

تأثیر دمای پایین بر بیان ژن‌های درگیر در مسیر ارسال پیام و ترابری هورمون اکسین در ریشه گیاهچه‌های گوجه فرنگی

پرویز حیدری

استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود، شاهرود، ایران
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۲/۸ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۵/۶/۲۱)

Suboptimal temperature effect on expression of genes involved in auxin transport and signaling in tomato root

Parviz Heidari

Assistant Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Shahrood University of Technology, Shahrood, Iran.

(Received: Apr. 27, 2016 - Accepted: Sep. 11, 2016)

Abstract

Auxin is a central hormone that exerts pleiotropic effects on plant growth including the development of shoots, roots, and other organs under normal condition or stress. In this study, the transcripts change of *AUX/IAA*, *ARF*, *BRX* and *PIN4* which involve in auxin transporter and signaling were evaluated in root of tolerant and sensitive tomato genotypes under 15°C. *AUX/IAA4* which is a negative regulator of auxin response genes was strongly up regulated in tolerant genotype at 15°C however, the transcript level of this gene was decreased in sensitive genotype. *ARF* and *PIN4* were highly up regulated by suboptimal temperature in sensitive genotype whereas they were down regulated in tolerant genotype in recovery time (2 hours). The expression pattern of *BREVIS RADIX* (*BRX*) gene as a common point of interaction of auxin and brassinosteroids suggested that the *BRX* gene under sub optimal temperature in sensitive genotype was up regulated and reached the maximum level after 2h transfer to 23°C. The results of this study show that auxin concentration is increased in sensitive genotype and it induced the *ARF*, *PIN4* and *BRX* whereas *AUX/IAA4* was repressed. The results of common motifs in 1500 bp of upstream revealed that the AATAT motif of PRISM algorithm was frequency observed in all genes.

Keywords: Low temperature stress, Auxin hormone, Tomato, Gene expression

چکیده

اکسین به عنوان یک هورمون گیاهی دارای نقش چندگانه‌ای در تنظیم رشد و توسعه ساقه، ریشه و سایر اندام‌ها، تحت شرایط طبیعی و یا تنش است. در این تحقیق تغییرات رونوشت ژن‌های *BRX*، *ARF*، *AUX/IAA* و *PIN4* درگیر در مسیر ارسال پیام و ترابری هورمون اکسین در ریشه‌ی دو ژنوتیپ متحمل و حساس به سرما گیاه گوجه‌فرنگی تحت شرایط ۱۵ درجه سانتی‌گراد مورد بررسی قرار گرفت. ژن *AUX/IAA4* که تنظیم کننده منفی ژن‌های پاسخ به اکسین است در ژنوتیپ متحمل تحت شرایط تنش دمای پایین، افزایش بیان را نشان داد اما رونوشت‌های این ژن در ژنوتیپ حساس کاهش یافتند. ژن‌های *ARF* و *PIN4* افزایش بیان بالای تحت شرایط دمای پایین در ژنوتیپ حساس نشان دادند در حالی که در ژنوتیپ متحمل در زمان ریکاوری ۲ ساعت بیشترین کاهش بیان را داشت. الگوی بیان ژن *BRX* به‌عنوان یک نقطه مشترک در برهمکنش اکسین و براسینواستروئید، نشان می‌دهد که بیان این ژن تحت دمای پایین در ژنوتیپ حساس افزایش می‌یابد و بیشترین میزان بیان در ۲ ساعت بازیافت پس از تنش مشاهده شد. نتایج این تحقیق نشان داد که غلظت هورمون اکسین در ریشه ژنوتیپ حساس با کاهش دما، افزایش می‌یابد و این باعث القاء ژن‌های *ARF*، *PIN4* و *BRX* می‌شود در حالی که بیان ژن *AUX/IAA4* را کاهش می‌دهد. نتایج شناسایی موتیف مشترک در ۱۵۰۰ جفت باز بالادست ژن‌های مورد مطالعه نشان داد موتیف *AATAT* از الگوریتم PRISM یک موتیف مشترک کلیدی در تنظیم ژن‌های مورد مطالعه می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: تنش دمای پایین، هورمون اکسین، گوجه فرنگی، بیان ژن.

مقدمه

دمای پایین یکی از عوامل اصلی کاهش عملکرد اقتصادی در گیاهان گرمسیری چون گوجه فرنگی (*Solanum lycopersicum*) است. دماهای پایین (12°C - 13°C) با تأثیر گذاشتن بر میزان فتوسنتز، تنفس، کربوهیدرات‌ها، غشاء سلولی و جذب آب و مواد معدنی سبب کلروز و پژمردگی می‌شود (Shibasaki *et al.*, 2009). دماهای پایین‌تر از حد نرمال (12°C - 18°C) در مراحل اولیه رشد گیاهچه مانع از رشد و ایجاد برگ‌های جدید و توسعه سطح برگ می‌شوند (Venema *et al.*, 2005). هورمون‌ها به عنوان تنظیم‌کننده‌های رشد تحت شرایط تنش نیز نقش کلیدی را تنظیم بیان ژن‌ها ایفا می‌کنند. اکسین به عنوان اولین فیتوهورمون گیاهی شناخته شده است که نقش آن در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی به همراه سایر هورمون‌های مشخص شده است (Weijers and Wagner, 2016). ژن‌های AUX/IAA و ARF^۱ در مسیر پیام‌رسانی هورمون اکسین از اهمیت بسزایی برخوردار هستند و باعث تنظیم بیان ژن‌های درگیر در رشد و توسعه گیاه می‌شوند. ژن‌های ARF جزء عوامل رونویسی هستند که پروتئین این ژن‌ها با اتصال به عوامل پاسخ به اکسین (AREs) در پروموتور ژن‌های اولیه پاسخ به اکسین، باعث رونویسی و القاء این ژن‌ها می‌شوند (Wang and Estelle, 2014). در غلظت‌های کم یا عدم وجود اکسین، پروتئین AUX/IAA با اتصال به ARF باعث غیر فعال شدن این پروتئین‌ها و عدم رونویسی از ژن‌های پاسخ به اکسین می‌شوند (Li *et al.*, 2016) (شکل ۱). اکسین با اتصال به F-box پروتئین‌های TIR1 باعث اتصال SCF^{TIR1} به AUX/IAA و شناسایی توسط یوبی‌کوئیتین پروتئین‌ها (Ub) و هضم پروتئین‌های AUX/IAA

می‌شود و رونویسی از ژن‌های پاسخ به اکسین شروع می‌گردد. در واقع ژن‌های القائی توسط اکسین، توسط پروتئین‌های AUX/IAA تنظیم منفی می‌شوند (Quint and Gray, 2006). گوجه فرنگی دارای ۲۲ ژن رمزکننده ARFs است در حالی که کلزا و آرابیدوپسیس به ترتیب ۳۱ و ۲۳ ژن ARF را دارند (Chandler, 2016). اکسین دارای یکسری ناقل است که باعث توزیع این هورمون در اندام‌های مختلف می‌شوند. ناقل قطبی اکسین (PAT)^۳ و انتقال دهنده‌های PIN^۴ و همچنین انتقال‌دهنده ABCB^۵ جزء ناقل‌های مهم توزیع اکسین می‌باشند (Sokolowska *et al.*, 2013). هفت ژن PIN تاکنون در آرابیدوپسیس شناسایی شده‌اند و نقش ژن‌های PIN1، PIN3 و PIN7 در انتقال ریزش قطبی اکسین در مریستم انتهایی ریشه اصلی کاملاً مشخص شده است هر چند فعالیت انتقال دهنده‌های اکسین در ریشه‌های فرعی و ریشه اصلی متفاوت از یکدیگر است (Muday *et al.*, 2012). بررسی تحقیقات صورت گرفته (Shibasaki *et al.*, 2009; Nadella *et al.*, 2006) نشان می‌دهد تنش سرما بر روی فعالیت انتقال دهنده‌های اکسین اثر می‌گذارد اما مکانیسم مولکولی آن هنوز ناشناخته باقی مانده است و همچنین اطلاعات کمی در رابطه با بیان *PIN4* نسبت به سایر PINها در اختیار است.

اکسین با سایر هورمون‌ها دارای برهمکنش‌های در تنظیم بیان ژن‌ها است، ژن BREVIS RADIX (BRX) که در توسعه و رشد ریشه درگیر است در نقطه مشترک در برهمکنش هورمون اکسین و براسینواسنترئوئید قرار دارد (شکل ۱). تحقیقات نشان داده است که با کاربرد اکسین به صورت اسپری بر روی گیاهان آرابیدوپسیس ژن BRX القاء می‌گردد و

3. Polar Auxin Transport

4. PIN-FORMED

5. ATP binding cassette subfamily B

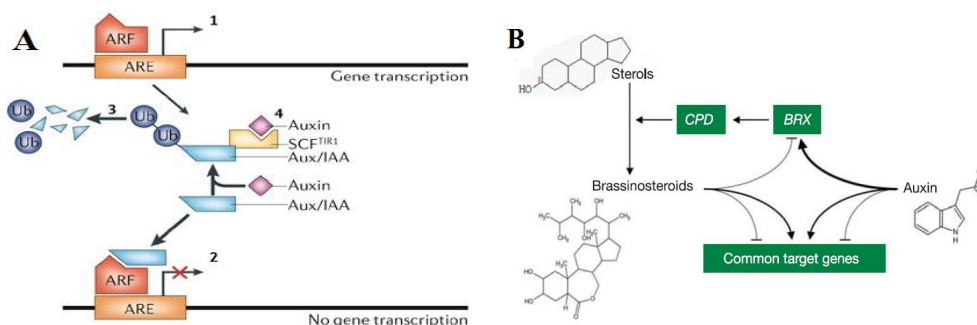
1. Auxin response factor

2. Auxin-responsive elements

اندام مهم در جذب آب و عناصر، دارای اهمیت است کمتر مورد توجه قرار گرفته است (Wachsman *et al.*, 2015). کاهش دما در خاک یا محیط هیدروپونیک، در ابتدا توسط ریشه‌ها درک می‌شود. اکسین یکی از مهم‌ترین تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهان است که درک تغییرات سیستم پیام‌رسانی و ترابری این هورمون تحت شرایط تنش، می‌تواند اطلاعات ارزشمندی در جهت اصلاح گوجه‌فرنگی در اختیار قرار بدهد. لذا در این پژوهش الگوی تغییرات بیان ژن‌های ARF و AUX/IAA از ژن‌های تنظیمی کلیدی در مسیر پیام‌رسانی هورمون اکسین و ژن PIN4 بعنوان یک انتقال دهنده هورمون اکسین که نسبت به سایر PINها اطلاعاتی از الگوی بیان این ژن در ریشه تحت شرایط کاهش دما در دسترس نیست به همراه ژن BRX که از ژن‌های مهم برهمکنش اکسین با سایر هورمون اکسین است، در ریشه ژنوتیپ‌های متحمل و حساس به سرما گیاه گوجه فرنگی تحت دمای پایین تر از حد نرمال (۱۵ درجه سانتی‌گراد) مورد ارزیابی قرار گرفت.

کاربرد هورمون براسینواستروئید در غلظت بالا باعث کنترل و کاهش بیان ژن BRX می‌شود (Mouchel *et al.*, 2006). جهش یافته *brx2* باعث کاهش رشد ریشه در آرابیدوپسیس شده و همچنین اسیدآبسیزیک تحت تنش خشکی باعث کاهش بیان ژن BRX می‌شود (Rodrigues *et al.*, 2009). هر چند که اطلاعات در مورد عملکرد BRXs در گیاهان تحت تنش‌های محیطی خیلی کم است و بعنوان یک کاندیدای مناسب می‌تواند در مطالعات مولکولی مورد بررسی قرار گیرد.

مطالعات در رابطه با تنظیم بیان ژن‌ها تحت تنش‌های سرما و دمای پایین در گوجه‌فرنگی صورت گرفته و شبکه‌ها و مسیرهای کلی مولکولی پاسخ گیاهان به این تنش‌ها مشخص گردیده است (Liu *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2015). اکثر تلاش‌های اصلاحی در زمینه افزایش عملکرد در گیاهان زراعی به صورت کلی بر روی خصوصیات وابسته به اندام هوایی تمرکز داشته‌اند در حالی که ریشه بعنوان نیمه مخفی گیاه بعنوان لنگرگاه و یک



شکل ۱. برهمکنش بین ARF و Aux/IAA تحت شرایط وجود و عدم وجود اکسین (A) (Teale *et al.*, 2006) و موقعیت ژن BRX در مسیر هورمون اکسین و براسینواستروئید (B) (Mouchel *et al.*, 2006).

اکسین، بذره‌های گوجه فرنگی، *S. lycopersicum* cv. Moneymaker (حساس به سرما) و *S. habrochaites* LA1777 (مقاوم به سرما) که از کمپانی ENZA zaden کشور هلند تهیه شده

مواد و روش‌ها

شرایط کشت و اعمال تیمارها

جهت بررسی اثر تنش دمای پایین بر الگوی بیان ژن‌های درگیر در پیام‌رسانی و ترابری هورمون

بودند، بین دو لایه کاغذ صافی در دمای ۲۳° سانتی‌گراد در اتاقک‌های رشد کشت گردیدند. پس از هفت روز ۵۰ درصد از گیاهچه‌های هر جنس به اتاقک رشد با دمای ۱۵° منتقل شد و به مدت سه روز در این دما نگهداری شدند. همچنین جهت مطالعه تغییرات رونوشت ژن‌های مورد مطالعه پس از تنش، تعدادی از گیاهچه‌ها پس از سه روز نگهداری در دمای ۱۵° به دمای ۲۳° سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت (2h) منتقل شدند. در این تحقیق دمای ۲۳° سانتی‌گراد به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد. ریشه‌های گیاهچه‌های ۱۰ روزه از هر دو جنس گوجه‌فرنگی برش و بلافاصله در نیتروژن مایع قرار داده شدند و سپس در ۸۰°- جهت مطالعه تغییرات رونوشت ژن‌ها نگهداری شدند.

mgr suite آغازگرها بر اساس توالی این ژن‌ها در گیاه گوجه‌فرنگی، طراحی و مورد آنالیز قرار گرفتند (جدول ۱). RNA کل با استفاده از تریزول (Trizol regent- SIGMA) استخراج گردید. کمیت و کیفیت RNA با استفاده از Thermo Nano Drop 2000 و ژل آگاروز ۱٪ بررسی شد. جهت حذف آلودگی DNA از RNase-free DNA جهت حذف آلودگی DNA از RNase-free DNA (Thermo Scientific) استفاده شد و cDNA با استفاده از کیت‌های شرکت پرومگا (Promega, USA) و طبق دستورالعمل آن ساخته شد. از دستگاه Applied Biosystems 7300 جهت مطالعه بیان ژن‌ها استفاده شد. واکنش RT-qPCR با استفاده از SYBR Green master mix (Thermo Scientific) و طبق دستورالعمل آن در سه تکرار مستقل انجام گردید. از ژن elongation factor 1- α به علت مناسب بودن برای تنش‌های دمای پایین (Nicot et al, 2005) به عنوان ژن کنترل استفاده شد. جهت محاسبه بیان نسبی ژن‌ها از فرمول ΔCt و $\Delta\Delta\text{Ct}$ برای محاسبه میزان تغییرات رونوشت‌ها استفاده شد (Livak and Schmittgen, 2001).

استخراج RNA و واکنش qPCR

طبق بررسی منابع صورت گرفته، ژن‌های ARF، AUX/IAA (IAA4)، PIN4 و BRX به عنوان ژن‌های کلیدی مهم که در مسیر انتقال پیام و ترابری هورمون اکسین درگیر هستند جهت مطالعه بیان ژن انتخاب شدند و با استفاده نرم افزار پرایمر ۳ و clone

جدول ۱. لیست آغازگرهای مورد استفاده در واکنش qPCR

ژن	شناسه ژن	توالی آغازگر برگشتی (۳-۵)	توالی آغازگر پیشبر (۳-۵)	طول محصول
<i>EF-1-α</i>	Solyc06g005060	CAACACCAACAGCAACAGTCT	GGAACCTTGAGAAGGAGCCTAAG	158
<i>AUX/IAA4</i>	Solyc04g076850	CACGTGAGGTCTCCTTTGTATC	CAGACGCTATGGATGGATTCTC	84
<i>ARF</i>	Solyc05g013040	AGATCAATGGCTCGTCCAAC	TGCACAGGCTCCATGTAAAC	135
<i>BRX</i>	Solyc08g005460	CCAGCAATGCTCATGGATACT	TTCTTATGCCTCCGGCTTTC	105
<i>PIN4</i>	Solyc05g008060	CTCCGACACCGGAGAATTAC	CAGCACCAACAGCCAAATG	93

مورد مطالعه از پایگاه اطلاعات ژنومی گوجه‌فرنگی (Sol genomics network) استخراج شد. از پایگاه SCOPE (Carlson et al., 2007) جهت شناسایی و مکانیابی موتیف‌های مشترک استفاده شد و بر اساس الگوریتم‌های شناخته شده بهترین توالی موتیف کاندیدا انتخاب شد. عملکرد موتیف‌های انتخاب شده از طریق

آنالیز توالی بالادست ژن‌ها

جهت شناسایی موتیف‌های مشترک و نواحی تنظیمی که امکان معرفی یک عامل سیس جدید در ژن‌های درگیر در پیام‌رسانی و ترابری هورمون اکسین فراهم می‌کند، ۱۵۰۰ جفت باز قبل از ناحیه شروع رونویسی به عنوان کاندید ناحیه پروموتوری در بالادست ژن‌های

طی تنش دمای پایین، می‌تواند به علت افزایش میزان اکسین در ریشه باشد. نتایج Vert و همکاران (2008) نشان داد که ژن BIN2 که در مسیر سنتز هورمون براسینواستروئید قرار دارد از طریق غیر فعال کردن عوامل سرکوب‌کننده ژن‌های پاسخ به اکسین باعث افزایش بیان ژن‌های ARF می‌شود و ژن ARF2 بعنوان یک نقطه مشترک در مسیر هورمون براسینواستروئید و اکسین معرفی شده است. بررسی ۳۶ ژن Aux/IAA در گیاه گوجه‌فرنگی نشان می‌دهد که همه آنها توسط اکسین غیرفعال می‌شوند هر چند پاسخ‌های متفاوتی به اکسین و اتیلن نشان می‌دهند و ژن‌های این خانواده بعنوان یک ناحیه کلیدی در اثر متقابل هورمون‌ها شناخته شده است همچنین (Audran-Delalande *et al.*, 2012). همکاران Paul و همکاران (۲۰۱۶) ۵۵ ژن Aux/IAA را در گیاه کلزا بر اساس همولوژی و دومین حفاظت شده شناسایی کردند که همه آنها در حضور اکسین کاهش بیان یافتند و ۲۱ ژن از این خانواده در اثر تنش‌های سرما، شوری و خشکی بیان افتراقی نشان دادند. نتایج شبکه ارتباطی ژن‌ها نشان می‌دهد که ژن IAA4 بیشترین ارتباط را با ژن‌های IAA3، IAA9 و IAA11 نسبت به سایر ژن‌های خانواده Aux/IAA داشت. نتایج بیان ژن‌های ARF و IAA4، همبستگی منفی بین ژن‌های خانواده Aux/IAA و ARF را تأیید کرد. بر اساس نتایج بیان ژن‌های ARF و Aux/IAA می‌توان بیان داشت در طی تنش دمای پایین غلظت اکسین در ریشه‌های ژنوتیپ‌های گوجه‌فرنگی تغییر می‌کند که سبب بیان افتراقی ژن‌های درگیر در مسیر پیام‌رسانی هورمون اکسین شده است.

ژن PIN4 که در مسیر ترابری اکسین درگیر است در ریشه گیاهچه‌های MoneyMaker (حساس به سرما) تحت شرایط کاهش دما القاء شد و افزایش بیان نشان داد در حالی که در ژنوتیپ مقاوم افزایش بیان معنی‌داری نسبت به شرایط بدون تنش

پایگاه (UniPROBE, Newburger and Bulyk, 2009) مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج و بحث

نتایج بررسی الگوی بیان ژن‌ها نشان داد که تنش دمای پایین بر روی بیان ژن‌های ARF و AUX/IAA4 که در مسیر پیام‌رسانی اکسین درگیر هستند اثر می‌گذارد بطوریکه بیان ژن ARF تحت تنش دمای پایین در گیاهچه‌های LA1777 (مقاوم به سرما) کاهش می‌یابد در حالی که در ژنوتیپ حساس افزایش بیان جزئی نشان داد. تحت شرایط ۲ ساعت نگهداری در دمای ۲۳ درجه پس از تنش دمای (2h)، این ژن در هر دو ژنوتیپ کاهش بیان نشان داد هر چند کاهش بیان در ژنوتیپ مقاوم بیشتر بود (شکل ۲). همچنین تغییرات رونوشت ژن AUX/IAA4 در ژنوتیپ مقاوم تغییرات محسوس‌تری نسبت به ژنوتیپ حساس نشان داد بطوریکه در دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد این ژن در ریشه ژنوتیپ مقاوم افزایش بیان یافت اما در زمان ۲ ساعت ریکاوری مقداری کاهش بیان (نسبت به میزان بیان در شرایط دمای پایین) نشان داد. بیان ژن AUX/IAA4 تحت شرایط پایین‌تر از دمای نرمال در ژنوتیپ حساس تفاوت معنی‌داری نسبت به شرایط دمای نرمال نشان نداد اما در زمان ۲ ساعت پس از ریکاوری، افزایش بیان یافت (شکل ۲).

نتایج بیان ژن نشان داد که در هنگام کاهش بیان Aux/IAA میزان بیان ARF افزایش می‌یابد. در حضور اکسین عامل Aux/IAA (به عنوان کنترل کننده منفی رونویسی از ژن‌های درگیر در پیام‌رسانی اکسین) از ARF جدا می‌گردد و ARF رونویسی از ژن‌های هدف را شروع می‌کند (Halliday, 2004). بیان ژن ARF در ریشه ژنوتیپ LA1777 تحت تنش دمای پایین، کاهش بیان نشان داد که به نظر می‌رسد ژن ARF در ریشه‌های ژنوتیپ حساس کمتر تحت شرایط تنش دمای پایین القاء می‌شود. کاهش بیان Aux/IAA در ریشه ژنوتیپ حساس در

با عملکرد دقیق ژن BRX اطلاعات کمی وجود دارد اما نقش آن در رشد ریشه شناخته شده است و نتایج این مطالعه نشان داد که پس از تنش دمایی پایین تر از حد نرمال و در زمان ریکاوری، این ژن نقش بیشتری نسبت به سایر ژن‌های مورد مطالعه دارد. در کل می‌توان بیان داشت که تحت شرایط تنش دمایی پایین غلظت اکسین در ریشه گیاهچه‌های ژنوتیپ حساس گوجه فرنگی افزایش می‌یابد و این افزایش محتوی اکسین باعث القاء ژن‌های ARF، BRX و PIN4 و کنترل بیان ژن AUX/IAA می‌گردد. به نظر می‌رسد که ژنوتیپ حساس به علت ساختار حساس دیواره سلولی، تنش دمایی پایین را بیشتر از ژنوتیپ متحمل درک کرده و در نتیجه باعث انتقال بیشتر اکسین از ساقه به ریشه گردیده است.

بررسی نواحی بالادست ژن‌ها

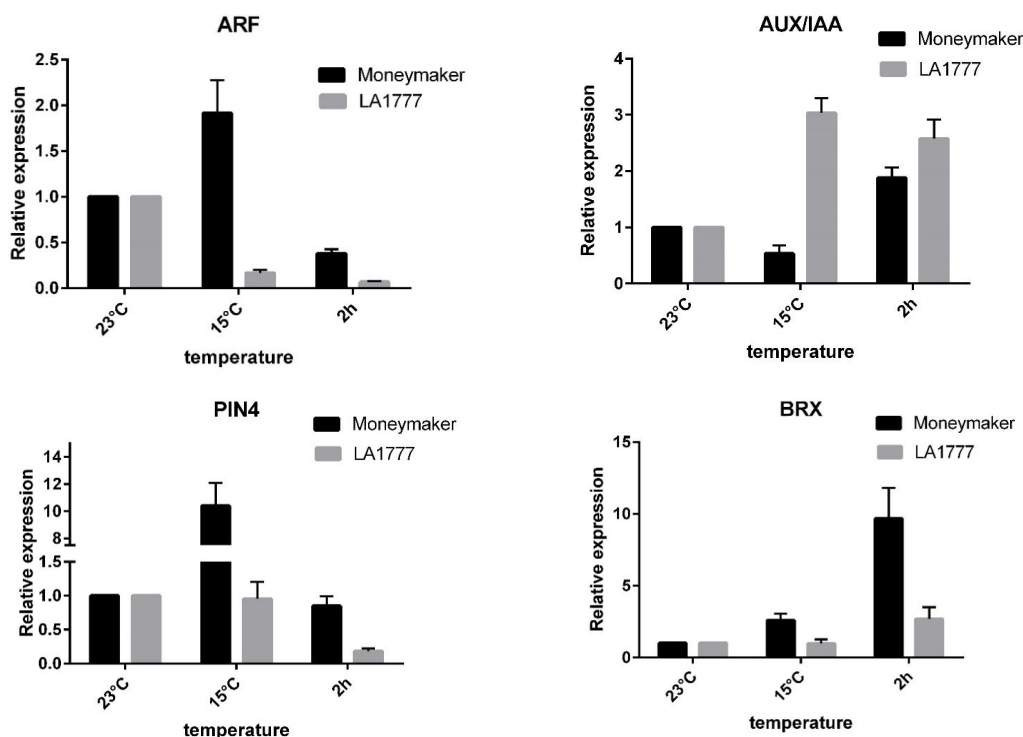
بررسی توالی بالادست ژن‌های مورد مطالعه نشان داد که موتیف‌های AATAT و CNTTTMWBA از الگوریتم PRISM، به ترتیب با ۹۴ و ۱۹ بار تکرار در ناحیه ۱۵۰۰ جفت باز بالا دست ژن‌ها مشاهده شدند (شکل ۳). موتیف AATAT بیشترین شباهت را به موتیف‌های Yap3 و Spt15 مخمر دارد که به عنوان موتیف‌های درگیر در رونویسی و جزئی از جعبه TATA شناخته شده‌اند. موتیف ATAAAAG از الگوریتم BEAM در توالی بالادست همه ژن‌های مورد مطالعه مشاهده گردید (شکل ۳) که مشابه با موتیف HOXD13_R306W که جزئی از خانواده عوامل رونویسی هوموباکس (Homobox) است، داشت. ناحیه بین ۱۲۰۰ تا ۱۴۰۰ جفت باز در بالادست ژن ARF به عنوان یک ناحیه غنی از موتیف‌ها شناخته شد (شکل ۳). این ناحیه می‌تواند نقش کلیدی در تنظیم فعالیت این ژن داشته باشد. موتیف AACNHWHNDWNRAGT از الگوریتم SPACER تنها در توالی بالادست ژن PIN4 مشاهده نشد (شکل ۳). این موتیف با Ste12 در

نشان نداد هرچند در زمان بازیافت ۲ ساعت (2h) کاهش بیان بیشتری نسبت به شاهد (دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد) نشان داد (شکل ۲). افزایش بیان در ژن‌های PIN2 و PIN3 در تنش سرما گزارش شده است (Shibasaki *et al.*, 2009)، هر چند تنش سرما در کل باعث کاهش فعالیت انتقال دهنده‌های داخل سلولی از جمله ناقل‌های ریزش اکسین در سلول می‌شود (Rahman, 2013). به نظر می‌رسد میزان بیان ژن‌های انتقال‌دهنده‌های اکسین در قسمت‌های مختلف ریشه متفاوت می‌باشد بطوریکه Robert و Friml (2009) بیان داشتند که ژن PIN4 در انتقال اکسین در ریشه‌های فرعی بیشتر از ریشه اصلی فعال است. در کل می‌توان بیان داشت تنش دمایی پایین تر از حد نرمال باعث القاء PIN4 در ریشه گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی می‌گردد و ژنوتیپ‌های حساس و مقاوم دارای پاسخ‌های متفاوت در بیان ژن PIN4 هستند. بررسی الگوهای بیان ژن‌ها نشان داد الگوی بیان ژن ARF با ژن PIN4 دارای همبستگی مثبت در این آزمایش می‌باشند.

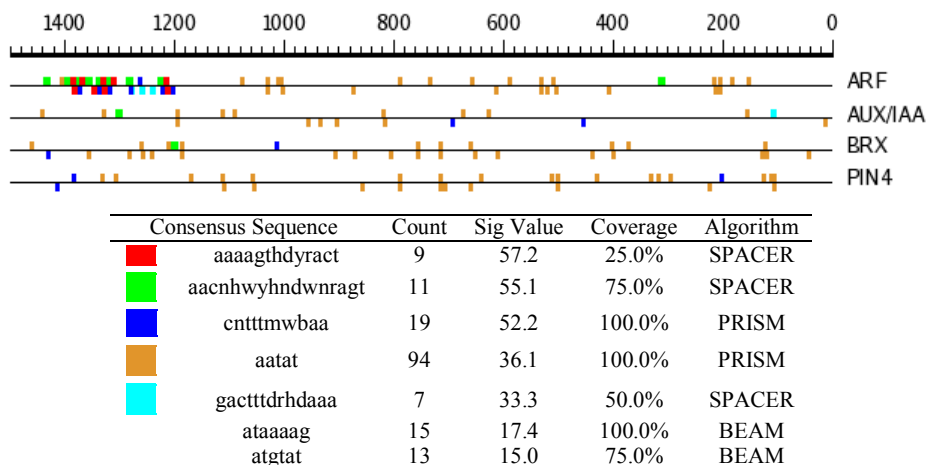
بررسی الگوی بیان ژن BRX نشان داد که این ژن در ژنوتیپ حساس بیشتر از ژنوتیپ مقاوم تحت دمایی پایین القاء می‌شود بطوریکه در زمان 2h بیشترین افزایش بیان را نشان داد. تغییرات رونوشت ژن BRX تحت تنش دمایی پایین نسبت به شرایط نرمال در ژنوتیپ مقاوم معنی‌دار نبود اما در تیمار 2h ژن BRX افزایش بیان نشان داد (شکل ۲). ژن BRX در رشد ریشه‌ها درگیر است و به‌عنوان یک نقطه برهمکنش بین مسیر براسینواستروئید و اکسین شناخته شده است بطوریکه توسط اکسین القاء و توسط براسینولید کنترل می‌شود (Mouchel *et al.*, 2006). اسید آبسازیک باعث کاهش بیان BRX و رشد ریشه در گیاه آراییدوپسیس شد و ژن BRX به‌عنوان ناحیه برهمکنش هورمون‌های اکسین و براسینواستروئید با اسید آبسازیک معرفی شد (Rodrigues *et al.*, 2009). هر چند که در ارتباط

مشترک (Heidari *et al.*, 2015). موتیف‌های مشترک شناسایی شده در توالی بالا دست ژن‌ها به عنوان Cis-elements کلیدی درگیر در تنظیم ژن‌ها برای اولین بار معرفی می‌شوند.

مخمر که توسط MAP کینازها فعال می‌شود، مشابهت داشت. شناسایی موتیف‌های مشترک در توالی تنظیمی بالا دست ژن‌ها امکان هم بیانی ژن‌ها و لقاء توسط یک عامل مشترک را فراهم می‌نماید



شکل ۲. الگوی تکثیر ژن‌های ARF، Aux/IAA، PIN4 و BRX در ژنوتیپ حساس (Moneymaker) و ژنوتیپ مقاوم (LA1777) تحت شرایط دمای نرمال (23°C)، دمای پایین تر از حد نرمال (15°C) به مدت سه روز و برگشت به دمای نرمال به مدت ۲ ساعت (2h).



شکل ۳. مکان توزیع و نوع عناصر تنظیمی در ۱۵۰۰ جفت باز بالا دست از جایگاه رونویسی ژن‌های مورد مطالعه، با استفاده از الگوریتم‌های موجود در پایگاه SCOPE

REFERENCES

- Audran-Delalande C, Bassa C, Mila I, Regad F, Zouine M, Bouzayen M (2012) Genome-wide identification, functional analysis and expression profiling of the Aux/IAA gene family in tomato, *Plant Cell Physiol.* 53(4): 659-672.
- Carlson JM, Chakravarty A, DeZiel CE, Gross RH (2007) SCOPE: a web server for practical *de novo* motif discovery. *Nucleic Acids Research.* doi: 10.1093/nar/gkm310.
- Chandler JW (2016) Auxin response factors. *Plant, Cell and Environment.* 39: 1014-1028.
- Chen H, Chen X, Chen D, Li J, Zhang Y, Wang A (2015) A comparison of the low temperature transcriptomes of two tomato genotypes that differ in freezing tolerance: *Solanum lycopersicum* and *Solanum habrochaites*. *BMC Plant Biology.* 15:132. doi:10.1186/s12870-015-0521-6.
- Halliday KJ (2004) Plant hormones: the interplay of brassinosteroids and auxin. *Curr. Biol.* 14:1008-1010.
- Heidari P, Ahmadizadeh M, Najafi-Zarrini H (2015) *In Silico* Analysis of Cis-Regulatory Elements on Co-Expressed Genes. *J. BIOL. ENVIRON. SCI.* 9(25): 1-9.
- Li SB, Xie ZZ, Hu CG, Zhang JZ (2016) A Review of Auxin Response Factors (ARFs) in Plants. *Frontiers of Plant Sciences.* 7:4.doi.org/10.3389/fpls.2016.00047.
- Liu H, Ouyang B, Zhang J, Wang T, Li H, Zhang Y, Yu C, Ye Z (2012) Differential Modulation of Photosynthesis, Signaling, and Transcriptional Regulation between Tolerant and Sensitive Tomato Genotypes under Cold Stress. *PLoS ONE.* 7(11): e50785. doi:10.1371/journal.pone.0050785
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta ct}$ Method. *METHODS.* 25: 402-408.
- Mouchel CF, Osmont KS, Hardtke CS (2006) BRX mediates feedback between brassinosteroid levels and auxin signalling in root growth. *Nature.* 443: 458-461.
- Muday GK, Rahman A, Binder BM (2012) Auxin and ethylene: collaboration or competitors? *Trends in Plant Science.* 17: 181-195.
- Nadella, V, Shipp MJ, Muday GK, Wyatt SE (2006) Evidence for altered polar and lateral auxin transport in the gravity persistent signal (*gps*) mutants of Arabidopsis. *Plant Cell Environ.* 29: 682-690.
- Newburger DE, Bulyk ML (2009) UniPROBE: an online database of protein binding microarray data on protein-DNA interactions. *Nucleic Acids Research.* doi: 10.1093/nar/gkn660.
- Nicot N, Hausman JF, Hoffmann L, Evers D (2005) Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. *J. Exp. Bot.* 56 (421): 2907-2914. doi:10.1093/jxb/eri285.
- Paul P, Dhandapani V, Rameneni JJ, Li X, Sivanandhan G, Choi SR, Pang W, Im S, Lim YP (2016) Genome-Wide Analysis and Characterization of Aux/IAA Family Genes in *Brassica rapa*. *PLoS ONE.* 11(4): e0151522. doi:10.1371/journal.pone.0151522.
- Quint M, Gray WM (2006) Auxin signaling. *Current opinion in plant biology.* 9(5): 448-53.
- Rahman A (2013) Auxin: a regulator of cold stress response. *Physiologia plantarum.* 147: 28-35.
- Robert HS, Friml J (2009) Auxin and other signals on the move in plants. *Nature chemical biology.* 5: 325-332.
- Rodrigues A, Santiago J, Rubio S, Saez A, Osmont KS, Gadea J, Hardtke CS,

- Rodriguez PL (2009) The Short-Rooted Phenotype of the *brevis radix* Mutant Partly Reflects Root Abscisic Acid Hypersensitivity. *Plant Physiology*. 149(4): 1917–1928.
- Shibasaki K, Uemura M, Tsurumi S, Rahman A (2009) Auxin Response in Arabidopsis under Cold Stress: Underlying Molecular Mechanisms. *The Plant Cell*. 21: 3823-3838.
- Sokolowska k, Kizinska J, Szewczuk Z, banasiak A (2014) Auxin conjugated to fluorescent dyes--a tool for the analysis of auxin transport pathways. *Plant biology*. 16: 866-877.
- Teale WD, Paponov IA, Palme K (2006) Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 7(11):847-859.
- Venema JH, Linger P, Van Heusden AW, Van Hasselt PR, Bruggemann W (2005) The inheritance of chilling tolerance in tomato (*Lycopersicon* spp.). *Plant Biol*. 7: 118–130.
- Vert G, Walcher CL, Chory J, Nemhauser JL (2008) Integration of auxin and brassinosteroid pathways by Auxin Response Factor 2. *PNAS*. 105: 9829–9834.
- Wachsman G, Sparks EE, Benfey PN (2015) Genes and networks regulating root anatomy and architecture. *New Phytologist*. 208(1):26-38.
- Wang R, Estelle M (2014) Diversity and specificity: auxin perception and signaling through the TIR1/AFB pathway. *Current Opinion in Plant Biology*. 21: 51-58.
- Weijers D, Wagner D (2016) Transcriptional Responses to the Auxin Hormone. *Annual Review of Plant Biology*. 67: 539 -574.