی محسوب می‌شود، در برخی گیاهان همانند انگور دمای مؤثر در تنش فصل بهار ۴ درجه سانتی‌گراد می‌باشد. سرمازدگی در درجه اول باعث کاهش فعالیت دیواره سلولی و یا حداقل کاهش سرعت پمپ‌های یونی متصل به غشاء می‌شود و علائم عمومی آن نکروز شدن برگ و درنهایت مرگ گیاه است. عدم تحمل به سرما یکی از عوامل اصلی کاهش عملکرد و کیفیت محصول می‌باشد. گیاهان وقتی در معرض دماهای پائین قرار می‌گیرند برای تطبیق خود با تنش و افزایش تحمل به سرما بسیاری از تغیرات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی را در خود ایجاد می‌نمایند (Xiao *et al*., 2006).

انگور بانام علمی *Vitis vinifera* یکی از محصولات استراتژیک دنیا و ایران و جزء میوه‌های مناطق معتدله می‌باشد. پراکندگی کشت و کار انگور در مناطق جغرافیایی متعدد و نامناسب سبب شده محصول زیادی در اثر سرمای بهاره این اقلیم‌ها از بین برود. علاوه بر آن کاهش دما در شب‌هنگام و اوایل بهار به‌ویژه اگر مصادف با باز شدن جوانه‌ها و گل‌ها باشد، گاه خسارت‌های قابل‌توجهی بر انگور برجای می‌گذارد. اکثر ارقام تجاری انگور متعلق به انگور اروپایی بوده و درحالی‌که این ارقام ازنظر کیفیت عالی هستند، تحمل نسبتاً ضعیفی نسبت به سرما دارند لذا در طول فصل زمستان و بهار، سرما آسیب قابل‌توجهی به باغات انگور وارد می‌آورد (Yu *et al*., 2017). تحقیقات نشان داد روبیسکو نقش مهمی در فرآیندهایی همچون مرگ سلولی، تجمع پروتئین، پاسخ به سرما و ایجاد مقاومت به تنش دمای پایین دارد، این بیان بیش‌ازحد روبیسکو تحت تنش سرمایی در گیاه توت‌فرنگی (Zuo *et al*., 2019) گزارش‌شده است. روش‌های مختلفی جهت کاهش خسارات ناشی از تنش مانند استفاده از بخاری‌ها، غرقاب کردن، آبیاری بارانی و حرکت مصنوعی هوا به‌وسیله

ماشین تولید باد وجود دارد، امروزه یکی از روش‌ها مرسوم استفاده از ترکیبات هورمونی و غیر هورمونی برای مقابله با اثرات نامطلوب حاصل از تنش، ترکیب GABA است. کاربرد GABA به‌صورت محلول‌پاشی برگی می‌تواند تا حدودی در کاهش خسارت‌های ناشی از تنش سرما در باغ‌ها نقش داشته باشد. GABA یک آمینواسید غیرپروتئینه چهارکربنه و مولکولی پیام‌رسان می‌باشد و متابولیسم آن در گیاهان از مسیری به نام شانت GABA انجام می‌گیرد، مسیر سنتزی GABA می‌تواند از پرولین (Signorelli *et al*., 2015) یا پلی آمین‌ها باشد. تحقیقات نشان داده پرولین ممکن است چندین مکانیسم سازگاری به دماهای سرمازدگی داشته باشد و این دمای سرمازدگی ممکن است باعث کاهش یا مانع‌شدن از فعالیت پرولین دهیدروژناز شده و سنتز پرولین را تحریک می‌کند و منجر به تجمع پرولین شود. GABA در پاسخ به تنش‌های همچون سرما در چهار رقم گوجه‌فرنگی (Deewatthanawong *et al*., 2010) و اسفناج (Yoon ., 2017 *et al*) نقش دارد. محققان گزارش کردند کاربرد۴۰ میلی‌مولار GABA در کاهش اثرهای تنش شوری روی بوته توت‌فرنگی نقش دارد (قبادی پور و همکاران، ۱۳۹۴).

دست‌کاری یک ژن رمزکنندهٔ پروتئین عملکردی، سبب ایجاد برخی درجه‌های تحمل می‌شود، از راه دست‌کاری یک ژن تنظیم‌کننده می‌توان رفتار گیاهان تحت شرایط تنش را مدیریت کرد.*BAP1* یک پروتئین اتصالی با فسفولیپید با دامنه C_2 است (Hua *et al*., 2001). *BAP1* چندین پروتئین درگیر در بیوسنتز هورمون یا مرتبط با عملکرد هورمون را تنظیم می‌کند، فعال شدن ژن *BAP1* بعد از ۲۴ ساعت سرمادهی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد ممانعت از سرمازدگی را به همراه دارد. Yang و همکاران (۲۰۰۷) گزارش کردند که *BAP1* مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلول‌ها را مهار می‌کند و زخمی شدن و بیولوژیکی استرس می‌توانند در بیان آن مؤثر باشند. همچنین بیان *BAP1* به‌صورت چندگانه تنظیم می‌شود و ازجمله محرک‌های آن می‌توان به درجه حرارت پایین اشاره کرد، سرما سبب فعال شدن پیام‌رسان‌هایی در غشاءکلروپلاست می‌شود که این پیام‌رسان‌ها تنظیمات هورمونی گیاه را کنترل می‌کنند و نیز قادرند برخی ژن‌های پاسخ‌دهنده به سرما همچون *BAP1* را فعال نمایند. عملکرد *BAP1* در انگور بررسی و مشاهده شد که ژن Vv*BAP1* وابسته به کلسیم بوده و با دریافت سیگنال دمای پایین و آزاد شدن کلسیم از غشاء سلولی بیان می‌شود، نتایج این تحقیق نشان داد که Vv*BAP1* می‌تواند مقاومت به سرما در انگور را از طریق تنظیم میزان قند محلول و فعال کردن فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی تقویت کند (Hou *et al*., 2018).

مواد روش‌ها

به‌منظور مطالعه اثر محلول‌پاشی برگی گاما آمینوبوتریک اسید (GABA) روی بیان ژن مقاومت به سرما پژوهشی در قالب طرح کامل تصادفی در سه تکرار بوده و تأثیر محلول‌پاشی GABA ۶۰ میلی‌مولار بر روی ارقام‌تجاری انگور موردبررسی قرار گرفت، طی آن نهال‌های تیمار شده با GABA در اتاقک رشد با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و در شش مرحله صفر، ۱، ۳، ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت نمونه‌برداری از برگ‌های جوان و توسعه‌یافته صورت پذیرفت. استخراج RNA برگ‌های انگور با استفاده از بافر استخراجی CTAB بوده است و سپس کمیت و کیفیت RNA استخراجی توسط ژل آگارز تعیین شد (Asif *et al*., 2006). برای ساخت cDNA از روش پیشنهادی شرکت فرمنتاز برای تمامی نمونه‌ها استفاده شد. توالی برای ژن*BAP1* به‌صورت: توالی رفت-'5 :F AGAAGAATGCCTTTGCCTTG-3'و برگشت '5-CCTCGCAGTTCCGATGACCC-3' :R بوده و از ژن *VvActin* به‌عنوان ژن پایه با توالی رفت '5-AATGAGAGATGGCTGGAAGAG-3' :Fو برگشت -'3 :R TACGAGCAAGAGCTGGAAA-5' استفاده گردید. در این تحقیق از دستگاه Green Runner و کیت SYBR BioPars با روش Real time PCR ارزیابی کمی صورت پذیرفت. پس از انجام واکنش تکثیر به روش QReal time PCR داده‌های خام به‌صورت Ctاز دستگاه استخراج شد و از روش ΔΔCt برای تجزیه داده‌ها استفاده گردید.

نتایج و بحث

تأثیرGABA بر بیان ژن *BAP1*تحت تنش سرما در دو رقم بیدانه سفید و حسینی بر اساس نتایج به‌دست‌آمده (شکل ۱)، مشاهده گردید که اثرات ساده رقم و زمان در سطح احتمال ۱٪ دارای اختلاف معنی‌دار هستند و اثرات دوجانبه رقم در زمان در ژن *BAP1* با سطح احتمال ۱٪ دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشد. میزان بیان نسبی در ژن *BAP1* در ساعت ۶ و۱۲ نمونه‌برداری بالاترین سطح را داشته است و بیان ۵۵ برابری در رقم بیدانه سفید نسبت به نمونه شاهد دیده‌شده است. به‌طورکلی عکس‌العمل ژن‌ها در رقم بیدانه سفید

با شدت بالاتری نسبت به رقم حسینی بوده است و نیز بالاترین سطح مقاومت را نشان داده است این امر می‌تواند به علت اثرات بنیادی و نهادینه این ارقام بوده باشد.

شکل ۱- اثرات تیمار GABA بر میزان بیان ژن *BAP1* در انگور بیدانه سفید و رقم حسینی. میانگین‌ها دارای حرف مشابه می‌باشند ازنظر آماری اختلاف معنی‌داری در سطح ۱ درصد آزمون چند دامنه‌ای دانکن ندارد.

نقش *BAP1* در مهار عوارض ناشی از صدمه و خسارت به گیاه، تنش دمایی پایین و مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلول به اثبات رسیده است و ژن *BAP1* بابیان At *BAP1* تحت دمای پایین قادر است مقاومت به سرما را در گیاه آرابیدوپسیس بالا ببرد (Zhu *et al*.,2011). بررسی‌های Zhang و همکاران (۲۰۱۴) نشان داد ژن *BAP1* محافظه‌کارانه عمل کرده و مکانیسم عملکردی وابسته به کلسیم دارد، در این پژوهش دیده شد بعد از ۱۲ ساعت دمای ۴ درجه سانتی‌گراد میزان بیان ژن Vv *BAP1* در رقم مقاوم نسبت به رقم حساس بالاتر بوده است و قدرت القای مقاومت به تنش بالاتری در ارقام مختلف ایفا می‌کند. بیوسنتز GABA در چرخه کربس و گیلیکولیز نشان‌دهنده تأثیر GABA از طریق مکانیسم‌های کربوهیدراتی برای مهار تنش سرما باشد. نتایج تحقیق حاضر نیز نشان داد گیاه تحت تنش سرما سیگنال‌هایی جهت مقاومت گیاه صادر می‌کند و کاربرد GABA سبب می‌شود از طریق تشدید بیوسنتز قندهای محلول و افزایش فعالیت کانال‌های کلسیمی، بر عملکرد بهتر ژن *BAP1* اثر گذارد.

نتیجه‌گیری کلی

همچنین با بررسی ژن *BAP1* مشخص گردید، گیاه پس از دریافت سیگنال‌های سرمایی از محیط شرایطی را در ساختار سلولی و غشایی خود تغییر می‌دهد که تغییر این زیرساخت‌ها بابیان ژن‌های مرتبط و تبدیل آن‌ها به دستورهای پروتئینی ممکن پذیر است. بیان ژن‌های *BAP1* در رقم بیدانه سفید بالاتر از رقم حسینی بود که این خود نیز می‌تواند بیانگر میزان مقاومت ارقام بوده و نیز دلیلی برافزایش سطوح آنتی‌اکسیدانی در رقم بیدانه سفید باشد.

منابع

Asif, M., Trivedi, P.K., Solomos, T., Tucker, M. 2006. Isolation of high quality RNA from apple fruit. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54: 5227-5229.

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

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

Hou, L., Zhang, G., Zhao, F., Zhu, D., Fan, X., Zhang, Z., Liu, X. 2018. Vv*BAP1* Is Involved in Cold Tolerancein *Vitis vinifera* L. Frontiers in Plant Science, 1(9):726.

Hua, J., Grisafi, P., Cheng, S.H., Fink, G.R. 2001. Plant growth homeostasis is controlled by the *Arabidopsis BON1* and *BAP1* genes. Genes & Development, 15: 2263-2272.

Li, W., Liu, J., Ashraf, U., Li, G., Li, Y., Lu, W., Gao, L., Han, F., Hu, J. 2016. Exogenous γ-aminobutyric Acid (GABA) application improved early growth, net photosynthesis, and associated physio-biochemical events in maize. Frontiers in Plant Science, 7: 215-221.

Rihan, H.Z., Al-Issawi, M., Fuller, M.P. 2017. Advances in physiological and molecular aspects of cold tolerance, Journal of Plant Interactions, 12:143-157.

Signorelli, S., Dans, P.D., Coitino, E.L., Borsani, O., Monza, J. 2015. Connecting proline and γ aminobutyric acid in stressed plants through non-enzymatic reactions. PLoSOne, 10: e0115349.

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.

Yang, H., Yang, S., Li, Y., Hua, J. 2007. The *Arabidopsis BAP1* and *BAP*2 genes are general inhibitors of programmed cell death. Plant Physiology, 145: 135-146.

Yu, D., Zhang, L., Zhao, K., Niu, R., Zhai, H., Zhang, J. 2017.*VaERD15*, a transcription factor gene associated with cold-tolerance in Chinese wild Vitis amurensis. Front. Plant Science, 8:297.

Yoon, Y.E., Kuppusamy, S., Cho, K.M., Kim, P.J., Kwack, Y.B., Lee, Y.B. 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.

Zhang, G., Xiao, P., Hou, L., Wang, W., Ma, Q., Liu, X. 2014. Gene cloning and expression analysis of *VvBAP1* in *Vitis vinifera*. Plant Physiology, 50: 829-834.

Zhu, Y., Yang, H., Mang, H. G., Hua, J. 2011. Induction of *BAP1* by a moderate decrease in temperature is mediated by ICE1 in *Arabidopsis*. Plant Physiology, 155: 580-588.

Zuo, Z. F., Kang, H.G., Park, M.Y., Jeong, H., Sun, H.J., Song, P.S., Lee, H.Y. 2019. Zoysia japonica MYC type transcription factor *ZjICE1* regulates cold tolerance in *transgenic Arabidopsis*. Plant Sciences, 289: 110254.

Evaluation of the effect of gamma-aminobutyric acid on expression of *BAP1* genes in commercial grape cultivars under cold stress

Bahareh Ghorbani [1*], Hamid Hassanpour [2], Morad Jafari [3]

[1] **Ph.D. in** Horticulture, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Urmia University

[2] **Associate Professor of** Horticulture, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Urmia University

[3] **Associate Professor of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture and Natural Resources,Urmia University**

Corresponding Author:* ***ghorbani.bahareh@ymail.com*

Abstract

Frost is one of the most important environmental stresses and effective in the process of plant growth and development and the production of horticultural and agricultural products and has a strong impact on plant growth and survival. Cold stress has different effects on plant growth, photosynthetic activity, cell membrane destruction, and even cell death in plants. The use of hormonal and quasi-hormonal compounds can reduce the damage caused by the cold to some extent. For this purpose, a study was performed on the performance of gamma aminobutyric acid (GABA) on some biochemical and physiological characteristics of commercial grapes of Bidaneh Sefid and Hosseini cultivars under cold stress. This study was a randomized complete design with three replications and the effect of 60 mM GABA foliar application on commercial grape cultivars under cold stress was investigated, during which GABA-treated seedlings were grown in a growth chamber at 4 ° C. They were exposed to Celsius and young and developed leaves were sampled in six stages of 0, 1, 3, 6, 12 and 24 hours. In this study, the expression of *BAP1* transcription factor between cultivars treated with GABA at a concentration of 60 mM was investigated. The results of Real Time-PCR showed that the expression level of resistance in grapes of Bidaneh Sefid cultivar increased at 6 and 12 hours after the application of cold stress and this indicates that GABA is able to somewhat enhance signaling within the plant. And affect the expression of resistance genes.

***Keywords*:** Growth chamber, Grapes, Gene expression, *BAP1* transcription factor