مقاله پژوهشی، صفحات ۲۹۱-۳۰۳
DOI :10.22034/cmr.2026.8821.3357

تاثیر گابا (GABA) بر متیلاسیون DNA و بیان ژن های *MKK2* و *EREB* در کالوس بنگ دانه

زهرا مهرآور[۱]، علیرضا ایرانبخش[۱*]، مصطفی عبادی[۲]، زهرا اوراقی اردبیلی[۳]، آزاده حکمت[۱]

[۱] گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

[۲] گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان، دامغان، ایران

[۳] گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد گرمسار، گرمسار، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۵/۰۳/۱۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۵/۰۵/۲۶

چکیده

شکی نیست که DNA متیلاسیون رخدادی مهم در تنظیم ساختار کروماتین و تنظیم ژن در سطح قبل از نسخه برداری است. این مطالعه به بررسی تغییرات اپی‌ژنتیک به ویژه متیلاسیون DNA و رفتار رونویسی ژن‌های *EREB* و *MKK2* کالوس گیاه بنگ‌دانه (*Hyoscyamus niger*) در پاسخ به افزودن آمینوبوتیریک اسید (گابا) به محیط کشت در شرایط درون شیشه پرداخت. ریزنمونه‌های برگی از گیاهچه‌های استریل در محیط کشت حاوی بنزیل‌آدنین ($0.5\ mgl^{-1}$) و دی‌کلروفنوکسی‌استیک اسید ($0.5\ mgl^{-1}$) به همراه غلظت‌های مختلف گابا شامل ۰، ۳۰۰ و ۷۰۰ میکرومولار کشت شدند. تیمار گابا در غلظت پایین موجب افزایش بیومس کالوس شد. درحالیکه، غلظت بالای گابا همراه با کاهش وزن تر کالوس بود. سطح دمتیلاسیون در پاسخ به تیمارهای گابا به میزان ۲۱.۴٪ کاهش یافت. غلظت پایین گابا میزان همی‌متیلاسیون را ۱۵.۴٪ کاهش داد، در حالی که غلظت بالای گابا این شاخص را ۷.۷٪ افزایش داد. درصدهای متیلاسیون سیتوزین داخلی در گروه‌های تیمار شده با گابا به طور میانگین ۲۵٪ کمتر از گروه کنترل بودند. درصدهای متیلاسیون کامل در گروه‌های تیمار شده با گابا ۲۱٪ کاهش یافتند. افزودن گابا در غلظت پایین به محیط کشت موجب افزایش بیان ژن *MKK2* به میزان ۷.۹ برابر شد. غلظت بالای گابا افزایش شدید این ژن حدود ۲۴ برابر را بدنبال داشت. بیان ژن *EREB* در اثر اعمال تیمار های گابا روندی افزایشی داشت. بنابراین، می توان نتیجه گیری کرد، که گابا به صورت وابسته به غلظت، مسیرهای پیام رسانی دفاعی گیاه را فعال کرده و می تواند موجب تحریک متابولیسم ثانویه شود.

واژگان کلیدی: اپی ژنتیک؛ الیسیتور؛ کالوس؛ گابا؛ بیان ژن

* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: iranbakhsh@iau.ac.ir

مقدمه

در قلمرو گیاهان، متابولیت‌های ثانویه مختلف از نظر اقتصادی و اکولوژیکی حائز اهمیت هستند. گیاه بنگ‌دانه (*Hyoscyamus niger*) یک گیاه مهم از نظر اقتصادی و دارویی هستند. اولین و مهم‌ترین متابولیت‌های ثانویه در *H. niger* آلکالوئیدهای تروپانی هستند. این ترکیبات به ویژه اسکوپولامین و هیوسیامین، دلیل اصلی تقاضای بالای این گیاه در صنعت داروسازی هستند. بعلاوه، این گیاه طیف متنوعی از سایر متابولیت‌های ثانویه مثل ترکیبات فنلی، لیگنان‌ها، کومارینو لیگنان‌ها، فلاونوئیدها، گلیسریدها، ساپونین‌ها و گلیکوز یدها را نیز تولید می‌کند.

در گیاهان، اسید آمینه غیرپروتئینی گاما-آمینوبوتیریک اسید (GABA) یک متابولیت اولیه و یک مولکول پیام‌رسان است (۷). این عامل پیام‌رسان زیست‌فعال را می‌توان در تمام اندام‌های گیاه یافت و به تنظیم طیف گسترده‌ای از رویدادهای بیولوژیکی مانند پاسخ‌های به

مقاله پژوهشی، صفحات ۲۹۱-۳۰۳
DOI :10.22034/cmr.2026.8821.3357

تنش، تنظیم روزنه‌ها، تعدیل تجمع گونه‌های فعال اکسیژن(ROS)، هدایت لوله گرده، برهمکنش گیاه-میکروب و پاسخ‌های به تنش کمک می‌کند (۷، ۱۶، ۳۱، ۳۲).

گیاهان به عنوان موجودات زنده ساکن (چسبیده به بستر)، شبکه‌های پیام‌رسانی پیچیده‌ای را تکامل داده‌اند تا به عوامل محیطی پاسخ دهند (۱۰، ۱۳، ۲۲، ۲۷). فیتوهورمون‌ها (۹، ۲۵)، فاکتورهای رونویسی(1)، میکروRNAها(27) ، پروتئین کینازها (۸) و سیستم تغییردهنده کروماتین (۲۰) نقش اصلی را در شبکه‌های تنظیم ژن ایفا می‌کنند.

در میان محرک‌های شیمیایی و فیزیکی متنوع، گابا به عنوان یک ماده چندعملکردی و سازگار با محیط زیست، توجه زیادی را در پاسخ به تقاضای روزافزون برای تولید مواد شیمیایی گیاهی در شرایط درون‌شیشه‌ای به خود جلب کرده است. این مطالعه پیامدهای کاربرد گابا در محیط کشت را بر کارایی کالوس‌زایی ریزنمونه بنگ‌دانه و پاسخ های مولکولی به این تیمارها بررسی می‌کند. به خوبی مستند شده است که فاکتورهای رونویسی ابرخانواده *AP2/ERF* یا *EREBF* به طور مؤثر در تعدیل مکانیسم‌های سازگاری با تنش، متابولیسم، تمایز بافتی و توسعه، عمدتاً از طریق کنترل پیش از رونویسی بیان ژن‌های پایین‌دست متعدد خود، مشارکت دارند (۵، ۶، ۲۸، ۲۹، ۳۰). علاوه بر این، یکی از اجزای مهم شبکه انتقال پیام سلولی، آبشار *MAPK* است (۲۰) که به طور نزدیکی با فاکتورهای رونویسی تعامل دارد (۱۱، ۱۲). به همین دلیل رفتار رونویسی ژن‌های *EREB* (یک فاکتور نسخه برداری) و *MKK2* (یک *MAPK*) در پاسخ به حضور گابا در محیط کشت نیز در این مطالعه بررسی شد. علاوه بر این، مطالعات کمی به بررسی تغییرات اپی‌ژنتیک متعاقب تیمارهای گابا پرداخته‌اند. با توجه به این خلا دانشی، نقش گابا به صورت اپی‌ژنتیک بر متیلاسیون سیتوزین DNA ارزیابی شد.

مواد و روش‌ها

بذرهای گیاه بنگ‌دانه (*Hyoscyamus niger*) از شرکت پاکان بذر (اصفهان، ایران) تهیه شدند. روش‌های مختلف فیزیکی (انجماد)، شیمیایی (اسید سولفوریک و اسید جیبرلیک) و مکانیکی (خراش‌دهی و ساب‌زدن) برای تعیین روش بهینه شکستن خواب بذر و تحریک جوانه‌زنی مورد آزمایش قرار گرفتند. بهترین پاسخ زمانی حاصل شد که بذرهای بنگ‌دانه به مدت ۴ ساعت منجمد شده و سپس به مدت ۲۴ ساعت در آب قرار داده شدند. پس از شستشوی متوالی (آب حاوی یک قطره مایع ظرفشویی به مدت ۵ دقیقه، هیپوکلریت ۱.۵ درصد به مدت ۲۰ دقیقه، اتانول ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه و آب دوبار استریل سه بار)، بذرها در محیط کشت موراشیگ و اسکوگ (MS) کشت شدند. جوانه‌زنی بذرها دو هفته طول کشید.

برای آغاز کالوس‌زایی، ریزنمونه‌های برگی از گیاهچه‌های ۳۰ روزه در محیط MS حاوی ۰.۵ میلی‌گرم در لیتر بنزیل‌آدنین (BA) و ۰.۵ میلی‌گرم در لیتر ۲,۴-دی‌کلروفنوکسی‌استیک اسید (2,4-D) به همراه غلظت‌های مختلف گابا شامل ۰، ۳۰۰ و ۷۰۰ میکرومولار (با استفاده از فیلترهای میلی پور ۰.۴۵ میکرومتر به محیط اضافه شد) کشت شدند. شروع فرآیند کالوس‌زایی یک هفته طول کشید. کالوس‌های ۳۰ روزه برای ارزیابی‌های مولکولی بعدی مورد استفاده قرار گرفتند.

بررسی پروفایل متیلاسیون DNA

مقاله پژوهشی، صفحات ۲۹۱-۳۰۳
DOI :10.22034/cmr.2026.8821.3357

برای شناسایی تغییرات در سطوح متیلاسیونDNA ، از تکنیک MSAP[1] استفاده شد. به طور خلاصه، DNA از نمونه‌های کالوس با استفاده از بافر هضم حاویSDS ، بافر CTAB و آنزیم پروتئیناز K استخراج شد. کنترل کیفیت DNA با استفاده از نانودراپ(Thermo-scientific, 2000c) وخوانش جذب در طول موج‌های ۲۳۰، ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر انجام شد. در مرحله بعد، مراحل آزمایشی در دو سری هضم موازی DNA شامل *EcoRI/HpaII* (i) و (ii) *EcoRI/MspI* انجام شد. سپس، مرحله اتصال اداپتور (جدول ۱) انجام شد. تکثیر PCR مرحله پیش‌انتخابی با استفاده از پرایمرهای اختصاصی در دستگاه ترموسایکلر انجام شد. تکثیر PCR در مرحله انتخابی با استفاده از پرایمرهای ارائه شده در جدول ۱ در دستگاه ترموسایکلر تحت برنامه دمایی ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه، ۵۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. برای ارزیابی کیفیت نتایج واکنش، ۳ میکرولیتر محصول PCR روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز شد. پس از آماده‌سازی ژل پلی‌آکریل آمید، ۲ میکرولیتر محصول PCR حاصل از مرحله انتخابی PCR روی ژل پلی‌آکریل آمید ۸٪ الکتروفورز شد. پس از رنگ‌آمیزی ژل به روش نیترات نقره، تصاویر ژل در نرم‌افزار Gelscannerثبت شد و قطعات مولکولی به دست آمده برای هر نمونه در دو سری موازی فوق، *EcoRI/HpaII*و*EcoRI/MspI* ، شناسایی شدند. نتایج در قالب فایل اکسل به صورت کدهای ۰ و ۱ ذخیره شده و برای تجزیه و تحلیل داده‌ها مورد استفاده قرار گرفتند. نتایج تحت تحلیل‌های بیشتر در بسته MSAP و نرم‌افزار R قرار گرفتند.

جدول ۱- پرایمرها و آداپتورهای بکاربرده شده برای بررسی متیلاسیون DNA متیلاسیون

adapter name	Sequence (5'-3')	Primer name	Sequence (5'-3')
MsHp-A1	GACGATGAGTCTAGAA	*MsHp*-pre	GATGAGTCTAGAACGGT
MsHp-A2	CGTTCTAGACTCATC	*Eco*RI-pre	GACTGCGTACCAATTCA
*Eco*RI-A1	CTCGTAGACTGCGTACC	*Eco*RI-ACT	GACTGCGTACCAATTCACT
*Eco*RI-A2	AATTGGTACGCAGTCTAC	*Eco*RI-AAG	GACTGCGTACCAATTCAAG
		MsHp-TAC	GATGAGTCTAGAACGGTAC
		MsHp-TC	GATGAGTCTAGAACGGTC

بررسی بیان ژن های هدف

در این مطالعه اثر اعمال تیمارهای گابا بر بیان ژن‌های *EREB*و *MKK2* استفاده شد. RNA از نمونه‌های پودر شده در نیتروژن مایع با استفاده از کیت مخصوص (دنازیست، ایران) طبق دستورالعمل استخراج گردید. کیفیت RNA استخراج شده روی ژل آگارز ۱٪ ارزیابی شد. همچنین نمونه‌ها با اندازه‌گیری جذب نمونه در سه طول موج شامل ۲۳۰، ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر با دستگاه نانودراپ تحت ارزیابی کمی و کیفی دقیق‌تری قرار

[1] methylation-sensitive amplified polymorphism technique (MSAP)

مقاله پژوهشی، صفحات ۲۹۱-۳۰۳
DOI :10.22034/cmr.2026.8821.3357

گرفتند. سپس نمونه‌های مناسب در مراحل بعدی مورد استفاده قرار گرفتند. در مرحله بعد، سنتز cDNA انجام شد و تا فرآیند Real-Time PCR در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. پرایمرها برای دو ژن هدف شامل MKK2 (NM_001247659) و EREB (AF502085) با استفاده از نرم‌افزار طراحی شد و توسط شرکت سیناکلون سنتز شدند. دمای ذوب بهینه بین ۵۸ تا ۶۰ درجه سانتی‌گراد و طول قطعه کمتر از ۱۵۰ جفت باز در هنگام طراحی پرایمرها در نظر گرفته شد. پرایمرهای Forward و Reverse طراحی شده برای ژن *EREB* به ترتیب AATGAGGGCAGGGATGGTTG و GACCCCACTGGCTCCTAAACبودند.

همچنین CTGTTCCTCTCCCTCTTCCAC و GCCACTACCGATGCGATTAACبه ترتیب توالی‌های پرایمرهای ژن *MKK2* بودند. علاوه بر این، TTCACATCAGCATCGTGGTCA و TCAGCAGCTTCCTTCTCGAAC توالی‌های پرایمر مورد استفاده برای ژن کنترل بودند.

واکنش Real Time PCR در محیط واکنشی شامل مخلوط سایبرگرین، پرایمرهای اختصاصی و cDNA سنتز شده انجام شد.

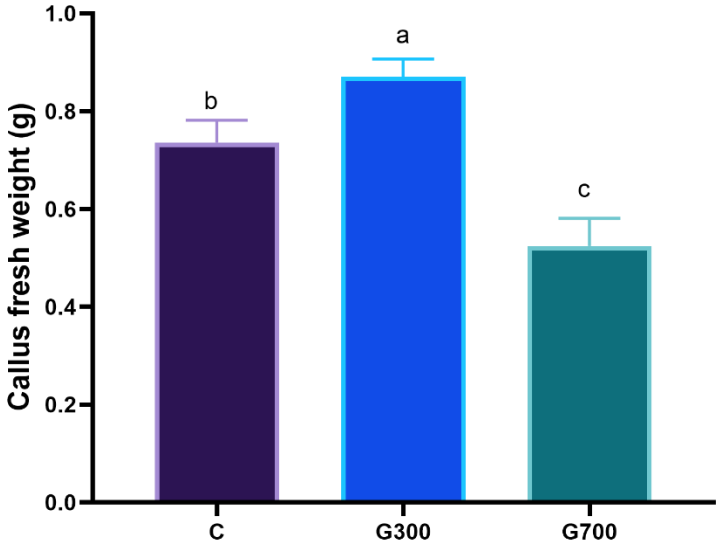
ارزیابی آماری

از نرم‌افزار GraphPad Prism 9 رای انجام تحلیل آماری بر روی تمام مجموعه داده‌ها استفاده شد. برای مقایسه مقادیر میانگین، از آزمون توکی در سطح احتمال ۵٪ استفاده گردید.

نتایج

تغییرات ناشی از کاربرد GABA در وزن تر کالوس و متیلاسیون DNA

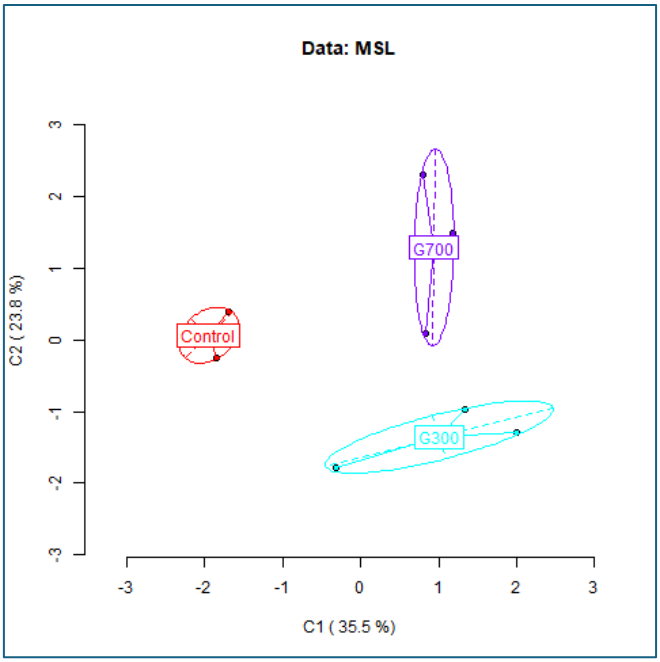
افزودن گابا به محیط کشت بسته به غلظت کاربردی تاثیر متفاوتی بر وزن تر کالوس داشت. تیمار گابا در غلظت ۳۰۰ میکرومولار موجب افزایش معنی دار بیومس کالوس در مقایسه با شاهد شد (شکل ۱). درحالیکه، گابا در غلظت ۷۰۰ همراه با کاهش معنی دار وزن تر کالوس نسبت به شاهد بود (شکل ۱).



شکل ۱- تاثیر غلظت های مختلف گابا بر وزن تر کالوس؛ حروف متفاوت نشاندهنده تفاوت معنی دار در $p\leq0.05$ است.

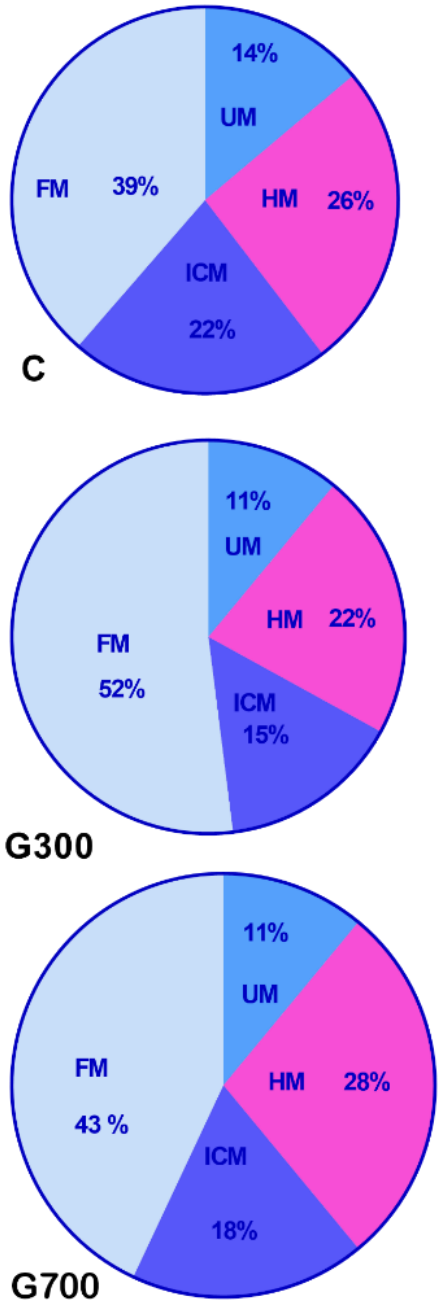
مقاله پژوهشی، صفحات ۲۹۱-۳۰۳
DOI :10.22034/cmr.2026.8821.3357

تعداد جایگاه‌های حساس به متیلاسیون (MSL) برابر با ۷۴ بود. از کل جایگاه‌هایMSL ، ۲۸ جایگاه چندشکلی نشان دادند. ارزیابی مولکولی نشان داد که تیمارهای GABA به صورت اپی‌ژنتیک بر ۲۸ جایگاه MSL موثر بود که معادل ۳۸٪ از کل چندشکلی MSLاست. شاخص تنوع شانون برای MSL برابر با ۰۸/۰±۶۱/۰ بود. نمودار PCoA ارائه شده در شکل ۲، اثر قابل توجه تیمارهای اعمال شده GABA را تأیید می‌کند. گروه کنترل از دو نمونه تیمار شده با GABA(به ویژه از گروه G300) متمایز است. سطح دمتیلاسیون در پاسخ به تیمارهای GABA به میزان ۲۱.۴٪ کاهش یافت (شکل ۳). تیمار G300 میزان همی‌متیلاسیون را ۱۵.۴٪ در مقایسه با گروه کنترل کاهش داد، در حالی که تیمار G700 این شاخص را ۷.۷٪ نسبت به کنترل افزایش داد. درصدهای متیلاسیون داخلی سیتوزین در گروه‌های تیمار G300 و G700 به ترتیب ۳۱.۸٪ و ۱۸.۲٪ کمتر از گروه کنترل بودند. درصدهای متیلاسیون کامل در تیمارهای G300و G700 به ترتیب ۳۳.۳٪ و ۱۰.۳٪ کاهش یافتند (شکل ۳).



شکل ۲: نمودار تحلیل مختصات اصلی (PCoA) جایگاه‌های حساس به متیلاسیون(MSL) ؛ گروه‌های تیماری: کنترل؛ G300- گابا با غلظت ۳۰۰ میکرومولار؛ G700 - گابا با غلظت ۷۰۰ میکرومولار

مقاله پژوهشی، صفحات ۲۹۱-۳۰۳
DOI :10.22034/cmr.2026.8821.3357

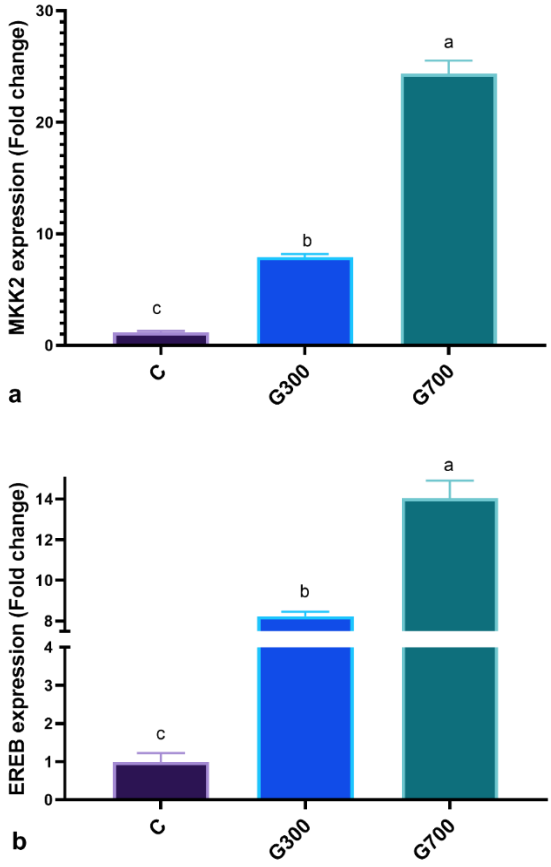


شکل ۳: تغییرات در الگوی DNA متیلاسیون برحسب متیلاسیون کامل (FM)، همی متیلاسیون (HM)، دمتیلاسیون (UM) و متیلاسیون سیتوزین داخلی (ICM). گروه های تیماری: کنترل یا شاهد، G300- گابا ۳۰۰ میکرومولار؛ G700- گابا ۷۰۰ میکرومولار

تغییرات در بیان ژن های هدف

افزودن گابا در غلظت ۳۰۰ میکرومولار به محیط کشت افزایش معنی دار بیان ژن *MKK2* به میزان ۷.۹ برابر نسبت به گروه شاهد شد (شکل 4a). تیمار گابا ۷۰۰ میکرومولار همراه با افزایش شدید این ژن حدود ۲۴ برابر نسبت به گروه شاهد شد. بیان ژن *EREB* در اثر اعمال تیمار گابا ۳۰۰ میکرومولار به میزان ۸.۲ برابر افزایش نشان داد. در روندی افزایشی مشابه، بیان این ژن در اثر تیمار گابا ۷۰۰ میکرومولار به اندازه ۱۴ برابر نسبت به گروه شاهد افزایش معنی دار داشت (شکل 4b).

مقاله پژوهشی، صفحات ۲۹۱-۳۰۳
DOI :10.22034/cmr.2026.8821.3357



شکل۴: بیان متمایز ژن های *MKK2* (a) و *EREB* (b) در پاسخ به افزودن غلظت های مختلف گابا به محیط کشت؛ حروف متفاوت نشاندهنده تفاوت معنی دار در $p\leq0.05$ است.

بحث

افزایش متیلاسیون کامل، کاهش UM و کاهش ICM بارزترین پاسخ ها به بکارگیری گابا بود. تفاوت اصلی بین دو تیمار G300 و G700 از نظر روند شاخص همی متیلاسیون HM بود. نیمار گابا در غلظت ۳۰۰ همراه با افزایش متوسط در بیان ژن های هدف (*MKK2* و *EREB*) بود. درحالیکه، گابا در غلظت ۷۰۰ میکرومولار ، موجب افزایش شدید ژن های هدف مذکور شد. افزایش شدید بیان ژن *EREB* می تواند بیانگر القا تنش باشد. به نظر می‌رسد در غلظت بالاتر(G700)، GABA توانسته است پاسخ اپی‌ژنتیکی قوی‌تری ایجاد کند. این مسئله می‌تواند ناشی از افزایش تنش فیزیولوژیک یا فعال شدن بیشتر مسیر پیام رسانی GABA باشد. در برخی مطالعات گزارش شده که افزایش GABA باعث تغییر در متابولیسم کربن، تعادل ROS و تنظیم بیان ژن‌های دخیل در رشد و تمایز می‌شود (۱۵). تجزیه و تحلیل ترکیبی ترنسکریپتوم و متابولومِ گیاهچه‌های بلوبری کشت‌شده در شرایط درون‌شیشه و تیمار داده شده با GABA نشان داد که اثرات مفید افزاینده رشد GABAرا می‌توان به دو سازوکار اصلی نسبت داد: ۱- GABAمتابولیسم کربن و جذب نیتروژن را تقویت کرد. فرایندهایی که می‌توانند انرژی و مواد اولیه بیشتری برای فعالیت‌های سلولی مانند سنتز نشاسته، سلولز و پروتئین فراهم کنند و در نتیجه موجب افزایش ماده خشک شوند.۲- GABA از طریق تنظیم متابولیسم ثانویه، سازگاری گیاهچه‌ها را با شرایط نامساعد محیطی افزایش داد و باعث افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه‌ای مانند فلاونوئیدها، استروئیدها و ترپن‌ها شد (۱۸). گابا

مقاله پژوهشی، صفحات ۲۹۱-۳۰۳
DOI :10.22034/cmr.2026.8821.3357

درگیاهان به‌عنوان یک مولکول پاسخ‌دهنده به تنش شناخته می‌شود و تحت شرایط تنش اکسیداتیو، کمبود اکسیژن، شوری و تنش‌های محیط کشت تجمع می‌یابد. افزایش GABA می‌تواند از طریق تنظیم سطح گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و مسیرهای دفاعی، بیان ژن‌های اپی‌ژنتیکی را تغییر دهد. از آنجا که ROS نقش مهمی در تنظیم ساختار کروماتین و فعالیت DNA متیل ترانسفرازها[۲] دارند، احتمال دارد که تیمار GABA موجب فعال شدن مسیر RdDM[3] و افزایش متیلاسیون سیتوزین شده باشد. در مطالعه‌ای روی سویا مشخص شد که طی جنین‌زایی سوماتیکی، افزایش متیلاسیون ژنومی به‌ویژه در جایگاه‌های CHH همراه با افزایش بیان ژن‌های مرتبط با مسیر RdDM رخ می‌دهد و این فرآیند برای حفظ پایداری ژنومی ضروری است (۱۳). علاوه بر این، Chen و همکاران (۴) نشان دادند که تعادل بین متیلاسیون و دمتیلاسیون DNA برای شروع جنین‌زایی ضروری است و افزایش بیش‌ازحد متیلاسیون می‌تواند روند تمایز سلولی را محدود کند. این یافته می‌تواند توضیحی برای کاهش شاخص‌های UM و ICM در تیمارهای دارای GABA باشد، زیرا افزایش متیلاسیون ممکن است انعطاف‌پذیری کروماتین را کاهش داده و توان بازبرنامه‌ریزی سلولی را محدود کرده باشد (۴). در مجموع، نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که GABA احتمالاً از طریق القای هایپرمتیلاسیون DNA و تغییر وضعیت اپی‌ژنتیکی، رشد و رفتار کالوس را تنظیم کرده است. اختلاف شاخص HM بین G300 و G700 نیز نشان می‌دهد که پاسخ اپی‌ژنتیکی وابسته به غلظت GABA بوده و غلظت بالاتر اثر قوی‌تری بر متیلاسیون ژنومی داشته است. به نظر می‌رسد GABA از طریق تنظیم وضعیت اکسیداتیو سلول، فعال‌سازی مسیرهای دفاعی و اثرگذاری بر فعالیت DNA متیل ترانسفرازها[۴] موجب افزایش متیلاسیون DNA در کالوس شده است. این هایپرمتیلاسیون احتمالاً باعث خاموشی نسبی ژن‌های مرتبط با تقسیم سلولی و جنین‌زایی شده در غلظت های بالای گابا شده است. بنابراین، GABA می‌تواند به‌عنوان یک تنظیم‌کننده اپی‌ژنتیکی مهم در فرآیند رشد و تمایز کالوس در نظر گرفته شود. با این وجود تحقیقات کمی در زمینه اثرات گابا بر DNA متیلاسیون در گیاهان وجود دارد و این تحقیق می تواند بستری مناسب برای طرح ریزی آزمایشات بعدی باشد.

نتایج این تحقیق نشان داد که تیمار GABA در هر دو غلظت ۳۰۰ و ۷۰۰ باعث افزایش بیان ژن‌های *MKK2* و *EREB* شده است، اما شدت پاسخ در غلظت ۷۰۰ بیشتر بوده است این الگو نشان می‌دهد که پاسخ ژنی وابسته به غلظت GABA بوده و با افزایش مقدار GABA، مسیرهای پیام‌رسانی مرتبط با تنش در گیاه فعال‌تر شده‌اند. در پروتوپلاست‌های آرابیدوپسیس، *MKK2* به‌طور اختصاصی توسط تنش سرما و شوری فعال شد (۲۶). آزمایش‌های سنجش‌های میکینازی نشان دادند که *MKK2* به‌طور مستقیم *MPK4* و *MPK6* را هدف قرار می‌دهد (۲۶). بر این اساس، گیاهانی که *MKK2* را بیش‌ازحد بیان می‌کردند، فعالیت دائمی *MPK4* و *MPK6* ، افزایش دائمی بیان ژن‌های نشانگر القاشده توسط تنش، و تحمل بیشتر نسبت به یخزدگی و شوری را نشان دادند. در مقابل، گیاهان فاقد *MKK2* جهش‌یافته‌های(mkk2) در فعال‌سازی *MPK4* و *MPK6* دچار اختلال بودند و

[۲] DNA methyltransferase
[3] RNA-directed DNA methylation
[4] DNA methyltransferase

مقاله پژوهشی، صفحات ۲۹۱-۳۰۳
DOI :10.22034/cmr.2026.8821.3357

نسبت به تنش شوری و سرما حساسیت بیشتری داشتند (۲۶). تحلیل کامل ترنسکریپتوم ژنومی در گیاهان دارای بیان بیش‌ازحد *MKK2* نشان داد که بیان ۱۵۲ ژنِ دخیل در تنظیم رونویسی، انتقال پیام سلولی، دفاع سلولی و متابولیسم تنش تغییر یافته است. این داده‌ها یک آبشار پیام‌رسانی کیناز MAP را شناسایی می‌کنند که تحمل به تنش سرما و شوری را در گیاهان میانجی‌گری می‌کند (۲۶). از سوی دیگر، ژن *EREB* متعلق به خانواده فاکتورهای رونویسی پاسخ‌دهنده به اتیلن است که در تنظیم پاسخ‌های دفاعی و سازگاری با تنش‌های غیرزیستی نقش دارند. افزایش بیان *EREB* پس از تیمار GABA نشان می‌دهد که GABA احتمالاً از طریق فعال‌سازی مسیرهای هورمونی و پیام رسانی تنش، رونویسی ژن‌های دفاعی را تحریک کرده است. مطالعات متعدد نشان داده‌اند که GABA به عنوان یک مولکول سیگنال‌دهنده عمل می‌کند و می‌تواند مسیرهای مرتبط باROS ، MAPK و هورمون اتیلن را تنظیم کند (۲۳).

افزایش متوسط بیان ژن‌ها در تیمار GABA300 احتمالاً بیانگر آن است که این غلظت برای فعال‌سازی اولیه سیستم دفاعی کافی بوده اما شدت سیگنال‌دهی محدود باقی مانده است. در مقابل، در تیمار GABA700مقدار بیشتر GABA احتمالاً سبب تجمع بیشتر مولکول‌های سیگنال‌دهنده مانند ROS و فعال‌سازی قوی‌تر مسیر MAPK شده و در نتیجه بیان ژن‌های *MKK2* و *EREB* به شدت افزایش یافته است. چنین پاسخ وابسته به دوز در مطالعات مربوط به GABAنیز گزارش شده است؛ به‌طوری‌که غلظت‌های بالاتر GABA معمولاً پاسخ‌های دفاعی و تحمل به تنش را تقویت می‌کنند.

از نظر فیزیولوژیکی، افزایش بیان این ژن‌ها نشان می‌دهد که GABA باعث تقویت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی، تنظیم تعادل یونی و بهبود تحمل گیاه نسبت به تنش شده است. فعال شدن *MKK2* می‌تواند آبشارهای فسفریلاسیون را تحریک کرده و در ادامه فاکتورهای رونویسی مانند *EREB* را فعال کند؛ بنابراین افزایش همزمان این دو ژن بیانگر هماهنگی بین مسیرهای انتقال پیام و تنظیم رونویسی در پاسخ به GABA در اثر دو تیمار گابا است. پیام رسانی گابا همراه با تغییرات در بیان ژن های مختلف است (۱۷). نتایج ما با نتایج دیگر تحقیقات در این زمینه همسو است. برای مثال، اثر تحریکی تیمار گابا بر بیان ژن های مسیر فنیل پروپانوئیدی مثل PAL, 4CL, C4H, CHS همسو با نتایج این تحقیق است (۲). Ji و همکاران (۳) *SlGAD1* را به عنوان ژن پاسخ دهنده به گابا معرفی کردند که از طریق آن مقاوت گیاه به تنش شوری القا می شود. در گیاه *Vicia faba*، کاربرد گابا از طریق القا بیان ژن های دفاعی و متابولیسم ثانویه منجر به ارتقا مقاومت گیاه به تنش خشکی شد (۲۴). پیام رسانی گابا در *Brassica napus* موجب ارتقا تحمل تنش خشکی با تحریک سیستم دفاعی شد (۲۱). برای پوشش خلاهای تحقیقاتی، مطالعات توالی‌یابی نسل جدید[5] پیشنهاد می شود.

نتیجه گیری

در مجموع، نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که کاربرد خارجی GABA توانسته است موجب القا پاسخ های اپی ژنتیک شود. شکی نیست که DNA متیلاسیون رخدادی مهم در تنظیم ساختار کروماتین و تنظیم ژن در سطح قبل از نسخه برداری است. همچنین، افزودن گابا به محیط کشت بیان ژن‌های کلیدی درگیر در انتقال

[5] NGS (Next-Generation Sequencing)

DOI :10.22034/cmr.2026.8821.3357
مقاله پژوهشی، صفحات ۲۹۱-۳۰۳

پیام و تنظیم بیان ژن را تحت تاثیر قرار داد و غلظت ۷۰۰ نسبت به ۳۰۰ اثر قوی‌تری داشت. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که GABA به صورت وابسته به غلظت، مسیرهای پیام رسانی دفاعی گیاه را فعال کرده و می تواند موجب تحریک متابولیسم ثانویه شود. این یافته ها برای تولیدکنندگان متابولیت های ثانویه دارای ارزش دارویی ارزشمند است و در مقیاس بزرگتر صنعتی می تواند کاربردی شود. بدلیل محدودیت های تحقیق به ویژه مالی، این تحقیق در شرایط کنترل شده آزمایشگاهی با سنجش های محدودی انجام شده است. لذا در تحقیقات آتی، میزان وسیعتری از غلظت ها و تعداد بیشتری سنجش های مولکولی و فیزیولوژیک برای ارتقا دانش ضروری است.

تضاد منافع

نویسندگان اعلام می کنند که هیچ تضاد منافعی ندارند.

فهرست منابع

1. Abedi, S., Iranbakhsh, A., Ardebili, Z.O. and Ebadi, M., (2021). Nitric oxide and selenium nanoparticles confer changes in growth, metabolism, antioxidant machinery, gene expression, and flowering in chicory (*Cichorium intybus* L.): potential benefits and risk assessment. Environmental Science and Pollution Research, 28(3), 3136-3148. https://doi.org/10.1007/s11356-020-10706-2
2. Ali, M., Baek, K., Park SU (2023). γ-Aminobutyric acid (GABA) mediated stilbene biosynthesis and alleviated oxidative stress induced by UV-C radiation during peanuts germination. Acta Physiologiae Plantarum 45(2), 32.
3. Ji J, Zheng L, Yue J, Yao X, Liang Y, Sun Y, (2025). Comparative transcriptome analysis revealed that tomato response to salt stress induced by exogenous GABA and functional verification of SlGAD1. BMC Plant Biology 25(1):211
4. Chen, X., Xu, X., Shen, X., Li, H., Zhu, C., Chen, R., Munir, N., Zhang, Z., Chen, Y., Xuhan, X. and Lin, Y., (2020). Genome-wide investigation of DNA methylation dynamics reveals a critical role of DNA demethylation during the early somatic embryogenesis of Dimocarpus longan Lour. Tree Physiology, 40(12), 1807-1826.
5. Darigh, F., Iranbakhsh, A., Ardebili, Z.O., Ebadi, M. and Hassanpour, H., (2022). Simulated microgravity contributed to modification of callogenesis performance and secondary metabolite production in Cannabis Indica. Plant Physiology and Biochemistry, 186, 157-168.
6. Darigh, F., Iranbakhsh, A., Oraghi Ardebili, Z. and Ebadi, M., (2023). Non-thermal plasma improved callogenesis performance and elicited the production of cannabinoids by modifying DNA methylome, expression of WRKY1 and ERF1B transcription factors, and expression of genes that contributed to the biosynthesis of cannabinoids. Protoplasma, 260(1), 159-170.
7. Fromm, H., (2020). GABA signaling in plants: targeting the missing pieces of the puzzle. Journal of Experimental Botany, 71(20), 6238-6245.
8. He, F., Shen, H., Lin, C., Fu, H., Sheteiwy, M.S., Guan, Y., Huang, Y. and Hu, J., (2017). Transcriptome analysis of chilling-imbibed embryo revealed membrane recovery related genes in maize. Frontiers in plant science, 7, 1978.
9. Hu, Q., Fu, Y., Guan, Y., Lin, C., Cao, D., Hu, W., Sheteiwy, M. and Hu, J., (2016). Inhibitory effect of chemical combinations on seed germination and pre-harvest sprouting in hybrid

مقاله پژوهشی، صفحات ۲۹۱-۳۰۳ DOI :10.22034/cmr.2026.8821.3357

rice. Plant Growth Regulation 80(3), 281-289.
10. Hu, Q., Lin, C., Guan, Y., Sheteiwy, M.S., Hu, W. and Hu, J., (2017). Inhibitory effect of eugenol on seed germination and pre-harvest sprouting of hybrid rice (Oryza sativa L.). Scientific reports, 7(1), 1-9.
11. Iranbakhsh, A., Ardebili, Z.O. and Ardebili, N.O., (2021). Gene regulation by H2S in plants. In Hydrogen Sulfide in Plant Biology (pp. 171-199). Academic Press, Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85862-5.00014-2
12. Iranbakhsh, A., Ardebili, Z.O. and Ardebili, N.O., (2021). Gene regulation by NO in plants. In nitric oxide in Plant Biology (Chapter 27). Academic Press, Elsevier.
13. Jia, H., Wang, X., Wei, T., Zhou, R., Muhammad, H., Hua, L., Ren, X., Guo, J. and Ding, Y., (2019). Accumulation and fixation of Cd by tomato cell wall pectin under Cd stress. Environmental and Experimental Botany, 167, p.103829.
14. Jin, X., Liu, T., Xu, J., Gao, Z. and Hu, X., (2019). Exogenous GABA enhances muskmelon tolerance to salinity-alkalinity stress by regulating redox balance and chlorophyll biosynthesis. BMC plant biology, 19(1), p.48.
15. Lancien, M. and Roberts, M.R., (2006). Regulation of Arabidopsis thaliana 14-3-3 gene expression by γ-aminobutyric acid. Plant, cell & environment, 29(7), pp.1430-1436.
16. Li, X., Kim, Y.B., Uddin, M.R., Lee, S., Kim, S.J. and Park, S.U., (2013). Influence of light on the free amino acid content and γ-aminobutyric acid synthesis in Brassica juncea seedlings. Journal of Agricultural and food chemistry, 61(36), pp.8624-8631
17. Liu W, Li Y, Su S, Liu C, Chen J, Zhang S. (2018). Roles of γ-aminobutyric acid on salinity-responsive genes at transcriptomic level in poplar: involving in abscisic acid and ethylene-signalling pathways. Planta 248(3), 675-90.
18. Liu, M., Bai, M., Yue, J., Fei, X. and Xia, X., (2023). Integrating transcriptome and metabolome to explore the growth-promoting mechanisms of GABA in blueberry plantlets. Frontiers in Plant Science, 14, p.1319700.
19. Ramos-Ruiz, R., Martinez, F. and Knauf-Beiter, G., (2019). The effects of GABA in plants. Cogent Food & Agriculture, 5(1), p.1670553.
20. Mirakhorli, T., Oraghi Ardebili, Z., Ladan-Moghadam, A. and Danaee, E., (2022). Nitric oxide improved growth and yield in soybean (Glycine max) by mediating physiological, anatomical, and transcriptional modifications. Journal of Plant Growth Regulation, 41(3), 1331-1343.
21. Palabıyık, Ş., Çetinkaya, İ., Öztürk, T.A. and Bor, M., (2024). Flagellin Induced GABA-shunt improves Drought stress tolerance in Brassica napus L. BMC Plant Biology, 24(1), p.864.
22. Oumarou Abdoulaye, A., Lu, H., Zhu, Y., Alhaj Hamoud, Y. and Sheteiwy, M., (2019). The global trend of the net irrigation water requirement of maize from 1960 to 2050. Climate, 7(10), p.124.
23. Priya, M., Sharma, L., Kaur, R., Bindumadhava, H., Nair, R.M., Siddique, K.H.M. and Nayyar, H., (2019). GABA (γ-aminobutyric acid), as a thermo-protectant, to improve the reproductive function of heat-stressed mungbean plants. Scientific reports, 9(1), p.7788.
24. Seifikalhor M, Niknam V, Ebrahimzadeh H (2026). Enhancing drought tolerance in faba bean (Vicia faba L.) by optimizing gamma-aminobutyric acid (GABA) supplementation: physiological,

مقاله پژوهشی، صفحات ۲۹۱-۳۰۳
DOI :10.22034/cmr.2026.8821.3357

biochemical and molecular insights. Protoplasma 263(2), 345-62.
25. Sheteiwy, M.S., Shao, H., Qi, W., Daly, P., Sharma, A., Shaghaleh, H., Hamoud, Y.A., El-Esawi, M.A., Pan, R., Wan, Q. and Lu, H., (2021). Seed priming and foliar application with jasmonic acid enhance salinity stress tolerance of soybean (Glycine max L.) seedlings. Journal of the Science of Food and Agriculture, 101(5), 2027-2041.
26. Teige, M., Scheikl, E., Eulgem, T., Doczi, R., Ichimura, K., Shinozaki, K., Dangl, J.L. and Hirt, H., (2004). The MKK2 pathway mediates cold and salt stress signaling in Arabidopsis. Molecular cell, 15(1), 141-152.
27. Villalba-Bermell, P., Marquez-Molins, J., Marques, M.C., Hernandez-Azurdia, A.G., Corell-Sierra, J., Pico, B., Monforte, A.J., Elena, S.F. and Gomez, G.G., (2021). Combined Stress Conditions in Melon Induce Non-additive Effects in the Core miRNA Regulatory Network. Frontiers in plant science, 12, 769093-769093.
28. Wang, S. and Chen, J.G., 2014. Regulation of cell fate determination by single-repeat R3 MYB transcription factors in Arabidopsis. Frontiers in Plant Science, 5, p.133.
29. Wu, Y., Li, X., Zhang, J., Zhao, H., Tan, S., Xu, W., Pan, J., Yang, F. and Pi, E., 2022. ERF subfamily transcription factors and their function in plant responses to abiotic stresses. Frontiers in Plant Science, 13, p.1042084
30. Xie, Y., Huhn, K., Brandt, R., Potschin, M., Bieker, S., Straub, D., Doll, J., Drechsler, T., Zentgraf, U. and Wenkel, S., 2014. REVOLUTA and WRKY53 connect early and late leaf development in Arabidopsis. Development, 141(24), 4772-4783.
31. Xu, B., Long, Y., Feng, X., Zhu, X., Sai, N., Chirkova, L., Betts, A., Herrmann, J., Edwards, E.J., Okamoto, M. and Hedrich, R., 2021. GABA signalling modulates stomatal opening to enhance plant water use efficiency and drought resilience. Nature communications, 12(1), 1-13.
32. Yong, B., Xie, H., Li, Z., Li, Y.P., Zhang, Y., Nie, G., Zhang, X.Q., Ma, X., Huang, L.K., Yan, Y.H. and Peng, Y., 2017. Exogenous application of GABA improves PEG-induced drought tolerance positively associated with GABA-shunt, polyamines, and proline metabolism in white clover. Frontiers in physiology, 8, p.1107.

مقاله پژوهشی، صفحات ۲۹۱-۳۰۳
DOI :10.22034/cmr.2026.8821.3357

The Effect of GABA On DNA methylation and expression of *MKK2* and *EREB* genes in Henbane-derived callus

Zahra Mehravar[1], Alireza Iranbakhsh[1*], Mostafa Ebadi[2], Zahra Oraghi Ardebili[3], Azadeh Hekmat[1]

[1]Department of Biology, SR.C., Islamic Azad University, Tehran, Iran.
[22]Department of Biology, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran
[3]Department of Biology, Ga.C., Islamic Azad University, Garmsar, Iran
[*]*Corresponding Author Email*: iranbakhsh@iau.ac.ir

Abstract:
There is no denying the fact that DNA methylation is an important event in the regulation of chromatin structure and gene regulation at the pre-transcriptional level. This study investigated epigenetic changes, particularly DNA methylation and transcriptional behavior of the *EREB* and *MKK2* genes, in the callus of the hemp plant (*Hyoscyamus niger*) in response to the addition of aminobutyric acid (GABA) to the culture medium in vitro. Leaf explants from sterile seedlings were cultured in medium containing benzyladenine (0.5 mgL^{-1}) and dichlorophenoxy acetic acid (0.5 mgL^{-1}) along with different concentrations of GABA, including 0, 300, and 700 µM. GABA treatment at low concentration increased the callus biomass. Whereas high concentrations of GABA were associated with a decrease in the callus fresh weight. The demethylation level decreased by 21.4% in response to GABA treatments. Low GABA concentration decreased the hemimethylation rate by 15.4%, while high GABA concentration increased this index by 7.7%. The percentages of internal cytosine methylation in GABA-treated groups were, on average, 25% lower than the control group. The percentages of complete methylation in GABA-treated groups were reduced by 21%. Adding GABA at low concentration to the culture medium increased the expression of *the MKK2* gene by 7.9-fold. High GABA concentration led to a sharp increase in this gene by about 24-fold. *EREB* gene expression increased due to GABA treatments. Therefore, we concluded that GABA activates plant defense signaling pathways in a concentration-dependent manner and can stimulate secondary metabolism.

Keywords: Epigenetics; Elicitor; Callus; GABA; Gene expression