علوم باغبانی ایران
دورهٔ ۴۶، شمارهٔ ۳، پاییز ۱۳۹۴ (ص ۳۸۶-۳۷۹)

مقایسهٔ کمّی بیان ژن‌های CBF1 و CBF4 تحت تنش سرما در ارقام انگور وینیفرا (*Vitis vinifera* L.) خلیلی دانه‌دار، شاهرودی و گونهٔ ریپاریا (*Vitis riparia*)

علی عبادی[1*]، مریم کریمی علویجه[2]، سید امیر موسوی[3] و سید علی‌رضا سلامی[4]
۱، ۲ و ۴. استاد، دانشجوی سابق دکتری و استادیار پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج
۳. دانشیار پژوهشگاه مهندسی ژنتیک ایران
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۲/۵ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۳/۵/۲۶)

چکیده

با توجه به اینکه انگور از جنبهٔ اقتصادی اهمیت خاصی دارد، انجام مطالعاتی برای بررسی جنبه‌های متفاوت فرایندهایی که منجر به ایجاد مقاومت در برابر سرماهای غیرمنتظرهٔ پاییز یا دیررس بهاره می‌شود، ضروری به نظر می‌رسد. در این راستا بررسی بیان ژن‌هایی که موجب افزایش تحمل به سرما می‌شوند اهمیت ویژه‌ای دارد. لازمهٔ بیان ژن‌های سنتزکنندهٔ پروتئین‌هایی که در سازگاری به سرما نقش دارند گروهی از عوامل رونویسی‌اند. در این آزمایش تفاوت بیان دو عامل رونویسی CBF1 و CBF4 در ارقام انگور خلیلی دانه‌دار، شاهرودی و گونهٔ ریپاریا تحت تنش سرما مقایسه شد. نتایج نشان داد بیان ژن CBF1 در دقایق اولیهٔ بعد از تنش سرما افزایش نشان داد و انگور ریپاریا بیان بیشتری نسبت به دو رقم انگور وینیفرا داشت، همچنین کمترین میزان بیان ژن CBF1 مربوط به رقم شاهرودی بود که بعد از گذشت یک روز از شروع تنش مشاهده شد. در مورد ژن CBF4 افزایش بیان با گذشت ساعت‌های اولیهٔ پس از تنش آغاز شد و مشابه ژن CBF1 بیشترین بیان مربوط به انگور ریپاریا بود. مقایسهٔ میزان بیان این دو ژن در انگور ریپاریا نشان داد که به‌طورکلی، میزان بیان ژن CBF4 حدود ۱۰ برابر میزان بیان ژن CBF1 بود.

واژه‌های کلیدی: انگور، بیان ژن، تنش سرما، عوامل رونویسی، CBF1، CBF4.

مقدمه

دمای کم از عوامل محیطی مهمی است که رشد، تولید و پراکنش محصولات کشاورزی را محدود می‌کند. هرساله به‌دلیل سرماهای غیرمنتظره در پاییز یا سرماهای دیررس بهاره خسارت‌های چشمگیری به گیاهان وارد می‌شود. گیاهان در پاسخ به شرایط تنش یک‌سری تغییرات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی نشان می‌دهند که گیاه را قادر به بقا و تولید مثل می‌کند. زمانی که گیاه در معرض تنش‌های غیرزنده قرار می‌گیرد، مجموعه‌ای از ژن‌ها با عملکردهای متفاوت القا یا خاموش می‌شوند. محصول پروتئینی این ژن‌ها را می‌توان به دو گروه تقسیم کرد. گروه اول شامل پروتئین‌های عملکردی هستند. این پروتئین‌ها به‌طور مستقیم گیاهان را از صدمات تنش محیطی حفاظت می‌کنند. گروه دوم شامل پروتئین‌هایی هستند که در طبیعت به‌منزلهٔ تنظیم‌کننده‌اند و انتقال سیگنال و بیان ژن‌های پاسخ‌گو به سرما را کنترل می‌کنند. بررسی وظایف این ژن‌ها برای فهم بیشتر مکانیسم‌های مدیریتی گیاه در شرایط تنش‌های غیرزنده ضروری است و به دستکاری‌های ژنتیکی برای افزایش تحمل گیاه به استرس کمک می‌کند (Agarwal *et al*., 2006; Lata

* تلفن: ۰۹۱۲۵۶۷۷۵۲۱
E-mail: aebadi@ut.ac.ir

(& Prasad, 2011; Shinozaki, 2007). ژنتیک کلاسیک، صفت تحمل به تنش‌ها در گیاهان را به‌صورت چندژنی و کمّی گروه‌بندی می‌کند. از این‌رو دستکاری مسیرهای وابسته به تنش‌های محیطی با استفاده از تکنیک‌های مولکولی مدرن نیز سخت است. دستکاری یک ژن رمزکنندهٔ پروتئین عملکردی، ممکن است سبب ایجاد برخی درجه‌های تحمل شود، ولی موجب ایجاد تحمل کافی به بیشتر تنش‌های غیرزنده نمی‌شود. بدین ترتیب گروه دیگری از ژن‌ها به نام ژن‌های رمزکنندهٔ پروتئین‌های تنظیم‌کننده برای مهندسی ژنتیک مدنظر قرار گرفتند. چنین ژن‌هایی نقش مهمی در بقای گیاهان تحت شرایط تنش دارند و به‌منزلهٔ تنظیم‌کنندهٔ اصلی گروه ژن‌های پایین‌دست پاسخ‌گو به تنش عمل می‌کنند. بنابراین، بیان بسیاری از ژن‌های پاسخ‌گو به تنش‌های غیرزنده از راه دستکاری یک ژن تنظیم‌کننده قابل تغییر است و بدین ترتیب می‌توان رفتار گیاهان تحت شرایط تنش را مدیریت کرد (Thomashow, 2001; Century *et al*., 2008; Yang *et al*., 2011). پروتئین‌های CBFs (عناصر متصل‌شونده به تکرار C[1]) در گیاهان هنگام مواجهه با تنش‌های غیرزنده تأثیر حیاتی دارند. ژنوم آرابیدوبسیس شش ژن DREB1/CBF دارد که عبارت‌اند از DREB1A/CBF3، DREB1B/CBF1، DREB1C/CBF2، DREB1D/CBF4، DDF1/DREB1F و DDF2/DREB1E (Sakuma *et al*., 2002).

عوامل رونویسی DREB1/CBF در بسیاری از گیاهان سازگار به سرما مانند کلزا (Jaglo *et al*., 2001) و جو (Choi *et al*., 2002) و گیاهانی که به سرما سازگار نیستند مانند گوجه‌فرنگی و برنج (Dubouzet *et al*., 2003; Zhang *et al*., 2004) وجود دارند. وجود مسیرهای CBF/DREB در درختان که ظرفیت سازگاری به سرمای بالایی دارند نیز بررسی شده است (Puhakainen *et al*., 2004). ارتولوگ‌های DREB1/CBF در تعدادی از گیاهان چوبی ازجمله توس (Welling & Palva, 2008)، اکالیپتوس (Navarro *et al*., 2009) و انگور (Xiao *et al*., 2006) شناخته شده‌اند. پروتئین‌های متعلق به خانوادهٔ CBF/DREB، دمین متصل‌شونده به DNA بسیار حفاظت‌شده‌ای دارند که دمین AP2/ERF نامیده می‌شود و حدود ۶۰ اسید آمینه دارد. این دمین خاص گیاهان است (Riechmenn & Meyerowiz, 1998).

بیان ژن‌های DREB1/CBF تحت تنش‌های مختلف غیرزنده در بسیاری از گونه‌های گیاهی بررسی شده است. بیان اغلب این ژن‌ها یک روند کلی را طی می‌کند، به‌طوری‌که در بسیاری از گونه‌های گیاهی ابتدا بیان افزایش و سپس کاهش می‌یابد و بیشترین بیان بین ۱ تا ۴ ساعت بعد از تیمار سرما حاصل می‌شود. در آرابیدوبسیس ژن‌های CBF1، CBF2 و CBF3 بر اثر تنش سرما میزان بیان بالایی نشان دادند ولی تنش خشکی و شوری چنین تأثیری را بر این ژن‌ها نشان نداده است (Gilmour *et al*., 1998; Liu *et al*., 1998). برخی ژن‌های AREB1/CBFs مانند BrCBF در کلم چینی (Jiang *et al*., 2011)، MbDREB1 در سیب (Yang *et al*., 2011)، OsDREB1F در برنج (Wang *et al*., 2008)، VviDREB1 در نوعی انگور فرنگی (Wang *et al*., 2010) تنها به سرما پاسخ نمی‌دهند، بلکه به شوری زیاد، خشکی و ABA خارجی نیز پاسخ می‌دهند. تصور می‌شود در مسیرهای متفاوت درک تنش‌های غیرزنده توسط سلول، عناصر مشترکی برهمکنش دارند و به‌صورت نقاط مشترکی در این مسیرها عمل می‌کنند. احتمالاً ژن‌های CBF، به‌منزلهٔ نقاط اتصال‌دهندهٔ چندین مسیر عمل می‌کنند و مسیرهای سرما، شوری، خشکی و اسید آبسزیک را به هم مربوط می‌کنند (Qin *et al*., 2007) در انگور ژن CBF4 اغلب به‌وسیلهٔ سرما تحریک می‌شود درحالی‌که CBF1، CBF2 و CBF3 پاسخ بهتری به تنش خشکی نسبت به تنش سرما دارند (Xiao *et al*., 2008).

پروتئین‌های DREB1/CBF دمین متصل‌شونده به DNA به نام AP2 دارند که به‌طور اختصاصی به توالی‌های CRT/DRE متصل شده و نسخه‌برداری از روی این ژن‌ها را که به‌وسیلهٔ این توالی‌ها راه‌اندازی می‌شوند فعال می‌کنند. علاوه بر عناصر CRT/DRE،

1. C-repeat Binding Factor

ژن‌های ICE1 (تحریک‌کنندهٔ بیان CBF)، HOS1 (ژن‌های پاسخگوی سوماتیکی با بیان بالا) و MYB15 بیان ژن‌های DREB1/CBF و ژن‌های پایین‌دست آن‌ها را تنظیم می‌کنند. ICE1 یک فعال‌کنندهٔ نسخه‌برداری ژن CBF3 است که کدکنندهٔ پروتئینی است که به‌طور دائم بیان می‌شود و در هسته عمل می‌کند و به عناصر MYC با توالی CANNTG در پروموتر ژن‌های CBF3 متصل می‌شود و بدین ترتیب بیان آن را افزایش می‌دهد (Chinnusamy *et al.*, 2004). به‌علاوه بررسی موتانت‌های CBF2 که در آن‌ها بیان این ژن مختل شده بود، بیانگر اثر تنظیم‌کنندگی منفی این ژن بر CBF1 و CBF3 بود. بیان ژن‌های CBF/DREB1 تا حدودی به‌وسیلهٔ خودشان کنترل می‌شود (Novillo *et al.*, 2004). به‌طورکلی، این سه پروتئین در قالب شبکه‌ای عمل می‌کنند و برای تنظیم بیان ژن‌های CBF و کنترل پاسخ گیاه به دمای کم با همدیگر تعامل دارند.

ارقام گونهٔ وینیفرا در سرمای تدریجی، دماهای زمستان را تا ۱۵ـ درجهٔ سانتی‌گراد بدون آسیب سرمایی تحمل می‌کنند، درحالی‌که گونه‌های آسیایی و آمریکای شمالی دماهای ۳۵ـ تا ۴۰ـ درجهٔ سانتی‌گراد را می‌توانند تحمل کنند (Mullins *et al.*, 1992; Fennell *et al.*, 2004). در این پژوهش بیان دو عامل رونویسی CBF1 و CBF4 که در فعال‌کردن زنجیرهٔ فعال‌سازی ژن‌های دخیل در مقاومت به سرما فعالیت می‌کنند به‌وسیلهٔ روش کمّی در دو رقم انگور وینیفرا (خلیلی دانه‌دار و شاهرودی) و انگور ریپاریا با هدف بررسی علل تحمل متفاوت این دو گونه از انگور بررسی‌شده قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

قلمه‌های انگور از بوتهٔ رقم خلیلی دانه‌دار که پس از سرمای زمستان سال ۱۳۸۶ زنده مانده بود و رقم شاهرودی که بوتهٔ آن در زمستان سال ۱۳۸۶ تا سطح زمین خشکیده بود و دوباره در بهار سبز شده بود، در زمستان سال ۱۳۸۹ از مرکز تحقیقات گروه علوم باغبانی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران جمع‌آوری و به گلخانه‌های گروه علوم باغبانی انتقال یافت. این قلمه‌ها در گلدان‌ها کشت شد و شرایط محیطی مناسب برای ریشه‌دار شدن و رشد قلمه‌ها فراهم شد. گیاهان رشدیافتهٔ یک‌ساله به فیتوترون‌های با شرایط دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد و شدت نور فلورسنت ۲۰ تا ۲۵ نانومول بر مترمربع بر ثانیه که به‌طور دائمی بود، منتقل شدند. در زمان‌های مشخص (نیم ساعت، ۴ ساعت، ۸ ساعت، ۲۴ ساعت، ۷۲ ساعت، ۱۲۰ ساعت، ۲۴۰ ساعت) نمونه‌گیری از برگ‌ها انجام شد و نمونه‌ها در داخل ازت مایع به فریزر ۸۰- درجهٔ سانتی‌گراد منتقل شدند. روشی که در این پژوهش برای استخراج RNA استفاده شد روش تغییر یافته‌ای از استخراج RNA از بافت حبهٔ انگور بود که اولین بار Reid *et al.* (2006) آن را به‌کار گرفتند.

برای ساختن تمام محلول‌ها از آب تیمارشده با DEPC استفاده شد. همهٔ لوازم شیشه‌ای و تیوب‌ها با آب دارای ۱ درصد DEPC به‌مدت یک شب تیمار شده و سپس دو مرتبه به‌مدت ۴۵ دقیقه اتوکلاو شدند. هاون‌های چینی استفاده‌شده برای پودرکردن بافت به‌مدت ۳ ساعت در دمای ۲۰۰ درجهٔ سانتی‌گراد حرارت داده و قبل از مصرف در دمای ۲۰- درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شدند.

با توجه به اطلاعات ثبت‌شده در مورد این ژن‌ها در بانک اطلاعات داده‌ها (NCBI) و مراجعه به سایت جینواسکوپ (Genoscop) که اطلاعات کاملی از توالی‌یابی ژنوم انگور در آن ثبت شده است، به طراحی آغازگرهای مربوط به دو عامل رونویسی CBF1 و CBF4 پرداخته شد. توجه به این نکته ضروری بود که این ژن‌ها توالی‌هایی با شباهت زیاد دارند و طی طراحی آغازگر از این توالی‌های مشابه چشم‌پوشی شد، زیرا مکان‌های مناسبی برای طراحی آغازگر نبودند. سپس با استفاده از برنامهٔ وکتور ان تی آی آغازگرها طراحی شدند (جدول ۱) و دمای این آغازگرها در برنامهٔ الیگوکلکیولیت بررسی شد. در این پژوهش برای آزمایش پی سی آر کمی از دستگاه Real time PCR مدل Applied Biosystems استفاده شد.

به‌منظور انجام واکنش ریل تایم پی سی آر غلظت هر آغازگر ۱۰ مایکرو مولار در واکنش نهایی به‌کار

گرفته شد. همچنین ۵۰ نانوگرم از cDNA به‌منزلهٔ الگو در هر واکنش استفاده شد. برای آزمایش پی سی آر کمی حداقل ۳ تکرار برای هر نمونه استفاده شد. ژن رفرنس استفاده‌شده در این آزمایش ژن EF1α بود که بر صورت اختصاصی براساس ژنوم انگور طراحی شد.

جدول ۱. توالی و اندازهٔ قطعات تکثیری آغازگرهای اختصاصی طراحی‌شده در انگور برای استفاده در آزمایش پی سی آر کمّی

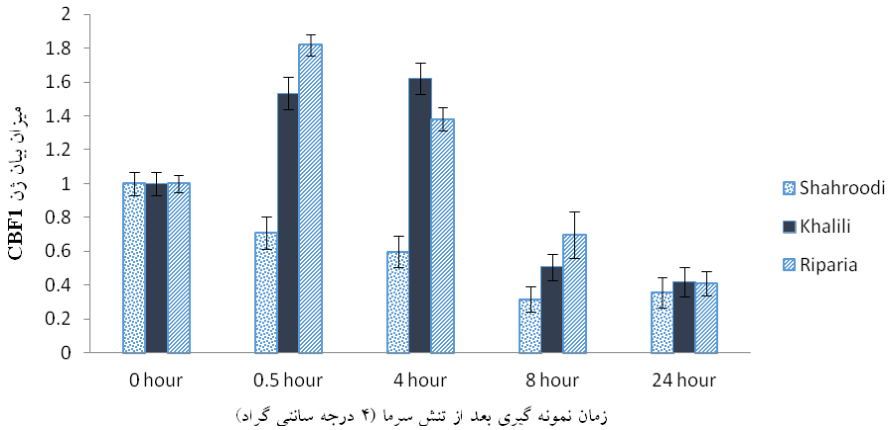
ژن	توالی آغازگر	اندازهٔ قطعه تکثیری	دمای اتصال °C
CBF1	F:AGAGAAGGTTGGAGATGGTTCA R:CAGGTGGAGTAAGGAGCAAAC	142 bp	۶۰
CBF4	F:ACCCTCACCCGCTCGTATG R:CCGCGTCTCCCGAAACTT	128 bp	۶۰
EF1α	F:CGGGCAAGAGATACCTCAAT R:AGAGCCTCTCCCTCAAAAGG	84 bp	۶۰

برای سنجش میزان بیان ژن در دستگاه ریل تایم از رنگ سایبرگرین استفاده شد. به‌منظور مقایسهٔ دو نمونه مختلف روش دلتا دلتا سی تی (ΔΔCT) به‌کار گرفته شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها براساس روش Livak & Schmittgen (2001) انجام گرفت و برای محاسبهٔ تغییرات بیان ژن‌ها از روش $۲^{(-\Delta\Delta CT)}$ استفاده شد.

نتایج و بحث

بیان ژن CBF1 در ساعت‌های مختلف پس از اعمال تنش سرما

نتایج حاصل از بررسی بیان ژن CBF1 در مراحل مختلف نمونه‌گیری بعد از تنش سرمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد مشخص کرد که بیان این ژن در دقایق اولیه بعد از آغاز تنش در گونه ریپاریا و رقم خلیلی دانه‌دار افزایش یافت، درحالی‌که در رقم شاهرودی این افزایش بیان مشاهده نشد و روند کاهشی بیان ژن در این رقم تا انتهای روز اول ادامه داشت. گونهٔ ریپاریا بیشترین میزان بیان این ژن را در محدودهٔ زمانی نیم ساعت بعد از اعمال تنش و رقم خلیلی دانه‌دار بیشترین میزان بیان را ۴ ساعت بعد از آغاز تنش نشان داد (شکل۱). روند نزولی بیان ژن CBF1 در هر سه انگور ۸ ساعت بعد از آغاز اعمال تنش مشاهده شد و یک روز بعد از شروع تنش بیان این ژن در هر سه تفاوت معناداری نداشت. تفاوت میزان بیان ژن CBF1 بین رقم شاهرودی با گونهٔ ریپاریا و رقم خلیلی دانه‌دار در سه زمان نیم، ۴ و ۸ ساعت معنادار بود، در همین زمان‌ها رقم خلیلی دانه‌دار با گونهٔ ریپاریا از نظر میزان بیان ژن CBF1 تفاوت معنادار داشت، ولی این تفاوت به نسبت کمتر از تفاوت بین رقم شاهرودی با گونهٔ ریپاریا بود. بین رقم خلیلی دانه‌دار و شاهرودی در این زمان‌ها تفاوت معنادار بود. بااین‌حال رقم خلیلی دانه‌دار و ریپاریا در ۸ ساعت تفاوت معناداری نداشتند، ولی تفاوت آن‌ها با رقم شاهرودی معنادار بود، اما در ۲۴ ساعت میزان بیان بین آن‌ها معنادار نبود (شکل۱).



شکل ۱. میزان بیان ژن CBF1 در سه انگور شاهرودی، خلیلی دانه‌دار و ریپاریا در زمان‌های مختلف

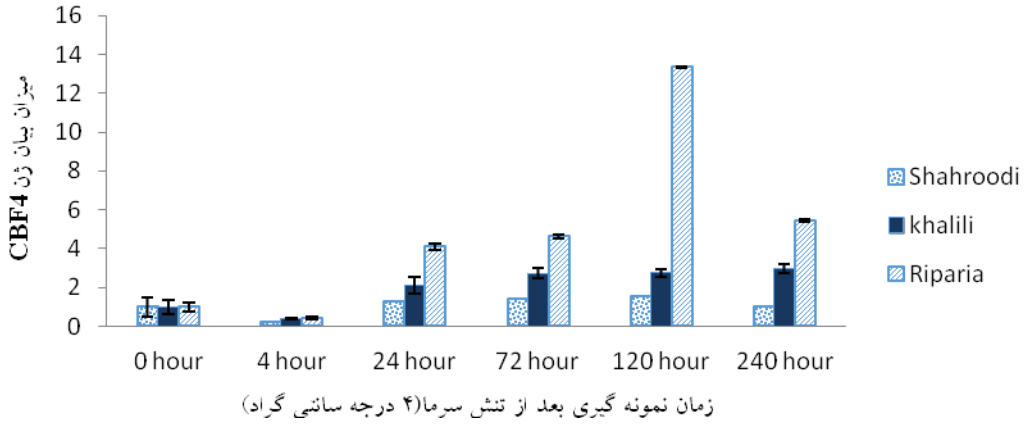
در پژوهشی ژن CBF1 که از خانوادهٔ عوامل رونویسی است و تحت تنش سرما شروع به بیان می‌کند، طی ۱۵ دقیقه بعد از قرارگیری در دمای تنش‌زا فعالیت خود را آغاز کرد (Gilmour *et al*., 1998; Stockinger *et al*., 1997). در مطالعه بر روی آرابیدوبسیس‌های تراریخت، تنش سرمای ۵ درجهٔ سانتی‌گراد سبب افزایش بیان ژن CBF1 در ساعت‌های اولیه شد. همچنین آرابیدوبسیس‌هایی که به‌منزلهٔ ارقام مقاوم در نظر گرفته شده بودند نسبت به آرابیدوبسیس‌های شاهد بیان بالایی را برای این ژن نشان دادند (Mckhann *et al*., 2008). بررسی دیگری بر روی اکالیپتوس، بیانگر آغاز بیان دو آلل ژن CBF1a,b در حدود نیم ساعت بعد از تنش بود که بیشترین میزان بیان برای این ژن در اکالیپتوس‌های تیمارشده در سرمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد، دو ساعت بعد از اعمال سرما مشاهده شد و به‌طورکلی، میزان بیان آلل CBF1a نسبت به آلل CBF1b بیشتر بود (kayal *et al*., 2006). در گوجه‌فرنگی نیز رونوشت‌های ژن LeCBF1 به‌سرعت در پاسخ به سرما تجمع پیدا کردند (Jaglo *et al*., 2001). در مطالعات مشابه با پژوهش قبلی بیان این ژن در گوجه‌فرنگی در شرایط نور دائم و فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی مقایسه شد. در شرایط نور دائم بیشترین رونوشت حدود دو ساعت بعد از آغاز تنش مشاهده شد و حدود ۲۴ ساعت بعد از آغاز تیمار به سطح بیان این ژن در گیاهان تیمارنشده رسید. در مقایسهٔ بیشترین بیان این ژن در فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی، بیشترین بیان در ۱۶ ساعت بعد از اعمال تنش مشاهده شد و بعد از ۲۴ ساعت کاهش نشان داد. البته باید در نظر داشت که میزان کلی بیان در شرایط نور دائم بیشتر از شرایط فتوپریود روشنایی و تاریکی است. دیگر پژوهش انجام‌شده بر روی این ژن در گیاهان دوسالهٔ انگور رقم شاردونی بوده است. نتایج نشان داد که بیان ژن CBF1 در فاصلهٔ کوتاهی بعد از اعمال تنش آغاز شد و تا حدود ۸ ساعت بعد از آن ادامه داشت و بعد از ۱۲ ساعت بیان این ژن بسیار کم بود (Xiao *et al*., 2006). نتایج بیان این ژن در رقم خلیلی دانه‌دار و گونهٔ ریپاریا نیز با نتایج آزمایش‌های گزارش‌شده مطابقت دارد. بنابراین، در دقایق اولیهٔ بعد از تنش، اولین گروه عوامل رونویسی که برای فعال‌کردن ژن‌های پایین‌دست (COR) لازم‌اند، فعالیت خود را آغاز می‌کنند تا پروتئین‌های لازم برای سازگاری گیاه با شرایط احتمالی دمای پایین سنتز شوند.

بیان ژن CBF4 در ساعت‌های مختلف پس از اعمال تنش سرما

نتایج بررسی کمّی این ژن در گونهٔ ریپاریا و ارقام ایرانی نشان‌دهندهٔ آغاز بیان از روز اول و تداوم بیان تا روز دهم بعد از آغاز تنش سرما بود. گونهٔ ریپاریا در مورد این ژن نیز بیان بیشتری داشت و بعد از آن رقم خلیلی دانه‌دار بیشترین بیان را نشان داد. گونهٔ ریپاریا روند افزایشی بیان را تا روز پنجم نشان داد و در روز دهم کاهش بیان مشاهده شد. رقم خلیلی دانه‌دار نیز در پاسخ به تنش سرما افزایش بیان داشت، ولی روند افزایشی برای این رقم در مقایسه با گونهٔ ریپاریا بسیار نامحسوس بود و تقریباً تا روز دهم این روند افزایشی مشاهده شد. بین زمان‌های مختلف نمونه‌برداری گونهٔ ریپاریا تفاوت معناداری در بیان ژن CBF4 وجود داشت درحالی‌که برای رقم خلیلی دانه‌دار این تفاوت بین تمام زمان‌ها قابل مشاهده نبود. رقم شاهرودی همان‌طور که در شکل مشاهده می‌شود بر اثر تنش سرما نسبت به زمان شاهد که گیاهان تحت استرس نبوده‌اند افزایش بیان معناداری نداشت (شکل۲). اگرچه در این رقم نیز تداوم بیان ژن CBF4 تا روز دهم قابل مشاهده بود. رقم شاهرودی در بیان این ژن نسبت به گونهٔ ریپاریا که گونهٔ متحمل به تنش سرماست و رقم خلیلی دانه‌دار ضعیف‌تر عمل کرد، بدین ترتیب انتظار می‌رود این رقم به‌دلیل توانایی کم در فعال‌سازی ژن‌های پایین‌دست و به دنبال آن سنتز کمتر پروتئین‌های دخیل در سازگاری به شرایط سرما نسبت به انگور ریپاریا حساسیت بیشتری نشان دهد.

بیان ژن VrCBF4 در بافت‌های بالغ بیش از چند روز ادامه یافت، که نشان‌دهندهٔ تأثیر منحصر به‌فرد این ژن در سازگاری به تنش‌هاست. رونوشت‌های ژن CBF4 در هر دو انگور وینیفرا و ریپاریا و در هر دو برگ جوان و پیر به‌مدت چندین روز قابل ردیابی بود و

سن بیولوژیکی برگ بر روی بیان این ژن اثری نداشته است (Xiao *et al.*, 2008). زمان طولانی افزایش بیان این ژن با ژن BNCBF17 در کلم (Gao *et al.*, 2002)، HvCBF7 در جو (Skinner *et al.*, 2005) و EguCBF1b در اکالیپتوس (Kayal *et al.*, 2006) مشابهت داشت. در پروموتر دو ژن CBF1 و CBF4 توالی مشابهی وجود دارد که محصول پروتئینی ژنی به نام ICEr1 روی آن قرار می‌گیرد و سبب می‌شود این ژن نه‌تنها با سرما بلکه با استرس‌های دیگر نیز تحریک شود (Moody, 2009). شاید بتوان طولانی‌تر بودن محدودهٔ زمان بیان برای ژن CBF4 را نسبت به دیگر CBFها به‌علت وجود توالی‌های بیشتر CRT در پروموتر این ژن دانست که سبب فعال‌بودن این ژن در زمان بیشتری می‌شود برخلاف گزارش موجود در مورد آرابیدوبسیس که بیان این ژن را تنها به تنش خشکی و تیمار با ABA وابسته دانسته است (Haak *et al.*, 2002)، این ژن در انگور تحت تنش سرما نیز بیان دارد. مقایسهٔ بین آرابیدوبسیس‌های تراریخت شده با ژن‌های CBF1 و CBF4 انگور نشان داد که آرابیدوبسیس‌های تراریخت شده با ژن CBF4 تحمل بیشتری به تنش سرمای ۷- درجهٔ سانتی‌گراد داشتند (Siddiqua & Nassuth, 2011).



شکل۲. میزان بیان ژن CBF4 در ارقام انگور شاهرودی و خلیلی دانه‌دار و گونهٔ ریپاریا در زمان‌های مختلف

نتیجه‌گیری کلی

بیان ژن CBF1 در دقایق اولیهٔ بعد از آغاز تنش شروع به افزایش کرد و بیشترین میزان بیان این ژن در انگور گونهٔ ریپاریا در محدودهٔ زمانی نیم ساعت بعد از اعمال تنش و در رقم خلیلی دانه‌دار بیشترین میزان بیان ۴ ساعت بعد از آغاز تنش مشاهده شد. روند نزولی بیان ژن CBF1 در هر سه نوع انگور ۸ ساعت بعد از آغاز اعمال تنش مشاهده شد و یک روز بعد از شروع تنش بیان این ژن در هر سه تفاوت معناداری نداشت. تفاوت بیان ژن CBF1 بین رقم شاهرودی با گونهٔ ریپاریا و رقم خلیلی دانه‌دار در سه زمان نیم، ۴ و ۸ ساعت معنادار بود، درحالی‌که تفاوت بین خلیلی دانه‌دار و ریپاریا کم بود. بیان ژن CBF4 به‌طورکلی، نسبت به میزان بیان ژن CBF1 بالاتر بود و حدود ۱۰ برابر آن بیان داشت. گونهٔ ریپاریا طی ساعت‌های اولیه به‌طور چشمگیری افزایش بیان نشان داد درحالی‌که دو رقم خلیلی دانه‌دار و شاهرودی این شدت بیان را نشان ندادند. نتایج نشان داد عوامل رونویسی بلافاصله برای سازگارکردن و تحمل گیاه به شرایط تنش شروع به بیان می‌کنند. در محدودهٔ زمانی لازم برای به حداکثر رسیدن فعالیت ژن CBF4، ژن CBF1 وظیفهٔ فعال‌کردن ژن‌های پایین‌دست که نقش اساسی در سنتز پروتئین‌های سازگارکننده به سرما را در انگور دارند، به عهده می‌گیرد. اگر شرایط تنش‌زا تداوم نداشته باشد بیان دیگر ژن‌های CBF ضروری به نظر نمی‌رسد. نتایج نشان داد که مقاومت بالاتر گونهٔ ریپاریا و رقم خلیلی دانه‌دار به احتمال زیاد در ارتباط با بیان بیشتر ژن‌های CBF1 و CBF4 آن‌ها بوده است که توانسته ژن‌های پایین‌دست (COR genes) را فعال کند و سبب مقاومت بیشتر آن‌ها نسبت به تنش سرما شود.

REFERENCES

1. Agarwal, P., Agarwal, K., Reddy, P. & Sopory, S. K. (2006). Role of DREB transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants. *Plant Cell Rep*., 25, 1263-1274.
2. Century, K., Reuber, T. L. & Ratcliffe, O. J. (2008). Regulating the regulators: the future prospects for transcription-factor-based agricultural biotechnology products. *Plant Physiology*, 147, 20-29.
3. Chinnusamy, V., Schumaker, K. & Zhu, J. K. (2004). Molecular genetic perspectives on cross-talk and specifcity in abiotic stress signalling in plants. *Journal Experimental Botany*, 55, 225-23.
4. Choi, D. W., Rodriguez, E. M. & Close, T. J. (2002). Barley Cbf3 gene identification, expression pattern, and map location. *Plant Physiology*, 129, 1781-1787.
5. Dubouzet, J. G., Sakuma, Y., Ito, Y., Kasuga, M., Dubouzet, E. G. & Miura, S. (2003). OsDREB genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought-, highsalt- and cold-responsive gene expression. *Plant Journal*, 33, 751-76.
6. Fennell, A. (2004). Freezing tolerance and injury in grapevines. *Journal of Crop Improvement*, 10(1-2), 201-235.
7. Gao, M. J., Allard, G., Byass, L., Flanagan, A.M. & Singh, J. (2002). Regulation and characterization of four CBF transcription factors from Brassica napus. *Plant Molecular Biology*, 49, 459-471.
8. Gilmour, S. J., Zarka, D. G., Stockinger, E. J., Salazar, M. P., Houghton, J. M. & Thomashow, M. F. (1998). Low temperature regulation of Arabidopsis CBF family of AP2 transcriptional activators as an early step in cold-induced COR gene expression. *Plant Journal*, 16, 433-44.
9. Haake, V., Cook, D., Riechmann, J.L., Pineda, O., Thomashow, M.F. & Zhang, J.Z. (2002). Transcription factor CBF4 is a regulator of drought adaptation in arabidopsis. *Plant Physiology*, 130, 639-648.
10. Jaglo, K.R., Kleff, S., Amundsen, K.L., Zhang, X., Haake, V., Zhang, J.Z., Deits, T. & Thomashow, M.F. (2001). Components of the Arabidopsis C-repeat/dehydration-responsive element binding factor cold-response pathway are conserved in Brassica napus and other plant species. *Plant Physiology*, 127, 910-917.
11. Jiang, F., Wang, F., Wu, Z., Li, Y., Shi, G., Hu, J. & Hou, X. (2011). Components of the Arabidopsis CBF cold-response pathway are conserved in non-heading chinese cabbage. *Plant Molecular Biology Reporter*, 29, 525-532.
12. Kayal, E. W., Navarro, M., Marque, G., Keller, G., Marque, C. & Teulieres, C. (2006). Expression profile of CBF-like transcriptional factor genes from Eucalyptus in response to cold. *Journal of Exprerimental Botany*, 10, 2455-2469.
13. Kayal, E. W., Navarro, M., Marque, G., Keller, G., Marque, C. & Teulieres, C. (2006). Expression profile of CBF-like transcriptional factor genes from Eucalyptus in response to cold. *Journal of Exprerimental Botany*, 10, 2455-2469.
14. Lata, C. & Prasad, M. (2011). Role of DREBs in regulation of abiotic stress responses in plants. *Journal Experimental Botany*, 62, 4731-4748.
15. Liu, Q., Kasuga, M., Sakuma, Y., Abe, H., Miura, S. & Goda, H. (1998). Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature responsive gene expression, respectively, in Arabidopsis. *Plant Cell*, 10, 391-406.
16. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2-\Delta\Delta C_T$ method. *Methods*, 25, 402-408.
17. Mckhann, H. I., Gery, C., Berard, A., Leveque, S., Zuther, E., Hincha, D., Mita, S. D., Brunel, D. & Teole, E. (2008). Natural variation in CBF gene sequence, gene expression and freezing tolerance in the Versailles core collection of Arabidopsis thaliana. *BMC Plant Biology*, 8, 1-18.
18. Moody, A. M. (2009). *Molecular aspects of vitis CBF gene activation.* M.Sc. thesis. Guelph University, Canada.
19. Mullins, MG., Bouquet, A. & Williams, L. E. (1992). Biology of the grapevine: *Cambridge University Press.*
20. Navarro, M., Marque, G., Ayax, C., Keller, G., Borges, J. P., Marque, C. & Teulieres, C. (2009). Complementary regulation of four eucalyptus CBF genes under various cold conditions. *Journal Experimental Botany*, 60, 2713-2724.
21. Novillo, F., Alonso, J. M., Ecker, J. R. & Salinas, J. (2004). CBF2/DREB1C is a negative regulator of CBF1/DREB1B and CBF3/DREB1A expression and plays a central role in stress tolerance in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 101, 3985-3990.
22. Puhakainen, T., Li, C., Boije-Malm, M., Kangasjrvi, J., Heino, P. & Palva, E. T. (2004). Short-day potentiation of low temperatureinduced gene expression of a C-repeat-binding factor-controlled gene during cold acclimation in silver birch. *Plant Physiology*, 136, 4299-4307.

23. Qin, Q., Liu, J., Zhang, Z., Peng, R., Xiong, A., Yao, Q. & Chen, J. (2007). Isolation, optimization, and functional analysis of the cDNA encoding transcription factor OsDREB1B in *Oryza Sativa* L. *Molecular Breeding*, 19, 329-340.
24. Reid, K. E., Olsson, N., Schlosser, J., Peng, F. & Lund, S. T. (2006). An optimized grapevine RNA isolation procedure and statistical determination of reference genes for real-time RT-PCR during berry development. *BMC Plant Biology*, 6, 27.
25. Riechmann, J. L. & Meyerowitz, E. M. (1998) The AP2/EREBP family of plant transcription factors. *Journal of Biological Chemistry*, 379, 633-646.
26. Sakuma, Y., Liu, Q., Dubouzet, J. G., Abe, H., Shinozaki, K. & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2002). DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of Arabidopsis DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 290, 998-1009.
27. Shinozaki, K. & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2007). Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *Journal Experimental Botany*, 58, 221-227.
28. Siddiqua, M. & Nassuth, A. (2011). Vitis CBF1 and CBF4 differ in their effect on Arabidopsis abiotic stress tolerance, development and gene expression. *Plant, Cell& Environment*, 34, 1345-1359.
29. Skinner, J. S., von Zitzewitz, J., Szucs, P., Marquez-Cedillo, L., Filichkin, T., Amundsen, K., Stockinger, E. J., Thomashow, M. F., Chen, T. N. N. & Hayes, P. M. (2005). Structural, functional, and phylogenetic characterization of a large CBF gene family in barley. *Plant Molecular Biology*, 59, 533-551.
30. Stockinger, E. J., Gilmour, S. J. & Thomashow, M. F. (1997), Arabidopsis thaliana CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcription activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 94, 1035-1040.
31. Thomashow, M. F. (2001). So what's new in the field of plant cold acclimation? *Plant Physiology*, 125, 89-93.
32. Wang, Q.J., Xu, K.Y., Tong, Z.G., Wang, S. H., Gao, Z.H. & Zhang, J.Y. (2010). Characterization of a new dehydration responsive element binding factor in central arctic cowberry. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 101, 211-21.
33. Wang, Q., Guan, Y., Wu, Y., Chen, H., Chen, F. & Chu, C. (2008). Overexpression of a rice OsDREB1F gene increases salt, drought, and low temperature tolerance in both Arabidopsis and rice. *Plant Molecular Biology*, 67, 589-602.
34. Welling, A. & Palva, T. (2008) Involvement of CBF transcription factors in winter hardiness in Birch. *Plant Physiology*, 147, 1199-1211.
35. Xiao, H., Tattersall, E. A. R., Siddiqua, M. K., Cramer, G. & Nassuth, A. (2008). CBF4 is a unique member of the CBF transcription factor family *of Vitis vinifera* and *Vitis riparia*. *Plant, Cell and Environment*, 31, 1-10.
36. Xiao, H., Siddiqua, M., Braybrook, S. & Nassuth, A. (2006). Three grape CBF/DREB1 genes respond to low temperature, drought and abscisic acid. *Plant, Cell & Environment*, 29, 1410-1421.
37. Yang, W., Liu, X. D., Chi, X. J., Wu, C. A., Li, Y. Z. & Song, L. L. (2011). Dwarf apple MbDREB1 enhances plant tolerance to low temperature, drought, and salt stress via both ABA-dependent and ABA-independent pathways. *Planta*, 233, 219-229.
38. Zhang, X., Fowler, S. G., Cheng, H., Lou, Y., Rhee, S. Y., Stockinger, E. J. & Thomashow, M. F. (2004). Freezing-sensitive tomato has a functional CBF cold response pathway, but a CBF regulon that differs from that of freezing-tolerant Arabidopsis. *Plant Journal*, 39, 905-919.

Iranian Journal of Horticultural Science, Vol. 46, No. 3, Autumn 2015

Quantitative expression analysis of CBF1 and CBF4 genes under cold stress treatments in grape cultivars “Khalili-Danedar”, “Shahroodi” in comparison with Vitis Riparia

Ali Ebadi[1*], Maryam Karimi Alvijeh[2], Seyed Amir Moosavi[3] and Seyed Alireza Salami[4]

1, 2, 4. Professor, Post Graduate Student and Assistant Professor, University College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

3. Assistant Professor, Genetic Engineering Research Institute of Iran

(Received: Feb. 24, 2014 - Accepted: Aug. 17, 2014)

ABSTRACT

With regard to its economic importance of grapevine, study on different aspects of factors that induce hardiness to the unexpected early-season and late-season cold seems to be essential. Some of the transcription factors are essential for synthesis of proteins that are important for cold adaptation. In the present study, differences in the expression patterns of two CBF1 and CBF4 transcription factors were evaluated under cold stress conditions in the “Khalili-Danedar”, “Shahroodi” and “Riparia”. Results showed that expression of CBF1 was increased at early minutes of cold stress and “Riparia” showed higher expression compared with two other genotypes. Also the least expression was recorded for “Shahroodi” after 24 h of cold treatment. Regarding CBF4, increase in the expression was started one hour after cold treatment and similar to the CBF1, the highest expression was recorded for “Riparia”. Results of expression patterns of these two genes in “Riparia” grape showed that expression of CBF4 was about 10 fold of CBF1.

Keywords: CBF1, CBF4, cold stress, gene expression, grape, transcription factors.

* Corresponding author E-mail: aebadi@ut.ac.ir Tel: +98 912 5677521