Archive of SID

Crop Biotech.
Autumn (2018) 23: 15-24.

مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌فناوری گیاهان زراعی
سال هشتم، شماره بیست‌وسوم، پائیز ۱۳۹۷ (۲۴-۱۵)

بررسی نواحی تنظیمی در پروموتور ژن‌های هم بیان تحت شرایط تنش دمای پایین در گوجه‌فرنگی

پرویز حیدری[1*]، توماس نوسباومر[2]
۱. استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه صنعتی شاهرود، ایران
۲. محقق دوره پسا دکترا مؤسسه INET، مونیخ، آلمان
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۱/۱۸ – تاریخ تصویب: ۱۳۹۷/۸/۱)

Study of regulatory elements in promoter regions of co-expressed genes in tomato when facing low temperatures

Parviz Heidari[1*], Thomas Nussbaumer[2]
1. Assistant Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Shahrood University of Technology, Shahrood, Iran.
2. Postdoc Researcher, INET Institute, Munchen, Germany.
(Received: Feb. 7, 2018 - Accepted: Oct. 23, 2018)

چکیده

روش‌های نسل نوین توالی‌یابی همچون RNA-Seq توانایی ارائه حجم بالایی از اطلاعات در زمینه رونوشت ژن‌ها را دارند. بازسازی شبکه ژن‌های هم‌بیان بر اساس اطلاعات حاصل از داده‌های RNA-seq اطلاعات ارزشمندی جهت درک سیستم پاسخی گیاهان به تغییرات محیطی را ارائه می‌دهد. لذا در این تحقیق پروفایل کامل بیانی ژن‌های گوجه فرنگی تحت تیمار دمای پایین با استفاده از روش شبکه‌های هم بیان وزن‌دار مورد آنالیز قرار گرفت. نتایج کلاسترهای هم بیان نشان داد که ۲۰۲۶۷ژن نرمال شده در هشت ماژول معنادار قرار می‌گیرند. نتایج آنالیز عبارات GO نشان داد که بین گروه‌های هم بیان عملکردهای متفاوتی بر حسب فرایندهای بیولوژی و عملکرد مولکولی وجود دارد. بر این اساس ماژول اول به پروتئین‌های شوک دمایی (HSPs) اختصاص یافت. پروتئین کینازها و پروتئین‌های درگیر در تغییرات پس از ترجمه به‌ترتیب در ماژول دوم و سوم قرار گرفتند. پروموتور ژن‌های ماژول پنج با توجه به الگوی بیان متفاوت در ژنوتیپ‌ها مورد بررسی قرار گرفت. عناصر سیس ACGTG و TTGACدر پروموتور همه ژن‌ها مشاهده شدند. عوامل رونویسی خانواده AP2/ERF و ZF-HD دارای بیشترین جایگاه اتصال در پروموتور ژن‌های ماژول پنج بودند. نتایج حاصل توانست عناصر تنظیمی کلیدی که در تنظیم بیان یک شبکه ژنی تحت تنش سرما و فرایندهای آنتی‌اکسیدانتی درگیر بودند، را معرفی نماید.

واژه‌های کلیدی: عناصر Cis، ماژول‌ها، شبکه‌های هم بیان وزن‌دار، فرایندهای مولکولی.

Abstract

Next-generation sequencing (NGS) techniques such as RNA-Seq can provide expression information per gene and can be used to construct co-expression networks. These networks can produce valuable information to understand plant responses when facing environmental changes. In this study, a complete profile of tomato gene expressions under low temperature treatment was analyzed by "Weighted Gene Co-expression Network Analysis". The clustering results allowed to group 20,267 genes into eight modules. The results of Gene ontology (GO) term analysis highlighted different functions between co-expression groups in terms of biological process and molecular function. Accordingly, the first module overrepresented to heat shock proteins (HSPs). Protein kinases and proteins involved in post-translational modification were in the second and third modules, respectively. The promoter of genes in fifth module was screened according to the different expression patterns in the tomato genotypes. The cis-elements such as ACGTG and TTGAC were observed in promoter site of all genes. The transcription factor families of AP2 / ERF and ZF-HD have the highest binding status in promoter of genes of the fifth module. The results present the key cis-regulatory elements that effect on co-expressed genes network and involve in anti-oxidant process under cold stress.

Keywords: Cis elements, Modules, Weighted Gene Co-expression Network, Molecular functions

* نویسنده مسئول: پرویز حیدری
E-mail: heidarip@shahroodut.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

گیاه گوجه‌فرنگی مانند سایر گیاهان مناطق گرمسیری از جمله ذرت و برنج به تنش سرما حساس می‌باشد و در اثر کاهش دما خسارت‌های اقتصادی به این گیاه وارد می‌شود. در طی تنش کاهش دما، تغییرات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی در جهت سازگاری و تحمل این تنش در گیاه رخ می‌دهد (Chen *et al*., 2015). بررسی کامل رونوشت ژن‌ها نشان می‌دهد که در اثر تنش سرما تعداد زیادی ژن فعال می‌شوند که این ژن‌ها در مسیرهای موازی که دارای برهمکنش‌های زیادی با یکدیگر هستند، قرار دارند (Liu *et al*., 2012). استفاده از لاین‌های موتانت‌ها و جهش‌زایی مصنوعی و بررسی نواحی پروموتوری کمک بسیار زیادی به درک برهمکنش و عملکرد ژن‌های دخیل در تنش دمای پایین می‌نماید. پروتئین‌ها و غشاءهای سلولی تنها اجزای سلولی هستند که نوسانات درجه حرارت بیشترین تأثیر را بر آنها دارد و گیرنده‌های غشایی و پروتئین‌های کانال یونی جزء اولین اجزای ادراک تنش هستند (Chinnusamy *et al*., 2007). دمای پایین توسط گیرنده‌ها دریافت می‌شود که این گیرنده‌ها به‌صورت غیر مستقیم و یا مستقیم باعث تغییراتی در غشای می‌شوند که تغییرات مستقیم شامل فعال کردن کینازها و تغییرات غیر مستقیم شامل برهمکنش پروتئین با پروتئین و فعال شدن عوامل رونویسی وابسته به تنش سرما است (Liu *et al*., 2012). عوامل رونویسی نقش مهمی در تنظیم مسیرهای پیام‌رسانی سلولی در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی بر عهده دارند. پروتئین این عوامل با اتصال به پروموتور ژن‌های هدف سبب تنظیم فعالیت (القاء یا سرکوب) آنها می‌شوند (Lindemose *et al*., 2013). عوامل رونویسی برحسب دومین اتصال به DNA به خانواده‌های مختلفی تقسیم می‌شوند که خانواده AP2/ERF در تنش سرما دارای نقش پر رنگ‌تری نسبت به سایر خانواده عوامل رونویسی است (Saibo *et al*., 2009). بازسازی شبکه ژن‌های هم بیان، یکی از روش‌های است که امکان مطالعه روابط ژنی در پاسخ به تغییر شرایط محیطی را فراهم می‌کند (Heidari *et al*., 2015). برای شناسایی ژن‌های هم بیان استراتژی‌ها و روش‌های مختلفی وجود دارد که در برخی روش‌ها یک ژن به عنوان نقطه تمرکز یا ژن راهنما در نظر گرفته می‌شود و سایر ژن‌های که با آن دارای بیشترین همبستگی هستند انتخاب می‌شوند. در برخی روش‌های دیگر هیچ ژن هدفی وجود ندارد بلکه بر اساس مدل‌های ناحیه‌ای، ژن‌ها بر اساس عملکرد بیوژلوی و مولکولی به دسته‌های مختلفی تقسیم می‌شوند (Cai *et al*., 2014; Aoki *et al*., 2007). شبکه WGCNA[1] (شبکه‌های هم بیان وزن‌دار) از جمله روش‌های تعیین گروه‌های هم بیان بر اساس شدت بیان ژن‌ها است که در تفکیک ژن‌ها و ترسیم شبکه‌های ژنی استفاده می‌گردد (Bergmann *et al*., 2004). شناسایی وزن‌دار گروه‌های هم بیان پروفایل بیانی حاصل از داده‌های میکروآرایه و RNA-seq به‌طور گسترده‌ای مورد استفاده قرار گرفته است. روش‌های نسل نوین توالی‌یابی همچون RNA-seq سبب گردیده است که حجم بالایی از اطلاعات در زمینه رونوشت ژن‌ها و ژنومیکس عملکردی به‌دست آید. اطلاعات حاصل را می‌توان در جهت شناسایی مسیرهای مولکولی درگیر در پاسخ به تنش موردنظر استفاده نمود و درک بهتری از پاسخ‌های مولکولی سلول تحت تنش ارائه داد (Cai *et al*., 2014). بازسازی شبکه ژن‌های هم بیان بر اساس اطلاعات حاصل از روش RNA-seq کمک شایانی به شناسایی ژن‌های همکار و مکانیسم‌های کنترلی آنها می‌نماید. بررسی نواحی تنظیمی در پروموتور ژن‌های هم بیان نقش کلیدی در شناسایی عوامل رونویسی و کنترل بیان ژن‌ها دارد (Heidari *et al*., 2015).

۱. Weighted Gene Co-expression Network Analysis

www.SID.ir

Archive of SID

با توجه به پیشرفت‌های صورت گرفته متأسفانه تاکنون جزئیات دقیق مولکولی مکانیزم‌های تنظیمی کنترل‌کننده واکنش به دمای پایین مشخص نشده است. لذا در این تحقیق بر اساس اطلاعات حاصل از پروفایل کامل بیان ژن‌ها گوجه فرنگی تحت تنش دمای پایین، بازسازی شبکه ژن‌های هم‌بیان مورد بررسی قرار گرفتند و همچنین نواحی تنظیمی که در کنترل بیان و القای این ژن‌ها درگیر می‌باشند شناسایی شدند.

مواد و روش‌ها

داده‌های اولیه RNA-seq مرتبط به تنش دمای پایین (دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد) به مدت سه روز و دمای نرمال (۲۳ درجه سانتی‌گراد) در ریشه گیاهچه‌های هشت روزه گوجه‌فرنگی زراعی *Solanum lycopersicum* cv. Moneymaker (حساس به سرما) و وحشی *S. habrochaites* LA1777 (مقاوم به دمای پایین) با شماره دسترسی E-MTAB-4855 از پایگاه ArrayExpress استخراج گردید. نرمال سازی نمونه‌ها با استفاده از آزمون دوجمله منفی تحت بسته DESeq (Anders and Huber, 2010) برنامه R صورت گرفت. پروفایل وزن‌دار بیان ژن‌های نرمال‌شده بر اساس بسته نرم‌افزاری مربوطه (Langfelder and Horvath, 2008) با نرم افزار R جهت بازسازی شبکه‌های ژن‌های هم بیان مورد آنالیز قرار گرفت. با استفاده از روش cutree برنامه R جهت گروه‌بندی کلاسترها استفاده شد و از بسته gplots برنامه R جهت ترسیم خوشه سلسله مراتبی بر اساس بیان ژن‌ها استفاده گردید. آنالیزعبارات GO برای هر گروه توسط بسته GOstats (Falcon and Gentleman 2006) برنامه R انجام شد و از پایگاه ReviGO (Supek *et al*., 2011) (http://revigo.irb.hr) جهت ادغام کردن GO مشابه و شناسایی عبارات کلیدی GO استفاده گردید. توالی ۱۵۰۰ بازی بالا دست ناحیه شروع رونویسی در ژن‌های مدل پنج از سایت SNG (http://solgenomics.net) (Fernandez-Pozo *et al*., 2015) شناسایی و ذخیره شدند. نواحی تنظیمی با استفاده از پایگاه داده PlantPAN2 (Chow *et al*., 2016) مورد آنالیز قرار گرفت.

نتایج و بحث

نتایج اولیه بر حسب نرمال کردن داده‌های خام نشان داد که ۲۰۲۶۷ ژن در پروفایل بیانی گوجه‌فرنگی تحت تنش دمای پایین وجود دارد که بر حسب آنالیز هم بیانی با روش WGCNA، هشت ماژول که ژن‌های درون هر ماژول دارای همبستگی بالایی در میزان بیان بودند، ایجاد گردید و برای هر ماژول ژن‌های کلیدی و مرکزی شناسایی نگردید و در نهایت کلاستر بندی آنها با روش ترسیم خوشه سلسله مراتبی (Heat map) صورت گرفت و هر کدام از این ماژول‌ها با رنگ‌های مختلف با تعداد ژن‌های موجود در آن در شکل ۱ نشان داده شده است. بیشترین تعداد ژن‌ها در ماژول سه (۴۱۷۳ عدد ژن) و کمترین تعداد در ماژول دو (۴۹۷ عدد ژن) قرار داشتند. بر اساس ژن‌های موجود در گروه (ماژول)، آنالیز GO[1]صورت گرفت (جدول ۱). نتایج GO نشان داد که بین گروه‌های هم‌بیان عملکردهای متفاوتی بر حسب عملکرد مولکولی و فرایندهای بیولوژی وجود دارد. بر این اساس می‌توان ماژول اول را به پروتئین‌های شوک دمایی[2](HSPs) اختصاص داد (جدول ۱). مشارکت پروتئین‌های HSP در فرایند تحمل و سازگاری گیاهان به تنش سرما و دماهای پایین قبلا در گوجه فرنگی گزارش شده است (Chen *et al*., 2015; Liu *et al*.,

1. Gene ontology
2. Heat shock proteins

www.SID.ir

Archive of SID

2012). پروتئین کینازها و پروتئین‌های با خاصیت کینازی بیشتر در ماژول دوم قرار گرفتند لذا ژن‌های این گروه به همراه ژن‌های ماژول سوم نقش مهمی در تغییرات پس از ترجمه و تنظیم پیام رسانی سلولی بر عهده دارند. ژن‌های موجود در ماژول شماره هشت بیشتر در فرایند انتقال نقش دارند. انتقال دهنده‌ها نقش بارزی در تنظیم غلظت عناصر و یون‌ها در درون سلول و توزیع هورمون‌ها برعهده دارند. ژن‌های ماژول پنج دارای الگوی بیان کاملاً متفاوت در ژنوتیپ حساس و مقاوم بودند به‌طوری‌که در ژنوتیپ حساس افزایش بیان و در ژنوتیپ مقاوم کاهش بیان را نشان دادند. فرایندهای همچون فعالیت آنتی‌اکسیدانت‌ها و اتصال لیپیدها که نقش کلیدی در کاهش صدمات اکسیدانت‌ها در طی تنش غیرزیستی و زیستی بر عهده دارند در ماژول پنجم قرار داشتند (جدول ۱).

آنتوسیانین از جمله رنگدانه‌های است که می‌تواند به گلوکوزیل ترانسفرازها متصل شود که تحقیقات بر روی گندم سیاه نشان داده است که ژن‌های گلوکوزیل ترانسفرازها تحت شرایط تنش سرما افزایش بیان می‌یابند (Zhou *et al*., 2016). همچنین لیو و همکاران (۲۰۱۲) نیز گزارش دادند که ژن‌های گلوکوزیل ترانسفراز در طی تنش سرما فعال می‌شوند. فعالیت Anthocyanin 5-O-glucosyltransferase از جمله GO معنادار در ماژول پنجم بود. همچنین عبارت GO مرتبط به فعالیت Phosphopyruvate hydratase و Calcium-dependent phospholipid binding بر اساس تعداد ژن‌های موجود در ماژول پنج به‌صورت معناداری مشاهده شد. کلسیم جزء سیگنال‌های ثانویه در مسیر سیگنالینگ سلولی در پاسخ به تنش‌ها است. بررسی گیاهان تراریخت آرابیدوپسیس برای ژن AtCLB[1] مشخص نمود که پروتئین AtCLB یک تنظیم‌گر منفی تحت تنش‌های غیر زیستی است (de Silva *et al*., 2011). فسفوپیروات هیدراتاز (معروف به Enolase) به‌عنوان یک متالوآنزیم در تبدیل فسفوگلیسرات (2-PG) به فسفوانول پیروات (PEP) در فرایند گلیکولیز و چرخه تری کربوکسیل اسید (TCA) درگیر است. پاسخ‌های دفاعی و کاهش اکسیدانت‌ها از مهمترین واکنش‌های گیاهان در برابر تنش‌ها است که وجود این عملکردهای مهم مولکولی در این ماژول از اهمیت ژن‌های موجود در آن می‌باشد. چرخه TCA یک چرخه مهم در تولید انرژی و برخی واکنش‌های مهم سلولی چون مکانیسم‌های اکسیدانتی و گونه‌های آزاد اکسیژن (ROS) در موجودات هوازی است (Mailloux *et al*., 2007). با توجه به الگوی بیان متفاوت در ژنوتیپ‌های حساس و مقاوم و قرار گرفتن ژن‌های درگیر در فرایندهای همچون فعالیت آنتی اکسیدانت در ماژول شماره پنج، لذا ژن‌های این گروه مورد آنالیز عملکردی و پروموتوری قرار گرفتند.

شناسایی جایگاه عوامل رونویسی

عناصر تنظیمی Cis[2] (CREs) از مناطق مهم در ناحیه پروموتوری ژن‌ها است که در کنترل رونویسی درگیر هستند. بررسی مناطق ۱۵۰۰ جفت باز از بالادست ژن‌های موجود در گروه پنجم کلاستر ژن‌های هم بیان نشان داد که CRE های مهمی که در تنش‌های زیستی و غیر زیستی درگیر هستند در این ناحیه بالادست توزیع شده‌اند (جدول ۲). توالی CREهای که محل اتصال عوامل رونویسی خانواده AP2/ ERF و ZF-HD بودند در ناحیه بالا دست شروع رونویسی همه ژن‌های مورد مطالعه مشاهده شدند (جدول ۲). توالی جعبه CCAAT بیشتر در

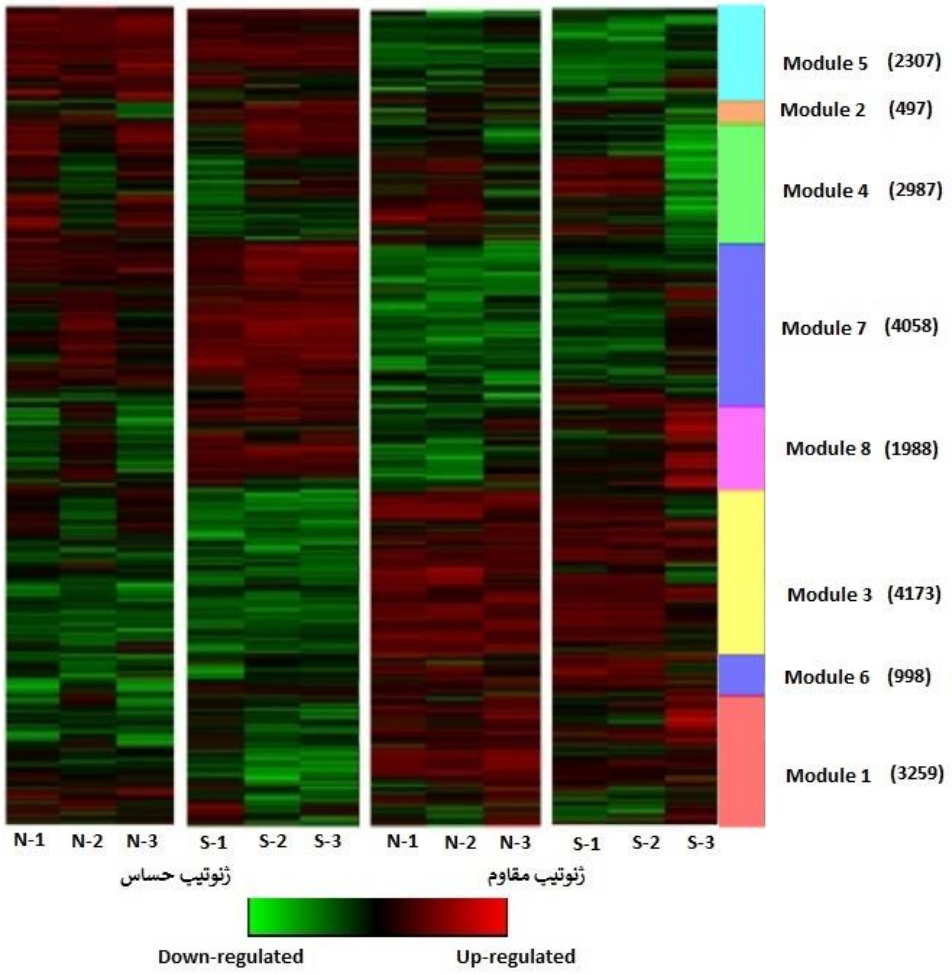
1. Calcium-dependent lipid-binding

2. Cis-regulatory elements

www.SID.ir

Archive of SID

پروموتور ژن‌های شوک دمایی Hsp90 قرار دارد و سبب ارتقاء و افزایش بیان می‌شود (Haralampidis *et al.*, 2002). عوامل رونویسی خانواده AP2/ERF از بزرگترین خانواده عوامل رونویسی هستند که در تنش‌های دمای پایین و سرما درگیر هستند (Licausi *et al.*, 2013). ژن‌های CBF که از اصلی‌ترین ژن‌های پاسخ به سرما هستند جزء عوامل رونویسی خانواده AP2/ERF هستند. ژن‌های خانواده ژنی AP2/ERF همگی دارای دومین AP2 هستند و به سه کلاس اصلی AP2، ERF و RAV تقسیم می‌شوند. پروتئین‌های کلاس RAV علاوه بر داشتن دومین AP2 دارای دومین B3 نیز هستند که نقش آنها در پاسخ به تغییرات محیطی به اثبات رسیده است (Licausi *et al.*, 2013). موتیف CAACA جایگاه اتصال عوامل رونویسی RAV است که در ۹۹/۹٪ توالی پروموتوری ژن‌ها مشاهده شد. توالی CCGAC از CREهای مهم درگیر در تنش سرما است که عوامل رونویسی Dehydrin که نقش مهمی در تنظیم رونویسی از ژن‌های پاسخ به سرما را دارد به این توالی متصل می‌شود. توالی CCGAC تقریباً در پروموتور همه ژن‌ها مشاهده شد که این از نقش مهم ژن‌های هم بیان موجود در ماژول پنجم است. پروتئین‌های Dehydrin (DHNs) در پاسخ به تنش‌های چون خشکی، شوری، حرارت بالا و دمای پایین که مرتبط به آب‌زدایی سلولی هستند فعال می‌شود و همچنین در مسیر پیام رسانی هورمون آبسیزیک اسید قرار دارند (Verma *et al.*, 2017).



شکل ۱. گروه‌بندی ژن‌های درگیر در تنش سرما بر اساس روش WGCNA و الگوی بیان در ۱۲ نمونه گیاه گوجه فرنگی. N و S

www.SID.ir

Archive of SID

به‌ترتیب نشان‌دهنده شرایط نرمال و شرایط تنش است و اعداد داخل پرانتز نشان‌دهنده تعداد ژن‌های موجود در هر ماژول است.

جدول ۱. لیست Gene ontology معنادار (FDR<0.01) بر اساس عملکرد مولکولی و فرایندهای بیولوژی در ماژول‌ها

Module	Molecular function	Biological process
1	Transcription factor activity, Helicase activity, Heat shock protein binding, P-P-bond-hydrolysis-driven protein transmembrane transporter activity	mRNA processing, Cellular process, Metal ion transport, Cellular response to DNA damage stimulus
2	Glucan exo-1,3-beta-glucosidase activity, Protein kinase binding, Enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase activity, Calcium-independent protein kinase C activity	Transcription initiation from RNA polymerase II promoter, Response to light stimulus, Retrograde transport, Endosome to Golgi, methylation
3	Transcription factor activity, Ubiquitin-protein transferase activity, Potassium:sodium symporter activity, Methylated histone binding	Protein transport, Post-translational protein modification, Regulation of biological process
4	Transcription factor activity, Outward rectifier potassium channel activity, GTPase regulator activity, Phosphoric ester hydrolase activity	Protein dephosphorylation, localization, Cell communication, Porphyrin-containing compound metabolic process
5	Antioxidant activity, Anthocyanin 5-O-glucosyltransferase activity, Calcium-dependent phospholipid binding, Lipid binding, Phosphopyruvate hydratase activity	Defense response, Response to stimulus, Regulation of cellular protein metabolism
6	Farnesyltranstransferase activity, Protein phosphatase type 2A regulator, Photoreceptor activity, Solute:cation symporter	Cellular protein modification process, Response to stimulus
7	Structural constituent of ribosome, Rho guanyl-nucleotide exchange factor activity, Protein complex binding, Proton-transporting ATPase activity, Rotational mechanism	Cellular component organization or biogenesis, Cell wall organization or biogenesis
8	Structural constituent of ribosome, Transporter activity, ATP-dependent microtubule motor activity, Auxin efflux transmembrane transporter, Metallochaperone activity	Microtubule-based movement, Response to heat, Protein transport, Homeostatic process

ژن‌های Homeobox جزء ژن‌های درگیر در رشد و توسعه گیاهان هستند که دارای ۶۰ اسیدآمینه هستند هرچند انواع غیرمعمول آنها با نام TALE دارای ۶۳ اسیدآمینه می‌باشند. پروتئین‌های ZF-HD یک زیرخانواده از Homeoboxها هستند که دارای دو موتیف اثرانگشت روی هستند و در برهمکنش بین پروتئین‌ها درگیر می‌باشند (Bhattacharjee *et al*., 2015). در نتایج حاصل از بررسی ناحیه تنظیمی بالادست ژن‌های هم‌بیان، موتیف ATTA و TGAC که به‌ترتیب جایگاه اتصال پروتئین‌های ZF-HD و Homeodomain; TALE هستند در بیش از ۹۹٪ از ژن‌ها وجود داشتند (جدول ۲). همچنین موتیف‌های TGACG، AAGAAT و ACGT که در ارتباط با پروتئین‌های bZIP هستند در پروموتور بیش از ۹۰٪ ژن‌ها مشاهده شدند. پروتئین‌های bZIP از عوامل رونویسی هستند که دارای عملکردهای چندگانه‌ای در توسعه و نمو سلول‌ها، پاسخ به تنش‌ها و تغییرات پس از ترجمه هستند (Sornaraj *et al*., 2016).

موتیف [AG]GATT که جایگاه اتصال عوامل رونویسی Myb/SANT; MYB; ARR-B است در توالی پروموتوری بیش از ۹۹٪ از ژن‌ها وجود داشت. این عامل رونویسی در مکانیسم پیام‌رسانی فسفوترانسفرهیستیدین به اسپارتیک (His to Asp) درگیر است. انتقال سیگنال از هیستیدین کینازها دارای اهمیت خاصی در واکنش‌های سلولی به محرک‌های بیرونی است و همچنین در مسیرهای پیام‌رسانی سیتوکینین و اتیلن درگیر است (Imamura *et al*.,

www.SID.ir

Archive of SID

1998). موتیف‌های ATACGTGT و CACGTG از دیگر عناصر تنظیمی مهم اتصال عوامل رونویسی bHLH هستند که در ناحیه تنظیمی بالادست اکثر ژن‌ها مشاهده شد. موتیف ATACGTGT به‌عنوان Z-box شناخته شده است و در پروموتور ژن‌های پاسخ‌دهنده به نور قرار دارد (Yadav *et al*., 2005). جعبه W (W-box) با توالی TTGAC[CT] جایگاه اتصال پروتئین‌های WRKY است که در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیر زیستی درگیر است (Brand *et al*., 2013) در پروموتور ۹۷٪ ژن‌ها وجود داشت.

موتیف‌های حفاظت شده

شناسایی موتیف حفاظت‌شده که به‌عنوان جایگاه اتصال بالقوه عوامل رونویسی باشند در نواحی تنظیمی ژن‌ها، سبب تعیین مسیرهای پاسخی ژن‌ها و تعیین برهمکنش آنها می‌شود. بررسی تنها ناحیه اتصال عوامل رونویسی بدون نوع عامل رونویسی اتصالی، در ژن‌های هم بیان نشان داد که موتیف ACGTG و TTGAC در همه ژن‌ها توزیع شده است. موتیف ACGTG به‌علت شباهت به ABRE (عناصر تنظیمی پاسخ به آبسیزیک اسید) به‌نام موتیف ABRELATERD1 شناخته شده است و در پاسخ به هورمون آبسیزیک اسید و تنش سرما مشارکت دارد (Nakashima *et al*., 2006). موتیف TTGAC به‌عنوان جعبه W شناخته شده است که در پروموتور ژن NPR1 که جزء مرکز مهم مقاومت به عوامل بیماری‌زا در گیاهان است و در پاسخ به حمله پاتوژن و یا محلول پاشی سالیسیلیک اسید القاء و فعال می‌شود (Yu *et al*., 2001). موتیف W-box به‌عنوان جایگاه اتصال عامل رونویسی WRKY18 در گیاه آرابیدوپسیس معرفی شده است که این عامل رونویسی در افزایش مقاومت به حمله پاتوژن از طریق تحریک ژن NPR1 درگیر است (Chen and Chen, 2002). موتیف TTTGACY نیز یک جایگاه اتصال برای پروتئین‌های WRKY معرفی گردیده است که بیش از ۹۹٪ از پروموتور ژن‌ها دارای این موتیف بودند (جدول۳). موتیف‌های GCCAC و GCCAC در بیش از ۹۹٪ توالی پروموتور ژن‌ها مشاهده شدند. توالی NGATT به‌عنوان جایگاه اتصال عامل رونویسی ARR1 در گیاه ارابیدوپسیس در پاسخ به سیتوکینین درگیر است (Rose *et al*, 2004) و موتیف‌های GCCAC و GGGCC (SORLIP2AT) در پروموتور ژن‌های القاءشده توسط نور مشاهده شده است (Hudson and Quail, 2003).

جدول ۲. لیست CREها و خانواده عوامل رونویسی اتصالی و میزان توزیع در پروموتور ژن‌های هم بیان در ماژول ۵

Sequence of Cis-element	TF Family of TFBS	Support (promoter sites)
ATTA	ZF-HD	100%
ATCTA	AP2; ERF	100%
CCAAT	NF-YB; NF-YA; NF-YC	100%
CCGAC	Dehydrin	99.9%
GTTAC	Trihelix	99.9%
TGACG	bZIP	99.9%
AA[AG]G	Dof	99.9%
GATA	GATA; tify	99.9%
TGAC	Homeodomain; TALE	99.9%
[AG]GATT	Myb/SANT; MYB; ARR-B	99.8%
ATACGTGT	bHLH	99.5%
CAACA	AP2; RAV; B3	99 %
CACGTG	bHLH	98.6%
TTGAC[CT]	WRKY	97.5%
GTAC	SBP	96%
AAGAAT	bZIP	94%
ACGT	bZIP	93%

www.SID.ir

Archive of SID

TF: transcription factor, TFBS: TF binding site

جدول ۳. موتیف‌های بالقوه جایگاه اتصال عوامل رونویسی در پروموتور ژن‌های ماژول ۵

TFBS Name	Sequence	Support (promoter sites)
ABRELATERD1	ACGTG	100%
WBOXATNPR1	TTGAC	100%
ARR1AT	NGATT	99.9%
SORLIP1AT	GCCAC	99.9%
GT1CONSENSUS	GRWAAW	99.9%
MYBCOREATCYCB1	AACGG	99.8%
SURECOREATSULTR11	GAGAC	99.8%
WBBOXPCWRKY1	TTTGACY	99.5%
SORLIP2AT	GGGCC	99%

موتیف GRWAAW با عناصر اتصال GT1 مشابه است که نقش آن در تنش‌های زیستی و القاء سیستم SAR[1] به اثبات رسیده است (Buchel *et al.*, 1999). عناصر تنظیمی AACGG به‌نام موتیف MYBCOREATCYCB1 شناخته شده است که مشابه عناصر تنظیمی myb است و در چرخه سیکل سلولی در فازهای G1 و G2 درگیر است (Planchais *et al.*, 2002). موتیف GAGAC جزء عناصر پاسخ به سولفور[2] (SURE) هستند که در پروموتور ژن SULTR که یک انتقال‌دهنده سولفور است شناسایی شده است (Maruyama-Nakashita *et al.*, 2005) به‌همین دلیل SURECOREATSULTR11 نامیده می‌شود. این موتیف در بیش از ۹۹٪ پروموتور ژن‌ها مشاهده شد (جدول ۳). وجود عناصر تنظیمی مختلف در ناحیه پروموتور ژن‌های هم بیان حاکی از آن است که این ژن‌ها توسط عوامل مختلفی تحریک شده و در نتیجه در مسیرهای پاسخی مختلفی درگیر هستند و به افزایش سازگاری گیاهان کمک می‌کنند. با توجه به توسعه روش‌های نسل نوین توالی‌یابی و ارائه اطلاعات گسترده در زمینه پروفایل کامل بیانی ژن‌ها در پاسخ به تنش‌های مختلف محیطی، استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیکی در آنالیز این داده‌ها سبب اشکار شدن جنبه‌های جدیدی از رابطه ژن‌ها می‌شود. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که خانواده پروتئین‌های شوک دمایی (HSPs) و سیستم‌های آنتی‌اکسیدانتی نقش پر رنگی در پاسخ به تنش کاهش دما دارند. با آنالیز نواحی بالادست ژن‌ها عناصر تنظیمی همچون عناصر پاسخ به اسید آبسیزیک و پروتئین‌های WRKY دارای بیشترین فراوانی بودند و عوامل رونویسی خانواده AP2/ERF و ZF/HD دارای بیشترین جایگاه اتصال بودند که به‌عنوان تنظیم‌گرهای تنش دمایی پایین معرفی می‌شوند. نتایج این پژوهش جنبه‌های همکاری و همبستگی ژن‌ها در پاسخ به تنش دمایی پایین در گوجه‌فرنگی را ارائه داد.

REFERENCES

Anders S, Huber W (2010) Differential expression analysis for sequence count data. Genome Biology. doi: 10.1186/gb-2010-11-10-r106.

Aoki K, Ogata Y, Shibata D (2007) Approaches for extracting practical information from gene co-expression networks in plant biology. Plant cell physiology 48: 381-390.

Bergmann S, Ihmels J, Barkai N (2004) Similarities and differences in genome-wide expression data of six organisms. PLoS Biol. 2(1): 85-93.

Bhattacharjee A, Ghangal R, Garg R, Jain M (2015) Genome-Wide Analysis of Homeobox Gene Family in Legumes: Identification, Gene Duplication and Expression Profiling. PLoS ONE 10(3): e0119198. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119198.

www.SID.ir

Archive of SID

1. Systemic acquired resistance
2. Sulfur-responsive element

Brand LH, Fischer NM, Harter K, Kohlbacher O, Wanke D (2013) Elucidating the evolutionary conserved DNA-binding specificities of WRKY transcription factors by molecular dynamics and in vitro binding assays. Nucleic Acids Research. 41(21): 9764-9778.

Buchel AS, Brederode FT, Bol JF, Linthorst HJ (1999) Mutation of GT-1 binding sites in the Pr-1A promoter influences the level of inducible gene expression *in vivo*. Plant. Mol. Biol. 40: 387-396.

Cai B, Li CH, Huang J (2014) Systematic identification of cell-wall related genes in populous based on analysis of functional modules in co-expression network. PloS One. 9: e95176. Doi:10.1371/journal.pone.0095176.

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.

Chen C, Chen Z (2002) Potentiation of Developmentally Regulated Plant Defense Response by AtWRKY18, a Pathogen-Induced Arabidopsis Transcription Factor. Plant Physiology. 129(2): 706-716.

Chinnusamy V, Ohta M, Kanrar S, Lee B, Hong X (2007) ICE1: a regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in Arabidopsis. Genes & Development 17: 1043-1054.

Chow CN, Zheng H.Q, Wu NY, Chien C.H, Huang HD, Lee TY, Chang W.C (2016) PlantPAN 2.0: an update of plant promoter analysis navigator for reconstructing transcriptional regulatory networks in plants. Nucleic Acids Research. 44 (Database issue): D1154-1160.

de Silva K, Laska B, Brown C, Sederoff H, Khodakovskaya M (2011) Arabidopsis thaliana calcium-dependent lipid-binding protein (AtCLB): a novel repressor of abiotic stress response. Journal of Experimental Botany 62(8): 2679-2689.

Falcon S, Gentleman R (2006) Using GOstats to Test Gene Lists for GO Term Association. Bioinformatics 23(2): 257-258.

Fernandez-Pozo N, Menda N, Edwards JD, Saha S, Tecle IY, Strickler SR, Mueller L. A (2015) The Sol Genomics Network (SGN)-from genotype to phenotype to breeding. Nucleic Acids Research. 43(Database issue): D1036-D1041.

Haralampidis K, Milioni D, Rigas S, Hatzopoulos P (2002) Combinatorial Interaction of Cis Elements Specifies the Expression of the Arabidopsis AtHsp90-1 Gene. Plant Physiology. 129(3):1138-1149.

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.

Hudson ME, Quail PH (2003) Identification of Promoter Motifs Involved in the Network of Phytochrome A-Regulated Gene Expression by Combined Analysis of Genomic Sequence and Microarray Data. Plant Physiology 133(4): 1605-1616.

Imamura A, Hanaki N, Umeda H, Nakamura A, Suzuki T, Ueguchi C, Mizuno T (1998) Response regulators implicated in His-to-Asp phosphotransfer signaling in Arabidopsis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 95(5): 2691-2696.

Langfelder P, Horvath S (2008) WGCNA: An R package for weighted correlation network analysis. BMC bioinformatics.

www.SID.ir

Archive of SID

9(1): 559. https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-559.

Licausi F, Ohme-Takagi M, Perata P (2013) APETALA2/Ethylene Responsive Factor (AP2/ERF) transcription factors: mediators of stress responses and developmental programs. New Phytologist. 199 (3): 639-649.

Lindemose S, O'Shea C, Jensen MK, Skriver K (2013) Structure, function and networks of transcription factors involved in abiotic stress responses. International Journal of Molecular Sciences. 14: 5842-5878. 56.

Liu H, Ouyang B, Zhang J, Wang T, Li H, et al. (2012) Differential Modulation of Photosynthesis, Signaling, and Transcriptional Regulation between Tolerant and Sensitive Tomato Genotypes under Cold Stress. PLoS ONE. 7(11): e50785. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050785.

Mailloux RJ, Bériault R, Lemire J, Singh R, Chénier DR, Hamel RD, et al. (2007) The Tricarboxylic Acid Cycle, an Ancient Metabolic Network with a Novel Twist. PLoS ONE 2(8): e690. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000690

Maruyama-Nakashita A, Nakamura Y, Watanabe-Takahashi A, Inoue E, Yamaya T, Takahashi H (2005) Identification of a novel cis-acting element conferring sulfur deficiency response in Arabidopsis roots. Plant Journal 42(3): 305-314.

Nakashima K, Fujita Y, Katsura K, Maruyama, K, Narusaka Y, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2006) Plant Mol Biol. 60: 51-68.

Planchais S, Perennes C, Glab N**,** Mironov V, Inzé D, Bergounioux C (2002) Characterization of *cis*-acting element involved in cell cycle phase-independent activation of Arath; *CycB1*;1 transcription and identification of putative regulatory proteins. Plant Mol Biol 50: 109-125.

Ross E, Stone JM, Elowsky CG, Arredondo-Peter R, Klucas R, Sarath G (2004) Activation of the *Oryza sativa* non-symbiotic haemoglobin-2 promoter by the cytokinin-regulated transcription factor, ARR1. Journal of Experimental Botany. 55 (403): 1721-1731.

Saibo NJ, Lourenco T, Oliveira MM (2009) Transcription factors and regulation of photosynthetic and related metabolism under environmental stresses. Annals of Botany. 103: 609-623.

Sornaraj P, Luang S, Lopato S, Hrmova M (2016) Basic leucine zipper (bZIP) transcription factors involved in abiotic stresses: A molecular model of a wheat bZIP factor and implications of its structure in function. Biochimica et Biophysica Acta (BBA). 1860 (1): 46-56.

Supek F, Bošnjak M, Škunca N, Šmuc T (2011) REVIGO Summarizes and Visualizes Long Lists of Gene Ontology Terms. PLoS ONE 6(7): e21800. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021800.

Verma G, Dhar YV, Srivastava D, Kidwai M, Chauhan PS, Bag SK, et al. (2017) Genome-wide analysis of rice dehydrin gene family: Its evolutionary conservedness and expression pattern in response to PEG induced dehydration stress. PLoS ONE 12(5): e0176399. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176399.

Yadav V, Mallappa C, Gangappa SN, Bhatia S, Chattopadhyay S (2005) A Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor in Arabidopsis, MYC2, Acts as a Repressor of Blue Light–Mediated Photomorphogenic Growth. The Plant Cell. 17(7): 1953-1966.

Yu D, Chen C, Chen Z (2001) Evidence for an important role of WRKY DNA binding proteins in the regulation of NPR1 gene expression. Plant Cell. 13: 1527-1540.

Zhou j, Li C, Gao F, Luo X, Li Q, Zhao H, Yao H, Chen H, Wang A, Wu Q (2016) Characterization of Three Glucosyltransferase Genes in Tartary Buckwheat and Their Expression after Cold Stress. Journal of Agricultural and Food Chemistry 64 (37): 6930-6938.

www.SID.ir

Archive of SID

www.SID.ir