

Evaluation of HSP-70 heat-tolerance gene in Yaghooti grape of Sistan under hormonal treatment by Indole acetic acid, Gibberellic acid and Abscisic acid

Yasoub Shiri 

*Corresponding author. Assistant Professor, Department of Biotechnology and Plant Breeding, Agriculture Research Institute, University of Zabol (UOZ), Zabol, Iran. E-mail: Yasob.shiri@.ac.ir

Nooshin Kalkali 

M.Sc Graduate of Agricultural Biotechnology, University of Zabol (UOZ), Zabol, Iran. E-mail: nooshinkalkali1991@yahoo.com

Abstract

Objective

Yaghooti seedless grape is one of the early-ripens variety of grapes in Iran where its fruit marketed by mid-May. This grape has high resistance to extreme heat of the region, which made Yaghooti grape one of the unique and exclusive products of the province and country. Heavy heat-shock proteins like HSP60, HSP70 and HSP90 seems to have key role in survival and rescue the plants against the heat-stress. By considering this unique feature of the plant and key role of the HSP-70 protein in said process studied and analyzed in all three stages of cluster growth and development under influence of hormonal treatment of abscisic acid, gibberellic acid and Indole-acetic acid.

Materials and methods

Plant materials used for total RNA extraction were sampled in three stages: cluster formation, berry formation and final size of cluster growth process. Specific primers of HSP-70 gene (1104687527) and Actin-7 gene (100232866) as housekeeping gene were designed by CLC main workbench and used for Real Time-PCR reaction. Finally, the relative expression was calculated

based on the obtained Cts using Pfaffl formula. The results were analyzed using a completely randomized factorial design and Duncan test with a significance level of 0.01 using SAS 9.0 software. The co-expression network was rebuilt using Cytoscape software.

Results

The relatively highest expression obtained for the HSP-70 at the 2nd stage of development simultaneously with the flowering and under influence of abscisic hormonal treatment. Elevation in the level of abscisic acid resulted in upregulation of ABI2 gene that subsequently suppresses the internal synthesis of abscisic acid hormone and upregulation of HSP-70.

Conclusions

Abscisic acid in compare with Indole-acetic acid and gibberellin hormone has key role in upregulation and heat-resistance induction in Yaghooti grape. Hormone-treated clusters in comparison to the control clusters had lesser congestion and density. Gibberellin treatment cause the increase in length of cluster in addition to decrease in grapes number per cluster.

Keywords: qRT-PCR; Stress, Gene Expression; Gene Network

Paper Type: Research Paper.

Citation: Shiri Y, Kalkali N (2021) Evaluation of HSP-70 heat-tolerance gene in Yaghooti grape of Sistan under hormonal treatment by Indole acetic acid, Gibberellic acid and Abscisic acid. *Agricultural Biotechnology Journal* 13 (3), 25-42.

Agricultural Biotechnology Journal 13 (3), 25-42.

DOI: 10.22103/jab.2021.16618.1265

Received: July 2, 2021.

Accepted: August 5, 2021.



Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.


© the authors

بررسی بیان ژن تحمل تنش گرمایی HSP-70 در انگور یاقوتی سیستان تحت تاثیر تیمارهای هورمونی ایندول-استیک اسید، جیبرلیک اسید و آبسزیک اسید

یعتوب شیری 

*نویسنده مسئول: استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، پژوهشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران. رایانامه:

yasob.shiri@uoz.ac.ir

نوشین کلکلی 

دانش آموخته بیوتکنولوژی در کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران. رایانامه: nooshinkalkali1991@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۵/۱۴

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۴/۱۱

چکیده

هدف: انگور بی دانه یاقوتی یکی از زودرس ترین ارقام انگور در ایران است که اواخر اردیبهشت ماه محصول آن به بازار ارائه می شود. همچنین تحمل بالای آن در برابر گرمای شدید منطقه سیستان و بلوچستان، آن را به یک رقم منحصر به فرد تبدیل کرده است. پروتئین های شوک حرارتی با وزن بالا نظیر HSP70، HSP60 و HSP90 به نظر می رسد نقشی اساسی در بقاء و رهایی از تنش گرمایی در گیاهان را دارند. با توجه به ویژگی برجسته تحمل در برابر تنش گرمایی در انگور یاقوتی سیستان و نقش کلیدی ژن HSP-70 در القای تحمل تنش گرمایی، در این مطالعه بیان ژن HSP-70 در سه مرحله رشدی نمو خوشه، تحت تاثیر تیمارهای هورمونی آبسزیک اسید، جیبرلیک اسید و ایندول استیک اسید مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها: مواد گیاهی مورد استفاده برای استخراج RNA کل در سه مرحله شکل گیری خوشه، شکل گیری حبه ها و پایان فرایند رشد طولی خوشه نمونه برداری شد. آغازگرهای اختصاصی ژن HSP-70 (1104687527) و ژن Actin-7 (100232866) به عنوان کنترل داخلی، جهت انجام واکنش Real Time-PCR مورد استفاده قرار گرفتند. در نهایت میزان بیان نسبی ژن مورد مطالعه بر اساس Ct های بدست آمده و با استفاده از فرمول Pfaffl آنالیز و نتایج با استفاده از طرح کاملا تصادفی

بر پایه فاکتوریل و آزمون دانکن سطح معنی‌داری یک درصد با استفاده از نرم افزار SAS 9.0 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. با استفاده از نرم‌افزار Cytoscape شبکه هم‌بیانی ترسیم شد.

نتایج: بالاترین میزان بیان نسبی بدست آمده برای ژن *HSP-70* در مرحله دوم نمو خوشه همزمان با گلدهی و تحت تاثیر تیمار هورمون آبسزیک اسید بود. افزایش سطح هورمون آبسزیک اسید سبب افزایش بیان ژن *ABI2* می‌گردد که نتیجه آن سرکوب سنتز داخلی هورمون آبسزیک اسید و افزایش بیان ژن *HSP-70* می‌شود.

نتیجه‌گیری: هورمون آبسزیک اسید در مقایسه با تیمار هورمون ایندول استیک اسید و هورمون جیبرلین نقش اصلی را در افزایش بیان و القای تحمل تنش گرمایی انگور یاقوتی داشت. خوشه‌های تیمار هورمونی در مقایسه با نمونه شاهد از تراکم خوشه کمتری برخوردار بودند. تیمار جیبرلین علاوه بر کاهش تعداد حبه‌ها، افزایش طولی خوشه به دلیل رشد محور اصلی خوشه را نشان داد.

کلیدواژه‌ها: qRT-PCR، تنش، بیان ژن، شبکه ژنی.

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: شیر یعثوب، کلکی نوشین (۱۴۰۰) بررسی بیان ژن تحمل تنش گرمایی *HSP-70* در انگور یاقوتی سیستان تحت تاثیر تیمارهای هورمونی ایندول-استیک اسید، جیبرلیک اسید و آبسزیک اسید. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۳(۳)، ۲۵-۴۲.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.



© the authors

مقدمه

انگور یاقوتی سیستان زودرس ترین انگور در ایران می‌باشد. بطوری که اواخر اردیبهشت محصول آن روانه بازار می‌شود (Shiri et al. 2019). این در حالی است که منطقه گرم و خشک سیستان امکان کشت و کار کمتر گیاهی را فراهم می‌کند. پروتئین‌های کوچک شوک حرارتی (smHSPs) در همه موجودات زنده یافت می‌شوند، اما در گیاهان فراوانی و تنوع بیشتری دارند. این پروتئین‌ها از لحاظ اندازه از ۱۷ تا ۳۰ کیلودالتون متغیر هستند و یک دومین C-terminal محافظت شده و معمول در همه یوکاریوت‌ها را دارا می‌باشند (Muthusamy et al. 2017). در گیاهان عالی ۶ خانواده ژنی در هسته پروتئین‌های کوچک

¹- Small heat shock protein (smHSP)

شوگ حرارتی را کد می‌کنند. هر خانواده ژنی پروتئین‌هایی را کد می‌کند که در بخش‌های مختلف سلولی شامل سیتوزول، کلروپلاست، شبکه آندوپلاسمی و میتوکندری یافت می‌شوند. در انگور یاقوتی سیستان یک ژن از این خانواده با نام $HSP-23.6$ ^۲ در میتوکندری، و ژن دیگری با نام $HSP-21$ ^۳ در کلروپلاست ایفای نقش می‌کند (Dolati-Baneh & Jalili 2014). بطور کلی پروتئین‌های smHSPs در پاسخ به تنش‌های گرمایی بیان می‌شوند. اگر چه پروتئین‌های smHSPs ظاهراً مسائل عملکردهای بنیادی سلول نیستند اما بعنوان پروتئین‌های شوگ حرارتی با وزن بالا نظیر HSP70، HSP60 و HSP90 به نظر می‌رسد نقشی اساسی در بقاء و رهایی از تنش گرمایی داشته باشند. تجزیه و تحلیل بیوشیمی نشان می‌دهد که smHSPs در اجتماعات با وزن مولکولی بالا بین ۲۰۰-۴۰۰ کیلوالتون هستند که به احتمال زیاد تنها از زیرواحدهای smHSP متعدد تشکیل شده است. پروتئین‌های smHSP در درون گیاه بعنوان نگهبانان مولکولی هستند که پروتئین‌های دنا توره شده نسبی را به هم متصل کرده و از غیرفعال شدن آنها جلوگیری می‌کنند و این فعالیت به تحمل گرما توسط گیاه کمک می‌کند (Muthusamy et al. 2017). در مطالعه ای نشان داده شد که در میان ژن‌های HSP، خاموش سازی HSP-70 سبب آسیب‌های شدید در مراکز واکنش فتوسنتز II به خصوص پس از تنش شوری شده است (Almi et al. 2019). مطالعه دیگری نشان داده بیان ژن‌های HSP از الگوی نمودار زنگوله‌ای پیروی می‌کند. به طوری که بیان آن‌ها از نخستین مرحله نمو خوشه شروع به افزایش پیدا می‌کند. در مرحله دوم، همزمان با گرمای شدید در منطقه سیستان، به نقطه اوج خود می‌رسد. سپس در مرحله سوم، همزمان با خشی شدن سلول‌های خوشه و افزایش مقاومت سلول‌ها از بیان آن‌ها کاسته می‌شود (Shiri et al. 2018). هورمون‌های گیاهی گروهی از مواد آلی هستند که در غلظت‌های کم روی فرآیندهای فیزیولوژیکی تأثیر می‌گذارند. فرآیندهای تأثیرگذار عمدتاً شامل رشد و نمو گیاه می‌باشند، گرچه سایر فرایندها مانند حرکت روزنه نیز ممکن است تحت تأثیر قرار گیرند (Davies 2010).

در اواخر دهه ۸۰ میلادی مطالعات و بررسی‌های به عمل آمده روشن نمود که مکانیسم‌های مولکولی در زمره مهم‌ترین فرایندهای ژنتیکی (مشمول بر همانندسازی DNA، رونویسی، ترجمه و حتی نحوه تنظیم ژن‌ها) هستند (Mohammadabadi and Tohidinejad 2017). با توجه به نیازهای زیستی موجود زنده در یک مرحله رشدی و نمو خاص، فقط بخشی از ژن‌ها با افزایش سطوح بیانی^۴، پروتئین‌ها و آنزیم‌های مورد نیاز در آن مرحله زیستی را تولید می‌نمایند (Tohidi nezhad et al. 2015). نیاز به افزایش سطوح بیانی یک ژن بر اساس مرحله رشدی و شرایط محیطی القاء می‌شود و در صورت عدم نیاز به فرآورده یک ژن، با استفاده از مکانیسم‌های متنوع خاموشی، کاهش سطوح بیانی^۵ برای آن ژن اعمال می‌شود (Mohammadabadi et al. 2019a; Ahsani et al. 2018). همچنین توجه به این نکته ضروریست که بیان ژن در یوکاریوت‌ها برای هر بافت بصورت اختصاصی می‌باشد (Ahsani et al. 2019b). هرچند محصول بیان یک ژن در یک بافت الزاماً تنها در همان بافت اثرات

^۲- 23.6 kda heat shock protein, mitochondrial

^۳- Small heat shock protein 21, chloroplatic

^۴- Up regulation of gene expression

^۵- Down regulation of gene expression

مولکولی و بیولوژیکی نداشتته و در بافت یا بافت‌های دیگر و یا در کل فرایندهای زیستی موجود زنده ایفای نقش می‌کند. (Mohammadabadi et al. 2017). بر اساس این توضیحات میزان محصول ژن *HSP* در یک مرحله رشدی و تحت شرایط تنش گرمایی افزایش یافته و با جلوگیری از تخریب ساختار پروتئین‌ها و آنزیم‌های فعال در آن مرحله رشدی، کل فرایندهای زیستی گیاه را محافظت می‌کند. لذا مطالعه ژن‌ها و پروتئین‌های اثرگذار در عملکرد زیستی و همچنین مرتبط با صفات اقتصادی در سطوح سلولی-مولکولی بسیار حائز اهمیت می‌باشد (Jafari Darehdor et al. 2016).

ویژگی برجسته تحمل در برابر تنش گرمایی در انگور یاقوتی سیستان و نقش متنوع هورمون‌های گیاهی در فرایند رشد، تمایز و نمو گیاهان، در کنار نقش کلیدی ژن *HSP-70* در القای تحمل گرمایی، لزوم بررسی جامع بیان این ژن تحت شرایط تیمارهای هورمونی در فرایند رشدی انگور یاقوتی سیستان را نشان می‌دهد. در این مطالعه بیان ژن *HSP-70* را در سه مرحله رشدی نمو خوشه، تحت تاثیر تیمارهای هورمونی آبسزیک اسید، جیبرلیک اسید و ایندول استیک اسید مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی مورد استفاده برای استخراج RNA کل، بوته‌های انگور یاقوتی قرمز سیستان از باغ‌های انگور پژوهشکده کشاورزی دانشگاه زابل تهیه شد. محلول پاشی هورمون به ترتیب با استفاده از اسید جیبرلیک (GA)^۶، ایندول استیک اسید (IAA)^۷ و آبسزیک اسید (ABA)^۸ به ترتیب در غلظت‌های ۴۰ میلی‌گرم در لیتر (Shiri et al. 2019)؛ ۲۰ میلی‌گرم در لیتر (Aliyu et al. 2011)؛ ۵۰ میلی‌مولار بر لیتر (Padmalatha et al. 2017) حدود یک هفته قبل از گلدهی تقریباً، یک ساعت پس از طلوع آفتاب صورت گرفت. در این شرایط، منافذ گیاه باز هستند و همچنین دمای زیر ۲۵ درجه سانتیگراد احتمال جذب هورمون توسط گیاه را افزایش می‌دهد. همزمان، از محلول پاشی آب مقطر برای نمونه‌های شاهد استفاده شد. نمونه برداری از خوشه‌ها در سه مرحله صورت گرفت.

- مرحله اول - شکل‌گیری خوشه - زمانی که اندازه تقریبی خوشه‌ها در حدود ۵ سانتی‌متر بوده و هنوز گل‌های آن باز نشده بودند.
- مرحله دوم - شکل‌گیری حبه‌ها - دو هفته پس از نمونه برداری اول، زمانی که ۷۰٪ حبه‌ها شکل گرفته و اندازه تقریبی خوشه‌ها در حدود ۱۵ سانتی‌متر بود.

^۶- Gibberellic acid

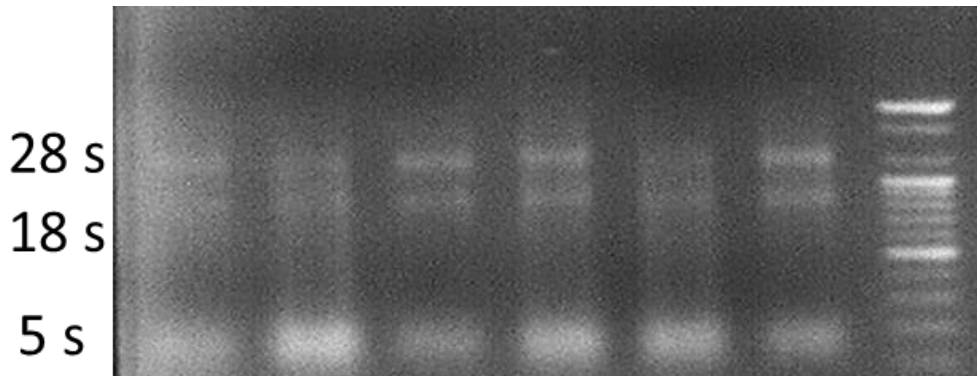
^۷- Indole acetic acid

^۸- Abscisic acid

- مرحله سوم - پایان فرایند رشد طولی خوشه - دو هفته پس از نمونه برداری دوم، زمانی که حبه‌های انگور تقریباً به ۷۰٪ اندازه نهایی خود رسیده بودند.

استخراج RNA کل: استخراج RNA کل از دم حبه‌ها و ساقچه‌های خوشه^۹ پس از حذف حبه‌ها، با استفاده از روش

استخراج (Japelaghi et al. 2011) صورت گرفت. سپس کیفیت RNA های استخراج شده با استفاده از الکتروفورز در ژل آگارز ۱ درصد تعیین شد (شکل ۱).



شکل ۱. تصویر ژل الکتروفورز RNA استخراج شده از خوشه‌های انگور یاقوتی سیستان

Figure 1. Picture of electrophoresis gel about extracted RNA from Yaghooti grape cluster

در ادامه سنتز cDNA با استفاده از کیت 2-Steps RT-PCR ساخت شرکت Vivantis مالزی و طبق دستورالعمل ارائه شده توسط شرکت صورت گرفت. طراحی آغازگرهای اختصاصی ژن *HSP-70* (1104687527) با استفاده از نرم افزار CLC Main Workbench 7.9.1 و کنترل صحت توالی پرایمرها از پایگاه داده NCBI (Primer blast) انجام شد. همچنین آغازگرهای اختصاصی ژن *Actin-7* (100232866) به عنوان کنترل داخلی^{۱۰}، مورد استفاده قرار گرفتند (جدول ۱). پس از شناسایی دمای بهینه اتصال آغازگرها با استفاده از گرادیان دمایی (شکل ۲)، شرایط RT-PCR برای ۴۰ چرخه بصورت ذیل تعیین شد. ۹۴ °C به مدت ۳۰ ثانیه برای واشرت سازی، اتصال آغازگرها دمای ۶۰ °C برای تکثیر توالی ژن *HSP-70* و ۶۱ °C برای تکثیر ژن *Actin-7* به مدت ۴۵ ثانیه و به دنبال آن گسترش ۷۲ °C به مدت ۳۰ ثانیه استفاده شد.

واکنش Real Time-PCR: قبل از انجام واکنش Real Time-PCR به منظور صرفه‌جویی در هزینه و زمان، سه

تکرار بیولوژیکی که بهترین نتایج استخراج RNA و سنتز cDNA را داشتند باهم ترکیب شدند و برای هر نمونه آزمایش یک نماینده وارد واکنش Real Time-PCR شد. در مقابل سه تکرار تکنیکی برای هر نمونه در سنجش بیان ژن مورد استفاده قرار گرفت.

^۹- Cluster peduncle and pedicels

^{۱۰}- House keeping

جدول ۱. مشخصات آغازگرهای استفاده شده در واکنش Real Time PCR

Table 1. Properties of primers used in Real Time PCR reaction

آغازگرها Primers	توالی Sequence	دمای ذوب Melting Temperature (°C)	طول محصول Product Length (bp)
آغازگر رفت <i>HSP-70</i> Forward primer <i>HSP-70</i>	5'- GAGGACTGGCTTTACGAGGA -3'	58.98	205
آغازگر برگشت <i>HSP-70</i> Revers primer <i>HSP-70</i>	5'- TTTGCTCTCCGTCGTTAGGT -3'	59.53	
آغازگر رفت <i>Actin-7</i> Forward primer <i>Actin-7</i>	5'- TGTGCCTGCCATGTATGTTG -3'	59.6	160
آغازگر برگشت <i>Actin-7</i> Revers primer <i>Actin-7</i>	5'- AGCAAGGTCAAGACGAAGGA -3'	59.3	

بیان ژن *HSP-70* بر اساس روش استاندارد به صورت نسبی در سه مرحله نموی خو شه انگور یا قوتی انجام شد. کمیت نسبی با اندازه گیری میزان تشعشع فلورسنس ساطع شده از رنگ Eva Green به کمک دستگاه Corbett Research RG-3000 (ساخت شرکت CORBETT Research استرالیا) محاسبه شد. جدول ۲ اجزای واکنش Real Time-PCR را در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر نشان می‌دهد. در نهایت میزان بیان نسبی ژن مورد مطالعه بر اساس Ct های بدست آمده و با استفاده از فرمول Pfaffl آنالیز و $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen 2001) برای سه مرحله نموی محاسبه شد. در این روش تفاضل بیانی ژن‌های مورد مطالعه با نمونه شاهد بعنوان بیان نسبی آن خواهد بود. بدیهیست تفاضل بیانی نمونه شاهد همیشه صفر خواهد بود و از آوردن آن در نمودارها و آنالیزهای آماری اجتناب می‌گردد. نتایج با استفاده از طرح کاملاً تصادفی بر پایه فاکتوریل و آزمون دانکن سطح معنی‌داری یک درصد با استفاده از نرم افزار SAS 9.0 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

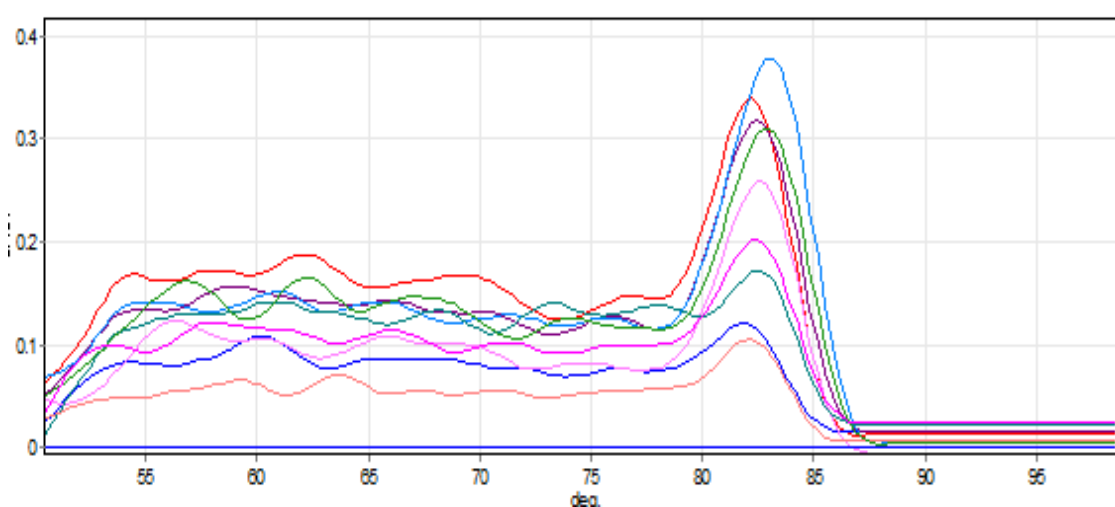
بررسی کارایی آغازگرها: پس از پایان هر سیکل Real Time-PCR منحنی ذوب آغازگرها مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج نشان داد فرایند اتصال و تکثیر قطعه مورد مطالعه بصورت اختصاصی صورت گرفته است (شکل ۲). همچنین نتایج تکثیر ژن هدف بر روی ژل آگارز ۱ در صد الکتروفورز شد. همانطور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود طول قطعه تکثیر شده با طول قطعه طراحی شده برای سنتز همخوانی دارد.

جدول ۲. اجزای واکنش Real Time-PCR

Table 2. Real Time-PCR Reaction components

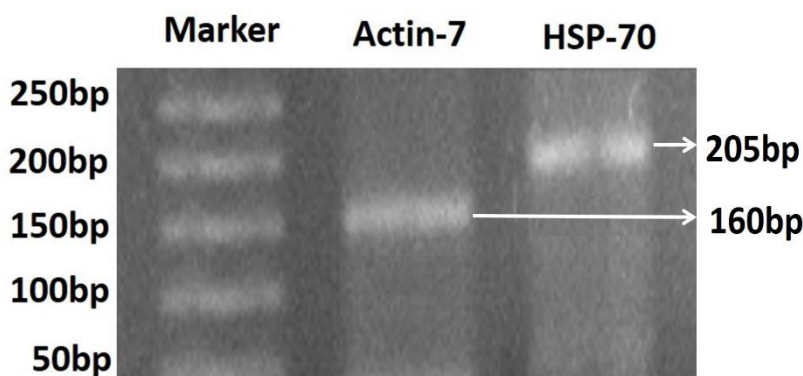
Value	مقدار (μl)	Component ماده
4		Master mix (Eva Green) بافر پایه
0.5		Forward primer آغازگر رفت
0.5		Revers primer آغازگر برگشت
1		cDNA
14		Distilled water آب مقطر
20		The final volume حجم نهایی

شکل ۲. منحنی ذوب ژن *HSP-70* نشان دهنده تکثیر اختصاصی واکنش RT-PCR می باشدFigure 2. Melt curve of *HSP-70* gene shows specific amplification is the RT-PCR reaction

ترسیم شبکه هم‌بیانی ژن *HSP-70*: بر اساس پایگاه داده Uniprot ژن‌های دارای هم‌بیانی با ژن *HSP-70* جمع آوری شدند (Apweiler et al. 2004). سپس میزان همبستگی این ژن‌ها بر اساس پارامتر Co-Expression و Experiments با استفاده از پایگاه داده STRING-db محاسبه شدند (Szkarczyk et al. 2017) نهایتاً با استفاده از نرم‌افزار Cytoscape شبکه هم‌بیانی ترسیم شد (Shannon et al. 2003). توپولوژی شبکه بر اساس مؤلفه‌های ^{۱۱}(BC) و ^{۱۲}(CC) با استفاده از نرم‌افزار NetworkAnalyzer مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت (Assenov et al. 2008). مؤلفه

^{۱۱}- Betweenness Centrality^{۱۲}- Closeness Centrality

BC عبارت است از میزان مرکزیت یک گره^{۱۳} در یک شبکه پیچیده و بر اساس تعداد خطوط ارتباطی هر گره محاسبه می‌گردد. در مقابل CC عبارت است از کوتاه‌ترین فاصله از یک گره به سایر گره‌ها. به عبارت ساده‌تر میزان بالای BC و CC برای یک گره نشان دهنده اهمیت بالای آن گره در شبکه می‌باشد (Shiri et al. 2018; Shiri et al. 2019).



شکل ۳. نتایج الکتروفورز محصول PCR برای ژن *HSP-70* و ژن *Actin-7* نشان دهنده تکثیر اختصاصی قطعات مورد انتظار بود

Figure 3. Electrophoresis result of PCR products for HSP-70 and Actin-7 genes, it showed specific amplification of the expected fragments

نتایج و بحث

ژن تحمل تنش *HSP-70* نقش کلیدی در فرایند تحمل استرس گرمایی انگور یاقوتی دارد. جدول ۳ نشان دهنده معنی‌داری تغییرات مشاهده شده در سطوح مرحله رشدی، تیمار هورمونی و اثرات متقابل در سطح ۰/۰۱ می‌باشد. همچنین شکل ۴ نمودار اثرات ساده و اثر متقابل مرحله رشدی و تیمار هورمونی را نشان می‌دهد. همان‌طور که در نمودار اثرات ساده مشاهده می‌شود مرحله دوم و اول نمو خوشه به ترتیب بالاترین تغییرات بیانی را در مقایسه با مرحله سوم نشان دادند. همچنین هورمون آبسزیزیک اسید بیشترین تغییرات بیانی را موجب شد. در خصوص اثرات متقابل هورمون آبسزیزیک اسید در مرحله دوم نمو خوشه بیشترین اثر گذاری را در افزایش بیان ژن *HSP-70* و القای تحمل تنش گرمایی در انگور یاقوتی داشت. همان‌طور که مشاهده می‌شود بالاترین میزان بیان نسبی بدست آمده برای ژن *HSP-70* در مرحله دوم نمو خوشه همزمان با گلدهی و تحت تاثیر تیمار هورمون آبسزیزیک اسید بدست آمد. نتایج نشان داد هورمون آبسزیزیک اسید در هر سه مرحله رشدی بیشترین تاثیر را در افزایش بیان ژن تحمل تنش گرمایی دارد. بطور کلی هورمون آبسزیزیک اسید در شرایط تنش محیطی نظیر کمبود مواد غذایی، تنش آبی و سردی

^{۱۳}- Node

هوا افزایش پیدا می‌کند. لذا این هورمون را هورمون تنش در گیاهان می‌شناسند، چرا که باعث بسته شدن روزنه‌ها شده و مانع از دست رفتن آب گیاه می‌گردد (Negrão et al. 2016).

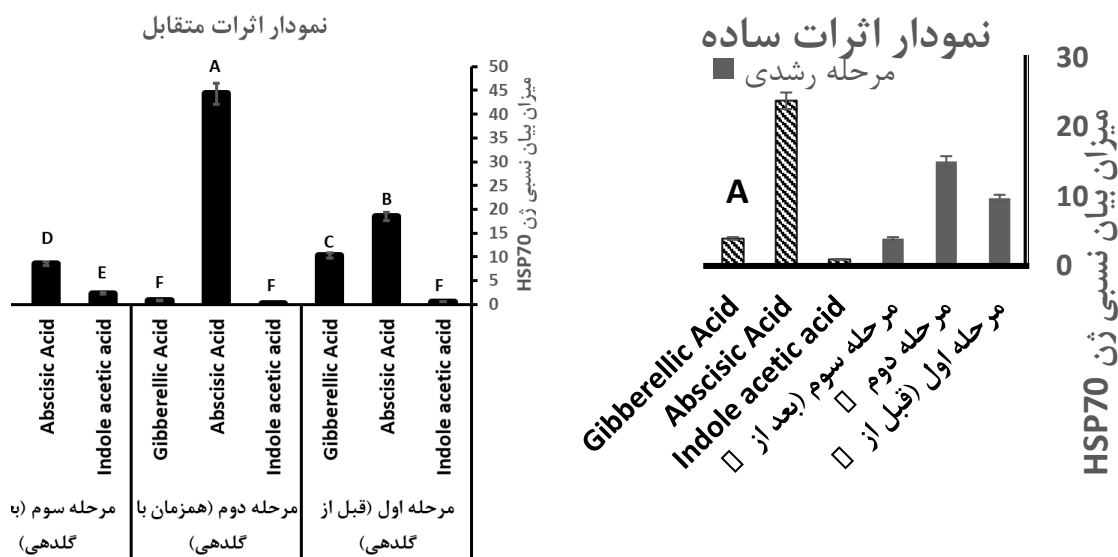
جدول ۳. تجزیه واریانس بیان ژن *HSP-70* انگور یاقوتی تحت تاثیر تیمارهای هورمونی

Table 3. Analysis of variance of *HSP-70* gene expression of yaghooti grapes under the influence of hormonal treatments

Mean square	میانگین مربعات	df	درجه آزادی	منابع تغییرات	Source
277.6375**		2		Hormonal treatment (A)	تیمار هورمونی
1383.4870**		2		Developmental stage (B)	مرحله رشدی
418.4445**		4		Interaction (A*B)	اثر متقابل
0.449728		16		Error	خطای آزمایش
6.994201		-		Coefficient of Variation	ضریب تغییرات

** - Parameter significance at the level of 0.01

**-معنی‌داری در سطح 0.01



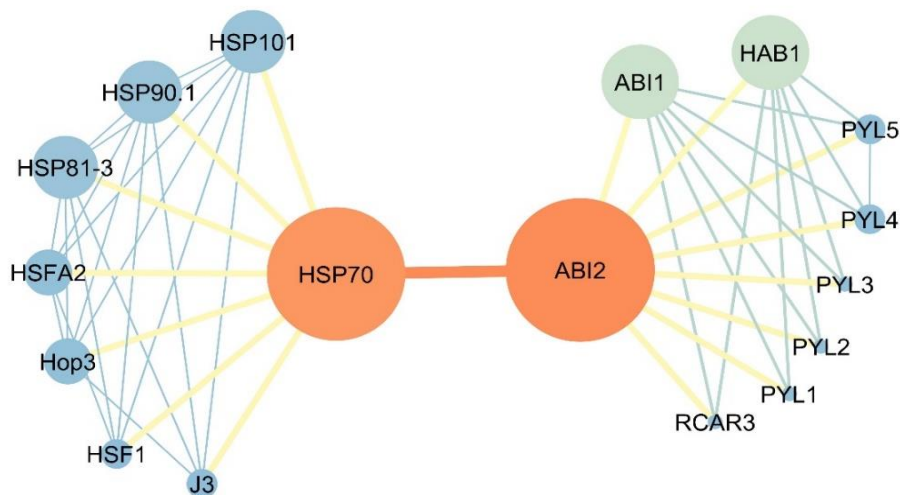
شکل ۴. نمودار اثرات ساده و اثر متقابل مرحله رشدی و تیمار هورمونی بر میزان بیان ژن *HSP-70*

Figure 4. Diagram of simple and interaction effects of growth stage and hormonal treatment on HSP gene expression

مکانیسم القای بیان ژن *HSP-70* را شاید بتوان از طریق شبکه ژنی بازسازی شده در شکل ۵ مشخص کرد. آنالیز توپولوژی شبکه نشان داد ژن های *ABI2* و *HSP-70* به ترتیب با ۹ و ۷ ارتباط بیشترین نقش را در همبستگی ساختار شبکه دارد. از نظر مولفه های BC و CC نیز ژن های *ABI2* و *HSP-70* به ترتیب با (۰/۵۷ و ۰/۵۳) و (۰/۶۹ و ۰/۶۶) دارای بالاترین مقادیر بودند. افزایش بیان ژن *ABI2* تحت تاثیر میزان بالای سطح آبسزیک سبب سرکوب مسیر سنتز آبسزیک اسید می گردد. به نظر می رسد افزایش بیان *ABI2* این پیام بیوشیمیایی را تحریک می کند که گیاه در شرایط تنش خشکی هست. شبکه شکل ۵ این نکته را تایید می کند که این پیام مستقیماً به ژن *HSP-70* می رسد و نتیجه آن افزایش بیان ژن *HSP-70* به منظور افزایش تحمل گیاه در مقابل تنش ایجاد شده می گردد. در شبکه باز سازی شده در شکل ۵ ژن های *PYL1-PYL5* و *RCAR3* همگی و اسطه های سنتز هورمون آبسزیک اسید در گیاهان می باشد (Zhang et al. 2013). در مقابل ژن های *HSP101*، *HSP90.1*، *HSP81-3* و سایر ژن های این بخش از شبکه از خانواده پروتئین های شوک حرارتی یا تحریک کننده بیان ژن های این خانواده می باشند (Charng et al. 2007). مطالعات نشان داده مرحله دوم نمو خوشه انگور یاقوتی که همزمان با گلدهی آن است فعال ترین دوره رشدی از نظر تعداد ژن های فعال و فرایندهای بیولوژیکی می باشد. افزایش بیان ژن *HSP-70* در مرحله دوم نمو همزمان است با افزایش دمای محیط در منطقه سیستان می باشد (Shiri et al. 2018). در حقیقت هورمون آبسزیک میزان افزایش بیان این ژن را در هر سه مرحله رشدی تشدید می کند.

تاثیر هورمون ایندول استیک اسید در القای تحمل تنش گرمایی معنی دار نبود. این هورمون در هر سه مرحله نمو خوشه انگور تفاوت معنی داری در بیان ژن *HSP-70* نداشته است. اما شاهد افزایش بیان ژن *HSP-70* تحت تاثیر تیمار هورمون جیبرلیک اسید در مرحله اول نمو خوشه در انگور یاقوتی هستیم. مطالعات نشان داده میزان هورمون اکسین و جیبرلین تحت تاثیر تنش شوری به طور معنی داری کاهش می یابد (Kargar Khorrani et al. 2020). هر دو هورمون اکسین و جیبرلین هورمون رشد گیاهی هستند و نقش مثبتی در رشد و نمو اندامک های گیاهی دارند.

مقایسه سه نمونه تیمار هورمونی با نمونه شاهد (W) نشان دهنده اختلاف مورفولوژیکی در ویژگی های ظاهری خوشه ها می باشد (شکل ۶). بطور کلی شاهد کاهش تراکم خوشه های تیمار هورمونی در مقایسه با نمونه شاهد بودیم که دلیل آن ریزش بخشی از گل ها تحت تاثیر تیمارهای هورمونی به دلیل برهم خوردن تعادل فیزیولوژیکی گیاه در مرحله گلدهی می باشد. درخصوص تیمار جیبرلین علاوه بر کاهش تعداد حبه ها، افزایش طولی خوشه به دلیل رشد محور اصلی خوشه را داشتیم. به عبارت دیگر فرایند رشد خوشه با اتمام مرحله دوم نمو خوشه متوقف نشده و بصورت پیوسته تا مراحل پایانی رسیدگی جبه های انگور ادامه می یابد. این درحالیست که در نمونه شاهد با رسیدن خوشه به مرحله سوم نمو خوشه بافت خوشه خشبی شده و دیگر یک بافت زنده و پویا نیست. بلکه تنها به مجرای برای انتقال مواد به حبه ها تبدیل می گردد. در شکل ۶ اندازه کوچک حبه های انگور تحت تیمار جیبرلیک اسید در تصویر بخاطر کوچک کردن اندازه تصویر جهت قرار گرفتن در کادر هم اندازه با سایر تصاویر است. همانطور که در شکل ۶ مشاهده می گردد هورمون جیبرلین سبب افزایش طول محور اصلی خوشه در انگور یاقوتی می گردد.



شکل ۵. شبکه ژنی ارتباط بیان ژن *HSP-70* با ژن *ABI2*، سرکوب کننده مسیر سیگنالی و سنتز هورمون آبسیزیک اسید. افزایش سطح هورمون آبسیزیک اسید سبب افزایش بیان ژن *ABI2* می‌گردد که نتیجه آن سرکوب سنتز داخلی هورمون آبسیزیک اسید و افزایش بیان ژن *HSP-70* می‌شود. اندازه گره بر اساس میزان BC (اندازه کوچک برای مقادیر کمتر)، و رنگ گره از آبی (CC پایین) تا قرمز (CC بالا) متغیر می‌باشد. رنگ و ضخامت خطوط ارتباطی بر مبنای Edge Betweenness از قرمز و ضخیم برای مقادیر زیاد تا آبی و نازک برای مقادیر کم متغیر است

Figure 5. Gene network of the relationship between HSP-70 gene expression and ABI2 gene, suppressor of signal pathway and synthesis of abscisic acid hormone. Increasing the level of abscisic acid increases the expression of ABI2 gene, which results in suppressing the internal synthesis of abscisic acid and increasing the expression of HSP-70 gene. The node size is based on betweenness centrality (low values to small size) while its color is based on closeness centrality (blue to low values), and edge thickness and color is based on edge betweenness is variable from blue color and thin edge (The lowest betweenness) to red color and thick edge (The highest betweenness)



شکل ۶. خوشه بالغ انگور یاقوتی تحت تاثیر سه هورمون جیبرلین (GA)، ایندول ۳-استیک اسید (IAA)، آبسیزیک اسید (ABA) و نمونه شاهد (W)

Figure 6. Mature clusters of Yaghooti grape are affected by three hormones gibberellin (GA), indole 3-acetic acid (IAA), abscisic acid (ABA) and control (W)

تنظیم کننده‌های رشد درون‌زا، از طریق حساس سازی فرایندهای رشد و نمو، نقش مهمی در تنظیم پاسخ گیاه به تنش‌های غیر زیستی ایفا می‌کنند. در حالی که مکانیسم فیزیولوژیکی و مولکولی مرتبط با نقش آبسیزیک اسید و سیتوکینین‌ها در تحمل تنش به خوبی توضیح داده شده است، شاهد افزایش مطالعات برای روشن سازی ارتباط بین اکسین‌ها، جیبرلین‌ها، اتیلن و برا سینو استروئیدها در مکانیسم تحمل تنش و همچنین شناسایی برهمکنش‌های احتمالی مکانیسم‌های مقاومت در میان تنظیم کننده‌های رشد در زمان بروز تنش هستیم (Davies 2010).

رشد در دمای بالا (۲۸/۲۹ درجه سانتیگراد) منجر به افزایش قابل توجه تعداد ساقه‌های گیاه شده، برگ‌های بلند، کاهش توده^{۱۴} و گلدهی زود هنگام می‌شود. این فنوتیپ را اصطلاحاً سندروم اجتناب از سایه^{۱۵} می‌نامند. گمان می‌رود این پاسخ فنوتیپی در جهت کاهش اثرگذاری گرما بر روی گیاه با افزایش سطوح برگ و بافت‌های مریستمی به منظور از دست دادن گرما و قرار گرفتن در مسیر جریان هوا باشد. مطالعات متعدد در گیاه آرابیدوپسیس نشان داده‌اند که هورمون‌های گیاهی در تنظیم بیوماس گیاه تحت شرایط تنش دمایی نقش دارند. در دمای پایین (۴ درجه سانتیگراد) کاهش بیوماس گیاهی با بیان ژن‌های سازگاری به دمای پایین همبستگی دارد. اخیراً نشان داده شده است که این کاهش بیوماس گیاهی در نتیجه افزایش بیان خانواده پروتئینی DELLA که سرکوب کننده سطح سنتز هورمون جیبرلین هستند حاصل می‌شود. در مقابل هورمون جیبرلین با افزایش تخریب پروتئین‌های DELLA از طریق پروتئوزوم رشد را افزایش می‌دهد (Koini et al. 2009).

^{۱۴}- Biomass

^{۱۵}- Shade avoidance syndrome

درک بهتر مکانیسم‌های مربوط به تحمل گیاه به تنش گرمایی از اهمیت حیاتی برخوردار است. استفاده از هورمون‌های گیاهی از طریق افزایش سنتز یا محلول‌پاشی فیتوهورمون‌های مختلف در دوزهای مناسب می‌تواند به کنترل تنش گرما کمک کرده و در نتیجه سطح تولید محصولات را حفظ کند این در شرایطی است که شاهد تغییرات آب و هوایی کره زمین به سوی گرم‌تر شدن آن هستیم. شایان ذکر است که شناسایی و فعال سازی ژن‌های پاسخ دهنده به هورمون در یک بافت خاص برای ایجاد مکانیسم تحمل تنش بسیار مهم است. استفاده از تنظیم کننده‌های رشد به یکی از مولفه‌های مهم روش‌های زراعی برای اکثر گیاهان زیر کشت و به ویژه گیاهان میوه تبدیل شده است. با استفاده از محلول‌پاشی تنظیم کننده‌های رشد گیاه، می‌توان ریزش بیش از حد میوه را کنترل کرد. از اکسین و جیبرلین‌ها به طور گسترده‌ای برای کنترل ریزش میوه و بهبود کیفیت میوه استفاده می‌شود.

نتیجه‌گیری: تحمل در برابر تنش گرمایی یکی از ویژگی‌های بارز انگور یاقوتی سیستان می‌باشد. ژن *HSP-70* نقش کلیدی در القای این ویژگی دارد. نتایج نشان دهنده معنی‌داری تغییرات مشاهده شده در سطوح مرحله رشدی، تیمار هورمونی و اثرات متقابل در سطح ۰/۰۱ می‌باشد. بالاترین میزان بیان نسبی بدست آمده برای ژن *HSP-70* در مرحله دوم نمو خوشه همزمان با گلدهی و تحت تاثیر تیمار هورمون آبسزیک اسید بود. بررسی شبکه ژنی باز سازی شده برای مشخص شدن مکانیسم عمل هورمون آبسزیک اسید نشان داد افزایش سطح هورمون آبسزیک اسید سبب افزایش بیان ژن *ABI2* می‌گردد که نتیجه آن سرکوب سنتز داخلی هورمون آبسزیک اسید و افزایش بیان ژن *HSP-70* می‌شود. مرحله دوم نمو خوشه انگور یاقوتی که همزمان با گلدهی آن است فعال‌ترین دوره رشدی از نظر تعداد ژن‌های فعال و فرایندهای بیولوژیکی می‌باشد. هورمون ایندول استیک اسید و هورمون جیبرلین نقشی در افزایش بیان و القای تحمل تنش گرمایی انگور یاقوتی نداشتند. خوشه‌های تیمار هورمونی در مقایسه با نمونه شاهد از تراکم خوشه کمتری برخوردار بودند که دلیل آن ریزش بخشی از گل‌ها تحت تاثیر تیمارهای هورمونی به دلیل برهم خوردن تعادل فیزیولوژیکی گیاه در مرحله گلدهی می‌باشد. درخصوص تیمار جیبرلین علاوه بر کاهش تعداد حبه‌ها، افزایش طولی خوشه به دلیل رشد محور اصلی خوشه را داشتیم.

سپاسگزاری: ضمن تقدیر و قدردانی از معاونت پژوهشی دانشگاه زابل اعلام می‌گردد این تحقیق با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه زابل در قالب طرح شماره PR-UOZ98-10 اجرا شده است.

منابع

- احسنی محمدرضا، محمدآبادی محمدرضا، اسدی فوزی و همکاران (۱۳۹۸) بیان ژن لپتین در بافت چربی زیرپوستی گاوهای هلستاین با استفاده از Real Time PCR. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۱(۱)، ۱۵۰-۱۳۵.
- توحیدی نژاد فاطمه، محمدآبادی محمدرضا، اسمعیلی زاده کشکوئیه علی، نجمی نوری عذرا (۱۳۹۳) مقایسه سطوح مختلف بیان ژن *Rheb* در بافت‌های مختلف بز کرکی رابنی. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۶(۴)، ۵۰-۳۵.

جعفری دره در امیر حسین، محمدآبادی محمدرضا، اسمعیلی زاده کشکوئیه علی، ریاحی مدوار علی (۱۳۹۵) بررسی بیان ژن CIB4 در بافت‌های مختلف گوسفند کرمانی با استفاده از Real Time qPCR. مجله پژوهش در نشخوارکنندگان ۴(۴)، ۱۳۲-۱۱۹.

دولتی بانه حامد، جلیلی رسول (۱۳۹۳) اصلاح درختان میوه (ژنتیک و اصلاح انگور). جهاد دانشگاهی (دانشگاه مشهد) صفحات ۱۷۶-۱۷۷.

References

- Ahsani MR, Mohammadabadi MR, Asadi Fozi M et al. (2019a) Effect of Roasted Soybean and Canola Seeds on Peroxisome Proliferator-Activated Receptors Gamma (PPARG) Gene Expression and Cattle Milk Characteristics. *Iran J Appl Anim Sci* 9, 635-642.
- Ahsani MR, Mohammadabadi MR, Asadi Fozi M et al. (2019b) Leptin gene expression in subcutaneous adipose tissue of Holstein dairy cattle using Real Time PCR. *Agric Biotechnol J* 11, 135-150 (In Persian).
- Aliyu OM, Adeigbe OO, Awopetu JA (2011) Foliar application of the exogenous plant hormones at pre-blooming stage improves flowering and fruiting in cashew (*Anacardium occidentale* L.). *Journal of Crop Science and Biotechnology* 14, 143-150.
- Almi z, shariati m, Hosseini Tafreshi sa (2019) Effects of Transient Silencing of HSP90, HSP70 and smHSP on Chlorophyll a fluorescence of *Nicotiana benthamiana* during Adaptation to Salinity Stress. *Journal of Plant Process and Function* 7, 1-18.
- Apweiler R, Bairoch A, Wu CH et al. (2004) UniProt: the Universal Protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res* 32, D115-D119.
- Assenov Y, Ramirez F, Schelhorn SE et al. (2008) Computing topological parameters of biological networks. *Bioinformatics* 24, 282-284.
- Chang Y-y, Liu H-c, Liu N-y et al. (2007) A Heat-Inducible Transcription Factor, HsfA2, Is Required for Extension of Acquired Thermotolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 143, 251.
- Davies PJ (2010) The Plant Hormones: Their Nature, Occurrence, and Functions. In: *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action!* Davies PJ (ed). Springer Netherlands, Dordrecht. pp. 1-15.
- Dolati-Baneh H, Jalili R (2014) Modification of fruit trees (Genetic and breeding of Grape Reproduction). Mashhad University Press, IR Iran (In Persian).
- Jafari Darehdor AH, Mohammadabadi MR, Esmailzadeh AK, Riahi Madvar A (2016) Investigating expression of CIB4 gene in different tissues of Kermani Sheep using Real Time qPCR. *J Rumin Res* 4, 119-132 (In Persian).

- Japelaghi RH, Haddad R, Garoosi GA (2011) Rapid and efficient isolation of high quality nucleic acids from plant tissues rich in polyphenols and polysaccharides. *Molecular biotechnology* 49, 129-137.
- Kargar Khorrani S, Jamei R, Darvishzadeh R et al. (2020) Effect of salinity stress on hormones of auxin, gibberellin, physiological, morphological and anatomical characteristics of *Hibiscus esculentus* L. *Iranian Journal of Plant Biology* 11, 67-82.
- Koini MA, Alvey L, Allen T et al. (2009) High Temperature-Mediated Adaptations in Plant Architecture Require the bHLH Transcription Factor PIF4. *Current Biology* 19, 408-413.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif)* 25, 402-408.
- Mohammadabadi MR, Tohidinejad F (2017) Characteristics determination of Rheb gene and protein in Raini Cashmere goat. *Iran J Appl Anim Sci* 7, 289-295.
- Mohammadabadi MR, Jafari AHD, Bordbar F (2017) Molecular analysis of CIB4 gene and protein in Kermani sheep. *Brazil J Med Biol Res* 50, e6177.
- Mohammadabadi MR, Kord M, Nazari M (2018) Studying expression of leptin gene in different tissues of Kermani Sheep using Real Time PCR. *Agric Biotechnol J* 10, 111-122 (in Persian).
- Muthusamy SK, Dalal M, Chinnusamy V et al. (2017) Genome-wide identification and analysis of biotic and abiotic stress regulation of small heat shock protein (HSP20) family genes in bread wheat. *Journal of plant physiology* 211. ۱۱۳-۱۰۰ ,
- Negrão S, Schmöckel SM, Tester M (2016) Evaluating physiological responses of plants to salinity stress. *Annals of Botany* 119, 1-11.
- Padmalatha K, Weksler H, Mugzach A et al. (2017) ABA Application during Flowering and Fruit Set Reduces Berry Number and Improves Cluster Uniformity.
- Shannon P, Markiel A, Ozier O et al. (2003) Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome research* 13, 2498-2504.
- Shiri Y, Solouki M, Ebrahimie E et al. (2018) Unraveling the Transcriptional Complexity of Compactness in Sistan Grape Cluster. *Plant Science*.
- Shiri Y, Solouki M, Ebrahimie E et al. (2019) Gibberellin causes wide transcriptional modifications in the early stage of grape cluster development. *Genomics*.

- Szklarczyk D, Morris JH, Cook H et al. (2017) The STRING database in 2017: quality-controlled protein–protein association networks, made broadly accessible. *Nucleic Acids Res* 45, D362-D368.
- Tohidi nezhad F, Mohammadabadi MR, Esmailizadeh AK, Najmi Noori A (2015) Comparison of different levels of Rheb gene expression in different tissues of Raini Cashmir goat. *Agric Biotechnol J* 6, 35-50.
- Zhang X, Jiang L, Wang G et al. (2013) Structural Insights into the Abscisic Acid Stereospecificity by the ABA Receptors PYR/PYL/RCAR. *PLOS ONE* 8, e67477.