

بررسی بیان ژن های STE20 و MYBA مرتبط با انتقال سیگنال در زودرسی انگور

یاقوتی سیستان

سجاد نوروزی، عباسعلی امام‌جمعه^{*}، محمود سلوکی و فروزان حیدری

ایران، زابل، دانشگاه زابل، دانشکده کشاورزی، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی

تاریخ دریافت: ۹۷/۱۲/۱۲ تاریخ پذیرش: ۹۷/۶/۴

چکیده

انگور یاقوتی یک میوه مهم در ایران است. انگور یاقوتی سیستان بدلیل زودرسی و فرار از تنش‌های محیطی منطقه از لحاظ اقتصادی حائز اهمیت می‌باشد. این رقم زودرس ترین انگور کشور بوده و هفته اول خرداد قابل برداشت است. بنابراین بررسی عوامل زودرسی این انگور اهمیت ویژه‌ای دارد. در این پژوهش ابتدا ژن های مرتبط با انتقال سیگنال در فرآیند رسیدگی انگور مورد بررسی قرار گرفتند. سپس دو ژن STE20 و MYBA مربوط به رسیدگی و ژن GAPDH بعنوان ژن رفرنس انتخاب شد. تفاوت بیان MYBA در یاقوتی قرمز با تحقیقات پیشین بود که از نتایج جالب توجه این تحقیق بشمار می‌رود. بیان STE20 در ارقام زودرس و دیررس متفاوت بود. این ژن در ارقام زورس در مرحله حبه پرکنی بیان شد؛ درحالی که بیان این ژن در ارقام دیررس در مرحله رسیدگی اتفاق افتاده است. بنظر می‌رسد بیان STE20 در ارقام زودرس بدلیل تولید اتیلن و در ارقام دیررس بدلیل مواجه با تنش‌های محیطی باشد. ژن MYBA در رقم یاقوتی قرمز بیان متفاوتی در مقایسه با سایر ارقام این پژوهش و پژوهش‌های پیشین داشت. بنظر می‌رسد MYBA یکی از ژن های کاندید در زودرسی رقم یاقوتی قرمز باشد. بدلیل اثرگذاری MYBA در دوره‌های تنش بنظر می‌رسد علاوه بر رسیدگی، وجود تنش‌های محیطی از دیگر دلایل بیان MYBA در رقم چشم گاوی باشد.

واژگان کلیدی: آر آن آ، انگور، زودرسی، مسیر سیگنالی، واکنش زنجیره ای پلیمرز در زمان واقعی

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۵۴۳۱۲۳۲۱۶۲، پست الکترونیکی: aliimamjomeh@uoz.ac.ir

مقدمه

حدود ۵۰ سال می‌رسد. در طی این سال‌ها کشاورزان اقدام به کشت ارقام مختلف آن نموده‌اند که در بیست سال اخیر تولید انگور بخصوص انگور یاقوتی رشد چشمگیری داشته بطوریکه 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 (۲۳). 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 (۴). این رقم زودرس‌ترین انگور کشور بوده و حدود هفته اول

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 (۱). برابر آمار سازمان کشاورزی استان سیستان و بلوچستان سطح زیر کشت انگور استان ۳۰۳۷/۵ هکتار بوده که یک درصد حدود سطح زیر کشت انگورکاری کشور را به خود اختصاص داده است. 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

می‌کند (۳۱). در سطح سلول مولکولی چنین پاسخ‌هایی شامل تغییر در رونویسی یا ترجمه ژن‌ها، تغییرات پس از ترجمه و سازگاری پروتئین‌ها و همچنین تغییر در موقعیت آن‌ها است. این وقایع مولکولی مکانیسم اساسی کنترل رشد سلول، تکثیر، متابولیسم و بسیاری از فرآیندهای دیگر است (۲۶). بیوسنتز آنتوسیانین در گیاهانی مانند اطلسی و ذرت توسط عوامل رونویسی MYC و MYB کنترل می‌شود. در واقع یک عامل رونویسی این خانواده یعنی MYBA برای تنظیم بیان UDP-glucose: flavonoid 3-O-glucosyltransferase (UFGT) بسیار ضروری است (۴۵). والکر و همکاران (۲۰۰۷) نشان دادند که دو ایزوفرم از MYBA یعنی MYBA1 و MYBA2 در تجمع آنتوسیانین در انگور نقش دارند (۴۲). آنتوسیانین‌ها از گروه فنیل پروپانئیدها هستند. ژن‌های کنترل‌کننده فنیل پروپانئیدها عمدتاً با تغییر در رونویسی تنظیم می‌شوند (۹). در تمام گونه‌های مورد مطالعه تا به امروز این تنظیمات از طریق مجموعه‌ای شامل MYB transcription factors، basic helix-loop-helix transcription factors، WD-repeat proteins و (bHLH) انجام می‌شود. این کمپلکس 'MBW' MYB-bHLH-WD40 نامیده می‌شود (۵). اعضای تشکیل‌دهنده مجموعه MYB اغلب بعنوان عامل تعیین‌کننده‌ای در تغییرات رنگ‌دانه آنتوسیانین شناخته می‌شوند (۵، ۹). فاکتور رونویسی MYB یکی از بزرگ‌ترین خانواده‌های ژنی از دسته فاکتورهای رونویسی در گیاهان است. تنها در آرابتیدوپسیس ۱۲۶ نوع از ژن MYB R2R3 شناخته شده است (۴۰). آن دسته از توالی‌هایی که اثر تنظیمی مثبت در مسیر سنتز رنگ‌دانه آنتوسیانین دارند از زیرمجموعه‌های ژن PAPI (AtMYB75, At1g56650) هستند (۷).

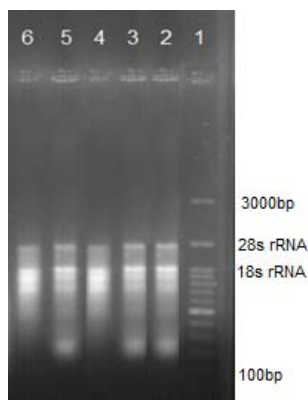
ژن STE20 یکی از مجموعه ژن‌هایی است که گروه بزرگی از پروتئین کینازها را کد می‌کند. در گیاهان فسفریلاسیون پروتئین در پاسخ به بسیاری از سیگنال‌ها از جمله نور، حمله پاتوژن‌ها، هورمون‌ها، تنش دما، و محرومیت از مواد

خرداد قابل برداشت می‌باشد (۱). پس از لحاظ اقتصادی برای مردم سیستان حائز اهمیت است. خوشه‌های این انگور فشرده و دارای حبه‌های کوچک است (۱۹) (۴). در تعریف کلاسیک رسیدن میوه به دو صورت کلیماکتریک (climateric) و غیر کلیماکتریک (Non-climateric) 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 (۱۸). انگور (*Vitis vinifera* L.) یک میوه غیر کلیماکتریک می‌باشد که بعنوان یک میوه رسمی، کشمش خشکیده، برای وینیفیکاسیون (Vionification) و عصاره‌گیری استفاده می‌شود. رشد انگور از یک منحنی سیگموئیدی دوگانه (Double sigmoid curve) پیروی می‌کند. طوریکه در مرحله اول اندازه حبه افزایشی سریع دارد. مرحله دوم فاز تأخیری (Lag phase) 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 وراسیون (Veraison) افزایش تجمع قند، نرم شدن بافت حبه، ساخت آنتوسیانین، متابولیسم اسیدهای آلی، تجمع ترکیبات عطر و طعم رخ می‌دهد (۱۱).

انتقال سیگنال (Signal transduction) فرآیندی است که طی آن یک سیگنال فیزیکی یا شیمیایی در سلول بوسیله یک سری وقایع مولکولی انتقال داده می‌شود. آبخار سیگنال یک زنجیره از وقایع بیوشیمیایی در امتداد یک مسیر سیگنال-دهی است. هنگامی مسیره‌های سیگنال دهی با یکدیگر ارتباط برقرار می‌کنند، شبکه‌هایی را ایجاد می‌کنند که اغلب بوسیله وقایع سیگنال دهی ترکیبی پاسخ سلولی ایجاد

سنگی و ارقام دیررس فخری و چشم‌گاو در دو مرحله نمو، حبه پرکنی و رسیدگی انجام شد. در هر مرحله نمونه‌های برگ در ۳ تکرار بیولوژیکی و از گره‌های مختلف روی شاخه‌های انگور جمع‌آوری شد.

استخراج RNA و تعیین کیفیت و کمیت: RNA برای بررسی بیان ژن نیاز به استخراج RNA از نمونه‌های گیاهی داریم. استخراج Total RNA از نمونه‌های برگ گیاهان نامبرده با استفاده از کیت خریداری شده از شرکت دنا زیست آسیا و با اسفاده از روش پیشنهادی این شرکت انجام گردید. بمنظور تعیین کیفیت RNA استخراج‌شده از روش الکتروفورز ژل آگارز بر اساس روش سامبروک و همکاران (۱۹۸۹) انجام شد (شکل ۱) (۳۴). نسبت جذب Total RNA استخراج‌شده در طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر برای نمونه‌های مورد بررسی، حداقل و حداکثر برابر با ۱/۸۱ - ۱/۹۷ توسط اسپکتروفتومتری رویت گردید. برای محاسبه غلظت RNA استخراج شده برحسب نانوگرم بر میکرولیتر از حاصلضرب میزان جذب نور در طول موج ۲۶۰ نانومتر در عدد ۵۰ استفاده گردید.



شکل ۱- RNA استخراج شده: ۱- Ladder ۲- یاقوتی قرمز ۳- یاقوتی سفید ۴- چشم‌گاو ۵- فخری ۶- سنگی

طراحی آغازگرها: 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 (۲۶) و در نظر گرفتن خصوصیات

غذایی انجام می‌شود. ژن STE20 در تنظیم گروهی از کینازها بنام پروتئین کیناز فعال‌شده با میتوزن (-mitogen activated protein kinase (MAPK)) نقش دارد. این کینازها در پاسخ به محرک‌های خارجی اثراتی مانند رشد سلولی، توقف چرخه سلولی، آپوپتوسیس و تغییرات سیتواسکلتی دارند (۲۱). MAPK ها دارای اجزای فعالی هستند که در مسیر انتقال سیگنال مؤثر بوده و نقش مهمی در رشد و نمو دارند. اگرچه اعضای این خانواده در تعدادی از گیاهان شناخته شده‌اند، اما اطلاعات کمی در مورد نقش آن‌ها در میوه‌ها در دسترس است. مطالعات انجام‌شده روی میوه موز توسط حسن اسیف و همکاران نشان می‌دهد که وجود MAPK در مسیر سیگنال‌دهی اتیلن در طی رسیدن میوه موز ضروری است (۶). نتایج تحقیقات Ouaked و همکاران (۲۰۰۳) نشان‌دهنده این موضوع است که MAPK ها در تنظیم سیگنال‌دهی اتیلن در گیاه و در نتیجه رسیدگی نقش دارند (۳۰).

رقم یاقوتی سیستان زودرس ترین انگور کشور بوده و هفته اول خرداد قابل برداشت است. بنابراین بررسی عوامل زودرسی این انگور اهمیت ویژه‌ای دارد. در این پژوهش ابتدا ژن‌های انتقال سیگنال مؤثر در رسیدگی انگور مورد بررسی قرار گرفتند، مراحل فیزیولوژیکی مختلف و در نمونه‌های برگ ارقام زودرس (یاقوتی قرمز و سفید) و دیررس (فخری و چشم‌گاو) انگور منطقه سیستان بررسی شد. رقم یاقوتی سیستان زودرس ترین انگور کشور بوده و هفته اول خرداد قابل برداشت است. بنابراین بررسی عوامل زودرسی این انگور اهمیت ویژه‌ای دارد.

مواد و روشها

تهیه مواد گیاهی: در این تحقیق، از بوته‌های انگور موجود در مرکز تحقیقات کشاورزی زهک استفاده شد. انتخاب نمونه از برگ، براساس تجربیات پیشین انجام شد (۸) (۱۴) (۴۳) (۴۴). نمونه برداری از برگ پنج رقم شامل: ارقام زودرس یاقوتی قرمز و سفید، رقم متوسط رس

مطلوب برای استفاده در روش qRT-PCR آغازگرها طراحی گردیدند (جدول ۱). بمنظور سنتز آغازگرها،

جدول ۱- اطلاعات توالی آغازگرهای پیشرو و پسرو

نام ژن	نوع	توالی آغازگر	درصد GC	دمای اتصال (°C)
MYBA	پیشرو	GAGCAGGGTTGAATAGAT	۳۸/۸۹	۴۹/۳
	پسرو	ATCAAGGACCATCTGTTC	۳۰/۰	۵۰/۲
STE20	پیشرو	GGTGTATGCCAATGTATA	۵۵/۵۶	۵۶/۱
	پسرو	TATGAGTCTCCACTGTAA	۴۴/۴۴	۵۱/۶
GAPDH	پیشرو	TCAAGGAGGAGTCAGAGG	۵۵/۵۶	۵۶/۱
	پسرو	AAGATGCTGGACCTGTTG	۵۰/۰	۵۳/۹

مجزا مطابق با جدول ۲ تهیه شد. با توجه به این که حجم کلی مخلوط برای واکنش برای یک نمونه ۲۰ میکرولیتر بود، میزان cDNA برای هر نمونه یک میکرولیتر و محلول پایه آغازگر ۱۹ در نظر گرفته شد. سپس تیوب‌ها در دستگاه ترموسایکلر قرار گرفتند. برنامه چرخه دمایی دستگاه مطابق با جدول ۳ برنامه‌ریزی شد.

تهیه و آماده سازی cDNA جهت انجام Real Time PCR: تهیه 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 بمنظور جلوگیری از بروز خطا و نیز برای راحتی و سرعت عمل بیشتر، محلول پایه برای هر جفت آغازگر بصورت

جدول ۲- مواد موردنیاز برای Real Time PCR

مقدار (μl)	غلظت پایه	مواد مورد نیاز
۴	5X	Eva Green qPCR Mix-Rox
۰/۵	Pmol/μl ۱۰	آغازگر رفت
۰/۵	Pmol/μl ۱۰	آغازگر برگشت
۱	-	cDNA
۱۴	-	آب مقطر دوبار استریل
۲۰		حجم نهایی

جدول ۳- برنامه دستگاه Real Time PCR

مرحله	دما و زمان مورد استفاده
فعال سازی 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
منحنی ذوب	افزایش دما از ۳۳ درجه تا ۵۲ درجه هر ۵ ثانیه ادرجه

ژن مورد نظر تفاوت وجود دارد. بنابراین این تفاوت را در مقادیر Ct مربوط به ژن مورد نظر و ژن کنترل، اعمال کردیم و داده‌ها که مقادیر Ct هستند را نرمال نمودیم. برای نرمال کردن داده‌ها Ct ژن مورد بررسی را در تک تک نمونه‌ها

تجزیه و تحلیل داده‌های بیان ژن: تجزیه و تحلیل نتایج با شروع واکنش منحنی تکثیر رسم شده توسط دستگاه آغاز گردید. برای تجزیه داده‌ها از روش $\Delta\Delta Ct$ استفاده شد (۲۸). در این روش بین مقادیر Ct مربوط به ژن کنترل داخلی و

MYB در مراحل پس از وراسیون یعنی رسیدگی بیان بالایی داشته و بیان آن پس از تغییر رنگ تا رسیدگی کامل سیر صعودی داشته است. در مرحله حبه پرکنی اما ژن MYB در انگور موسکاتوبیانکو شدت بیان پایینی داشت (۱۲). تحقیقات رومرو و همکارانش (۲۰۱۳) روی سه رقم از انگور کشور پرتغال بنام‌های ترینکادیرا (Trincadeira)، آراگونس (Aragone's) و تریگه نشنال (Touriga Nacional) نشان می‌دهد که بیان ژن MYBA در دو مرحله وراسیون و رسیدگی کامل بالا بوده، ولی در مرحله حبه پرکنی بیان این ژن پایین بوده است (۲). بررسی رونویسی انگور ترینکادیرا در مراحل مختلف رسیدگی توسط فرتس و همکاران (۲۰۱۱) نیز بر این موضوع تأکید دارد که بیان MYB در مراحل وراسیون به بعد بالا و پیش از وراسیون کم بوده است (۱۶). مطالعه شان‌گوان و همکارانش (۲۰۱۷) روی انگور فوجی‌مینوری (Fujiminori) که یکی ارقام معروف چین است، در سه مرحله حبه پرکنی، وراسیون و رسیدگی انجام شده است. نتایج این مطالعه بیانگر بیان شدید MYBA در مرحله وراسیون و رسیدگی است، درحالی‌که این ژن در مرحله حبه پرکنی بسختی بیان شده است (۳۶).

MYBA در انگور یاقوتی قرمز در مرحله حبه پرکنی بیان بالایی از خود نشان داد درحالی‌که بیان این ژن در مرحله رسیدگی سرکوب شده است. همان‌طور که در (شکل ۲) ملاحظه می‌کنید نتایج ما در مورد انگور یاقوتی با انگورهای موسکاتوبیانکو، ترینکادیرا، آراگونس، تریگه نشنال، فوجی‌مینوری و چشم‌گاو متفاوت است. در واقع بیان MYB در یاقوتی قرمز زودتر شروع شده و زودتر پایان می‌یابد. با توجه به زودرس بودن یاقوتی قرمز و بیان متفاوت آن با سایر انگورها احتمال این مسئله وجود دارد که MYB در زودرسی یاقوتی قرمز دخیل باشد.

MYBA از طریق بیان UFGT در تنظیم آنتوسیانین نقش دارد (۲۵). آنتوسیانین‌ها از جمله رنگ‌دانه‌های گیاهی هستند

از Ct ژن کنترل داخلی همان نمونه کسر کردیم. از آنجایی که داده‌های نرمال برای هر نمونه از تفریق Ct ژن مورد نظر از Ct ژن کنترل داخلی بدست آمده است، داده نرمال شده را دلتا (ΔCt) می‌نامیم.

$$\Delta Ct = Ct - (\text{ژن مورد نظر})$$

ΔCt از نوع لگاریتمی برپایه ۲ می‌باشد (زیرا در real time هر سیکل محصول ما ۲ برابر می‌شود). بنابراین باید مقادیر ΔCt را بجای 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 (ΔΔCt) می‌نامیم.

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct - (\text{نمونه مورد نظر})$$

Ct، ΔCt و ΔΔCt بر اساس لگاریتم بر پایه ۲ هستند بنابراین آن‌ها را بحالت خطی درآوردیم، پس $2^{-\Delta\Delta Ct}$ بیانگر سطح بیان نسبی ژن بود.

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

در پایان تجزیه واریانس داده‌های بدست آمده نرم افزار SAS نسخه ۹/۴ انجام شد. مقایسه میانگین داده‌ها نیز به روش دانکن در سطح احتمال ۱ درصد و ۵ درصد انجام گرفت.

نتایج و بحث

بیان MYBA در انگور: طبق نتایج حاصل از تجزیه واریانس برای ژن MYBA (جدول ۴) اثرات ساده ارقام مختلف انگور و سطوح متفاوت مراحل نمو و اثرات متقابل، تفاوت معنی‌داری را در سطح احتمال یک درصد از خود نشان دادند. ارقام یاقوتی قرمز در مرحله حبه‌پرکنی و چشم‌گاو در مرحله رسیدگی بیان بالایی از ژن MYBA داشتند (شکل ۲). در مطالعه‌ای کاستنتینی و همکاران (۲۰۱۷) روی رونویسی انگور موسکاتوبیانکو (Moscato Bianco) انجام شد، بیان ژن‌های انگور در ۵ مرحله از مراحل نمو انگور در دو سال ۲۰۰۶ و ۲۰۱۶ مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که ژن

سیگنال‌های پایین‌دست مرتبط با تنش‌های محیطی دارند (۲۷). همچنین دانشمندان دریافتند که در ارقام انگور VvmybA3 و VvmybA2، VvmybA1، ژن‌های Kyoho، بیان می‌شوند که در این میان در ارقام سیاه رنگ، این ژن‌ها از بیان بیشتری نسبت به سایر ارقام برخوردار بودند (۱۵). علاوه بر این، تجمع آنتوسیانین با بیان ژن MYBA همبستگی داشت (۳۲).

که موجب تشکیل رنگ‌های قرمز، بنفش و سیاه در میوه و سایر اندام‌های گیاهی می‌شوند (۲۴). آنتوسیانین‌ها در برابر اشعه ماوراءبنفش نقش محافظت از گیاه را بر عهده دارند (۲۰). ژن‌های خانواده MYB در تنظیم فرایندهایی از قبیل نمو، متابولیسم و پاسخ به تنش‌های محیطی ایفای نقش می‌کنند. این ژن‌ها نقش حیاتی در پاسخ به تنش‌های محیطی مختلف از طریق اثرگذاری بر رونویسی، سطوح پسارونویسی و کنترل پروتئین و همچنین تنظیم

جدول ۴ - تجزیه واریانس برای ژن MYBA

منابع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات
رقم (A)	۳	۸۴/۹۰۱	۲۸/۳۰۰**
خطای رقم (E_a)	۸	۰/۴۹۴	۰/۰۶۱
مراحل نموی (B)	۱	۲۶/۰۸۰	۲۶/۰۸۰**
مرحله نموی × رقم (A×B)	۳	۱۱۲/۴۶۱	۳۷/۴۸۷**
تکرار × مرحله نموی	۲	۰/۱۱۰	۰/۰۵۵
تکرار × مرحله نموی × رقم	۶	۰/۳۷۶	۰/۰۶۲
کل	۲۳	۲۲۴/۴۲۵	
ضریب تغییرات	۱۶/۲۱۳		

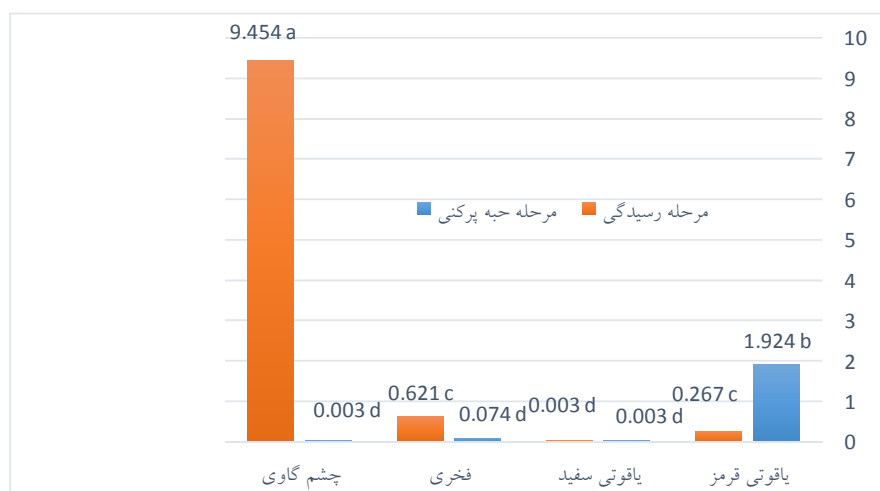
** تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد می‌باشد.

بیان **STE20** در انگور: طبق نتایج حاصل از تجزیه واریانس برای ژن **STE20** (جدول ۵) اثرات ساده ارقام مختلف انگور و اثر متقابل ارقام در مراحل مختلف، تفاوت معنی‌داری را در سطح احتمال یک درصد از خود نشان دادند، اما در سطوح مراحل نموی تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. **STE20** در ارقام زودرس (یاقوتی قرمز و یاقوتی سفید) در مرحله حبه پرکنی و در ارقام دیررس (فخری و چشم‌گاو) در مرحله رسیدگی بیان بالایی داشت (شکل ۳). ژن **STE20** از طریق **MAPK** در سیگنال‌دهی مسیر اتیلن نقش دارد. اتیلن از هورمون‌های مهم در رسیدگی می‌باشد. تحقیقات انجام شده روی موز نیز بیانگر این موضوع است (۶، ۲۹). انگور، یک میوه غیرکلیماکتریک، به اتیلن بسیار حساس نیست؛ با این حال، معمولاً اتیلن برای رسیدن میوه ضروری است (۴۱).

همان‌طور که در (شکل ۲) مشاهده شد، بیان **MYB** در انگور چشم‌گاو در مرحله رسیدگی شدت بالا بوده و در مرحله حبه پرکنی بیان نشده است. در مورد چشم‌گاو نتایج ما با نتایج تحقیقات پیشین روی انگورهای مختلف مطابقت داشت. **MYB** در چشم‌گاو بیشترین بیان را در بین ارقام بررسی شده داشت. با توجه به رنگ قرمز رقم چشم‌گاو و رسیدن آن در شرایط تنش‌های محیطی تابستان سیستان این شدت بیان قابل توجه است. همان‌طور که قبلاً ذکر شد **MYB** در مقابله با تنش‌های محیطی، اشعه ماوراءبنفش و سنتز آنتوسیانین نقش دارد. در مورد یاقوتی سفید و فخری با توجه به رنگ سفید حبه‌ها و عدم وجود آنتوسیانین در آن‌ها بیان نشدن **MYB** در این ارقام قابل پیش‌بینی بود.

داده باشند. در مطالعه انگور، این هورمون دقیقاً قبل از شروع veraison مشاهده شد، و پس از آن کاهش غلظت اتیلن برای چند هفته پس از آن مشاهده شد (۱۳). تحقیقات شان گوان و همکاران روی انگور فوجی مینوری نشان‌دهنده بیان بالای STE20 در مرحله حبه پرکنی است، اما بیان این ژن در مرحله رسیدگی کاهش یافته است (۳۷). نتایج ما در مورد دو رقم یاقوتی سفید و یاقوتی قرمز نیز با نتایج شان گوان مطابقت دارد. بنظر می‌رسد بیان بالای STE20 در مرحله حبه پرکنی و یا پیش وراسیون بدلیل اثر آن در سنتز اتیلن است و برای رسیدگی انگور مهم است.

افزایش اتیلن در فرآیند رسیدن در ارقام کلیماکتریک، پس از سوختن CO₂ اتفاق می‌افتد (۱۷). در گوجه‌فرنگی، در زمانی که میوه‌ها سبز هستند این اتفاق می‌افتد. در این مرحله، میوه‌های گوجه‌فرنگی به اتیلن حساس می‌شوند و با تولید اتیلن شروع به رسیدگی می‌کنند (۱۳). در میوه‌های غیرکلیماکتریک، هیچ انسداد تنفسی برای CO₂ وجود ندارد و بنظر می‌رسد در فرآیند رسیدگی مصرف اتیلن مهم نباشد (۱۷). با این حال، اخیراً مشخص شده است که برخی از میوه‌های غیرکلیماکتریک مانند توت‌فرنگی (۲۹)، فلفل قرمز (۳) و انگور (۱۰) مقدار کمی هورمون اتیلن تولید می‌کنند و بنظر می‌رسد در مراحل مشخصی به اتیلن پاسخ



شکل ۲- میزان بیان نسبی ژن MYBA در دو مرحله نمونه حبه پرکنی و رسیدگی کامل

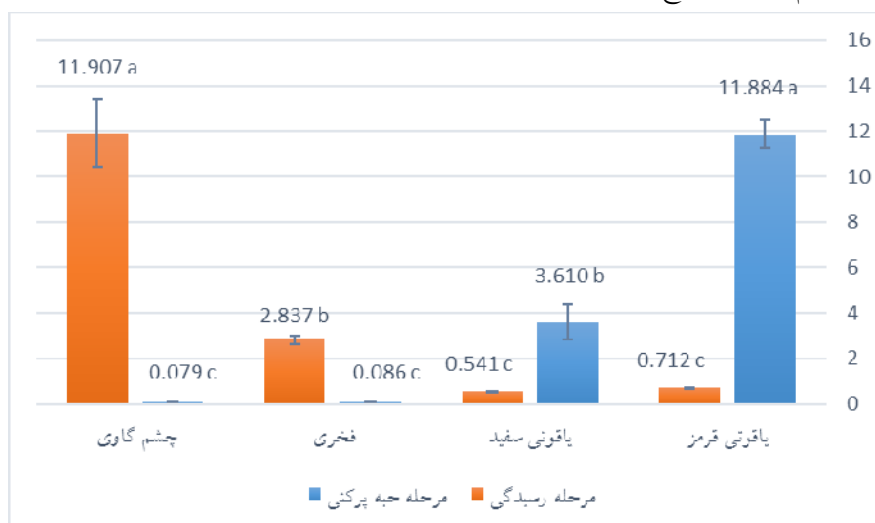
جدول ۵ - تجزیه واریانس برای ژن STE20

منابع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات
رقم (A)	۳	۱۱۶/۳۴۱	۳۸/۷۸۰**
خطای رقم (E _q)	۸	۳/۲۷۴	۰/۴۰۹
مراحل نمونه (B)	۱	۰/۰۴۲	۰/۰۴۲
مرحله نمونه × رقم (A×B)	۳	۴۴۲/۵۳۵	۱۴۰/۸۴۵**
تکرار × مرحله نمونه	۲	۱/۰۵۴	۰/۵۲۷
تکرار × مرحله نمونه × رقم	۶	۲/۱۴۴	۰/۳۷۵
کل	۲۳	۵۴۵/۳۹۳	
ضریب تغییرات	۱۵/۱۰۶		

** تفاوت معنی داری در سطح احتمال ۱ درصد می‌باشد

پروتئین کینازها در فسفریلاسیون پروتئین‌ها نقش دارند. در گیاهان فسفریلاسیون پروتئین در پاسخ به بسیاری از سیگنال‌ها از جمله نور، حمله پاتوژن‌ها، هورمون‌ها، تنش دما، و محرومیت از مواد غذایی انجام می‌شود (۳۹). ژن STE20 از طریق تنظیم گروهی از پروتئین کینازها بنام MAPK به تنش‌های زیستی و غیر زیستی پاسخ می‌دهد (۳۳، ۳۸). نتایج تحقیقات فرتس و همکاران (۲۰۱۱) روی انگور ترینکادیرا نشان می‌دهد که ژن STE20 در مرحله حبه پرکنی بیان پایینی داشته و بیان این ژن در مرحله رسیدگی بالا بوده است (۱۵). نتایج ما در مورد دو رقم دیررس فخری و چشم‌گاو با نتایج فرتس و همکاران

تساویه داشت. در مورد ژن STE20 ارقام دیررس در مرحله رسیدگی بیان بالایی داشتند. این موضوع در ارقام زودرس با ارقام دیررس متفاوت است، بطوری‌که در مرحله حبه پرکنی بیان بالایی در ارقام زودرس مشاهده شد و در مرحله رسیدگی بیان STE20 کاهش یافته است. با توجه به اثرگذاری پروتئین کینازها در شرایط تنش، بنظر می‌رسد بیان STE20 بیشتر بدلیل وجود تنش‌های تابستان سیستان باشد. هرچند همان‌طور که قبلاً اشاره کردیم، این ژن بدلیل دخالت در بیوستنز اتیلن در رسیدگی انگور هم مؤثر است.



شکل ۳- میزان بیان نسبی ژن STE20 در دو مرحله نموی حبه پرکنی و رسیدگی کامل

نتیجه‌گیری کلی در این پژوهش ابتدا ژن‌های انتقال سیگنال مؤثر در رسیدگی انگور مورد بررسی قرار گرفتند، سپس دو ژن MYBA و STE20 مربوط به رسیدگی و ژن GAPDH بعنوان ژن رفرنس انتخاب شد و بیان این ژن‌ها در مراحل فیزیولوژیکی مختلف و در نمونه‌های برگی ارقام زودرس (یاقوتی قرمز و سفید) و دیررس (فخری و چشم‌گاو) انگور منطقه سیستان بررسی شد. نتایج حاصل از تجزیه واریانس اثر متقابل ارقام در مراحل مختلف رسیدگی انگور در هر دو ژن MYBA و STE20 معنی‌دار بود. ژن

نتیجه‌گیری کلی

MYBA در دو رقم یاقوتی قرمز و چشم‌گاو بیان بالایی داشت. در رقم یاقوتی قرمز بیان این ژن در مرحله حبه پرکنی و در چشم‌گاو مربوط به مرحله رسیدگی است. بیان MYBA در انگور چشم‌گاو با مطالعات پیشین انجام شده روی سایر ارقام انگور مطابقت داشت. بدلیل اثرگذاری MYBA در دوره‌های تنش بنظر می‌رسد علاوه بر رسیدگی، وجود تنش‌های محیطی از دیگر دلایل بیان MYBA در رقم چشم‌گاو باشد. موضوع دیگر تفاوت بیان MYBA در یاقوتی قرمز با تحقیقات پیشین بود که از نتایج جالب توجه این تحقیق بشمار می‌رود. بیان

گیرد و با ژن‌های مطالعه شده در این مقاله مقایسه شده و نتایج کامل تری حاصل شود. بررسی برهم کنش‌های موجود در سطح ژن، پروتئین و متابولوم می‌تواند اطلاعات بسیار مفیدی را در این زمینه فراهم آورد که راهگشای به نژادی این گیاه در آینده خواهد بود (۲۲ و ۳۵).

سپاسگزاری

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

در ارقام زود رس و دیررس متفاوت بود. این ژن در ارقام زورس در مرحله حبه پرکنی بیان شده، در حالی که بیان این ژن در ارقام دیررس در مرحله رسیدگی اتفاق افتاده است. بنظر می‌رسد بیان STE20 در ارقام زودرس بدلیل تولید اتیلن و در ارقام دیررس بدلیل مواجهه با تنش‌های محیطی باشد.

با توجه به این که دو ژن مهم مربوط به انتقال سیگنال در انگور در این پژوهش بررسی شدند پیشنهاد می‌شود سایر ژن‌های مربوط به مسیرهای انتقال سیگنال مورد مطالعه قرار

منابع

- 1- Afrooze, F., Torkamani, J., Najafi, B. and Moosavinik, S. 2009. Economic research on the production and marketing of Yaghoui grape in the Sistan region. Sixth Iranian Agriculture Economics Conference, karaj, Iranian Agricultural Economics Association, Agriculture Pardis.
- 2- Agudelo-Romero, P., Erban, A., Sousa, L., Pais, M.S., Kopka, J. and Fortes, A.M. 2013. Search for transcriptional and metabolic markers of grape pre-ripening and ripening and insights into specific aroma development in three Portuguese cultivars. PLoS One, 8(4): p.e60422.
- 3- Aizat, W.M., Able, J.A., Stangoulis, J.C., and Able, A.J. 2013. Proteomic analysis during capsicum ripening reveals differential expression of ACC oxidase isoform 4 and other candidates. Functional plant biology, 40: 1115-1128.
- 4- Allahdou, M., Nouri Sadegh, A. and Kouhkan, S. 2012. Breeding of Sistan Yaghoui Grape using Clonal Selection. Journal Biotechnol Biomaterial, 13: 2-6.
- 5- Allan, A. C., Hellens, R. P., and Laing, W. A. 2008. MYB transcription factors that colour our fruit. Trends in plant science, 13(3): 99-102.
- 6- Asif, M.H., Lakhwani, D., Pathak, S., Bhambhani, S., Bag, S.K. and Trivedi, P.K. 2014. Genome-wide identification and expression analysis of the mitogen-activated protein kinase gene family from banana suggest involvement of specific members in different stages of fruit ripening. Functional & integrative genomics, 14(1): pp.161-175.
- 7- Borevitz, J. O., Xia, Y., Blount, J., Dixon, R. A., and Lamb, C. 2000. Activation tagging identifies a conserved MYB regulator of phenylpropanoid biosynthesis. The Plant Cell, 12(12): 2383-2393.
- 8- Boss, P. K., Davies, C. & Robinson, S. P. 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 Physiology, 111, 1059-1066.
- 9- Chagné, D., Gasic, K., Crowhurst, R.N., Han, Y., Bassett, H.C., Bowatte, D.R., Lawrence, T.J., Rikkerink, E.H., Gardiner, S.E. and Korban, S.S. 2008. Development of a set of SNP markers present in expressed genes of the apple. Genomics, 92(5): pp.353-358.
- 10- Chervin, C., El-Kereamy, A., Roustan, J.-P., Latché, A., Lamon, J., and Bouzayen, M. 2004. Ethylene seems required for the berry development and ripening in grape, a non-climacteric fruit. Plant Science, 167: 1301-1305.
- 11- Coombe, B. 1992. Research on development and ripening of the grape berry. American Journal of Enology and Viticulture 43: 101-110.
- 12- Costantini, L., Kappel, C.D., Trenti, M., Battilana, J., Emanuelli, F., Sordo, M., Moretto, M., Camps, C., Larcher, R., Delrot, S. and Grando, M.S. 2017. Drawing links from transcriptome to metabolites: the evolution of aroma in the ripening berry of Moscato Bianco (*Vitis vinifera* L.). Frontiers in plant science, 8: p.780-788.
- 13- Cramer, G.R., Ghan, R., Schlauch, K.A., Tillett, R.L., Heymann, H., Ferrarini, A., Delledonne, M., Zenoni, S., Fasoli, M., and Pezzotti, M. 2014. Transcriptomic analysis of the late stages of grapevine (*Vitis vinifera* cv. Cabernet

- Sauvignon*) berry ripening reveals significant induction of ethylene signaling and flavor pathways in the skin. *BMC plant biology*, 14: 370-376.
- 14- Degu, A., Hochberg, U., Wong, D. C., Alberti, G., Lazarovitch, N., Peterlunger, E., ... & Fait, A. 2019. Swift metabolite changes and leaf shedding are milestones in the acclimation process of grapevine under prolonged water stress. *BMC plant biology*, 19(1), 69-78.
 - 15- Fan, X., Zhao, R., Wang, Q., Liu, C., & Fang, J. 2018. Anthocyanin Composition and MybA-related Genotype in Kyoho Grape and Its Derivatives. *HortScience*, 53(12), 1766-1771.
 - 16- Fortes, A.M., Agudelo-Romero, P., Silva, M.S., Ali, K., Sousa, L., Maltese, F., Choi, Y.H., Grimplet, J., Martinez-Zapater, J.M., Verpoorte, R. and Pais, M.S. 2011. Transcript and metabolite analysis in Trincadeira cultivar reveals novel information regarding the dynamics of grape ripening. *BMC plant biology*, 11(1):p.149-158.
 - 17- Gapper, N.E., McQuinn, R.P., and Giovannoni, J.J. 2013. Molecular and genetic regulation of fruit ripening. *Plant Molecular Biology*, 82: 575-591.
 - 18- Giovannoni, J.J. 2007. Fruit ripening mutants yield insights into ripening control. *Current opinion in plant biology* 10, 283-289.
 - 19- Halimi, M., Moosavinik, S. and Asgharipoor, M. 2013. Research of Energy Efficiency and Economic Indicators in Grape production Systems in Sistan. Master of Science Thesis, University of Zabol, p: 32
 - 20- Holton, T.A. and Cornish, E.C. 1995. Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. *The Plant Cell*, 7(7): 1071-79.
 - 21- Johnston, A.M., Naselli, G., Gonez, L.J., Martin, R.M., Harrison, L.C. and DeAizpurua, H.J. 2000. SPAK, a STE20/SPS1-related kinase that activates the p38 pathway. *Oncogene*, 19(37): 4290-97.
 - 22- Kalirad, A. 2018. Green systems biology: From genome, proteome and metabolome to research in bioms and biotechnology. *Iranian Journal of Biology (Biological Science Promotion)*, 1 (2): 35-41.
 - 23- Karimkoshte, M., Rafiei, B. and Ashkani, A. 2002. efficiency Marketing of Grapes And ways to improve it in Sistan and Baluchestan. *commercial Research journal*, 23:139-164.
 - 24- Kevin, M.D. 2004. *Plant Pigments and Their Manipulation*. Wiley-Blackwell. 6-12.
 - 25- Kobayashi, S., Ishimaru, M., Hiraoka, K. and Honda, C. 2002. Myb-related genes of the Kyoho grape (*Vitis labruscana*) regulate anthocyanin biosynthesis. *Planta*, 215(6):924-933.
 - 26- Koressaar, T. and Remm, M. 2007. Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics*, 23(10): 1289-1291.
 - 27- Li, C., Ng, C.K.Y. and Fan, L.M. 2015. MYB transcription factors, active players in abiotic stress signaling. *Environmental and Experimental Botany*, 114:80-91.
 - 28- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta CT$ method. *methods*, 25(4):402-408.
 - 29- Merchante, C., Vallarino, J.G., Osorio, S., Aragüez, I., Villarreal, N., Ariza, M.T., Martínez, G.A., Medina-Escobar, N., Civello, M.P., and Fernie, A.R. 2013. Ethylene is involved in strawberry fruit ripening in an organ-specific manner. *Journal of experimental botany*, 64: 4421-4439.
 - 30- Ouaked, F., Rozhon, W., Lecourieux, D. and Hirt, H. 2003. A MAPK pathway mediates ethylene signaling in plants. *The EMBO Journal*, 22(6):1282-1288.
 - 31- Papin, J.A., Hunter, T., Palsson, B.O. and Subramaniam, S. 2005. Reconstruction of cellular signalling networks and analysis of their properties. *Nature reviews Molecular cell biology*, 6(2): 99-108.
 - 32- Plunkett, B. J., Espley, R. V., Dare, A. P., Warren, B. A., Grierson, E. R., Cordiner, S., ... & Schwinn, K. E. 2018. MYBA From Blueberry (*Vaccinium Section Cyanococcus*) Is a Subgroup 6 Type R2R3MYB Transcription Factor That Activates Anthocyanin Production. *Frontiers in plant science*, 9-16.
 - 33- Rao, K.P., Richa, T.A.M.B.I., Kumar, K.U.N.D.A.N., Raghuram, B.A.D.M.I. and Sinha, A.K. 2010. In silico analysis reveals 75 members of mitogen-activated protein kinase kinase gene family in rice. *DNA research*, 17(3):139-153.
 - 34- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual* (Cold spring harbor laboratory press).

- 35- Sardari, M and Rezaiof, A. 2019. The Role of Brain Nervous Transferor Systems In Oblivion Induced by Stress. Iranian Journal of Biology (Biological Science Promotion), 2 (1&2): 81-92.
- 36- Schwinn, K., Venail, J., Shang, Y., Mackay, S., Alm, V., Butelli, E. and Martin, C. 2006. A small family of MYB-regulatory genes controls floral pigmentation intensity and patterning in the genus *Antirrhinum*. *The Plant Cell*, 18(4): 831-851.
- 37- Shangguan, L., Mu, Q., Fang, X., Zhang, K., Jia, H., Li, X., Bao, Y. and Fang, J. 2017. RNA-sequencing reveals biological networks during table grapevine ('Fujiminori') fruit development. *PloS one*, 12(1): 0170571-79.
- 38- Sinha, A.K., Jaggi, M., Raghuram, B. and Tuteja, N. 2011. Mitogen-activated protein kinase signaling in plants under abiotic stress. *Plant signaling & behavior*, 6(2): 196-203.
- 39- Stone, J.M. and Walker, J.C. 1995. Plant protein kinase families and signal transduction. *Plant Physiology*, 108(2):451-457.
- 40- Stracke, R., Werber, M. and Weisshaar, B. 2001. The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Current opinion in plant biology*, 4(5): 447-456.
- 41- Tesniere, C., Pradal, M., El-Kereamy, A., Torregrosa, L., Chatelet, P., Roustan, J.-P., and Chervin, C. 2004. Involvement of ethylene signalling in a non-climacteric fruit: new elements regarding the regulation of ADH expression in grapevine. *Journal of experimental botany*, 55: 2235-2240.
- 42- Walker, A. R., Lee, E., Bogs, J., McDavid, D. A., Thomas, M. R., & Robinson, S. P. 2007. White grapes arose through the mutation of two similar and adjacent regulatory genes. *The Plant Journal*, 49(5): 772-785.
- 43- Wu, Y., Fu, T., Wang, Z., Jiao, C., Yang, Z., Ali, B. & Zhou, W. 2015. Differential gene expression analysis of early-ripening mutants of grape (*Vitis vinifera* L.). *Scientia Horticulturae*, 194: 7-17.
- 44- 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: e0147749-55.
- 45- Yakushiji, H., Kobayashi, S., Goto-Yamamoto, N., Jeong, S. T., Sueta, T., Mitani, N., and Azuma, A. 2006. A skin color mutation of grapevine, from black-skinned Pinot Noir to white-skinned Pinot Blanc, is caused by deletion of the functional *VvmybA1* allele. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 70(6): 1506-1508.

Studying of STE20 & MYBA Genes Expression Related to Signal Transduction of Early-ripening in Yaghouti Grape of Sistan

Norouzi S., Emamjomeh A., Solouki M. and Heidari F.

Dept. of Plant Breeding and Biotechnology (PBB), University of Zabol, Zabol, I.R. of Iran.

Abstract

Yaghouti grape of Sistan is an important fruit in Iran. Therefore, it is necessary some studies to evaluate different aspects related to early ripening in grape. This fruit can be harvested since first week of June. In this study, the genes related to signal transduction in early ripening were investigated, firstly; then two genes, MYBA and STE20, and GAPDH (as reference genes) were selected to more study. The expression of these genes were evaluated in different phenological growth stages and different early and late ripening genotypes of Sistan grape. The results indicated that expression of STE20 has been up-regulated highly in late-ripened genotypes (Fakhri and Cheshm-Gavi) during ripening stage. Also, there was significant difference between ripening and berry filling phenological growth stages as expression of STE20. On the other hand, this gene was down-regulated in early ripened Red-Yaghouti and White-Yaghouti genotypes. Also, the results indicated that expression of MYBA has up-regulated in early ripened Red-Yaghouti genotype of berry filling stage, while the expression of this gene was increased significantly in the late-ripened Chesm-Gavi genotype of ripening stage.

Key words: Early ripening, Quantitative Real Time PCR, RNA, Signaling pathway, Sistan cultivars of grapes, *vitis vinifera*