Agricultural of Biotechnology/Volume 22/ Issue 1/ pp. 25-36/ 2023
DOI: 10.22084/ab.2026.31931.1504

Investigating Changes in Molecular and Computational Analyses in Grape Seedling under Sodium Nitroprusside Treatment

Mohammad Ali Nejatian[1*], Mohammad Rasouli[2], Mahdi Tajalifar[2]

Received Date: 17 November 2023 Accepted Date: 26 December 2023

Abstract

Grapevine (*Vitis vinifera*) is one of the most important horticultural crops in Iran and worldwide, and its performance is strongly affected by environmental stresses, particularly cold. Sodium nitroprusside. Under controlled laboratory conditions. In this study, Initially the kondori grape (*Vitis Vinifera* L.) seedling were subjected to cold stress (zero, two and four weeks at 4^{0c}). To investigate the effect of sodium nitroprusside (SNP) treatment, varius concentrations (20, 40, 60 µM) were added to the culture medium. Foollowing stress Application, RNA was extracted, and cDNA was synthesized using the sinaclon kit. The expression levels of CBF3, CBF4, AND EF1α (as a reference gene) were determined by SYBR Green-based Real-Time PCR. To elucidate the molecular basis, three-dimensional structures of key molecules, including chlorophyll, carotenoids, carbohydrates, proline, protein, antioxidant compounds, APX, POD, CAT. Were Retrived from the PDB database and analyzed using PYMOL software. These analyses focused on the relationship between molecular structure, biochemical function, and their role in mitigating stress efects. RT-PCR results showed that the expression of CBF3 and CBF4 genes was undetectable in all treatments and time points, indicating a transient and time-dependent induction of these genes. Therefore, combining PyMOL-based molecular analyses with biochemical and genetic assessments provides an integrated framework to elucidate the mechanisms underlying cold stress responses and the role of SNP in enhancing structural stability and enzymatic activity in grapevine seedlings. Correlation analysis revealed that increases in one trait were generally accompanied by enhancements in others. Chlorophyll a and b, carotenoids, and carbohydrates were closely coordinated, reflecting a synergistic interaction in photosynthetic performance and carbon metabolism. Antioxidant enzymatic (APX, POD, and CAT) were also positively correlated, indicating a complementary and integrated defense system. This coordinated network suggests that pigments, metabolites, and enzymes collectively contribute to maintaining physiological and biochemical stability of grapevine seedlings under cold stress.

Keywords: Worldwide, Kondori, Gene expression, Biochemical pathways

1. Department of Horticulture, Qazvin Agricultural Research, Education and Promotion Organization, Horticultural Sciences Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Qazvin, Iran
2. Department of Plant Breeding, Tak.c., Islamic Azad University, Takestan, Iran
⁎: Corresponding author Email: ma.nejatian@areeo.ac.ir

فناوری زیستی در کشاورزی/ جلد بیست و دوم/ شمارهٔ اول/ صفحات ۲۵-۳۶/ سال ۱۴۰۲
DOI: 10.22084/ab.2026.31931.1504

بررسی تغییرات مولکولی و تحلیل محاسباتی گیاهچه‌های درون شیشه‌ای انگور تحت تیمارهای سدیم نیتروپروساید

Investigating Changes in Molecular and Computational Analyses in Grape Seedling under Sodium Nitroprusside Treatment

محمدعلی نجاتیان[1*]، محمد رسولی[۲] و مهدی تجلی فر[۲]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۸/۲۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۰/۰۵

چکیده

انگور (*Vitis vinifera*) یکی از مهم‌ترین محصولات باغی ایران و جهان است که عملکرد آن تحت تأثیر تنش‌های محیطی، به‌ویژه سرما، قرار می‌گیرد. در شرایط آزمایشگاهی کنترل‌شده. در این پژوهش، ابتدا گیاهچه های انگور رقم کندوری تحت تنش سرمایی (صفر، دو و چهار هفته در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد) بررسی شد. برای بررسی اثر سدیم نیترو پروساید (SNP)، غلظت‌های مختلف (۲۰، ۴۰ و ۶۰ میکرومولار) به محیط‌کشت افزوده شد. پس از اعمال تنش، RNA استخراج شده، و با استفاده از کیت سینا کلون، cDNA سنتز گردید. بیان ژن CBF3، CBF4 و EF1α (به‌عنوان ژن مرجع) با روش Real-Time PCR مبتنی بر SYBR Green تعیین شد. به‌منظور درک مبانی مولکولی، ساختارهای سه بُعدی مولکول‌های کلیدی شامل کلروفیل، کاروتنوئیدها، کربوهیدرات‌ها، پرولین، پروتئین، ترکیبات آنتی‌اکسیدانتی، آنزیم‌های APX، POD و CAT، از پایگاه PDB و با نرم‌افزار PyMOL تحلیل شدند. این تحلیل‌ها بر ارتباط بین ساختار مولکولی، عملکرد بیوشیمیایی و نقش آن‌ها در کاهش اثرات تنش تمرکز داشتند. نتایج RT-PCR بیان ژن‌های CBF3 و CBF4 را در هیچ‌یک از تیمارها و زمان‌ها قابل آشکارسازی نشان نداد، که بیانگر القای گذرا و وابسته به زمان این ژن‌ها است.. بنابراین، ترکیب تحلیل‌های مولکولی PyMOL با بررسی‌های بیوشیمیایی و ژنتیکی چارچوبی یکپارچه برای تبیین مکانیزم‌های پاسخ به سرما و نقش Sodium Nitroprusside (SNP) در بهبود پایداری ساختاری و فعالیت آنزیمی گیاهچه‌های انگور ارائه می‌دهد. همبستگی بین رنگیزه‌ها، متابولیت‌ها و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نشان داد که افزایش یک صفت معمولاً با تقویت سایر صفات همراه است، به‌گونه‌ای که کلروفیل‌ها و کاروتنوئیدها با کربوهیدرات‌ها و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی هماهنگ عمل می‌کنند. این شبکه هماهنگ نشان‌دهنده وجود یک سازوکار یکپارچه است که پایداری فیزیولوژیک و بیوشیمیایی گیاهچه‌های انگور را تحت تنش سرما حفظ می‌کند.

واژه‌های کلیدی: جهان، کندوری، بیان ژن، مسیرهای بیوشیمیایی

۱. بخش تحقیقات زراعی- باغی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان قزوین، موسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، قزوین، ایران
۲. گروه اصلاح نباتات، واحد تاکستان، دانشگاه آزاد اسلامی، تاکستان، ایران
*: نویسنده مسوول Email: ma.nejatian@areeo.ac.ir
مقاله مستخرج از رساله دکتری نویسنده سوم به راهنمایی نویسنده اول آقای دکتر محمدعلی نجاتیان می‌باشد.

مقدمه

انگور (*Vitis vinifera* L.) یکی از مهم‌ترین محصولات باغی جهان است که عملکرد آن تحت تأثیر تنش‌های محیطی، به‌ویژه سرما، قرار می‌گیرد و محدودیت اصلی رشد و پایداری این گیاه در مناطق سردسیر محسوب می‌شود (Nejatian & Doulati Baneh, 2016; Zandkarimi et al., 2015). گیاهان برای مقابله با چنین شرایط نامطلوبی مکانیسم‌های فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی متعددی را فعال می‌کنند. تنش سرما و سرمازدگی، از مهم‌ترین تنش‌های غیرزیستی بوده، که رشد و عملکرد گیاهان را تحت تأثیر قرار می‌دهد. این تنش‌ها سبب نابودی بسیاری از پروتئین‌های سلولی و در ادامه، ایجاد اختلال در سوخت‌وساز سلول و دگرگونی در پایداری و نفوذپذیری غشاء سلولی شد، که تأثیر آن در گام اول در غشاء سلولی تظاهر پیدا کرد (Harding et al., 1999). تنش سرمایی سبب القای بیان ژن و یا عدم بیان ژن‌های خاصی می‌شود، لذا شناختن ژن‌های ویژه در ارقام متحمل و حساس به کمک ارزیابی تغییرات بیان ژن آن‌ها در شرایط دارای تنش نسبت به حالت بدون تنش، برای اجرای پروژه‌های افزایش مقاومت گیاهان به تنش سرمازدگی می‌تواند یکی از راه‌های مطلوب باشد.

تعریف مقاومت به سرما: توانائی گیاهان به دماهای زیر صفر، بدون ایجادخسارت شدید، که شاخص مهمی برای ارزیابی کشت گونه و ارقام می باشد (Burke et al., 1996).

یکی از این مولکول‌ها نیتریک اکسید (NO) است که در رشد، فتوسنتز و پاسخ به تنش‌های محیطی نقش مهمی دارد (Freschi, 2023). سدیم نیتروپروساید (SNP) به‌عنوان منبع پایدار NO، در بسیاری از گونه‌ها موجب تقویت رشد ریشه، باززایی شاخه و کاهش تجمع گونه‌های فعال اکسیژن می‌شود (Lei et al., 2007; Xu et al., 2009; Tan et al., 2013). مطالعات نشان داده‌اند که اثر محرک‌زایی سدیم نیتروپروساید (SNP) عمدتاً ناشی از آزادسازی NO در محیط‌کشت بوده و می‌تواند پاسخ‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی گیاه را در شرایط کنترل‌شده افزایش دهد (Duan et al., 2007; Han et al., 2009). محلول‌پاشی سدیم نیتروپروساید در شرایط تنش خشکی باعث کم‌شدن نشت الکترولیت‌ها، تجمع مالون‌دی‌آلدهید، حفظ پتانسیل آب برگ، حفظ محتوای نسبی آب برگ و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی در برگ‌ها شد (Zhang et al., 2016). ازجمله مهم‌ترین مکانیسم‌ها، تنظیم بیان ژن‌های خانواده C-repeat Binding Factor (CBF) است که به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های کلیدی پاسخ به سرما شناخته شده و با اتصال به عناصر CRT/DRE در پروموتر ژن‌های هدف، بیان ژن‌های مرتبط با تحمل به سرما را فعال می‌کنند (Shi et al., 2018; Liu et al., 2019). علاوه‌بر عوامل ژنتیکی، مولکول‌های سیگنال‌دهنده شیمیایی نیز می‌توانند بیان ژن‌های CBF را تنظیم کنند (Zhao et al., 2020). در سطح مولکولی، بیان ژن‌ها در پاسخ به تنش‌های محیطی نقش کلیدی دارد. فاکتورهای رونویسی (TFs) مانند CBF/DREB، سیگنال‌های استرس را دریافت کرده و ژن‌های هدف مرتبط با پاسخ به سرما را فعال می‌کنند، که منجر به افزایش محتوای پرولین و کلروفیل و بهبود سازگاری گیاه می‌شود.

(Li et al., 2022; Zandkarimi et al., 2015). گیاهان در جواب‌دهی به شرایط تنش یک سری تغییرات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی بروز می‌دهند که گیاه را قادر به بقا و تولیدمثل می‌کند زمانی که گیاه در معرض تنش‌های غیرزیستی قرار می‌گیرد، مجموع‌های از ژن‌ها با عملکردهای متفاوت القاء یا خاموش می‌شوند. نتیجه پروتئینی این ژن‌ها را می‌توان به دو گروه تقسیم کرد. گروه اول شامل پروتئین‌های عملکردی هستند. این پروتئین‌ها به‌طور مستقیم گیاهان را از لطمه‌های تنش محیطی مراقبت می‌نمایند. گروه دوم شامل پروتئین‌های تنظیم‌کننده هستند که انتقال سیگنال و بیان ژن‌های پاسخ‌گو به سرما را کنترل می‌کنند. بررسی وظایف این ژن‌ها برای فهم بیشتر مکانیسم‌های مدیریتی گیاه در شرایط تنش‌های غیرزیستی لازم است و به دستکاری‌های ژنتیکی برای افزایش تحمل گیاه به تنش سرما کمک می‌کند (Agarwal et al., 2006; Shinozaki, 2007; Lata and Prasad, 2011). با وجود این یافته‌ها، اطلاعات کمی درباره تأثیر مولکولی SNP بر ژن‌های کلیدی مسیر CBF در انگور موجود است. بنابراین، مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر سدیم نیتروپروساید بر بیان ژن‌های CBF3 و CBF4 در گیاهچه‌های درون‌شیشه‌ای انگور تحت تنش سرمایی طراحی شد تا نقش احتمالی این ترکیب در افزایش مقاومت مولکولی به سرما مشخص گردد. بر این اساس، فرض بر آن بود که پیش‌تیمار با سدیم نیتروپروساید بتواند با تنظیم مثبت بیان ژن‌های CBF3 و CBF4، پاسخ‌های بیوشیمیایی آنتی‌اکسیدانی را بهبود بخشیده و تحمل گیاهچه‌های انگور به تنش سرما را افزایش دهد.

مواد و روش‌ها

اعمال تیمار آزمایش توسط سدیم نیترو پرو ساید

برای استقرار ریزنمونه‌ها، قطعات گیاهی پس از ضدعفونی سطحی، به‌صورت عمودی در لوله‌های آزمایش با ارتفاع ۱۵ سانتی‌متر و قطر داخلی ۲۴ میلی‌متر حاوی محیط پایه MS کشت داده شدند. محیط‌کشت شامل ۱ میلی‌گرم در لیتر بنزیل‌آمینوپورین (BAP)، ۳۰ گرم در لیتر ساکاروز به‌عنوان منبع کربن و ۶/۸ گرم در لیتر آگار برای جامدسازی محیط بود. دهانه لوله‌ها پس از استقرار ریزنمونه‌ها ابتدا با فویل آلومینیومی و سپس با پارافیلم پوشانده شد. نمونه‌ها در اتاق رشد با دمای ۱ ± ۲۴ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. پس از استقرار و تثبیت اولیه ریزنمونه‌ها، تیمار سدیم نیتروپروساید (SNP) به‌عنوان منبع آزادکننده نیتریک اکسید اعمال شد. غلظت‌های مورداستفاده شامل ۲۰، ۴۰ و ۶۰ میکرومولار بودند که با هدف بررسی دامنه پاسخ مولکولی گیاهچه‌ها به نیتریک اکسید و بر اساس کاربردهای رایج SNP در شرایط کشت درون‌شیشه‌ای انتخاب شدند. محلول SNP به‌صورت تازه تهیه و پس از استریل‌سازی با فیلتر، به محیط‌کشت استریل افزوده شد تا از تخریب حرارتی ترکیب جلوگیری شود. نمونه‌ها پس از پایان دوره تیمار، در زمان‌های تعیین‌شده برداشت و برای استخراج RNA و انجام آزمایش‌های مولکولی مورداستفاده قرار گرفتند. شرایط کشت و نحوه اعمال تیمار مطابق با اصول کشت درون‌شیشه‌ای و با الهام از روش‌های گزارش‌شده در مطالعات مشابه انجام شد (Jirani et al., 2014).

اعمال تیمار سرمادهی

محیط شاهد (۲۴ درجه سانتی‌گراد، ۰ هفته)

گیاهچه‌ها سالم بودند و هیچ تغییر ظاهری در برگ و ساقه مشاهده نشد. نمونه‌ها برای آزمایش‌های مولکولی و فیزیولوژیکی برداشت شدند.

تیمار سرما ۲ هفته

گیاهچه‌ها سالم باقی ماندند و هیچ نشانه جدی از خشکیدگی مشاهده نشد. نمونه‌برداری برای آزمایش مولکولی و فیزیولوژیکی انجام شد و برگ و ساقه‌ها جمع‌آوری شدند.

تیمار سرما ۴ هفته

در اثر سرمای طولانی‌مدت، بخشی از ساقه‌ها آسیب دیده بود و برخی نمونه‌ها تنها برگ برای نمونه‌برداری مولکولی داشتند (Amooaghaie & Khodadadi, 2023).

استخراج RNA نمونه‌ها به روش CTAB مبتنی بر کلرید لیتیم

استخراج RNA کل از ۱۰۰ میلی‌گرم بافت برگی با استفاده از پروتکل CTAB مبتنی بر کلرید لیتیم انجام شد. نمونه‌ها در نیتروژن مایع همگن‌سازی شده و با ۱ میلی‌لیتر بافر استخراج CTAB شامل CTAB ۲ درصد، ۱۰۰ میلی‌مولار Tris-HCl (pH 8.0)، ۲۰ میلی‌مولار EDTA، ۱/۴ مولار NaCl و ۲ درصد مرکاپتواتانول مخلوط شدند. پس از انکوباسیون در ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه، استخراج با محلول کلروفرم-ایزوآمیل الکل (۲۴:۱) انجام شد. سپس RNA با افزودن کلرید لیتیم ۸ مولار رسوب داده شد. رسوب RNA با اتانول ۷۰ درصد شستشو و در ۵۰ میکرولیتر آب بدون RNase حل گردید. خلوص و غلظت RNA از طریق نسبت‌های جذب ۲۸۰/۲۶۰ و ۲۳۰/۲۶۰ با نانودراپ اندازه‌گیری و یکپارچگی آن با الکتروفورز ژل آگاروز ۱/۵ درصد بررسی شد (Jafari et al., 2016).

تیمار RNA نمونه‌ها با آنزیم DNase I شرکت سیناکلون

به‌منظور حذف هرگونه آلودگی DNA ژنومی، نمونه‌های RNA استخراج‌شده با آنزیم DNase I (سیناکلون، ایران) تیمار شدند. در هر واکنش، ۵ میکروگرم RNA در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر با ۵ واحد DNase I در حضور بافر واکنش شامل ۱۰ میلی‌مولار Tris-HCl (pH 8.0)، ۲/۵ میلی‌مولار $MgCl_2$ و ۰/۵ میلی‌مولار $CaCl_2$ به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. غیرفعالسازی آنزیم با افزودن ۵ میکرولیتر EDTA 50 میلی‌مولار و حرارت‌دهی در ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت. جهت تأیید حذف کامل DNA ژنومی، یک واکنش کنترل No-RT با آغازگرهای EF1α انجام شد و عدم مشاهده باند تکثیری در ژل آگاروز ۱/۵ درصد پاکی نمونه را تأیید کرد (Moslem Khani & Mozaffari, 2014).

سنتز cDNA با کیت شرکت سیناکلون

سنتز cDNA بر اساس دستورالعمل کیت cDNA شرکت سیناکلون انجام شد. در هر واکنش، یک میکروگرم RNA به‌همراه ۱ میکرولیتر پرایمر الیگو (dT) (۵۰ میکرومولار)، ۴ میکرولیتر بافر واکنش 5X، ۲ میکرولیتر dNTP (۱۰ میلی‌مولار)، ۱ میکرولیتر آنزیم رونوشت‌بردار معکوس (200 U/µL) و آب فاقد نوکلئاز تا حجم ۲۰ میکرولیتر استفاده شد. برنامه دمایی شامل ۱۰ دقیقه در ۲۵ درجه سانتی‌گراد، ۶۰ دقیقه در ۴۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ دقیقه در ۸۵ درجه سانتی‌گراد بود. صحت سنتز cDNA با PCR اولیه با ژن EF1αو مشاهده باند مورد انتظار تأیید شد. cDNAها تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شدند (Ghanad Sabzevari & Hoseini, 2014).

بررسی و بهینه‌سازی دمای اتصال پرایمرها با DNA ژنومی

به‌منظور تعیین دمای بهینه اتصال پرایمرها، واکنش PCR گرادیانت با استفاده از cDNA و پرایمرهای اختصاصی ژن‌های CBF3، CBF4 و EF1α انجام شد. پرایمرها بر اساس توالی‌های گزارش‌شده طراحی و توسط شرکت سیناکلون سنتز شدند. واکنش در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۵ میکرولیتر Master Mix 2X، پرایمرها با غلظت نهایی ۰/۴ میکرومولار، ۵۰ نانوگرم cDNAو آب دیونیزه انجام گرفت. گرادیانت دمای اتصال در محدوده ۵۵-۶۵ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد. محصولات PCR روی ژل آگاروز ۲ درصد الکتروفورز و دمای بهینه بر اساس وضوح و اختصاصیت باند تعیین شد (Khademian et al., 2015).

نمونه‌ها با پرایمرهای (reference gene) EF1α، CBF3 وCBF4 RT-PCR

برای ارزیابی بیان ژن‌های CBF3 و CBF4 از روش Real-Time PCR مبتنی بر SYBR Green استفاده شد. ژن EF1αبه‌عنوان ژن مرجع برای نرمال‌سازی داده‌ها انتخاب شد. واکنش‌ها در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۵ میکرولیتر Master Mix دو برابر، ۰/۴میکرومولار از هر پرایمر، ۱ میکرولیتر cDNA و آب فاقد نوکلئاز انجام شد. برنامه حرارتی شامل دناتوراسیون اولیه (۴ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد)، سپس ۴۰ چرخه شامل ۱۰ ثانیه دناتوراسیون در ۹۵ درجه، ۱۵ ثانیه اتصال در دمای بهینه هر ژن، و ۲۰ ثانیه گسترش در ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود. پس از پایان چرخه‌ها، منحنی ذوب در بازه ۶۵-۹۵ درجه سانتی‌گراد ثبت شد. تمامی واکنش‌ها در سه تکرار فنی انجام و تحلیل داده‌ها با روش ΔΔCt صورت گرفت (Ebadi et al., 2015).

بازیابی ساختارهای مولکولی

ساختارهای سه‌بُعدی نه بیومولکول کلیدی از پایگاه داده پروتئینی RCSB Protein Data Bank (PDB) بازیابی شدند. این مولکول‌ها شامل کلروفیل (1c51)، کاروتنوئیدها (7ztq)، کربوهیدرات‌ها (5tqz)، پرولین (101m)، پروتئین کل (6lix)، ترکیبات آنتی‌اکسیدانی (7z60) و آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز (APX) (1oaf)، پراکسیداز (POD) (7oo5) و کاتالاز (CAT)((PDB id) 6j42) بودند.

تحلیل صفات فیزیولوژیک با استفاده از بصری‌سازی مولکولی

به‌منظور درک مبنای مولکولی فرآیندهای فیزیولوژیک کلیدی، ساختار سه‌بُعدی کلروفیل به‌عنوان رنگیزه‌ی مرکزی فتوسنتز از پایگاه PDB استخراج شد. در نرم‌افزار PyMOL، آرایش حلقه پورفیرین و موقعیت اتم مرکزی منیزیم بررسی شد. این تحلیل ساختاری چارچوب بصری برای تفسیر نحوه‌ی تأثیر تغییرات در سطح اتمی بر جذب نور، انتقال انرژی و کارایی فتوسنتزی فراهم می‌کند (Wiwczar et al., 2017).

تحلیل صفات بیوشیمیایی با استفاده از بصری‌سازی مولکولی

برای ارتباط‌دهی عملکرد بیوشیمیایی با ساختار مولکولی، ساختار سه‌بُعدی متابولیت‌های بنیادی موردبررسی قرار گرفت. ساختار پرولین از پایگاه PDB استخراج و ویژگی‌های حلقه پیرولیدین و آرایش گروه کربوکسیل آن بررسی شد که نقش این ترکیب را به‌عنوان یک اسموسمولیت و محافظ سلولی توجیه می‌کند. همچنین، ساختار یک ترکیب آنتی‌اکسیدانی شاخص (مانند گلوتاتیون یا یک اسید فنولیک) برای بررسی آرایش گروه‌های عاملی مؤثر در مهار رادیکال‌های آزاد بصری‌سازی شد. علاوه‌بر این، ساختار کاروتنوئیدها بررسی شد تا سیستم پیوندهای دوگانه مزدوج آن‌ها که برای جذب نور و حفاظت نوری ضروری است، تبیین شود. این بصری‌سازی‌ها ارتباط بین هندسه اتمی و نقش بیوشیمیایی ترکیبات در کاهش اثرات تنش را نشان می‌دهد (Harris et al., 2016).

تحلیل صفات آنزیمی با استفاده از بصری‌سازی مولکولی

مبنای ساختاری فعالیت آنزیم‌ها از طریق بصری‌سازی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کلیدی بررسی شد. ساختارهای سه‌بُعدی آنزیم‌های کاتالاز (CAT)، پراکسیداز (POD) و آسکوربات پراکسیداز (APX) از پایگاه PDB استخراج و در نرم‌افزار PyMOLبارگذاری شدند. تمرکز اصلی بر شناسایی جایگاه‌های فعال، گروه‌های هم (heme) و عناصر ساختار ثانویه شامل مارپیچ‌های آلفا و صفحات بتا بود. این بررسی به درک فضایی نحوه‌ی عملکرد معماری سه‌بُعدی این آنزیم‌ها در تسهیل واکنش‌های کاتالیزوری و سم‌زدایی گونه‌های فعال اکسیژن کمک می‌کند (Chertkova et al., 2024).

پروتکل بصری‌سازی ساختاری در نرم‌افزار PyMOL

تمامی مراحل بصری‌سازی و تحلیل ساختاری با استفاده از نرم‌افزار PyMOL Molecular Graphics System (نسخه2.5 .x) انجام شد. فایل‌های ساختاری با فرمت (cif.) در نرم‌افزار بارگذاری شدند و مراحل بصری‌سازی شامل تنظیم پس‌زمینه برای افزایش وضوح، به‌کارگیری حالت‌های مختلف نمایش مولکولی (نظیر Spheres، Sticks، Ribbon و Cartoon) برای برجسته‌سازی ویژگی‌های ساختاری، برچسب‌گذاری اتم‌ها، باقی‌مانده‌ها یا زنجیره‌ها برای شناسایی اجزای کلیدی و استفاده از الگوهای رنگ‌آمیزی بر اساس نوع عنصر، زنجیره یا ساختار ثانویه جهت تفکیک بهتر عناصر ساختاری بود (Wiwczar et al., 2017; Ji et al., 2023; Roskoski et al., 2024; Zhang & Zhu, 2024).

تجزیه و تحلیل داده‌های آماری

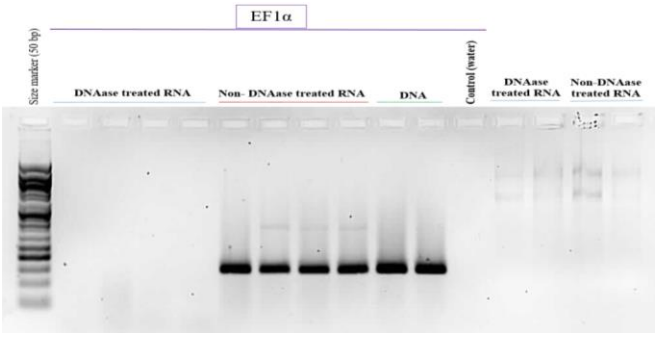
هر نمونه در سه تکرار فنی و حداقل سه تکرار زیستی مورد آزمایش قرار گرفت. کنترل‌های بدون الگو (NTC) و بدون نسخه‌بردار معکوس(No-RT) در هر سری واکنش لحاظ شدند تا از عدم آلودگی و حذف کامل DNA ژنومی اطمینان حاصل شود. داده‌های حاصل با روش ΔΔCt (Livak & Schemittgen 2001) و نرم‌افزار دستگاه تحلیل شدند و نتایج نهایی پس از نرمال‌سازی نسبت به ژن EF1α مورد تفسیر قرار گرفتند. تمام تصویربرداری‌ها و تحلیل‌های ساختاری با استفاده از PyMOL Molecular Graphics System (نسخه 2.5 .x) انجام شد. فایل‌های ساختار (cif.) بارگذاری و تنظیمات نمایش شامل حالت‌های Spheres، Sticks، Ribbon و Cartoon برای برجسته‌سازی ویژگی‌های ساختاری اعمال شد. رنگ‌آمیزی بر اساس نوع اتم، زنجیره یا ساختار ثانویه انجام شد تا اجزای کلیدی مشخص شوند. تحلیل داده‌های آماری با SPSS نشان داد که صفات فیزیولوژیک، بیوشیمیایی و آنزیمی به‌صورت شبکه‌ای هماهنگ با یکدیگر عمل می‌کنند. افزایش کلروفیل a و b همزمان با کاروتنوئیدها و کربوهیدرات‌ها مشاهده شد، که بیانگر هماهنگی بین عملکرد فتوسنتزی و تجمع انرژی است. فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (APX، POD و CAT) نیز با رنگیزه‌ها و متابولیت‌ها همبسته بود، که نشان می‌دهد پاسخ دفاع آنتی‌اکسیدانی گیاهچه‌ها به سرما به صورت یک سازوکار یکپارچه و مکمل عمل می‌کند. به عبارت دیگر، تغییر در یک صفت معمولاً با تغییرات همسو در سایر صفات همراه است، که این الگو همبستگی مثبت و هماهنگ شبکه‌ای را در پاسخ گیاهچه‌ها به تنش سرما نشان می‌دهد.

نتایج و بحث

بیان ژن‌های CBF3 وCBF4

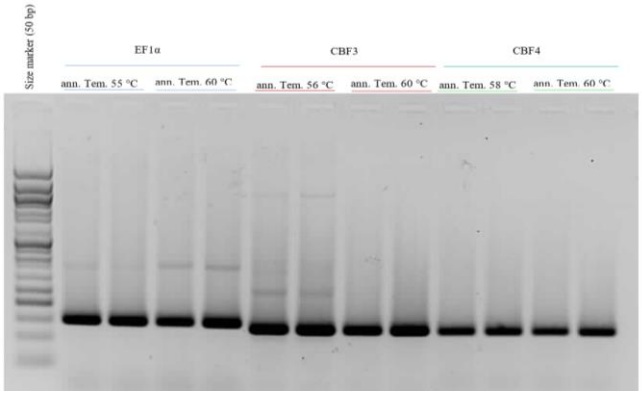
RNA استخراج شده از نمونه‌ها پس از تیمار با DNase I برای حذف DNA ژنومی و سنتز به cDNA با کیت Sinaclon، آماده شد. بررسی حذف DNA ژنومی با PCR و پرایمر EF1α روی نمونه‌های تیمار شده و شاهد تأیید شد (شکل ۱). پرایمرهای EF1α، CBF3 و CBF4 روی DNA ژنومی انگور بررسی شدند و نشان دادند که در دماهای اتصال مختلف به‌خوبی تکثیر می‌شوند؛ دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد برای مراحل بعدی انتخاب شد (شکل ۲). در بررسی اولیه cDNA، PCR با پرایمرهای EF1αو CBF3 نشان داد که EF1α در cDNA و DNA ژنومی تکثیر شد، اما CBF3 در cDNA قابل‌تشخیص نبود (شکل ۳). آزمایش‌های بعدی با cDNA ترکیبی از چهار نمونه نیز بیان ژنی CBF3 و CBF4 را نشان نداد (شکل‌های ۴، ۵، ۶)، حتی با تغییر دمای اتصال و افزایش غلظت cDNA عدم مشاهده بیان قابل‌تشخیص CBF3 و CBF4 در هفته‌های دوم و چهارم پس از سرمادهی، نشان‌دهنده گذرا بودن القای این ژن‌ها است که معمولاً در ساعات تا چند روز ابتدایی پس از شروع سرما به اوج می‌رسند و سپس به سطح پایه بازمی‌گردند. همچنین سطح پایه این ژن‌ها در شرایط بدون تنش بسیار پایین است، به‌ویژه CBF3 در انگور که پایین‌ترین سطح بیان را نسبت به دیگر ژن‌های خانواده CBF دارد. مطالعات پیشین نیز این نتایج را تأیید می‌کنند Feng et al., (2011) نشان دادند که CBF3 در ۱-۲

روز ابتدایی پس از سرما به اوج می‌رسد و سپس کاهش می‌یابد. Karimi et al., (2015) گزارش کردند که در دو رقم *Vitis vinifera* و گونه وحشی *V. riparia*، ژن‌های CBF1–CBF4 پس از شروع سرما افزایش‌یافته و سپس کاهش می‌یابند، با کمترین القا برای CBF3 همچنین الگوی بیان در بافت‌های مختلف متفاوت است؛ Dong et al., (2013) بیان کردند که CBF4 در برگ‌های *V. amurensis* تحت سرما افزایش قابل‌توجهی نداشت و Xiao et al., (2006) تفاوت القای سریع CBF1/2 و محدود بودن CBF3/4 را گزارش کردند که عمدتاً در ریشه و ساقه فعال بودند. الگوی زمانی بیان ژن‌ها تحت‌تأثیر گونه نیز قرار دارد. در گونه وحشی *V. amurensis*، القای CBF4پایدارتر بود، درحالی‌که در اکوتیپ‌های حساس مثل *V. vinifera* ‘Pinot Noir’ پاسخ یا القای CBF4 بسیار ضعیف یا غیرقابل‌تشخیص بود. این مثال نشان می‌دهد که بسته به گونه، CBF4 ممکن است به‌خوبی به سرما پاسخ ندهد. دیگران نیز گزارش کردند که CBF3در رقم‌های اهلی *V. vinifera*تقریباً غیرقابل تشخیص بود و CBF4 تنها در گونه‌های وحشی افزایش معنی‌دار داشت (Zandkarimi et ; Shi et al., 2022 al., 2015). القای CBFها در انگور ممکن است نیازمند سیگنال‌های کمکی مانند سالیسیلیک اسید باشد، بنابراین در شرایط معمول سرما، القای ژن‌ها محدود است (Ren et al., 2023). در کل، بیان ژن‌های CBF3 و CBF4 در انگور به زمان نمونه‌برداری، بافت مورد بررسی و گونه/ رقم وابسته است. عدم مشاهده بیان در این مطالعه احتمالاً نتیجه ترکیبی از این عوامل است و اهمیت گذرا و شرایطی بودن پاسخ‌های CBF به سرما را نشان می‌دهد. به طور کلی، نتایج نشان می‌دهند که بیان ژن‌های CBF3 و CBF4 در گیاهچه‌های انگور تحت شرایط تیمار با SNP بسیار محدود و گذرا است و سطح پایه آن‌ها پایین باقی می‌ماند. این یافته اهمیت زمان نمونه‌برداری، نوع بافت و گونه/رقم را در پاسخ به سرما برجسته می‌کند و تأکید می‌کند که مکانیسم‌های بیوشیمیایی و آنزیمی اندازه‌گیری شده ممکن است مستقل از القای CBF عمل کنند. بنابراین، عدم القای قابل تشخیص این ژن‌ها، خود یک یافته کلیدی مطالعه محسوب می‌شود و چارچوب مناسبی برای تفسیر نقش SNP در تنظیم پاسخ‌های مولکولی و بیوشیمیایی فراهم می‌آورد.



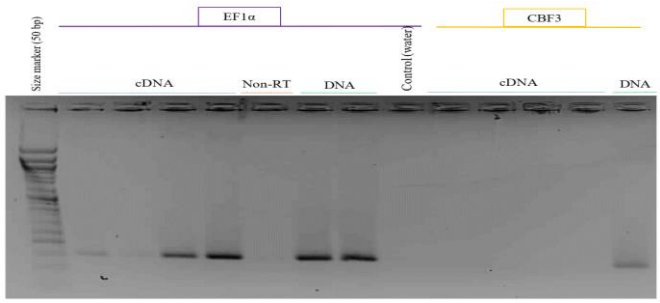
شکل ۱: بررسی تیمار DNase I روی RNAهای استخراج شده چند نمونه

Fig. 1: Investigation of DNase I Treatment on Extracted RNAs from Several Samples



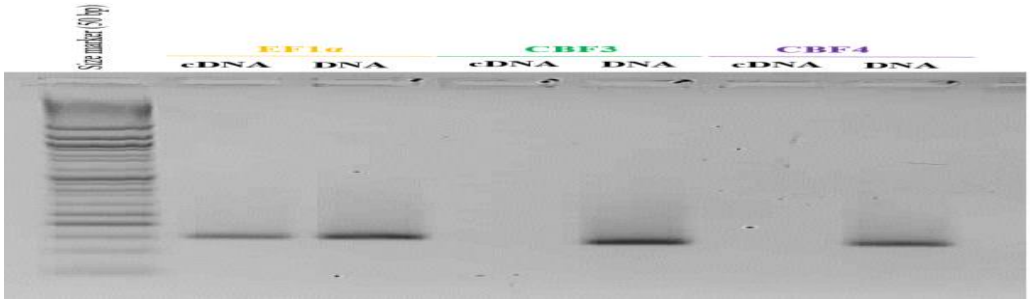
شکل ۲: بررسی پرایمرهای EF1α، CBF3 و CBF4 روی DNA ژنومی انگور

Fig. 2: Investigation of EF1α, CBF3, and CBF4 Primers on Grape Genomic DNA



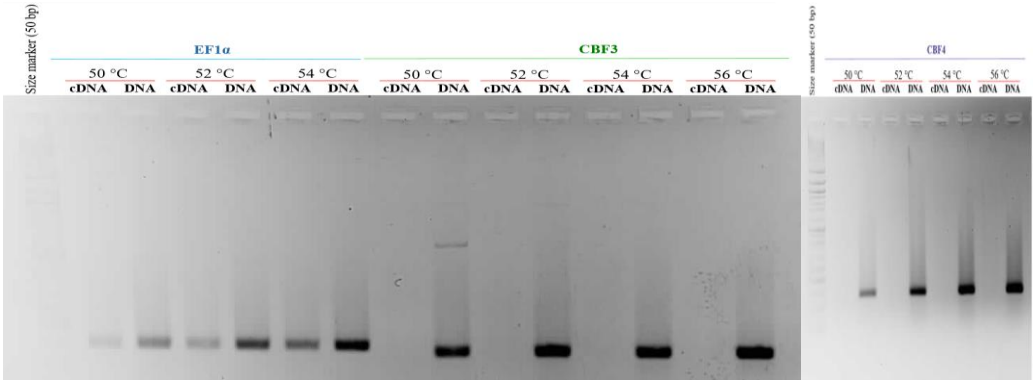
شکل ۳: بررسی اولیه سنتز cDNA چند نمونه با دو پرایمر

Fig. 3: Initial Assessment of cDNA Synthesis in Several Samples with Two Primers



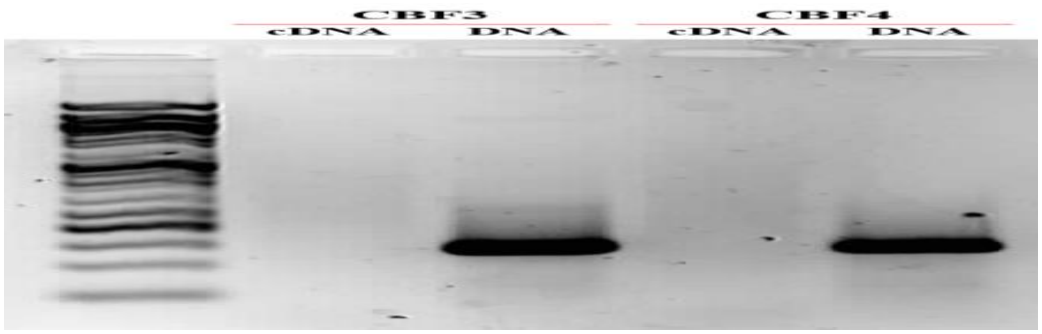
شکل ۴: بررسی پرایمرهای مورد مطالعه روی cDNA ترکیبی نمونه‌ها و DNA ژنومی انگور

Fig. 4: Investigation of the Studied Primers on the combined cDNA of samples and grape genomic DNA



شکل ۵: بررسی پرایمرهای مورد مطالعه در یک گرادیان دمایی روی cDNA ترکیبی نمونه‌ها و DNA ژنومی انگور

Fig. 5: Investigation of the Studied Primers in a Temperature Gradient on the combined cDNA of samples and grape genomic DNA



شکل ۶: بررسی بیان ژن‌های *CBF3* و *CBF4*

Fig. 6: Investigation of *CBF3* and *CBF4* gene expression

مقایسه و تحلیل یکپارچه بین صفات در پایمول

در مقایسه بین صفات بیوشیمیایی که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، هر مولکول ویژگی ساختاری منحصربه‌فرد خود را دارد که توانایی گیاهچه‌ها در مدیریت انرژی، کاهش فشار اکسیداتیو و پاسخ به تنش سرما را تقویت می‌کند. صفات آنزیمی با مارپیچ‌ها و صفحات β منظم و مراکز فعال بهینه، عملکرد دفاعی سلول و خنثی‌سازی پراکسیدها را تقویت می‌کنند. کلروفیل به‌عنوان صفت فیزیولوژیک پایه‌ای، جذب نور و آغاز فرایندهای فتوسنتزی را فراهم می‌آورد و با صفات بیوشیمیایی و آنزیمی هماهنگی دارد. نتیجه نهایی نشان می‌دهد که پاسخ گیاهچه‌های انگور به تیمار سدیم نیتروپروساید و تنش سرما، حاصل هماهنگی بین ساختارهای فضایی مولکولی، عملکرد بیوشیمیایی و فعالیت آنزیمی است. تحلیل ساختار سوم و چهارم پروتئین‌ها پایه‌ای برای درک این هماهنگی فراهم می‌آورد و اهمیت بیوانفورماتیک و شبیه‌سازی PyMOL در تبیین مکانیزم‌های مولکولی پاسخ گیاهچه‌ها را برجسته می‌سازد (Nejatian et al., 2025).

جدول ۱: بررسی ساختار مولکولی ترکیبات و آنزیم‌های مرتبط با پاسخ‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی با استفاده از نرم‌افزارPyMOL
Table 1: Analysis of the molecular structure of compounds and enzymes associated with physiological and biochemical responses using PyMOL software

شماره	صفت	نوع صفت	ویژگی‌های ساختاری (PyMOL)	عملکرد مولکولی و بیوشیمیایی	ارتباط با پاسخ گیاهچه‌ها
۱	کلروفیل	فیزیولوژیک	هسته پورفیرینی، اتم منیزیم مرکزی، آرایش متقارن حلقه‌ها	تثبیت عملکرد فتوسنتزی و جذب نور	تغییرات محتوای کلروفیل تحت SNP با ساختار فضایی هماهنگ است
۲	کاروتنوئید	بیوشیمیایی	زنجیره‌های بلند هیدروکربنی، پیوندهای دوگانه مزدوج	جذب و انتقال انرژی نور، افزایش ثبات مولکولی	تقویت عملکرد دفاع آنتی‌اکسیدانی گیاهچه‌ها
۳	کربوهیدرات	بیوشیمیایی	زنجیره‌های بلند، آرایش هندسی گروه‌های عاملی	انتقال انرژی، تعاملات بیوشیمیایی	تأمین انرژی و تعادل سلولی تحت تنش سرما
۴	پرولین	بیوشیمیایی	زنجیره‌های جانبی خاص، آرایش فضایی گروه‌های عاملی	تعدیل فشار اکسیداتیو و جذب انرژی	نقش کلیدی در پاسخ گیاهچه‌ها به استرس سرما
۵	پروتئین	بیوشیمیایی	پیوندهای هیدروژنی متعدد، آرایش مارپیچ‌های آلفا	تثبیت مولکولی و عملکرد بیوشیمیایی	تغییر عملکرد تحت تیمارSNP با ساختار فضایی هماهنگ است
۶	آنتی‌اکسیدانت	بیوشیمیایی	زنجیره‌های بلند هیدروکربنی، پیوندهای مزدوج	کاهش رادیکال‌های آزاد، افزایش فعالیت دفاعی	محافظت غشاها و سیستم فتوسنتزی در شرایط سرما
۷	اسکو ربات پراکسیداز	آنزیمی	مارپیچ‌های آلفا، صفحاتβ، پیوندهای هیدروژنی	خنثی‌سازی پراکسیدها، حفاظت سلولی	افزایش کارایی دفاع آنتی‌اکسیدانی در شرایط سرما
۸	پراکسیداز	آنزیمی	مارپیچ‌های آلفا و صفحات β منظم، شبکه پیوندهای هیدروژنی	خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد، حفاظت سلولی	تقویت فعالیت آنزیم در کاهش آسیب‌های اکسیداتیو
۹	کاتالاز	آنزیمی	مارپیچ‌های آلفا و صفحاتβ، مرکز فعال بهینه	تجزیه هیدروژن پراکسید، محافظت سلولی	کاهش آسیب رادیکال‌های آزاد و حفظ یکپارچگی متابولیک

همبستگی بین صفات فیزیولوژیکی، بیوشیمیائی و آنزیمی

تحلیل همبستگی‌ها نشان داد که روابط بین صفات موردبررسی تحت تأثیر نوع صفت و عملکرد سیستم‌های زیستی قرار دارد. کلروفیل a و کلروفیل b در پاسخ به تنش، هماهنگی نزدیکی با یکدیگر و با سایر رنگیزه‌ها و متابولیت‌ها ازجمله کاروتنوئیدها و کربوهیدرات‌ها نشان دادند، به‌طوری‌که افزایش یکی معمولاً با تقویت دیگری همراه بود. این الگو نشان‌دهنده عملکرد هم‌افزا و تنظیم هم‌زمان رنگیزه‌ها در دستگاه فتوسنتزی است و مشابه آنچه در مطالعات قبلی گزارش شده، نقش کلروفیل a را در سازگاری گیاه به تنش تأیید می‌کند (Ataei et al. 2021). کلروفیل b نیز با کاروتنوئیدها و شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی ارتباط نزدیکی داشت، که بیانگر یکپارچگی عملکرد این رنگیزه‌ها در حفاظت از فتوسیستم‌ها و تقویت ظرفیت آنتی‌اکسیدانی گیاه است (Froghi & Galeshi, 2022).

به همین ترتیب، کاروتنوئیدها و کربوهیدرات‌ها نیز هماهنگی مثبتی با یکدیگر نشان دادند، که حکایت از ارتباط بین کارایی فتوسنتزی و متابولیسم کربن در پاسخ به تنش دارد.

در بخش آنزیمی، فعالیت‌های آسکوربات پراکسیداز و پراکسیداز نیز الگوی همبستگی مثبت و مکملی از خود نشان دادند، به‌گونه‌ای که افزایش فعالیت یکی معمولاً با تقویت دیگری همراه بود و نشان‌دهنده پاسخ هماهنگ سیستم آنتی‌اکسیدانی به تنش است. این الگو مشابه آنچه در مطالعات قبلی گزارش شده، بیانگر عملکرد یکپارچه آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در تحمل استرس است (Wang et al., 2024). در مجموع، همبستگی‌های مشاهده‌شده حاکی از یک شبکه تنظیمی هماهنگ میان رنگیزه‌های فتوسنتزی، متابولیت‌ها و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی است که نقش کلیدی در پایداری فیزیولوژیک گیاه تحت شرایط تنش ایفا می‌کند.

جدول ۲: ضرایب همبستگی بین صفات فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و آنزیمی گیاهچه‌های انگور

Table 2: Correlation coefficients among physiological, biochemical, and enzymatic traits of grape seedlings

همبستگی بین صفات	کلروفیل a	کلروفیل b	کاروتنوئید	کربوهیدرات	پرولین	پروتئین	آنتی اکسیدانت	اسکوربات پراکسیداز	پراکسیداز	کاتالاز
کلروفیل a	1									
کلروفیل b	0.968**	1								
کاروتنوئید	0.987**	0.933**	1							
کربوهیدرات	0.826**	0.830**	0.817**	1						
پرولین	-0.026	0.047	0.049	0.009	1					
پروتئین	0.442*	0.057	0.187	0.192	0.193	1				
آنتی‌اکسیدانت	0.28	.923**	-0.032	0.009	0.021	0.01	1			
اسکوربات پراکسیداز	0.755**	0.248	0.522**	0.024	0.06	0.081	0.13	1		
پراکسیداز	0.415*	0.3	0.228	0.207	-0.022	0.038	0.08	0.128	1	
کاتالاز	0.05	0.034	0.34	-0.248	0.186	-0.101	-0.18	-0.167	-0.167	1

نتیجه‌گیری کلی

یافته‌های این پژوهش نشان داد که تیمار سدیم نیتروپروساید (SNP) در غلظت‌های ۲۰ تا ۶۰ میکرومولار اثرات قابل‌توجهی بر صفات فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و آنزیمی گیاهچه‌های انگور داشت؛ شاخص‌هایی مانند محتوای کلروفیل، پرولین، پروتئین و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (APX, POD, CAT) به‌طور معنی‌داری افزایش یافت و توانایی گیاهچه‌ها در مقابله با تنش سرمایی ارتقا یافت. بررسی RT-PCR نشان داد که بیان ژن‌های *CBF3* و *CBF4* در زمان‌های نمونه‌برداری هفته‌های دوم و چهارم بسیار پایین و تقریباً غیرقابل تشخیص بود، که نشان‌دهنده پاسخ گذرا و وابسته به زمان این ژن‌هاست. ارزیابی ساختاری با استفاده از نرم‌افزار PyMOL نیز مشخص کرد که مولکول‌های کلیدی فتوسنتزی و آنزیمی دارای آرایش سه‌بعدی پایدار، شامل حلقه‌های پورفیرینی، پیوندهای مزدوج و ساختارهای مارپیچی و صفحات β محافظت‌شده هستند، که با پایداری و کارایی عملکردی آن‌ها مرتبط است. این یافته‌ها نشان می‌دهد که اثر تیمار SNP عمدتاً از طریق تقویت مسیرهای بیوشیمیایی و آنزیمی و پایداری ساختاری مولکول‌ها اعمال می‌شود و نه القای مستقیم ژن‌های خانواده CBF. بنابراین کاربرد SNP می‌تواند به‌عنوان یک الایسیتور مولکولی غیرمستقیم در افزایش مقاومت گیاهچه‌های انگور به سرما مؤثر باشد و بررسی پاسخ‌های ژنی در زمان‌های اولیه‌تر تنش برای مطالعات آینده توصیه می‌شود. تجزیه و تحلیل همبستگی‌ها نشان داد که صفات رنگیزه‌ها، کربوهیدرات‌ها و فعالیت آنزیمی به‌صورت یک شبکه هماهنگ عمل می‌کنند؛ افزایش یک صفت معمولاً با تقویت سایر صفات همراه است و این هماهنگی مکمل بیانگر وجود یک پاسخ یکپارچه فیزیولوژیک و بیوشیمیایی به تنش سرما است.

سپاسگزاری

بدینوسیله از سرکارخانم دکتر نوشین کاظمی از پژوهشکده میوه‌های معتدله و سردسیری و همچنین جناب آقای دکتر مهرشاد زین العابدینی از پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی کرج، صمیمانه تشکر می‌نمایم.

References

Agarwal, P., Agarwal, K., Reddy, P. and Sopory, S. K. 2006. Role of DREB transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants. Plant Cell Report, 25: 1263-1274

Amooaghaie, R. and Khodadadi, A. 2023. Impact of seed scarification, pretreatment with nitrogenous compounds and cold stratification on emergence percentage and growth of *Gundelia tournefortii* L. seedlings. Iranian Journal of Seed Science and Research, 3:49-63.

Ataei, A., Gholamalipour Alamdari, E., Avarseji, Z. and Rahemi Karizaki, A. 2021. Study of allelopathic effect of aqueous extract of various organs of *Fumaria parviflora* on morphological, physiological and biochemical characteristics of Lolium rigidum. Scientific Journal of Applied Biology, 34(4): 112-130.

Burke, M. J., Gusta, L. V., Quamme, H. A.,Weiser, C. J. and Li, P. H. 1996. Freezing and injury in plants. Annual Reviews in Plant Physiology, 27: 507-528

Chertkova, R. V., Oleynikov, I. P., Pakhomov, A. A. and et al. 2024. The Increase in the Peroxidase Activity of the Cytochrome C with Substitutions in the Universal Binding Site Is Associated with Changes in the Ability to Interact with External Ligands. MDPI, 25: 1-23.

Dong, C., Zhang, M., Yu, Z., Ren, J., Qin, Y., Wang, B. and Tao, J. 2013. Isolation and expression analysis of 4 from *Vitis amurensis* associated with stress. Agricultural Sciences, 4: 224-229.

Duan, X., Su, X., You, Y., Qu, H., Li, Y. and Jiang, Y. 2007. Effect of nitric oxide on pericarp browning of harvested longan fruit in relation to phenolic metabolism. Food Chemistry, 104: 571-576.

Ebadi, A., Karimi Alvijeh, M., Moosavi, A. and Salam, A. 2015. Quantitative expression analysis of CBF1 and CBF4 genes under cold stress treatments in grape cultivars "Khalili-Danedar", "Shahroodi" in comparison with *Vitis riparia*. Iranian Journal of Horticultural Science, 3: 379-386.

Feng, Y., Cao, C. M., Vikram, M., Park, S., Kim, H. J., Hong, J. C., Cisneros-Zevallos, L. and Koiwa, H. 2011. A three-component gene expression system and its application for inducible flavonoid overproduction in transgenic *Arabidopsis thaliana*. PLoS ONE, 6: e17603.

Feschi, L. 2023. Nitric oxide as a versatile signaling molecule in plant abiotic stress responses. Frontiers in Plant Science, 14: 1182457.

Froghi, L. and Galeshi, S. 2022. Evaluation of morphological and physiological traits of wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars under flooding stress conditions and its relationship with grain yield. Environmental Stresses in Crop Sciences, 15(3): 831-846.

Ghanad Sabzevari, A. and Hoseini, R. 2014. cDNA cloning and investigating gene expression, physicochemical characteristics and functional structures of β-galactosidase enzymes of tomato fruit (*Lycopersicum esculentum* cv. Falcato). Journal of Agricultural Biotechnology, 12(2): 81-92.

Han, X., Yang, H., Duan, K., Zhang, X., Zhao, H., You, S. and Jiang, Q. 2009. Sodium nitroprusside promotes multiplication and regeneration of Malus hupehensis in vitro plantlets. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 96: 29-34.

Harding, M. M., Ward, L. G. and Haymet, A. D. J. 1999. Type I `antifreeze' proteins: Structure activity studies and mechanisms of ice growth inhibition. European Journal of Biochemistry, 264: 653-665.

Harris, D., Tala, O., Jalletb, D., Wilson, A., Kirilovsky, D. and Adira N. 2016. Orange carotenoid protein burrows into the phycobilisome to provide photoprotection. Pnas, 113(12): 1655-1662.

Jafari, Z., Haddad, R., Hosseini, R. and Garousi, G. H. A. 2015. Cloning and phylogenetic relationships analysis of an oxido reductase gene in product pathway of ethylene hormone. Iranian Journal of Biotechnology, 3: 55-74.

Ji, S., Tian, X., Li, X. and She, Q. 2023. Identification and structural analysis of a carbohydrate-binding module specific to alginate, a representative of a new family, CBM96. JBC, 299(2): 1-12.

Jirani, M., Mozafari, A. A., Koushesh Saba, M. and Gouran, A. 2014. Effect of sodium nitroprusside on in vitro regeneration of two grape (*Vitis vinifera* L.) cultivars. The First International Congress and the 13th Iranian Genetics Congress.

Karimi, M., Ebadi, A., Mousavi, S. A., Salami, S. A. and Zarei, A. 2015. Comparison of CBF1, CBF2, CBF3 and CBF4 expression in some grapevine cultivars and species under cold stress. Scientia Horticulturae, 197: 521-526.

Khademian, R., Babaeian Jelodar, N. A., Khayam Nekouie, M., Mardi, M. and Nakhoda, B. 2015. Designing specific primers to study single nucleotide diversity (SNP) of genes and to determine their performance. Journal of Crop Breeding, 16: 130-138.

Lata, C. and Prasad, M. 2011. Role of DREBs in regulation of abiotic stress responses in plants. Journal Experimental Botany, 62: 4731-4748.

Lei, Y., Yin, C., Ren, J. and Li, C. 2007. Effect of osmotic stress and sodium nitroprusside pretreatment on proline metabolism of wheat seedlings. Biologia Plantarum, 51: 386-390.

Li, X., Liang, X. et al. 2022. Isolation and functional analysis of MbCBF2, a *Malus baccata* (L.) Borkh BF transcription factor gene, with functions in tolerance to cold and salt stress in transgenic *Arabidopsis thaliana*. MDPI, 23: 1-20.

Liu, Q., Kasuga, M., Sakuma, Y., Abe, H., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. 2019. 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. The Plant Cell, 11: 637-651.

Livak, K. J. and Schemittgen, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2 (delta delta c(t)) method. Methods, 25(4): 402-408.

Moslem Khani, K. and Mozaffari, J. 2014. Effects of various parameters influencing the quality of results in a cDNA-AFLP technique used for transcriptome analysis of potato. Iranian Journal of Biotechnology, 1: 183-198.

Nejatian, M. A. and Doulati Baneh, H. 2016. Identification, distinctness and registration of commercial and native grape cultivars of Iran. Iranian Journal of Horticultural Science, 3: 581-594.

Nejatian, M. A., Rasouli, M. and Tajalifar, M. 2025. Investigating changes biochemical, Enzymatic, and Computational Analyses in grape seedlings under sodium nitroprusside treatments. Journal of Molecular Science, Accepted for publication.

Ren, C., Zhang, Y. and Wang, L. 2023. Advances in understanding cold tolerance in grapevine. Plant Physiology, 192: 1733-1743.

Roskoski Jr, R. 2024. Properties of FDA-approved small molecule protein kinase inhibitors: A 2024 update. Pharmacological Research, 11: 1-22.

Shi, W., Riemann, M., Rieger, S. M. and Nick, P. 2022. Cold-induced nuclear import of CBF4 regulates freezing tolerance. International Journal of Molecular Sciences, 23: 11417.

Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. 2007. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. Journal Experimental Botany, 58: 221-227.

Tan, C. B., Chin, C. F. and Alderson, P. 2013. Effects of sodium nitroprusside on shoot multiplication and regeneration of Vanilla planifolia Andrews. In Vitro Cellular and Developmental Biology–Plant, 49: 626-30.

Wang, J., Xie, F., Zhu, W., Ye, D., Xiao, Y., Shi, M., Zeng, R., Bian, J., Xu, X., Chen, L., Zhu, A., Zhu, K., Fan, T., Liu, B., Xiao, L. and Zhang, X. 2024. Relationship between serum carotenoids and telomere length in overweight or obese individuals. Frontiers in Nutrition, 11: 1479994.

Wiwczar, J. M., LaFountain, A. M., Wang, J., Frank, H. A. and Brudvig, G. W. 2018. Chlorophyll a with a farnesyl tail in thermophilic cyanobacteria. HHS Public Access, 134(2): 175-182.

Xiao, H., Siddiqua, M., Braybrook, S. and Nassuth, A. 2006. Three grape CBF/DREB1 genes respond to low temperature, drought and abscisic acid. Plant, Cell and Environment, 29: 1410-1421.

Xu, J., Yin, H., Wang, W., Mi, Q. and Xiaojing, L. 2009. Effects of sodium nitroprusside on callus induction and shoot regeneration in micropropagated Dioscorea opposite. Plant Growth Regulation, 59: 279-285.

Zandkarimi, H., Ebadi, A., Salami, S. A., Alizade, H. and Baisakh, N. 2015. Analyzing the expression profile of AREB/ABF and DREB/CBF genes under drought and salinity stresses in grape (*Vitis vinifera* L.). PLOS ONE, 10(7): e0134288.

Zhang, C., Liu, X., and Xu, X. 2021. Cold stress tolerance and CBF gene expression in grapevine cultivars. Plant Physiology and Biochemistry, 162: 241-251.

Zhang, L. and Zhu, W. 2024. Screening antioxidant components in Yiwei decoction using spectrum-effect relationship and network pharmacology. Journal of Analytical Methods in Chemistry, 2024: 1-16.

Zhao, C., Zhang, Z., Xie, S., Si, T., Li, Y. and Zhu, J. K. 2020. Mutational evidence for the critical role of CBF genes in cold acclimation in plants. Journal of Experimental Botany, 71: 122-133.