مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌فناوری گیاهان زراعی
سال هفتم، شماره نوزدهم، پائیز ۱۳۹۶ (۳۹-۵۰)

Crop Biotech.
Autumn (2017) 18: 39-50.

بررسی گسترده ژنومی خانواده ژن‌های پاسخ‌گو به هورمون اکسین (ARF) در لوبیا

سهیلا فاطمی[۱]، خالد میرزایی[۲*]، محمد صدیق کمانگر[۱]
۱. کارشناسی‌ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران
۲. دانشجوی دکتری، دانشکده زمین و زندگی، مرکز تحقیقات تنوع، دانشگاه کاتولیک لوون، ب-۱۳٤۸ بلژیک
(تاریخ دریافت: ۱۳۹٦/۲/۲۲ - تاریخ تصویب: ۱۳۹٦/٦/۲۹)

Genome-wide analysis of the auxin response factor (ARF) gene family in *Phaseolus vulgaris*

Soheila Fatemi[1], Khaled Mirzaei[2*], Mohamed Sedigh Kamangar[1]
1. M.Sc. of Biotechnology in Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran
2. Ph.D. Student, Earth & Life Institute, Biodiversity Research Centre, Université Catholique de Louvain (UCL), B-1348 Belgium

(Received: May 12, 2017 - Accepted: Sep. 21, 2017)

چکیده

اکسین نقش مهمی در تنظیم مراحل مختلف رشد و نمو گیاهان دارد. مطالعات نشان داده است که اکسین این فرآیندها را با استفاده از ژن‌های پاسخ‌گو به اکسین (ARF) تنظیم می‌کند. با توجه به نوع دومین میانی، پروتئین ARF به عنوان یک فاکتور رونویسی با اتصال به ژن‌های هدف باعث سرکوب و یا تحریک بیان این ژن‌ها می‌شود. ژن‌های ARF در چند گونه مختلف گیاهی با استفاده از روش‌های مولکولی مورد مطالعه قرار گرفته‌اند، با این حال برای درک بهتر مکانیسم این پروتئین‌ها نیاز به مطالعات بیشتری در گیاهان است. در این مطالعه با استفاده از روش‌های محاسباتی ۲۷ ژن ARF شناسایی شد که در قسمت‌های مختلف کروموزوم‌های لوبیا پراکنده هستند. بررسی درخت فیلوژنتیکی نشان داد این توالی‌ها در چهار گروه مجزا قرار دارند بدون اینکه در بین این توالی‌ها مضاعف‌شدگی مشاهده شود. بیان ژن‌های ARF باتوجه به نوع ژن و بر اساس نوع بافت به ترتیب به پنج و دو گروه تقسیم شد. ژن‌های ARF در بافت‌های برگ، سه برگچه‌های جوان، ساقه، غلاف‌های رسیده و غلاف‌های جوان در مقایسه با سایر بافت‌های دیگر بیان بیشتری داشتند. از کل توالی‌های ARF مورد بررسی، تعداد ۹ و ۱۷ توالی به ترتیب به عنوان محرک و سرکوب‌کننده بیان ژن شناسایی شدند.

واژه‌های کلیدی: لوبیا، خانواده ژنی، اکسین، ARF.

Abstract

Auxin has an important role in the various stages of plants growth and development. Studies have shown that auxin regulates these processes by auxin responsefactors (ARF) family. ARF proteins due to their central domain, mediate the cellular response to the auxin by activating or repressing the expression of downstream genes. ARF genes in several different plant species have been studied by molecular methods however to better understand the mechanisms of these proteins more studies are needed. In this study with computational methods, we found 27 ARF proteins, which they were scattered on the different parts of *Phaseolus vulgaris* chromosomes. The phylogenetic analysis of these sequences revealed they were divided into four different classes without any sign of gene-duplication between them. ARF genes expression according to the types of gene and based on the types of tissue respectively showed that they group into the five and two classes. In comparing with other tissues, ARF genes in leaf, young trifoliates, stems, mature pods and young pods tissues have a high level of expression. Of the 27 ARF *Phaseolus vulgaris* sequences surveyed in this study, nine ARF proteins were gene activator and 17 ARF proteins were gene suppressor.

Keywords: *Phaseolus vulgaris*, Gene family, auxin, ARF.

* نویسنده مسئول: خالد میرزایی
E-mail: Khaled.Mirzaei@uclouvain.be

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

اکسین در مهم‌ترین واکنش‌های رشد گیاه نقش کلیدی دارد. این هورمون مراحل مختلف نمو گیاه مانند اندام‌زایی، تمایز بافت آوندی، غالبیت راس ساقه، پیدایش ریشه و همچنین در سطح سلولی فرآیندهای تقسیم، تمایز و توسعه سلولی را کنترل می‌کند. با گذشت سه دهه از شناسایی اثرات سریع اکسین روی بیان و تنظیم ژن، در آرابیدوپسیس و دیگر گونه‌های گیاهی تعداد بزرگی از ژن‌هایی که توسط اکسین تنظیم می‌شوند و همچنین ژن‌هایی که ممکن است در فرآیندهای رشد و نمو نقش داشته باشند شناسایی شده‌اند (Di *et al.*, 2016). از جمله این ژن‌ها، اعضای خانواده فاکتورهای پاسخ‌گو به هورمون اکسین[1] (ARF) می‌باشند که در تنظیم بیان ژن‌های پاسخ‌گو به اکسین نقش کلیدی دارند. خانواده ژنی *ARF*، خانواده‌ای از فاکتورهای رونویسی است که با وجود صدها میلیون سال تکامل، به صورت حفاظت شده باقی مانده است (Ellis *et al.*, 2005). ژن‌هایی که توسط اکسین با افزایش تنظیم یا کاهش تنظیم روبرو می‌شوند دارای AUXRE[2] در پروموترهایی هستند که به فاکتورهای رونویسی خانواده ARF متصل می‌شوند. توالی AUXRE به سبب جداسازی ARF1 در آرابیدوپسیس شناسایی شد و پس از آن با استفاده از مطالعات مولکولی و ژنتیکی ۲۲ ژن ARF و یک ژن کاذب ARF در آرابیدوپسیس شناسایی گردید (Goetz *et al.*, 2006). مطالعات ژنتیکی و الگوهای تمایز و پویایی ژن‌های ARF در طول نمو، نشان داده است که ARFها فرآیندهای نمویی مشخصی را کنترل می‌کنند. اعضای پروتئینی خانواده ARF دارای ناحیه مرتبط با اتصال DNA، ناحیه محرک یا سرکوب رونویسی و ناحیه واکنش متقابل پروتئین- پروتئین در طول فرآیندهای پیام‌رسانی و دریافت اکسین می‌باشند (Guilfoyle, 2015).

امروزه با پیشرفت در زمینه بیوانفورماتیک و توالی‌های حاصل از بررسی‌های گسترده ژنومی در گیاهان مختلف، فرصت مناسبی برای بررسی و شناسایی خانواده‌های ژنی فراهم شده است. ژنوم لوبیاچیتی در سال ۲۰۱۴ توالی‌یابی شد و طول ژنوم آن ۵۳۷ مگا جفت باز است. تعداد لوکوس‌های آن ۲۷۴۳۳ و تعداد پروتئین‌های بیان شده از این لوکوس‌ها ۳۶۹۹۵ می‌باشد (Schmutz *et al.*, 2014). آنالیزهای گسترده و محاسباتی بسیاری در مورد خانواده‌های ژنی مختلف مانند بررسی پروتئین‌های آرگونات، شناسایی میکروآرانآ و ژن‌های هدف آن و نیز شناسایی و بررسی پروتئین‌های آکواپورین در لوبیا با استفاده از این داده‌های ژنومی صورت گرفته است (Mirzaei *et al.*, 2014; Ariani & Gepts, 2015).

با توجه به نقش کلیدی و مهم ژن ARF در فرایندهای مختلف فیزیولوژیکی و رشدی و استفاده بیشتر از آن‌ها در آینده برای تولید بهتر محصولات، به‌تازگی، این خانواده ژنی در چند گیاه مبتنی بر یافته‌های اخیر از ژنوم پرتقال، ذرت و گوجه‌فرنگی با استفاده از آنالیزهای مولکولی و بیوانفورماتیکی بررسی شده‌اند (Kumar *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2016). لوبیا یکی از گیاهان مدل در خانواده بقولات است که همواره به عنوان منبع غنی از پروتئین در رژیم غذایی انسان مورد توجه است. همچنین این گیاه به‌عنوان گونه‌ای مناسب جهت مطالعه همزیستی باکتری‌های تثبیت کننده نیتروژن شناخته شده است. با اشاره به اهمیت لوبیا به عنوان نماینده‌ای مهم از خانواده بقولات و همچنین اهمیت ژن‌های ARF و وجود داده‌های حاصل از توالی‌یابی ژنوم لوبیا، بررسی گسترده ژنومی این ژن‌ها در لوبیا انجام شد که نتایج این تحقیق در جهت بهبود مطالعات بنیادی در زمینه

1. *Auxin response factors* (*ARF*) family
2. Auxin response element

Archive of SID

www.SID.ir

خانواده‌های ژنی ARF و ارتباط تکاملی آن‌ها با سایر گیاهان و بررسی ارتباط آن‌ها با ژن‌های پاسخ دهنده به اکسین مفید خواهد بود.

مواد و روش‌ها

شناسایی خانواده ژنی ARF در لوبیا

به منظور شناسایی ژن‌های خانواده ARF، ژنوم و مجموع توالی‌های پروتئینی لوبیا از پایگاه اطلاعاتی فیتوزوم و ژن‌های ARF گیاهان آرابیدوپسیس، برنج و سویا از پایگاه اطلاعاتی NCBI دریافت شدند (Goodstein *et al.*, 2011). با استفاده از روش همردیفی[1] و با جستجوی توالی‌های پروتئینیARF (P-value=۰/۰۰۱) به کمک توالی‌های ARF آرابیدوپسیس، برنج و سویا، توالی‌های ARF در ژنوم لوبیا انتخاب شدند. از پایگاه اطلاعاتی Pfam جهت آزمون توالی‌ها برای داشتن دومین‌های مرتبط و مشابه با دیگر توالی‌های ARF گزارش شده در دیگر گیاهان استفاده شد. توالی‌های فاقد دومین‌های مرتبط با ژن ARF ، از ادامه بررسی حذف شدند. همچنین توالی ژن‌های کدکننده این پروتئین‌ها با استفاده از نرم افزار Clustal W برای حذف همپوشانی‌های ژنی در توالی DNA استفاده شد (Chenna *et al.*, 2003).

رسم درخت فیلوژنتیکی و مشخص کردن مناطق حفظ‌شده

همردیفی توالی‌های پروتئینی ARF به‌دست آمده از لوبیا با استفاده از نرم افزار Clustal W صورت گرفت. با استفاده از نتایج حاصل از همردیفی توالی‌های پروتئینی، درخت فیلوژنتیکی این توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار MEGA7 با روش نزدیکترین همسایگی و بوت استرپ ۱۰۰ در دو حالت و با به کارگیری توالی‌های ARF لوبیا با توالی‌های آرابیدوپسیس و همچنین توالی‌های ARF لوبیا به صورت مجزا رسم شد (Kumar *et al.*, 2016). در ادامه پس از بررسی نتایج همردیفی، نواحی حفظ شده روی توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار BioEdite به وضوح مشخص شدند و دومین‌ها روی توالی پروتئین‌های ARF لوبیا با استفاده از پایگاه اطلاعاتی NCBI رسم گردید.

بررسی تعداد تکرار هر ژن و محل آن‌ها در کروموزوم‌های لوبیا

با استفاده از اطلاعات به‌دست آمده از پایگاه اطلاعاتی فیتوزوم، ORFهای هر ژن به طور کامل به دست آمد و برای بررسی تکراری بودن و همچنین تکامل آن‌ها از همدیگر مورد بررسی قرار گرفتند. ژن‌های تایید شده همردیف شدند و درخت فیلوژنتیکی آن‌ها با استفاده از نرم افزار MEGA7 رسم گردید. جایگاه هر ژن در کروموزوم‌های لوبیا با استفاده از توالی‌های ژنی به دست آمده از ORF و بلاست نوکلئوتید در ژنوم لوبیا مشخص گردید و نقشه کروموزومی و جایگاه ژن‌های ARF رسم گردید. جهت بررسی وجود ژن‌های مضاعف، توالی‌های نوکلئوتید ORF های هر پروتئین همردیف شدند و ژن‌هایی که دارای مقدار مشابهت و هم‌پوشانی مساوی و بیشتر از ۸۰٪ را نسبت به ژن دیگر ARF داشتند به عنوان ژن‌های مضاعف در نظر گرفته شدند.

بررسی بیان ژن ARF در بافت‌های مختلف لوبیا

برای بررسی بیان ژن‌های ARF در بافت‌های مختلف لوبیا، داده‌های RNA-seq موجود در پایگاه اطلاعاتی فیتوزوم دریافت و مورد تحلیل قرار گرفت. در این داده‌ها میزان بیان هر ژن در بافت‌های متفاوت با شاخص FPKM[2] یا نسبت بیان نسبی یک

1. Alignment

2. Fragments per Kilobase of Transcript per Million Mapped Reads

Archive of SID

www.SID.ir

ترانسکریپت نسبت به قطعات cDNA نشان داده شده که پس از استخراج این داده‌ها و همچنین نرمال کردن داده‌ها (Log_2) با استفاده از نرم‌افزار R پروفایل بیان ژن‌های ARF رسم گردید.

نتایج و بحث

خانواده ژنی ARF نقش مهمی در مراحل نمو و رشد گیاه بازی می‌کند. ساختار این خانواده ژنی در گیاهان مختلف مانند آرابیدوپسیس، گوجه‌فرنگی و ذرت به صورت گسترده و دقیق مورد مطالعه قرار گرفته است، با این حال مطالعه این ژن‌ها در لوبیا به شکل دقیق انجام نشده است. در این مطالعه ابزارهای مختلفی برای شناسایی و بررسی این ژن‌های مهم به‌کار گرفته شد. با استفاده از همردیفی توالی پروتئین‌های ARF مربوط به آرابیدوپسیس در ژنوم لوبیا و همچنین با استفاده از حفظ شدگی دومین‌های آن‌ها، ۲۷ توالی پروتئینی ARF در ژنوم لوبیا با اطمینان بالا (E value=۰/۰۰۱) جداسازی شد (جدول ۱). این تعداد در گیاهانی مانند آرابیدوپسیس، برنج، انگور و ذرت به ترتیب ۲۳، ۲۵، ۲۰ و ۳۵ توالی پروتئینی ARF گزارش شده است. مضاعف‌شدگی در ژن‌ها به عنوان یکی از منابع مهم ایجاد صفات جدید در تکامل شناخته شده است که فرایندهای جدید مولکولی را به همراه دارد (Adams & Wendel, 2005). نتایج حاصل از بررسی وجود ژن‌های مضاعف در این توالی‌ها نشان داد که توالی‌های نوکلئوتیدی مورد بررسی، مضاعف‌شدگی ندارند. اما در بررسی ARFهای ذرت گزارش شده است که از مجموع ۳۵ توالی پروتئینی ARF، تعداد ۲۴ توالی حاصل از مضاعف‌شدگی ژنی هستند.

با توجه به محل قرارگیری این ژن‌ها روی کروموزوم‌های لوبیا، همه کروموزوم‌ها حاوی توالی‌های کدکننده ARF هستند. طول این پروتئین‌ها از ۵۳۷ (Phv-ARF17) تا ۱۱۶۳ (Phv-ARF19) آمینو اسید متغیر است. مسیر و محل قرارگیری هر ژن در کروموزم‌ها و توالی‌های مربوطه بسیار متناوب می‌باشد. بیشترین وزن پروتئینی در توالی Phv-ARF19 با ۱۳۰ دالتون و کمترین وزن پروتئینی در توالی Phv-ARF17 با ۵۹/۱۱ دالتون مشاهده شد. شاخص ایزوالکتریک و طول ORF پروتئین‌های مورد مطالعه بسیار متغیر بود که در جدول ۱ نشان داده شده است. در لوبیا ژن‌های با میزان بالای بیان، تمایل به کوتاه‌تر و مختصر شدن تعداد و طول اینترون دارند که به سبب بالا بردن کارایی در سرعت و کاهش مصرف انرژی چنین حالتی در اکثر گیاهان و حتی جانوران تکامل یافته است. اما در برنج و آرابیدوپسیس ژن‌های با بیان زیاد، دارای تعداد و طول اینترون بیشتری هستند که علت چنین ساختاری در ژنوم آن‌ها مشخص نیست (Ren *et al.*, 2006). تعداد اینترون‌ها در این پروتئین‌ها از یک اینترون در توالی Phv-ARF13 تا ۱۴ عدد در توالی‌های Phv-ARF1، Phv-ARF2، Phv-ARF5، Phv-ARF8، Phv-ARF11 و Phv-ARF22 متغیر است. با توجه به داده‌های بیان ژن و تعداد اینترون، در این مطالعه ارتباط مشابهی بین این دو یافت نشد.

نتایج رسم دندروگرام توالی‌های پروتئینی ARF لوبیا و آرابیدوپسیس با استفاده از روش نزدیک‌ترین همسایگی نشان داد که این پروتئین‌ها در چهار کلاس مجزا قرار می‌گیرند به این ترتیب که توالی‌های پروتئینی ARF لوبیا با شماره‌های ۲۵، ۲۶، ۲۷، ۶، ۸، ۹، ۲۰، ۱۹ و ۵ در گروه اول، توالی‌های ۲۳، ۳، ۲۴ و ۴ در گروه دوم، توالی‌های ۱۳، ۱۴، ۱۵، ۱۷ و ۱۸ در گروه سوم و گروه چهارم ARFهای ۱۱، ۱۲، ۱۶، ۱، ۲۱، ۲، ۲۲ و ۷ را در خود جای داده است (شکل a۱). نتایج مشابهی نیز در بین دندروگرام ترسیم شده برای توالی‌های پروتئینی ARF لوبیا در حالت ترکیب با ۲۳ پروتئین ARF آرابیدوپسیس مشاهده شد (شکل b۱).

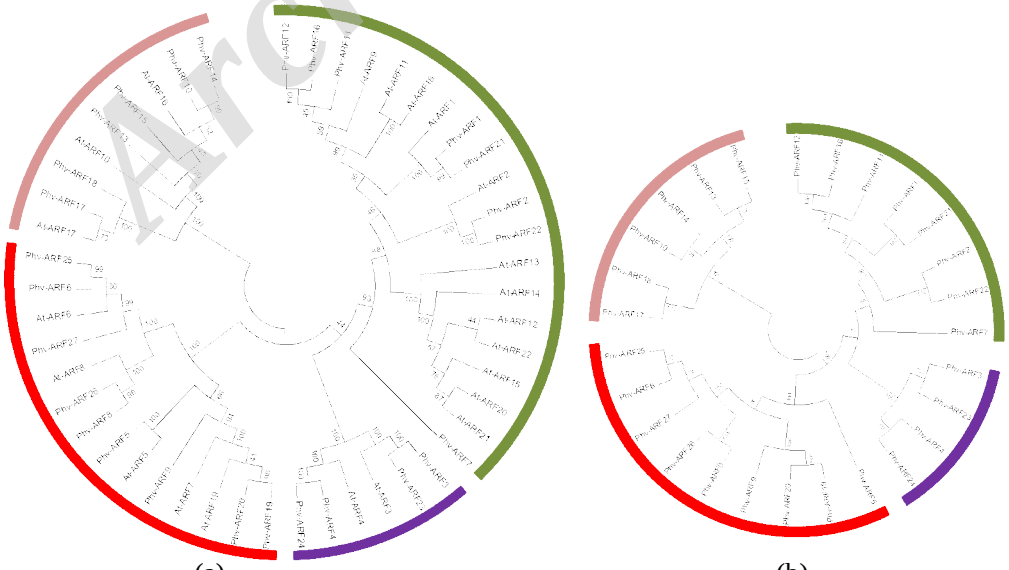
Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱. ویژگی‌های پروتئین‌های ARF در گیاه لوبیا

اسم	ژن ID	طول	مسیر توالی	محل ژن	کروموزم	وزن*	PI شاخص	* ORF طول	تعداد اینترون
Phv-ARF1	Phvul.003G075800.1	653	-	11987825-11996462	3	73.29	5.99	8638	14
Phv-ARF2	Phvul.002G282200.1	842	+	45145416-45150459	2	93.49	6.15	5044	14
Phv-ARF3	Phvul.003G290200.1	706	+	52772265-52777375	3	77.67	7.36	5110	10
Phv-ARF4	Phvul.005G136900.1	808	+	37881241-37887001	5	89.42	6.69	6144	11
Phv-ARF5	Phvul.001G008200.1	937	+	599468-604822	1	104.07	5.61	5355	14
Phv-ARF6	Phvul.002G177600.1	913	+	33689195-33698235	2	101.24	6.17	9068	13
Phv-ARF7	Phvul.001G202000.1	667	-	46052103-46059182	1	74.53	6.37	7080	13
Phv-ARF8	Phvul.006G084200.1	841	-	19583710-19591273	6	93.07	5.89	7564	14
Phv-ARF9	Phvul.004G177600.1	1106	+	47972034-47977952	4	122.31	6.30	5919	13
Phv-ARF10	Phvul.005G134500.1	698	+	37478132-37481450	5	76.81	8.12	3350	3
Phv-ARF11	Phvul.006G114300.1	717	+	22297355-22302358	6	79.73	6.06	5004	14
Phv-ARF12	Phvul.008G118400.1	659	-	14497509-14502527	8	73.9	6.05	5128	12
Phv-ARF13	Phvul.007G095000.1	608	-	10048831-10052457	7	66.73	6.76	3627	1
Phv-ARF14	Phvul.011G080100.1	696	-	7378711-7382375	11	76.38	8.75	3664	3
Phv-ARF15	Phvul.007G149000.1	708	+	24708218-24712159	7	78.53	7.11	3942	3
Phv-ARF16	Phvul.010G011600.1	693	-	1580869-1585471	10	77.2	5.73	4603	12
Phv-ARF17	Phvul.008G168700.1	537	+	47106133-47110314	8	59.11	6.02	4182	2
Phv-ARF18	Phvul.009G026200.1	551	+	6255690-6259530	9	60.64	6.48	3841	2
Phv-ARF19	Phvul.003G128800.1	1163	+	32230627-32238415	3	130.41	6.23	7789	13
Phv-ARF20	Phvul.009G224800.1	1122	+	33870810-33879044	9	125.47	6.08	8235	13
Phv-ARF21	Phvul.006G221500.1	664	-	31926575-31932515	6	74.04	5.86	5941	13
Phv-ARF22	Phvul.009G161900.1	843	+	24044308-24049658	9	93.75	5.99	5351	14
Phv-ARF23	Phvul.006G181200.1	734	+	28272608-28278580	6	80.37	6.40	6074	10
Phv-ARF24	Phvul.011G073600.1	792	-	6795177-6800959	11	87.91	6.03	6350	11
Phv-ARF25	Phvul.006G168109	908	-	27097291-27104763	6	100.83	6.18	6881	13
Phv-ARF26	Phvul.008G242400.1	844	+	59095534-59106535	8	93.84	6.01	11002	13
Phv-ARF27	Phvul.008G197600.1	894	-	54171451-54179607	8	98.85	6.13	8157	13

* طول بر حسب اسیدآمینه و وزن برحسب کیلودالتون.



(a) (b)

شکل ۱. a) درخت فیلوژنتیکی پروتئین‌های ARF مربوط به لوبیا و آرابیدوپسیس با استفاده از روش نزدیکترین همسایگی.
b) درخت فیلوژنتیکی پروتئین‌های ARF مربوط به لوبیا با استفاده از روش نزدیکترین همسایگی

Archive of SID

www.SID.ir

این نتایج با گروه‌بندی این ژن‌ها در مطالعات مربوط به گوجه‌فرنگی، آرابیدوپسیس و ذرت مشابه است (Kumar *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2016). الگوی گروه‌بندی این توالی‌ها با نحوه قرارگیری آن‌ها در هر کروموزوم مقایسه گردید که ارتباطی بین این دو یافت نشد و توالی‌های با منشا کروموزومی یکسان در یک گروه قرار نگرفتند.

بیشتر پروتئین‌های ARF دارای سه دومین می‌باشند، یک ناحیه DBD[1] در انتهای آمینی، یک ناحیه میانی متغیر به عنوان دومین محرک رونویسی[2] یا دومین سرکوب رونویسی[3] و یک ناحیه حفاظت دیمر در انتهای کربوکسی[4] که در واکنش متقابل پروتئین-پروتئین توسط دیمر شدن با ژن‌های خانواده auxin/indole-3-acetic acid (Aux/IAA) و همچنین بین ARFها نقش دارد (Li *et al.*, 2016). نتایج حاصل از بررسی دومین‌های ۲۷ پروتئین مورد نظر در پایگاه اطلاعاتی Pfam نشان داد که این پروتئین‌ها دارای سه دومین یاد شده هستند که ترتیب قرارگیری و طول این دومین‌ها در همه پروتئین‌های مورد مطالعه مشابه است (شکل ۲).

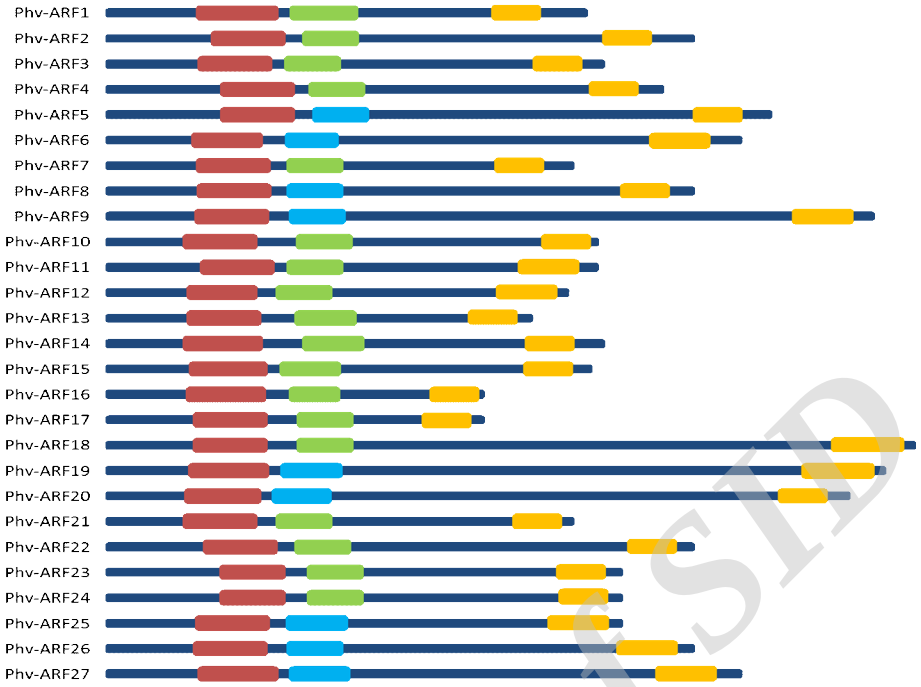
دومین محرک و دومین سرکوب در انتهای کربوکسی DBD واقع شده‌اند که دومین محرک رونویسی سرشار از اسیدآمینه‌های گلوتامین، لوسین و سرین است در حالی‌که دومین سرکوب رونویسی، غنی از اسیدآمینه‌های گلیسین، لوسین، سرین و پرولین می‌باشد(Tiwari *et al.*, 2003). ARFهای ۵، ۶، ۷، ۸ و ۱۹ در گیاه آرابیدوپسیس دارای دومین محرک هستند و بقیه ARFهای دیگر به عنوان سرکوبگر طبقه‌بندی شده‌اند. با توجه به نتایج بررسی درخت فیلوژنتیکی توالی‌های پروتئینی ARF لوبیا و آرابیدوپسیس، توالی های ARF ۵، ۶، ۷، ۸ و ۱۹ گیاه آرابیدوپسیس به همراه توالی‌های ARF ۵، ۶، ۸، ۹، ۱۹، ۲۰، ۲۶، ۲۷ و ۲۵ گیاه لوبیا در یک گروه قرار گرفتند که در شکل ۳ با نوار قرمز مشخص شده‌اند. جهت بررسی این گروه‌بندی براساس توالی دومین میانی، همه توالی‌های دومین میانی جداسازی و درخت فیلوژنتیکی آن‌ها رسم شد که نتایج آن با نوع گروه‌بندی ایجاد شده در دندروگرام‌های شکل ۱ کاملا مشابه است. این نتایج نشان داد که دو دومین DBD و auxin/indole-3-acetic acid در میان توالی‌های ARF تفاوتی ندارند و تفاوت این توالی‌ها در بین همدیگر به دومین میانی که نوع فعالیت ARF را تعیین می‌کند مربوط می‌شود. قرارگیری ژن‌های منشاء این پروتئین‌ها در شکل ۴ نشان داد که ARFها در همه کروموزوم‌ها پراکنده شده‌اند.

داده‌های حاصل از بیان ژن نشان داد که ARFها در بافت‌های مختلف بیان بسیار متفاوتی دارند به طوری که بیشترین مقدار بیان مربوط به Phv-ARF2 و Phv-ARF3 در غلاف‌های رسیده و کمترین مقدار بیان مربوط به ژن Phv-ARF7 است که بیان ناچیزی در بافت‌های مختلف دارد (شکل ۵). بیان این ژن‌ها براساس نوع ژن به پنج گروه و براساس نوع بافت به دو گروه تقسیم می‌شود. براساس نوع بافت، بیان ژن‌های ARF در بافت‌های برگ، سه برگچه‌های جوان، ساقه، غلاف‌های رسیده و غلاف‌های جوان در مقایسه با بافت گل و جوانه گل از میزان بیان بیشتری برخوردار است. مقدار بیان ژن‌های ARF در ریشه‌ها و گره‌های تثبیت‌کننده نیتروژن لوبیا در تعدادی ازجمله ARFهای ۲، ۳، ۶، ۱۱، ۱۶ و ۲۲ بسیار بالا و بیان بقیه ژن‌های ARF ناچیز است. با توجه به این پلات بیان ژن‌های سرکوبگر و محرک ARF در بافت‌های مختلف نشان داد که بیشتر ژن‌های ARF محرک در لوبیا میزان بیان بالایی دارند در حالی که فقط تعداد معدودی از ژن‌های سرکوبگر در بافت‌های مختلف چنین ویژگی دارند (شکل ۵).

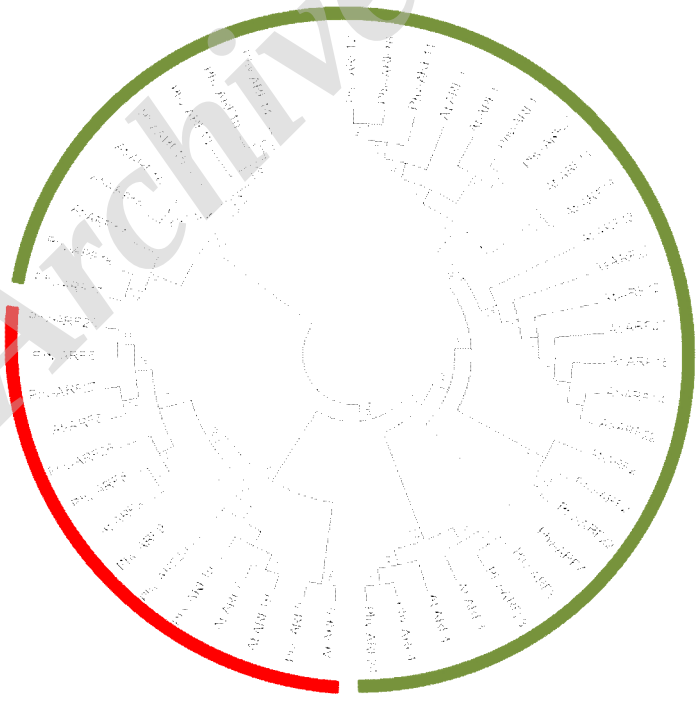
1. B3-type DNA binding domain (DBD)
2. Activation domain (AD)
3. Repression domain (RD)
4. Carboxy-terminal

Archive of SID

www.SID.ir



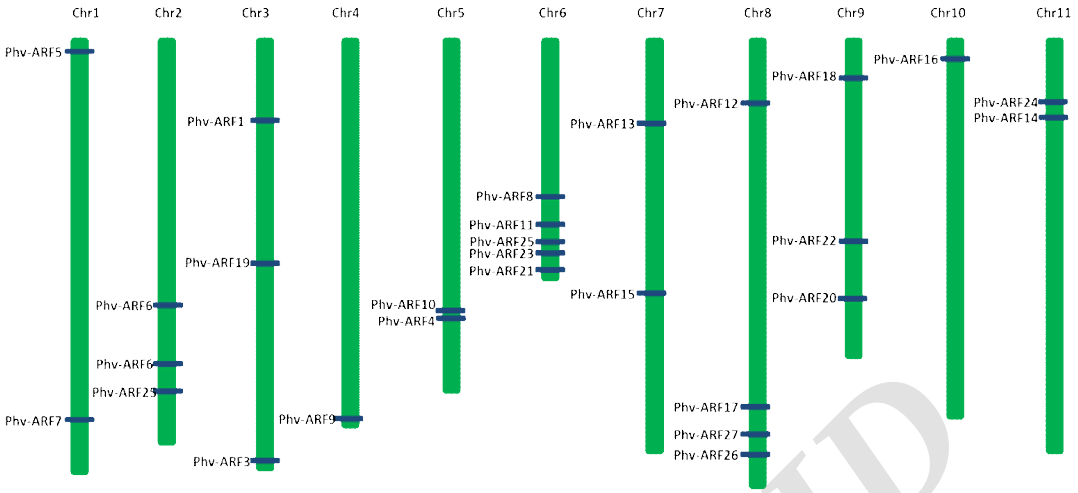
شکل ۲. جایگاه دامنه‌ها روی هر توالی ARF در لوبیا: ناحیه DBD (قرمز)، دامنه سرکوبگر (سبز)، دامنه محرک (آبی)، دامنه Aux/IAA (نارنجی)



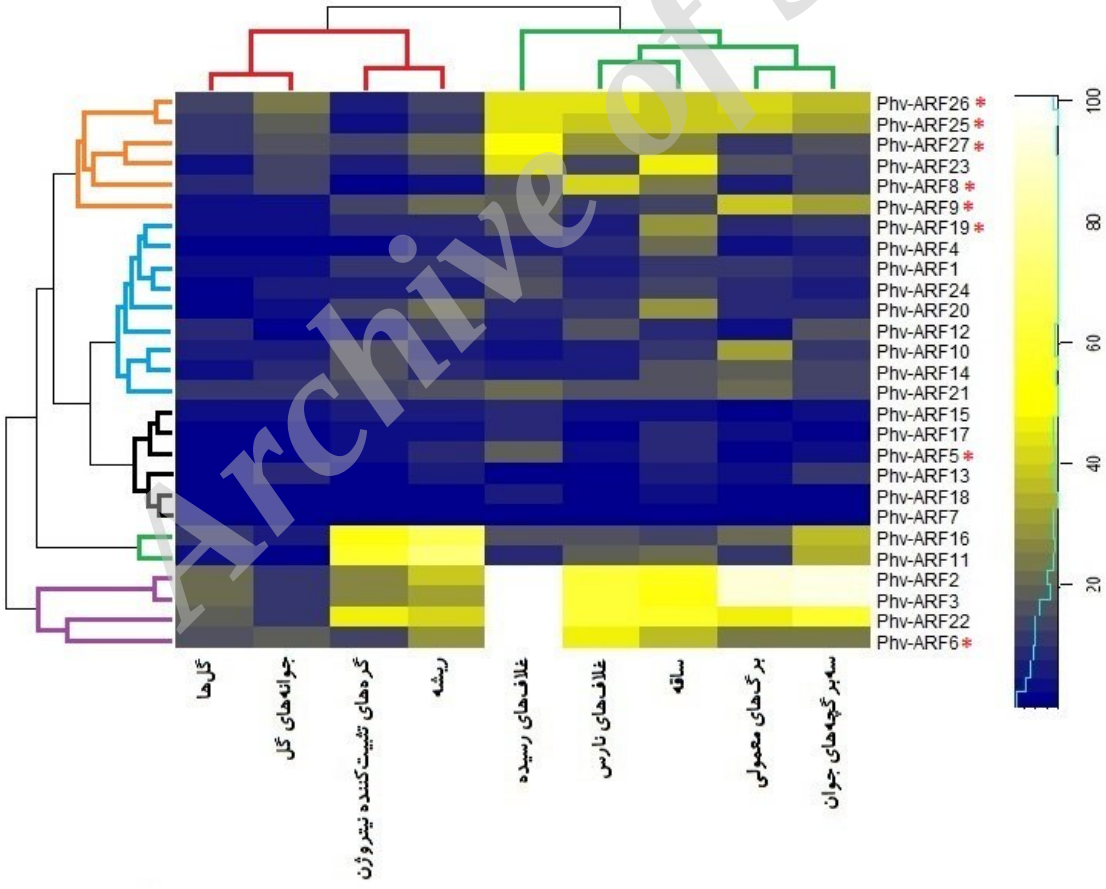
شکل ۳. درخت فیلوژنتیکی دامنه‌های میانی سرکوبگر (سبز) و محرک رونویسی (قرمز) در توالی‌های پروتئینی ARF در گیاه لوبیا با استفاده از روش نزدیک‌ترین همسایگی

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۴. جایگاه ژن‌های ARF روی کروموزوم‌های لوبیا



شکل ۵. پلات بیان ژن‌های ARF در بافت‌های مختلف لوبیا با استفاده از داده‌های RNA-seq، ARF محرک با علامت * مشخص شده است.

Archive of SID

www.SID.ir

ژن‌های ARF نقش تنظیمی خود را در بعضی بافت‌ها به صورت منحصربفرد و در تعدادی دیگر از بافت‌ها در تعامل با هم انجام می‌دهند. برای مثال ARF2 و ARF1 پیری برگ و ریزش اندام گل را در آرابیدوپسیس کنترل می‌کنند در حالیکه ARF3 برای تشکیل یک مجموعه عملکردی ضروری جهت تشخیص قطبیت برگ با پروتئین‌های KANDAI برهم‌کنش متقابل دارد (Ellis *et al.*, 2005). ژن ARF3 عملکردهای AGAMOUS (AG) و APETALA2 (AP2) در تعیین مریستم گل را تکمیل می‌کند، در حالی‌که ARF4 در قطبیت اندام نقش دارد و حضور ARF5 برای تشکیل گل و ریشه جنینی ضروری است (Hunter *et al.*, 2006). نقش ARF8 در تنظیم لقاح و نمو میوه گزارش شده است، همچنین ARF6 و ARF8 به فراوانی طی رسیدگی گل فعالیت می‌کنند (Finet *et al.*, 2010). در گوجه‌فرنگی ۲۱ عدد ARF با عملکردهای متفاوت شناسایی شده است و مطالعات ژنتیکی بیانگر تفاوت مکانیسم پیام‌رسانی ARF گوجه‌فرنگی در مقایسه با آرابیدوپسیس است (Zouine *et al.*, 2014). ژن ARF3 نقش‌های متعددی در نمو گوجه‌فرنگی بازی می‌کند و در تشکیل کرک‌ها و سلول‌های بشره‌ای دخالت دارد و ARF9، تقسیم سلول در طی نمو را به عهده دارد. ARF7 تا زمانی که گرده افشانی و لقاح رخ دهد به عنوان تنظیم کننده منفی تشکیل میوه عمل می‌کند و سپس پاسخ اکسین در طی رشد میوه در گوجه‌فرنگی را تعدیل می‌کند، همچنین تداخل بین پیام رسانی جیبرلین و اکسین طی تشکیل و نمو میوه گوجه فرنگی را واسطه‌گری می‌کند. جالب توجه است که ARF4 در کنترل متابولیسم قند در طی نمو میوه گوجه‌فرنگی درگیر است (Zouine *et al.*, 2014). بررسی ژن‌های ARF در دیگر گیاهان نیز بیانگر نقش تنظیمی آن‌ها در فرایندهای مهم گیاهی است به عنوان مثال در سویا تنظیم ARF8 برای تشکیل گره و نمو ریشه جانبی الزامی و در برنج حضور ARF16 و ARF12 برای پاسخ‌گویی به کمبود آهن با تنظیم توزیع مجدد اکسین ضروری است (Van *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2015).

فاکتورهای رونویسی که ایفاگر نقش کلیدی در فرآیندهای رشد و نمو هستند توسط خانواده ژنی ARF کد می‌شوند. بنابراین برای توضیح بهتر عملکرد ARFهای لوبیا در پاسخ ویژه اکسین، مطالعه حاضر خصوصیات ساختاری خانواده ژنی ARF در لوبیا را بررسی کرد. برای جداسازی کامل اعضای خانواده ARF و نمایش پروفایل بیان این تنظیم‌کننده‌های رونویسی از داده‌های توالی‌یابی ژنوم لوبیا و پروفایل ترانسکریپتوم آن استفاده شد. تعداد ARFهای یافت در لوبیا بیشتر از ژن‌های ARF در آرابیدوپسیس و برنج بود که ممکن است به دلیل بزرگ بودن اندازه ژنوم لوبیا نسبت به آرابیدوپسیس و برنج باشد (Zhang *et al.*, 2015). در این بررسی درخت فیلوژنتیکی به‌وضوح نشان داد که این ژن‌ها می‌توانند در چهار گروه تقسیم شوند که این آنالیزهای فیلوژنتیکی می‌تواند برای پیش‌بینی عملکرد پروتئین‌ها بین گونه‌های مختلف استفاده شود. بنابراین ترکیب پروتئین‌های ARF آرابیدوپسیس و لوبیا برای ترسیم درخت فیلوژنتیکی نه تنها روابط پروتئین‌های ARF را تعیین می‌کند بلکه به پیش‌بینی عملکرد پروتئین‌های لوبیا مبتنی بر عملکرد پروتئین‌های آرابیدوپسیس موجود در همان گروه کمک می‌کند. هرچند نقش ARF در این فرآیندها در لوبیا ناشناخته است اما می‌توان نتیجه گرفت که احتمالا ژن‌های ARF شرکت کننده در این فرآیندهای مختلف نمویی در لوبیا عملکرد مشابهی با ARFهای هم‌گروه دارند (Li *et al.*, 2015). برای مثال ARFهای ۵، ۶، ۷، ۸، و ۱۹ که تنظیم کننده مورفوژنز، تشکیل ریشه جانبی،

Archive of SID

www.SID.ir

زمین‌گرایی در آرابیدوپسیس هستند با ۹ ژن ARF ۵، ۶، ۸، ۹، ۱۹، ۲۰، ۲۵، ۲۶ و ۲۷ در لوبیا هم‌گروه هستند. به‌طور مشابه ARF ۱، ۲، ۹، ۱۱ و ۱۸ آرابیدوپسیس با ژن‌های ARF ۱، ۲، ۷، ۱۱، ۱۲، ۱۶، ۲۱ و ۲۲ در لوبیا در یک گروه قرار گرفته‌اند که در تنظیم فرآیند پیری برگ، ریزش اندام گل و اثرات متقابل اکسین نقش دارند (Harper *et al.*, 2000). ARFهای ۱۰، ۱۶ و ۱۷ در آرابیدوپسیس که تغییر الگودهی ریشه، زمین‌گرایی و میزان حساسیت اکسین از جوانه‌زنی تا مراحل پس از رویش را تحت تنظیم می‌کنند با دیگر ARFهای لوبیا ۱۰، ۱۳، ۱۴، ۱۵، ۱۷ و ۱۸ در یک گروه قرار دارند که این نتایج حاکی از احتمال عملکرد مشابه ARFهای شناسایی شده در لوبیا با نقش ARFهای بررسی شده در آرابیدوپسیس است. همچنین با توجه به مطالعات صورت گرفته در پرتقال بیان ژن‌های ARF در مرحله گلدهی بسیار ناچیز است که با نتایج ما در پروفایل به‌دست آمده از بررسی بیان ژن‌های ARF در لوبیا مشابه است (Li *et al.*, 2015). در دهه‌های اخیر به واسطه پیشرفت‌های علم ژنتیک، درک مکانیسم و عملکرد تنظیمی ARFها در گیاه مدلی مانند آرابیدوپسیس به سرعت در حال پیشرفت است، با این‌حال هنوز نحوه برهم‌کنش دیگر فاکتورهای رونویسی با ARFها و نحوه دقیق تنظیم بیان ژن توسط آن‌ها به درستی معلوم نیست. نتایج حاصل از این بررسی اطلاعات جامعی در مورد خانواده ژنی ARF در لوبیا شامل ساختار ژنی، نحوه پراکنش روی کروموزوم‌ها، روابط فیلوژنتیکی و الگوهای بیان فراهم کرد. تعداد اعضای خانواده ARF به دلیل متفاوت بودن اندازه ژنوم در گیاهان مختلف متغیر است. توزیع کروموزومی و روابط فیلوژنتیکی ژن‌های ARF دیدگاه ارزشمندی در مورد وضعیت تکاملی لوبیا فراهم آورد. تعدادی از ژن‌هایی که به وسیله ARF کنترل و تنظیم می‌شوند با استفاده از مطالعات محاسباتی و آزمایشگاهی در آرابیدوپسیس شناسایی شده‌اند اما در گیاهان دیگر بررسی این ژن‌ها و مکانیسم عمل آن‌ها بسیار محدود بوده است براین اساس به کمک پروفایل بیان گسترده آرابیدوپسیس، عملکرد و پتانسیل فاکتورهای رونویسی در این گیاه مهم پیش‌بینی شد، هرچند چالش بزرگی که در این میان وجود دارد تفاوت در مکانیسم عمل و نحوه تنظیم بیان ژن‌های مختلف به واسطه ژن‌های ARF در گیاهان مختلف است که می‌تواند در مطالعات آینده مورد توجه قرار گیرد.

REFERENCES

Adams KL, Wendel JF (2005) Polyploidy and genome evolution in plants. Curr. Opin. Plant. Biol. 8: 135-141.

Ariani A, Gepts P (2015) Genome-wide identification and characterization of aquaporin gene family in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Mol. Genet. Genomics. 290: 1771-1785.

Chenna R, Sugawara H, Koike T, Lopez R, Gibson TJ, Higgins DG, Thompson JD (2003) Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. Nucleic. Acids. Res. 31, no. 13: 3497-3500.

Di DW, Zhang C, Luo P, An CW, Guo GQ (2016) The biosynthesis of auxin: how many paths truly lead to IAA? Plant. Growth. Regul. 78: 275-285.

Ellis CM, Nagpal P, Young JC, Hagen G, Guilfoyle TJ, Reed JW (2005) Auxin response factor1 and Auxin response factor2 regulate senescence and floral organ abscission in Arabidopsis thaliana. Development. 132: 4563-4574.

Finet C, Fourquin C, Vinauger M, Berne-Dedieu A, Chambrier P, Paindavoine S, Scutt CP (2010) Parallel structural evolution of auxin response factors in the angiosperms.

Archive of SID

www.SID.ir

Plant. J. 63: 952-959.
Goetz M, Vivian-Smith A, Johnson SD, Koltunow AM (2006) AUXIN RESPONSE FACTOR8 is a negative regulator of fruit initiation in Arabidopsis. Plant. Cell. 18: 1873-1886.
Goodstein DM, Shu S, Howson R, Neupane R, Hayes RD, Fazo J, Mitros T, Dirks W, Hellsten U, Putnam N, Rokhsar DS (2011) Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. Nucleic. Acids. Res. 40: 1178-1186.
Guilfoyle TJ (2015) The PB1 domain in auxin response factor and Aux/IAA proteins: a versatile protein interaction module in the auxin response. Plant. Cell. 27: 33-43.
Harper RM, Stowe-Evans EL, Luesse DR, Muto H, Tatematsu K, Watahiki MK, Yamamoto K, Liscum E (2000) The NPH4 locus encodes the auxin response factor ARF7, a conditional regulator of differential growth in aerial Arabidopsis tissue. Plant. Cell. 12:757–770
Hunter C, Willmann MR, Wu G, Yoshikawa M, de la Luz Gutiérrez-Nava M, Poethig SR (2006) Trans-acting siRNA-mediated repression of ETTIN and ARF4 regulates heteroblasty in Arabidopsis. Development. 133: 2973-2981.
Kumar R, Tyagi AK, Sharma AK (2011) Genome-wide analysis of auxin response factor (ARF) gene family from tomato and analysis of their role in flower and fruit development. Mol. Genet. Genomics. 285: 245-260.
Kumar S, Stecher G, Tamura K (2016) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. Mol. Boil. Evol: msw054.
Li SB, OuYang WZ, Hou XJ, Xie LL, Hu CG, Zhang JZ (2015) Genome-wide identification, isolation and expression analysis of auxin response factor (ARF) gene family in sweet orange (*Citrus sinensis*). Front. Plant. Sci. 6: 119.
Li SB, Xie ZZ, Hu CG, Zhang JZ (2016) A Review of auxin response factors (ARFs) in plants. Front. Plant. Sci 7.
Liu Y, Jiang H, Chen W, Qian Y, Ma Q, Cheng B, Zhu S (2011) Genome-wide analysis of the auxin response factor (ARF) gene family in maize (*Zea mays*). Plant. Growth. Regul. 63: 225-234.
López-Pedrouso M, Bernal J, Franco D, Zapata C (2014) Evaluating Two-Dimensional Electrophoresis Profiles of the Protein Phaseolin as Markers of Genetic Differentiation and Seed Protein Quality in Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.). J. Agric. Food. Chem. 62: 7200-7208.
Mirzaei K, Bahramnejad B, Shamsifard MH, Zamani W (2014) In silico identification, phylogenetic and bioinformatic analysis of argonaute genes in plants. Int. J. Genomics. 2014.
Pandurangan S, Diapari M, Yin F, Munholland S, Perry GE, Chapman BP, Huang S, Sparvoli F, Bollini R, Crosby WL, Pauls KP (2016) Genomic Analysis of Storage Protein Deficiency in Genetically Related Lines of Common Bean (Phaseolus vulgaris). Front. Plant. Sci 7.
Ren XY, Vorst O, Fiers MW, Stiekema WJ, Nap JP (2006) In plants, highly expressed genes are the least compact. Trends. Genet. 22: 528-532.
Schmutz J, McClean PE, Mamidi S, Wu GA, Cannon SB, Grimwood J, Jenkins J, Shu S, Song Q, Chavarro C, Torres-Torres M (2014) A reference genome for common bean and genome-wide analysis of dual domestications. Nat. Genet 46: 707-713.
Tiwari SB, Hagen G, Guilfoyle T (2003) The roles of auxin response factor domains in auxin-responsive transcription. Plant. Cell. 15: 533-543.
Van Ha C, Le DT, Nishiyama R, Watanabe Y, Sulieman S, Tran UT, Mochida K, Van Dong N, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K, Tran LS (2013) The auxin response factor transcription factor

Archive of SID

www.SID.ir

family in soybean: genome-wide identification and expression analyses during development and water stress. DNA Res: dst027.

Zhang S, Wang S, Xu Y, Yu C, Shen C, Qian Q, Geisler M, Jiang DA, Qi Y (2015) The auxin response factor, OsARF19, controls rice leaf angles through positively regulating OsGH3-5 and OsBRI1. Plant. Cell. Environ. 38: 638-654.

Zouine M, Fu Y, Chateigner-Boutin AL, Mila I, Frasse P, Wang H, Audran C, Roustan JP, Bouzayen M (2014) Characterization of the tomato ARF gene family uncovers a multi-levels post-transcriptional regulation including alternative splicing. PLoS One. 9: e84203.

Archive of SID

www.SID.ir