

Evaluation of gene expression of 14-3-3 genes under drought stress in potato

Zahra Hajibarat

Ph.D. Student, Department of Plant Sciences and Biotechnology, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran. E-mail address: zahrahajibarat@yahoo.com

Abbas Saidi 

*Corresponding author. Professor, Department of Plant Sciences and Biotechnology, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran. E-mail address: abbas.saidi@gmail.com

Abstract

Objective

Potato (*Solanum tuberosum*) is an important food and economic crop in the world. However, potato shows susceptibility to drought stress. Thus, the investigation of the molecular mechanism of drought stress tolerance is essential considered. GF14/14-3-3 protein is one of the conserved dimeric proteins that regulate several cellular processes, ranging from metabolism to transport, growth, development, and stress response. However, only a few reports are available regarding the effect of 14-3-3 genes in response to stress in potatoes.

Materials and methods

In this study, twelve 14-3-3 genes were detected in the potato genome using bioinformatics methods. Further, motif analysis, gene structure, phylogenetic analysis, TFBS, and synteny analysis were performed on the 14-3-3 genes. In addition, the expression analysis of two genes (StGF14i and StGF14h) in four tissues (root, stem, leaf, and tuber) and their expression under drought stress in the greenhouse was investigated.

Results

Based on phylogenetic relationships, the *StGF14* family members were categorized into two classes. Analysis of transcription factor binding sites (TFBS) in the promoter region of 14-3-3 genes revealed that the highest and the lowest number of TFBS were MYB and CSD, respectively, were found in the promoters of 14-3-3 genes. Moreover, different

frequencies of TFBS in *14-3-3* genes could indicate that these genes control different developmental stages and are involved in complex regulatory mechanisms. Furthermore, the genome evolution of *S. tuberosum* using orthologs and paralogues identification was studied. The number of exons in *14-3-3* genes was from four to seven and most of these genes in the same subfamily had the same exon-intron patterns. The expression of two genes in leaves and tuber under drought stress as well as the gene expression of both genes in root, stem, leaf, and tuber tissues under drought were examined. Based on the expression analysis of two genes StGF14i and StGF14h in tissues and a survey of drought stress, the StGF14i gene has the maximum expression in four tissues and also, the highest expression in tubers under drought stress. Our results revealed that two orthologous gene pairs between *S. tuberosum* and *A. thaliana* as well as eight paralogous genes among potato genomes were identified.

Conclusions

The expression patterns of *StGF14i* and *StGF14h* genes in different tissues and in response to drought stress that two genes had the conserved and necessary roles in potato growth and development potato. It is hoped that the results of this study will be useful for further investigation of the functional role and molecular mechanisms of *14-3-3* genes in response to drought stresses.

Keywords: Drought, Promoter, TFBS, Phylogenetic, Paralogous

Paper Type: Research Paper.

Citation: Hajibarat Z, Saidi A (2022) Evaluation of gene expression of 14-3-3 genes under drought stress in potato. *Agricultural Biotechnology Journal* 14 (3), 63-82.

Agricultural Biotechnology Journal 14 (3), 63-82.

DOI: 10.22103/jab.2022.18681.1360

Received: May 10, 2022.

Received in revised form: June 26, 2022.

Accepted: June 27, 2022.

Published online: August 10, 2022

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant



Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian
Biotechnology Society.

© the authors

ارزیابی بیان ژن‌های ۱۴-۳-۳ در سیب‌زمینی تحت تنش خشکی

زهرا حاجی‌برات

دانشجوی دکتری، گروه زیست فناوری گیاهی و بیوتکنولوژی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران. رایانامه: zahrahajibarat@yahoo.com

عباس سعیدی 

*نویسنده مسئول: استاد، گروه زیست فناوری گیاهی و بیوتکنولوژی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران. رایانامه: abbas.saidi@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۲/۲۰ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۱/۰۴/۰۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۴/۰۶

چکیده

هدف: سیب‌زمینی یک محصول زراعی و غذای مهم در جهان است. اما گیاه سیب‌زمینی به تنش خشکی حساس است. به همین دلیل بررسی مکانیسم مولکولی تحمل به تنش خشکی ضروری به نظر می‌رسد. پروتئین GF14/14-3-3 یکی از پروتئین‌های دایمری محافظت شده هستند که چندین فرایند سلولی از متابولیسم تا انتقال، رشد و توسعه و پاسخ به تنش را تنظیم می‌کنند. اما گزارش‌های کمی درباره ژن‌های ۱۴-۳-۳ در سیب‌زمینی در دسترس است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، ۱۲ ژن در ژنوم سیب‌زمینی با استفاده از ابزار بیوانفورماتیک شناسایی شده است. علاوه بر این، آنالیز موتیف، ساختار ژن، آنالیز فیلوژنی، آنالیز جایگاه اتصال فاکتور رونویسی (TFBS) و سینتزی بر روی ژن‌های ۱۴-۳-۳ انجام شد. همچنین آنالیز بیان دو ژن (*StGF14h* و *StGF14i*) در چهار بافت ریشه، ساقه، برگ و غده و بیان آن‌ها تحت تنش خشکی در شرایط گلخانه بررسی شد.

نتایج: بر اساس آنالیز فیلوژنتیکی، اعضای خانواده ژنی StGF14 به دو کلاس تقسیم‌بندی شدند. آنالیز مکان‌های اتصال فاکتور رونویسی (TFBS) در ناحیه پرموتری ژن‌های ۱۴-۳-۳ نشان داد که بیشترین و کمترین تعداد TFBS به ترتیب مربوط به MYB و CSD

می‌باشد. علاوه بر این، فراوانی متفاوت TFBSها در ژن‌های ۱۴-۳-۳ می‌تواند نشان دهنده این باشد که این ژن‌ها در مراحل مختلف رشد و نمو و مکانیسم‌های پیچیده تنظیمی درگیر هستند. روابط تکاملی سیب‌زمینی با استفاده از شناسایی ارتولوگ‌ها و پارالوگ‌ها

مطالعه شد. تعداد آگزون‌ها در ژن‌های ۳-۳-۱۴ از ۴ تا ۷ متغیر بود و بیشتر این ژن‌ها در زیر خانواده مشابه دارای الگوی آگزون- اینترون مشابه هستند. بیان دو ژن در برگ و غده تحت تنش خشکی و همچنین بیان هر دو ژن در بافت‌های ریشه، ساقه، برگ و غده مورد بررسی قرار گرفت. براساس آنالیز بیان دو ژن *StGF14i* و *StGF14h* در بافت‌ها و بررسی تنش خشکی، ژن *StGF14i* بیان بالاتری در چهار بافت داشته و همچنین بالاترین بیان را در غده تحت تنش خشکی سیب‌زمینی نشان داد. نتایج نشان داد که دو جفت ارتولوگ بین سیب‌زمینی و آراییدوپسیس و همچنین ۸ جفت پارالوگ در ژنوم سیب‌زمینی وجود دارد.

نتیجه‌گیری: الگوی بیان ژن‌های *StGF14i* و *StGF14h* در بافت‌های مختلف و در پاسخ به تنش خشکی نشان می‌دهد که این دو ژن نقش‌های ضروری و محافظت‌شده در رشد و نمو سیب‌زمینی دارند. امید است که نتایج این مطالعه بتواند به بررسی‌های بیشتر بر روی نقش عملکردی و مکانیسم مولکولی ژن‌های ۳-۳-۱۴ در پاسخ به تنش خشکی در سیب‌زمینی کمک نماید.

کلیدواژه‌ها: خشکی، پروموتر، TFBS، فیلوژنتیک، پارالوگ.

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: حاجی‌برات زهرا، سعیدی عباس (۱۴۰۱) ارزیابی بیان ژن‌های ۳-۳-۱۴ در سیب‌زمینی تحت تنش خشکی. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۴(۳)، ۶۳-۸۲.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant
Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian
Biotechnology Society.



© the authors

مقدمه

سیب‌زمینی یکی از مهمترین گیاهان برای مصرف غذای انسان محسوب می‌شود و نقش مهمی در اقتصاد جهان و ایران دارد. سیب‌زمینی حاوی کربوهیدرات، پروتئین، مواد معدنی و ویتامین بیشتری در واحد سطح در مقایسه با غلات می‌باشد. با توجه به افزایش روزافزون جمعیت و کاهش عملکرد سیب‌زمینی تحت تاثیر تنش‌های زیستی و غیر زیستی وجود دارد در نتیجه با کمبود شدید مواد غذایی در جهان مواجه خواهیم شد. سیب‌زمینی محبوبیت رو به افزایشی بدلیل ارزش غذایی بالا و سادگی تکثیر در بین کشاورزان پیدا کرده است. با توجه به اینکه جمعیت جهانی تا سال ۲۰۵۰ به ۵۰ درصد افزایش می‌یابد، برای تامین چنین جمعیتی باید تولید محصولات زراعی افزایش پیدا کند (United Nations 2004). این در حالی است که افزایش سطح زمین‌های زراعی نه تنها روند رو به رشدی ندارد بلکه روند نزولی بدلیل تغییرات اقلیمی نیز پیدا کرده است. این مشکلات با کاهش آب و افزایش گرمای زمین تشدید می‌شود و در نتیجه پیش‌بینی عملکرد گیاهان زراعی با وجود این مشکلات به سختی انجام می‌پذیرد. همچنین شکاف بزرگی بین عملکرد محصولات زراعی و مصرف جهانی غذا به وجود می‌آید. سیب‌زمینی نه تنها جایگاه ویژه‌ای در تغذیه و خوراک دام دارد

بلکه از کاربردهای صنعتی متنوعی برخوردار می‌باشد. از کاربردهای دیگر سیب‌زمینی می‌توان تولید سیب‌زمینی سرخ کرده، کنسرو سیب‌زمینی و همچنین تولید نشاسته و الکل) اشاره کرد. با توجه به اهمیت و کاربرد این محصول در اقتصاد کشور ضرورت توجه به بالا بردن کیفیت و عملکرد این محصول ضروری به نظر می‌رسد (Khurana et al. 2003). برای تحقق این اهداف افزایش شناخت سازوکارهای مولکولی متاثر از تنش خشکی با استفاده از بررسی الگوی بیان بیشتر ژنها لازم می‌باشد.

سیب زمینی با دارا بودن سیستم ریشه‌ای کم‌عمق، حساس به استرس‌های غیرزیستی از جمله خشکی می‌باشد. تنش خشکی، تنش رایج در مناطق تولید سیب زمینی بوده که منجر به کاهش عملکرد و کیفیت غده می‌شود (Foti et al. 1995). وارپته‌های موجود سیب زمینی به استرس خشکی حساس می‌باشند و بنابراین اصلاح برای تحمل به خشکی ضروری تلقی می‌شود. تنش خشکی در سیب زمینی باعث کاهش عملکرد شده و می‌تواند به کیفیت محصول آسیب برساند و احتمالاً منجر به افزایش شیوع بیماری‌های سیب زمینی نیز می‌گردد (Mane et al. 2008). با توجه به تغییرات اقلیمی جهانی، انتخاب ارقام متحمل به خشکی و دارای پتانسیل عملکرد بالا از اهمیت حیاتی برخوردار است. در ایران به دلیل این که این محصول با مشکل جدی خشکی روبرو می‌باشد، بنابراین لازم است مکانیسم‌های مولکولی مقاومت گیاه تحت تنش خشکی با استفاده از ژن‌های متحمل به خشکی در سیب زمینی شناسایی گردیده تا به کولتیوارهای سیب زمینی جهت ایجاد ارقام متحمل به خشکی انتقال داده شوند. (Hasanpanah et al. 2003) با توجه به تغییرات اقلیمی در سطح کشور، بررسی ژن‌های مهم درگیر در مواجهه با تنش خشکی ضروری به نظر می‌رسد. از این رو بررسی بر روی پروتئین‌های ۱۴-۳-۳ در سیب‌زمینی انجام شد که نقش مهمی در تنش‌های محیطی ایفا می‌کنند.

پروتئین‌های ۱۴-۳-۳ (یک خانواده پروتئینی تنظیمی)، پروتئین‌های اتصال فسفوسرین هستند که فعالیت تعداد زیادی از فرآیندهای درون سلول مولکولی را از طریق برهم‌کنش پروتئین-پروتئین به طور مستقیم تنظیم می‌کنند (Bridges et al. 2005). پروتئین‌های ۱۴-۳-۳ گیاهی به یک طیف وسیعی از فاکتورهای رونویسی و دیگر پروتئین‌های سیگنالینگ را متصل می‌شوند و در تنظیم رشد گیاه و پاسخ به استرس نقش دارند (Roberts 2003). در گیاهان ایزوفرم ۱۴-۳-۳ به عنوان بخشی از یک کمپلکس پروتئین/G-box شناخته شده‌است و به همین دلیل GF14 (همولوگ‌های ۱۴-۳-۳ فاکتور G-box) یا GRF (فاکتور تنظیمی G-box یا فاکتور تنظیم عمومی) نامگذاری شدند (DeLille et al. 2001). برخی از مطالعات اخیر اشاره کردند که در گیاهان عالی، پروتئین‌های ۱۴-۳-۳ نقش مهمی در پاسخ به استرس‌های زیستی و غیر زیستی دارند. این پروتئین‌ها به دو فرم همو و هترو دایمر هستند که عملکرد بیولوژیکی آنها به برهم‌کنش فیزیکی با پروتئین هدف بستگی دارد و منجر به تغییر در پروتئین هدف می‌شود. در نهایت پروتئین‌های ۱۴-۳-۳ درگیر در طیف گسترده‌ای از فرآیندهای سلولی اعم از پاسخ به استرس، کنترل سیکل سلولی و آپوپتوز می‌شوند که تعداد زیادی فعال‌کننده، سرکوبگر و آداپتورها را به خدمت می‌گیرند (Feri et al. 2002). از جمله فعالیت‌های پروتئین‌های ۱۴-۳-۳ می‌توان به تنظیم فعالیت غشای پلازما H^+ -ATPase اشاره کرد که این برهم‌کنش‌ها نقش مهمی در استرس‌های غیر زیستی دارند. همچنین این پروتئین‌ها شرکای تنظیمی کانال‌های K^+ گیاه هستند. از دیگر فعالیت‌های این پروتئین‌ها آن است که با ABA و APX برهم‌کنش داده و نقش‌های مهمی در پاسخ به استرس‌های شوری دارند. اخیراً نقش

جدیدی برای پروتئین‌های ۳-۳-۱۴ در انتقال روبه جلو از کانال‌های یونی و کمپلکس‌های گیرنده در شبکه آندوپلاسمی تعریف شده‌است (MacKintosh et al. 2001). بیان *OsGRF* در پاسخ به گرما، دمای کم و استرس‌های شوری در برنج تغییر می‌کند. مطالعه قبلی نشان داد که ژن‌های *AtGRF9* و *AtGRF10* به انباشت نشاسته کمک می‌کنند (Sehnke et al. 2001). همچنین مطالعه دیگری نشان داد که ژن GF14-6 در مرحله گیاهچه‌ای تحت تنش شوری در برنج افزایش بیان داشته‌اند. علاوه بر این افزایش بیان پروتئین GF14 می‌تواند باعث افزایش مقاومت به سرما و پاسخ به استرس‌های محیطی مختلف شود (Visconti et al. 2019). بیشتر ژن‌های *MaGRFs* در طول رشد میوه در موز و رسیدن پس از برداشت در زمان رونویسی انباشته می‌شوند. هدف این مطالعه بررسی ژن‌های ۳-۳-۱۴ در سیب‌زمینی تحت تنش خشکی و همچنین بررسی بیان آنها در بافت‌های مختلف است که براساس یافته‌های دیگر محققان نقش مهمی در تنش خشکی در سیب‌زمینی دارند.

مواد و روش‌ها

شناسایی ژن‌های StGF14 در سیب‌زمینی: توالی‌های پروتئینی آرآبیدوپسیس از سایت TAIR دانلود شد. برای شناسایی ژن‌های سیب‌زمینی به روش tBLASTn از سایت phytozome استفاده شد. همه توالی‌ها با استفاده از Pfam و interproscan تایید شد. از مجموعه توالی‌ها ۱۲ توالی به عنوان ژن‌های StGF14 در نظر گرفته شد. برای آنالیز توالی‌های پروتئینی با استفاده از CLUSTAL W هم‌ردیف شدند و ترسیم درخت فیلوژنتیکی با استفاده از نرم افزار MEGA 6.0 انجام شد.

ویژگی‌های ساختار ژنی، موتیف و آنالیز TFBS: برای بررسی ساختار پروتئینی، توالی‌های DNA و CDS مربوط به هر ژن ۳-۳-۱۴ از سایت NCBI گرفته شد. سپس ساختار ژنی آنها با استفاده از نرم افزار GSDS ترسیم شد. برنامه MEME برای شناسایی موتیف‌های محافظت شده استفاده شد. ۱۵۰۰ جفت باز بالادست ناحیه پرموتوری از هر ژن StG14 با استفاده از PlantPAN جهت شناسایی مکان اتصال فاکتور رونویسی در توالی ژنی در نظر گرفته شد.

آنالیز سینتینی: برای ارزیابی روابط سینتینیک، ژن‌های ارتولوگ بین سیب‌زمینی و آرآبیدوپسیس از سایت Ensemble Plants شناسایی شدند. زمانی که دو ژن میزان شباهت بالاتر از ۷۰ درصد داشته باشند آن ژن‌ها ارتولوگ هستند (Ghorbani et al. 2020). ژن‌های پارالوگ در ژنوم موجود مطالعه زمانی وجود دارد که میزان شباهت بین ژن‌های مذکور بیشتر از ۸۵ درصد باشد. این بدین معنی است که آن ژن‌ها پارالوگ یکدیگر محسوب می‌شوند. ژن‌های پارالوگ و ارتولوگ با استفاده از برنامه Circos نمایش داده شدند. برای بررسی پارالوگ و ارتولوگ از BLASTp پروتئین‌ها استفاده شد. برای شناسایی الگوی دوبرابردگی از برنامه PLAZA استفاده شد.

آنالیز بیان ژن: رشد گیاه، پروفایل بیانی در بافت‌ها و بیان تحت تنش خشکی: برای آنالیز بیان در بافت‌های مختلف، نمونه‌برداری ۲ هفته بعد از رشد غده‌ها صورت گرفت. نمونه‌برداری از بخش ریشه، ساقه و برگ انجام شد. در حالی که نمونه‌برداری از غده‌ها ۴ هفته بعد از کشت در موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج انجام گردید. برای بررسی تنش خشکی، سه تکرار از هر غده برای تیمار نرمال و تنش استفاده شد. در طول ۶ هفته، همه گلدان‌ها یکسان آبیاری شدند و بعد از این مدت، ۲ هفته آبیاری برای گلدان‌های تنش خشکی انجام نشد در حالی که برای گلدان‌های تحت تیمار نرمال آبیاری به صورت بهینه انجام شد. نمونه‌برداری از برگ و غده تحت شرایط اشاره شده، انجام شد. سپس نمونه‌ها در نیتروژن مایع غوطه‌ور شدند و تا زمان استخراج RNA در فریزر ۸۰- نگهداری شدند.

استخراج RNA و PCR کمی در زمان واقعی (qRT-PCR): استخراج RNA از بافتهای ریشه، ساقه، برگ و غده انجام شد و همچنین از نمونه برگ و غده تحت تنش نرمال و خشکی استخراج RNA با استفاده از کیت سیناکلون صورت گرفت. برای حذف DNA از نمونه‌های RNA از آنزیم DNase I استفاده شد. کمیّت و کیفیت RNA با استفاده از ژل ۱ درصد و نانو دراپ بررسی شد. سپس سنتز cDNA با استفاده از کیت Easy cDNA Synthesis انجام شد. برای هر نمونه سه تکرار استفاده شد و ژن کنترل داخلی EF-1 α بود.

نتایج و بحث

شناسایی، طبقه‌بندی فیلوژنتیکی اعضای خانواده GF14: با بررسی توالی پروتئین‌های احتمالی که از طریق HMM و BLASTp انجام شد توالی پروتئینی احتمالی ۱۴-۳-۳ در سیب‌زمینی شناسایی شد. برای حصول اطمینان از حضور دمین ۱۴-۳-۳ توالی‌های پروتئینی یافت شده در پایگاه interproscan و Pfam مورد جستجو قرار گرفتند و تنها رونوشت‌های پروتئینی که دارای دمین ۱۴-۳-۳ بودند از سایت Ensemble Plants انتخاب شدند (جدول ۱). درخت فیلوژنی بر پایه دمین حفاظت شده ۱۴-۳-۳ اعضا یافت شده ترسیم شد و براساس شباهتهای ساختاری به کار رفته برای گروه‌بندی خانواده ژنی ۱۴-۳-۳ در سیب‌زمینی در زیرگروه E و غیر E تقسیم‌بندی شدند (شکل ۱). گروه E شامل ۴ عضو بود درحالی که اعضای گروه غیر E شامل ۸ عضو بود. گروه غیر E بیشترین تعداد را به خود اختصاص دادند. ترسیم درخت فیلوژنتیکی از سیب‌زمینی مطابق با مطالعات قبلی بر روی سیب، پنبه و خیار بود (Zuo et al. 2021; Xu et al. 2021; Sang et al. 2021). ترسیم درخت فیلوژنی با استفاده از الگوریتم Maximum likelihood صورت گرفت. این روش نسبت به سایر روش‌ها واریانس کمتری داشته است همچنین زمانی که بسیاری از توالی‌ها موارد نقض مفروضات می‌کنند این مدل به عنوان مدل پیشنهادی برای بررسی تکاملی قوی استفاده می‌شود.

جدول ۱. ویژگی ژن‌های StGF14 در سیب‌زمینی

Table 1. Characterization of StGF14 genes in potato

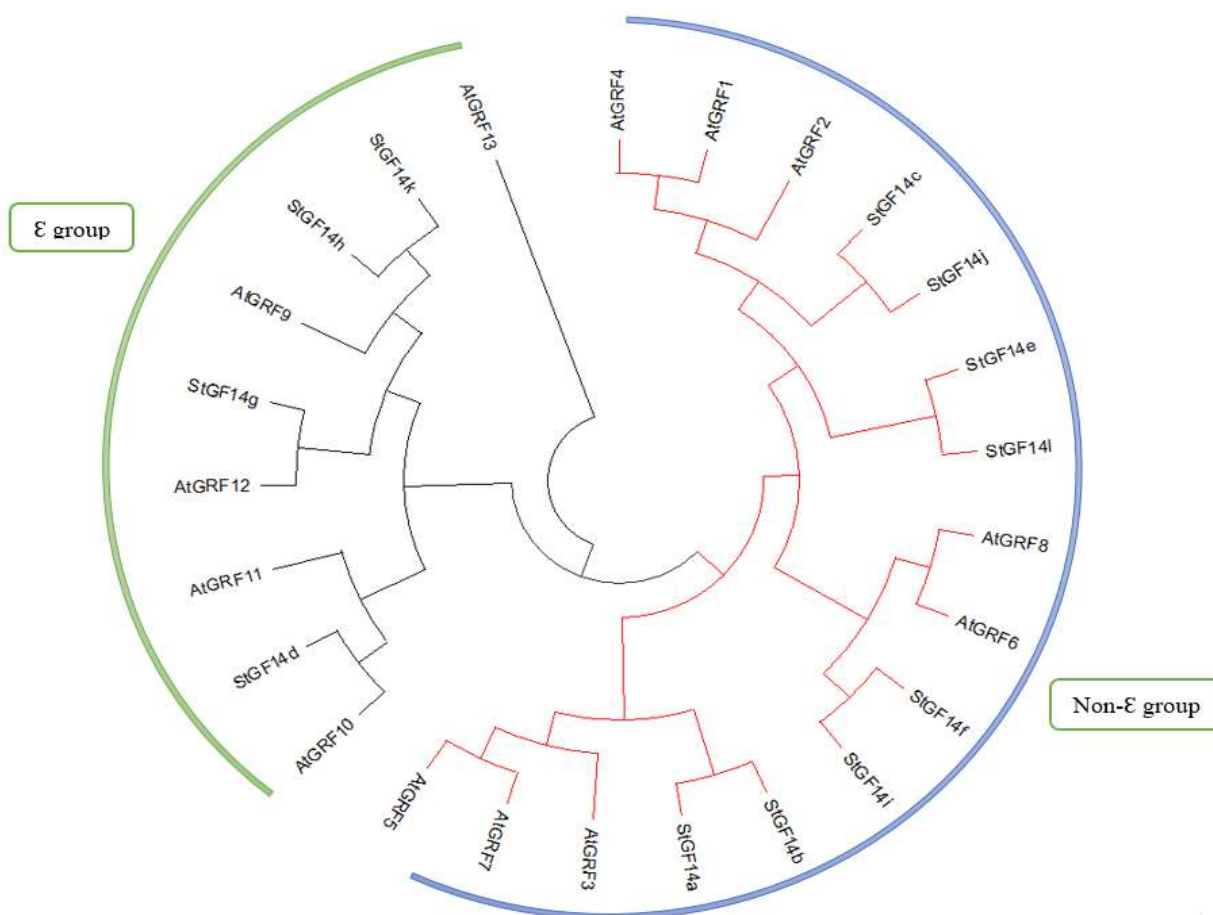
نام ژن	شماره دسترسی	کروموزم	موقعیت در سلول
Gene name	Accession number	Chromosome	Location in cell
StGF14a	PGSC0003DMG400024187	2	هسته (Nucleus)
StGF14b	PGSC0003DMG400019587	3	هسته (Nucleus)
StGF14c	PGSC0003DMG400023590	4	هسته (Nucleus)
StGF14d	PGSC0003DMG400006415	4	هسته (Nucleus)
StGF14e	PGSC0003DMG400030814	4	هسته (Nucleus)
StGF14f	PGSC0003DMG400012899	4	هسته (Nucleus)
StGF14g	PGSC0003DMG400028377	5	هسته (Nucleus)
StGF14h	PGSC0003DMG400020425	7	هسته (Nucleus)
StGF14i	PGSC0003DMG401016141	11	هسته (Nucleus)
StGF14j	PGSC0003DMG400016221	11	هسته (Nucleus)
StGF14k	PGSC0003DMG400007807	12	هسته (Nucleus)
StGF14l	PGSC0003DMG400017753	12	هسته (Nucleus)

ساختار ژنی و آنالیز موتیف: برای درک بهتر از تنوع ساختاری ژن‌های ۱۴-۳-۳، ساختار اینترون-اگزون از هر ژن ۳-

۱۴-۳ تعیین شد. تعداد اگزون‌ها در ژن‌های ۱۴-۳-۳ از ۳ تا ۷ متغیر بود. در حدود ۱۰۰ درصد از ژن‌های غیر از ϵ سه اینترون داشتند که دارای طول اگزون تقریباً مشابه بودند. این تشابه گویای حفاظت شدگی ژنتیکی این ژن‌ها می‌باشد. بیشترین تعداد اینترون در اعضای گروه ϵ مشاهده شد که دارای تفاوت ساختاری متنوع بودند. شواهد نشان می‌دهد که حفاظت شدگی عملکردی در این اعضا وجود دارد. همچنین سازماندهی ساختاری در اعضای خانواده ژنی ۱۴-۳-۳ مشاهده می‌شود. تعداد اگزون‌های هر ژن توانایی عملکردی اکتسابی ژن‌ها را بیان می‌کند. وجود اگزون و اینترون متعدد می‌تواند پیامد اصلی گسترش خانواده ژنی ۱۴-۳-۳ در سیب‌زمینی باشد (شکل ۲).

همه ژن‌های ۱۴-۳-۳ برای حضور موتیف‌های جدید با استفاده از برنامه MEME مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. طول موتیف‌ها از ۶ تا ۵۰ متغیر بود. موتیف‌های ۱، ۲ و ۳ به عنوان دمن‌های پروتئینی ۱۴-۳-۳ حاشیه‌نویسی شدند (شکل ۳ و جدول ۲). این ۳

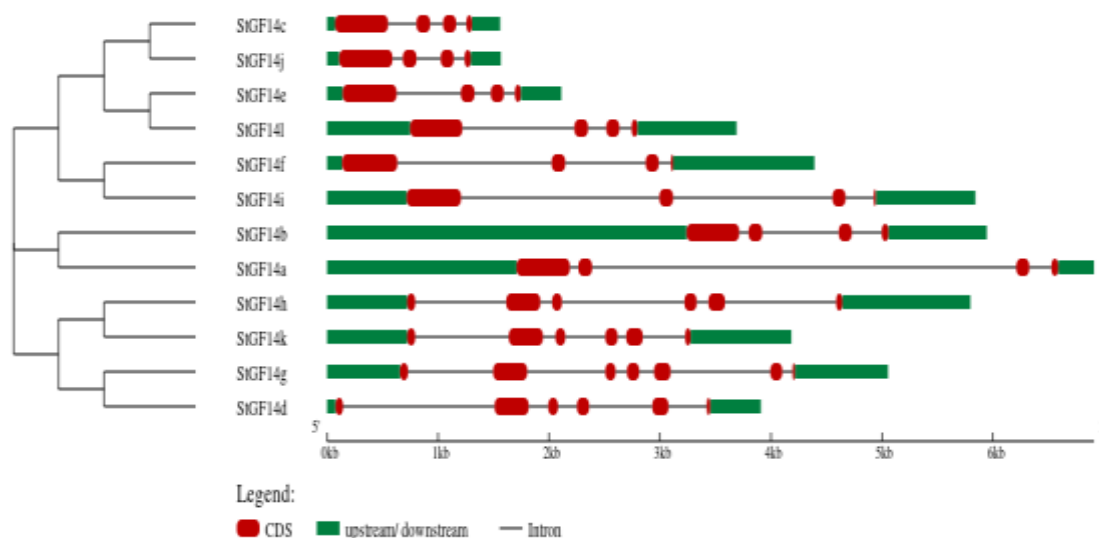
موتیف در همه پروتئین‌های GF14 سیب‌زمینی وجود داشتند که نشان‌دهنده حفاظت‌شدگی بالای آن‌ها است که ممکن است پیش نیاز برای عملکرد هر ژن باشد. در هر دو گروه E و غیر E، همه پروتئین‌ها شامل موتیف ۱، ۲ و ۳ هستند. برخی از این پروتئین‌ها دارای دمین متفاوت در هر گروه E و غیر E هستند. تفاوت در ساختار موتیف بین گروه E و غیر E می‌تواند تنوع عملکردی را منعکس کنند. نتایج مطالعه حاضر با مطالعه بر روی سیب نیز مطابقت داشت. موتیف‌ها و عملکرد آن‌ها در جدول ۲ نمایش داده شده است. حضور موتیف‌های محافظت شده در ژن‌های ۳-۳-۱۴ در سیب و سایر گیاهان نیز تایید شد (Zuo et al. 2021). آنالیز ساختار ژنی نشان داد که اعضای گروه غیر E تعداد اگزون و اینترون کمتری نسبت به اعضای گروه E دارند که در گونه‌های دیگر مانند آرابیدوپسیس، برنج، سویا، موز و صنوبر مشاهده شده است. این نتایج با مطالعه حاضر مطابقت داشت (Chen et al. 2006; Chevalier et al. 2009; Tian et al. 2015, Li et al. 2016; Wang et al. 2019).



شکل ۱. روابط فیلوژنتیکی پروتئین‌های StGF14 در آرابیدوپسیس و سیب‌زمینی با استفاده از نرم‌افزار

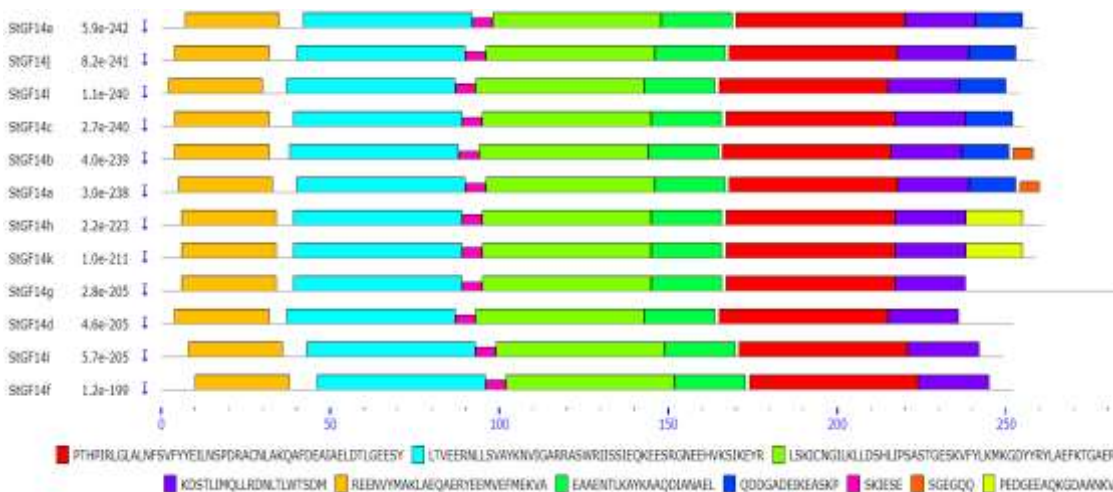
MEGA 6.0 به روش Maximum likelihood

Figure 1. Phylogenetic relationship StGF14 proteins in Arabidopsis and potato using MEGA 6.0 software by the Maximum likelihood



شکل ۲. ساختار اگزون و اینترون ژن‌های خانواده StGF14 در سیب‌زمینی با استفاده از نرم‌افزار GSDS.

Figure 2. Exon and intron structure of StGF14 gene family in potato using GSDS software



شکل ۳. ترسیم موتیف‌های محافظت‌شده خانواده ژنی StGF14 با استفاده از برنامه MEME و جعبه‌ها با رنگ‌های مختلف بیانگر موتیف‌های متفاوت هستند.

Figure 3. Drawn conserved motifs of StGF14 gene family using MEME program and boxes are different colors explains different motifs

جدول ۲. توالی و انوتیشن موتیف‌های محافظت شده در پروتئین‌های StGF14

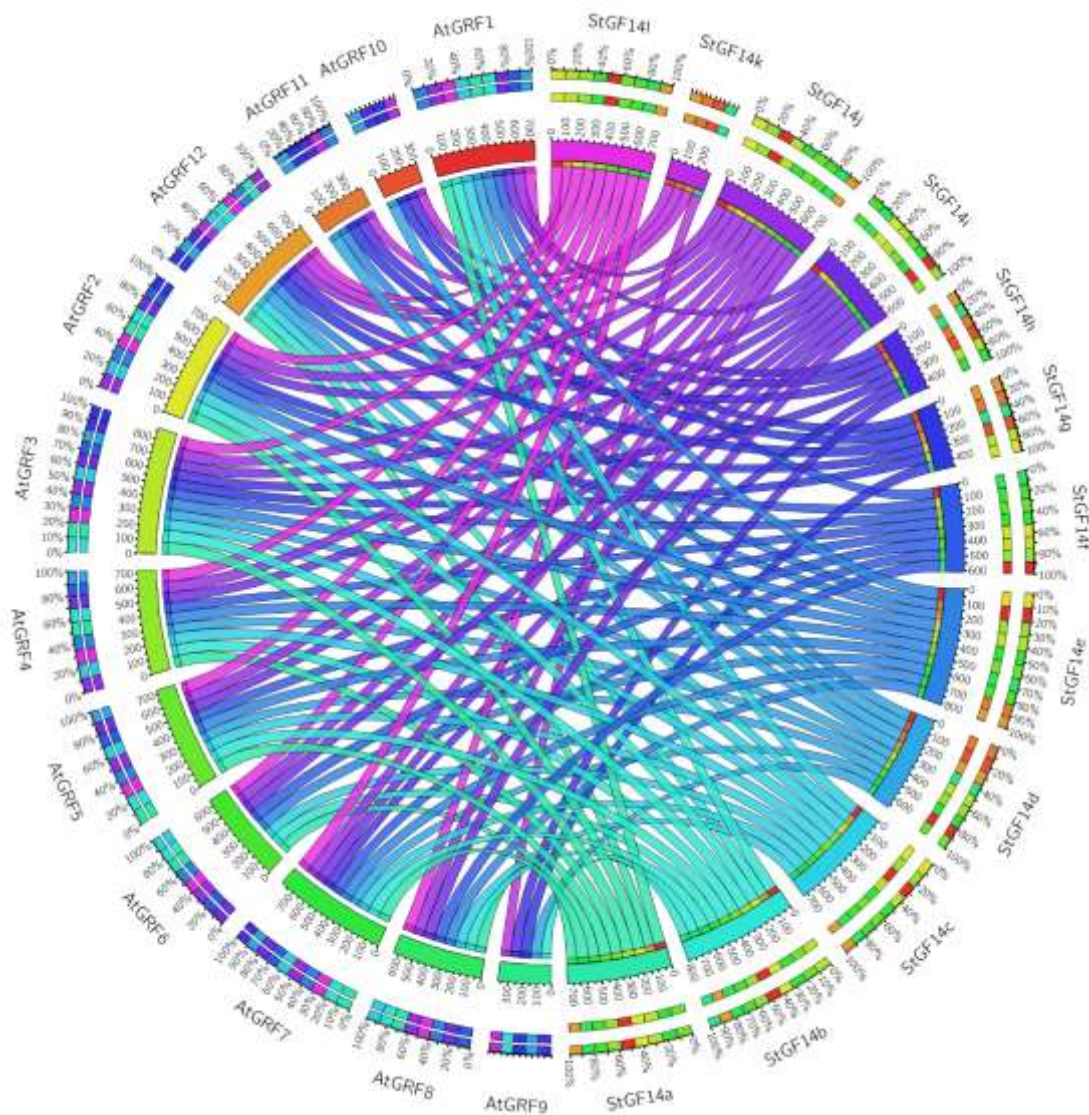
Table 2. Sequence and annotation conserved motifs in StGF14 proteins

No. شماره	Motif sequence توالی موتیف	Pfam
۱	PTHPIRLGLALNFSVFYIEILNSPDRACNLAKQAFDEAIAELDTLGEESY	Pfam:PF00244
۲	LTVEERNLLSVAYKNVIGARRASWRIISSIEQKEESRGNEEHVKSKEYR	Pfam:PF00244
۳	LSKICNGILKLLDLSHLIPSASTGESKVFYLMKMGDYRRLAELFKTGAERK	Pfam:PF00244
۴	KDSTLIMQLLRDNLTLWTSDM	-
۵	REENVYMAKLAEQAERYEEMVEFMEKVA	-
۶	EAAENTLKAYKAAQDIANAEL	-
۷	QDDGADEIKEASKP	-
۸	SKIESE	-
۹	SGEGQQ	-
۱۰	PEDGEEAQKGDAAANKVG	-

ژن‌های ارتولوگ و پارالوگ در StGF14: در این مطالعه آنالیز جامعی برای شناسایی ارتولوگ‌ها بین آراییدوپسیس و سیب‌زمینی انجام شد. براساس بر نتایج بدست آمده، دو ژن در سیب‌زمینی با ۴ ژن آراییدوپسیس ارتولوگ بودند. همچنین ۱۶ ژن پارالوگ در سیب‌زمینی بیش از ۸۵ درصد تشابه داشتند. ارتولوگ بین سیب‌زمینی و آراییدوپسیس اشاره به دوبرابردگی کل ژنوم است که نقش مهمی در گسترش ژن‌های ۱۴-۳-۳ دارد. این نتایج نشان می‌دهد که دوبرابردگی ممکن است نقش مهمی در گستره ژنوم داشته است (Ghorbani et al. 2020) (شکل ۴ و ۵).

آنالیز بیان ژن‌های StGF14i و StGF14h: الگوی بیان StGF14i و StGF14h مخصوص بافت.

برای آنالیز بیشتر ویژگی‌ها و عملکرد ژن‌های StGF14، بیان دو ژن StGF14i و StGF14h بررسی شد. الگوی بیان این دو ژن در چهار بافت ریشه، ساقه، برگ و غده با استفاده از qPCR بررسی شد. همه پرایمرها در جدول ۳ فهرست شد. همانطور که در شکل ۶ نشان داده شده است، الگوی بیان این دو ژن متفاوت است. الگوی بیان در بافت غده و برگ تقریباً مشابه است در حالی که بیان StGF14i در ساقه و ریشه بیشتر از StGF14h است. ژن StGF14i، بالاترین بیان را در بافت ساقه در بین چهار بافت به خود اختصاص داد، در حالی که پایین‌ترین بیان در غده و برگ مشاهده شد.

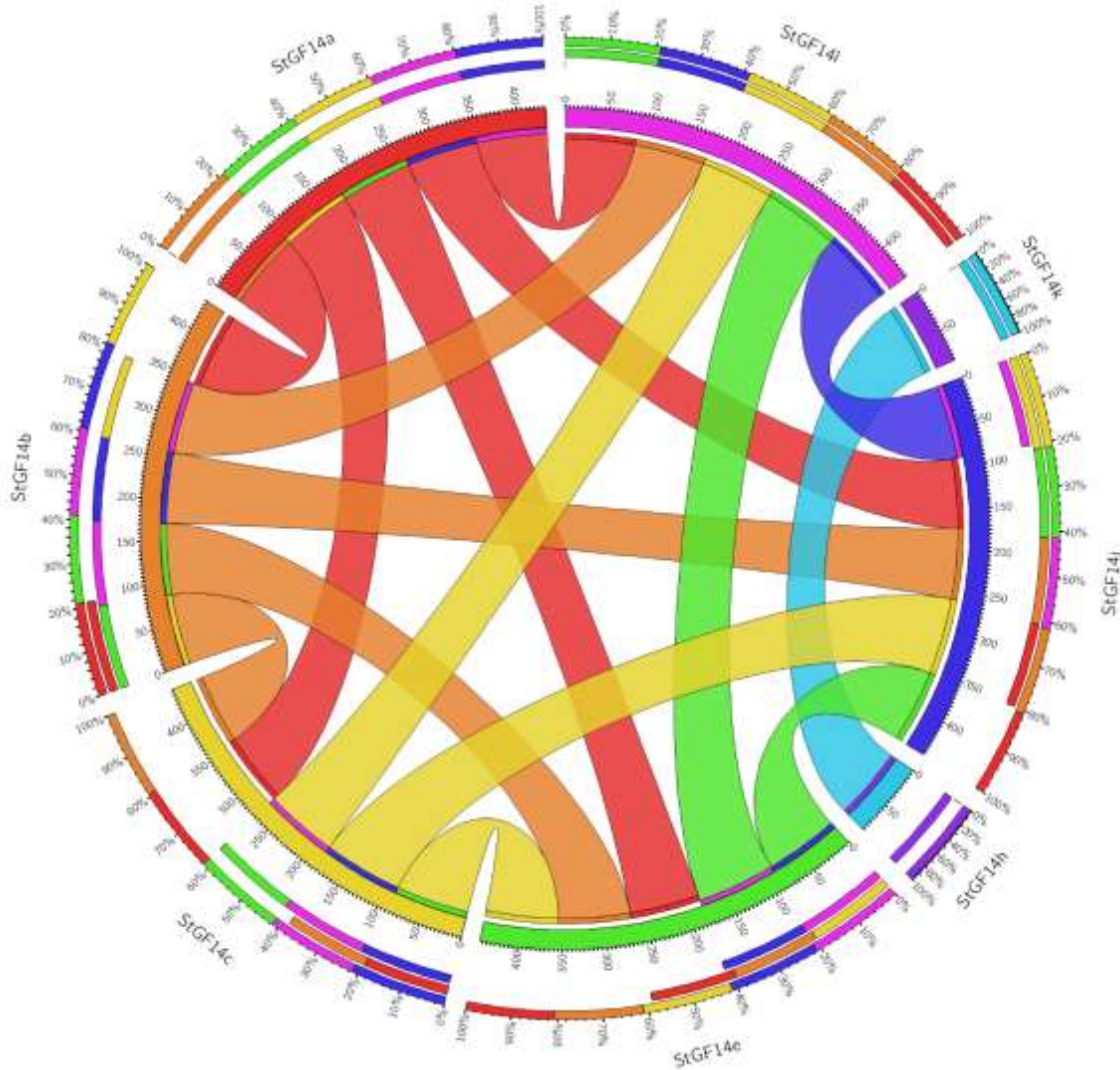


شکل ۴- روابط ژن های ارتولوگ StGF14 با ژنوم سیب زمینی و آراییدوپسیس ترسیم شده با نرم افزار Circos

Figure 4. The relationship orthologous *StGF14* genes with potato and *Arabidopsis* drawn with Circos software

اما ژن *StGF14h* بیان بالاتری را در غده سیب زمینی دارد. در حالی که بیان پایین تری را در ریشه، ساقه و برگ سیب زمینی داشته است. مطالعه ای که بر روی سیب انجام شد نشان داد که *MdGF14a*، *MdGF14d*، *MdGF14i* و *MdGF14j* ارتباط مستقیمی با ژن زمان گلدهی داشته و این ژن ها در گلدهی دخالت دارند (Zuo et al. 2021). براساس گزارشات انجام شده ژن های ۱۴-۳ در بافت های مختلف بیان دارند. ژن *PvGRFr* ممکن است در نمو گل بیان داشته باشد (Wu et al. 2016). در موز تعداد بیشتری از *MaGRFs* در طی رسیدگی میوه بیان می شوند (Li et al. 2012). بیان بالاتری ژن های *GmGF14* در بافت

رویشی نسبت به بافت زایشی وجود دارد که نشان‌دهنده آن است که ژن‌های ۳-۳-۱۴ ممکن است در مورفوژنز به صورت مستقیم یا غیرمستقیم مشارکت داشته باشند.



شکل ۵. روابط ژن‌های پارالوگ StGF14 ترسیم شده با نرم‌افزار Circos.

Figure 5. The relationship paralogous *StGF14* genes drawn with Circos software.

الگوی بیان *StGF14i* و *StGF14h* تحت تنش خشکی: برای دستیابی به درک بهتری از بیان ژن‌های *StGF14i* و *StGF14h* تحت تاثیر تنش خشکی، دو ژن انتخاب شد که یکی از آنها (*StGF14i*) از گروه غیر از ϵ و دیگری (*StGF14h*) از گروه ϵ بوده است که بررسی بیان تحت تنش خشکی ۸ هفته بعد از رشد انجام شد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که بیان در غده تحت تنش بالاترین بیان را داشته این در حالی است که میزان بیان این دو ژن تحت شرایط نرمال کم بوده است.

همچنین همانطور که در شکل ۶ مشاهده شده است ژن *StGF14i* بیان بالاتری نسبت به *StGF14h* دارد. براساس مطالعه‌های دیگری که بر روی بافت زایشی در سیب و پنبه انجام شد. مشاهده گردید که بیان ژن‌های ۳-۳-۱۴ در بافت زایشی بیشتر بوده است. در گیاه صنوبر بیان ژن *PtGRF12b* در ساقه افزایش داشته است (Tian et al. 2015). مطالعه دیگری که بر روی خیار انجام شد بیان ژن‌های *CsGF14* در بافت میوه بسیار بیشتر از سایر بافت‌ها بوده است (Xu et al. 2021). نتایج دیگر این مطالعه نشان داد که بیشتر ژن‌ها در سرما و خشکی افزایش بیان داشتند (Xu et al. 2021). همچنین در مطالعه دیگری که بر روی پنبه انجام شد بیان بیشتر *GhGRFs* در اندام‌های گل بیشتر از سایر بافت‌ها بوده است (Sang et al. 2021).

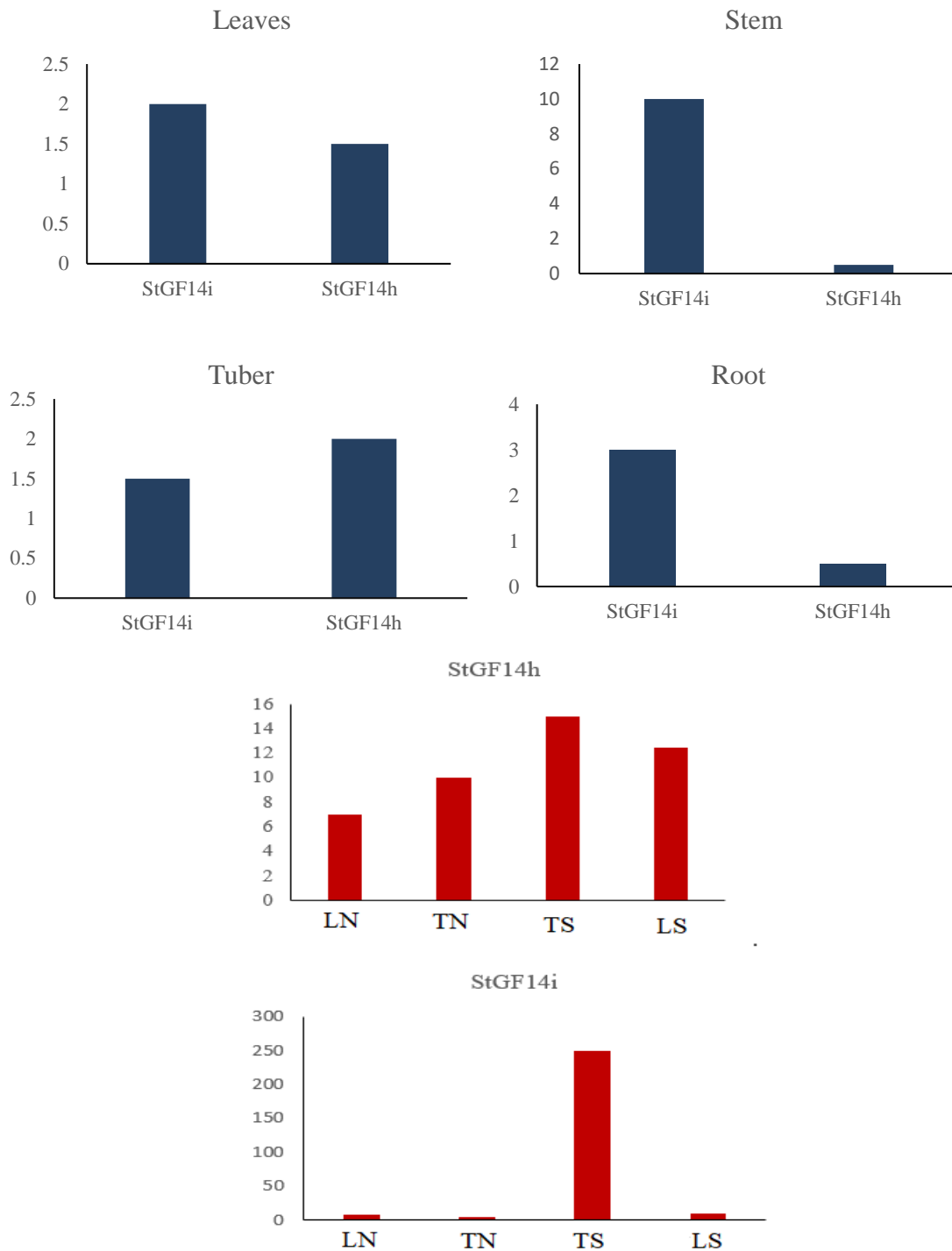
جدول ۳. توالی پرایمرهای استفاده شده برای qRT-PCR در این مطالعه

Table 3. Primer Sequences used for qRT-PCR in this Study

شماره	نام ژن	توالی پرایمر
No.	Name gene	Sequence primer
1	F:EF1 α	AGATGGTCAGACCCCGTGAAC
	R:EF1 α	CCTTGGAGTACTTCGGGGTG
2	F: StGF14i	F: ACCCCTTCTGGGCCGGTTATG
	R: StGF14i	R: CTCCTGGAGGAGCGGTATCA
3	F: StGF14h	F: TCCCTTTCACAGAAGATGCC
	r: StGF14h	R: ACCATTAGGCCCATTCACTGC

آنالیز TFBS در ناحیه پرموتری ژن‌های StGF14: جایگاه اتصال فاکتور رونویسی (TFBS)، ناحیه اتصال

DNA در پرموتر است که ناحیه شروع رونویسی از ژن‌های هدف هستند. برای شناسایی TFBS در ناحیه پرموتری که ۱۵۰۰ جفت باز توالی بالادست از هر ژن هستند از پایگاه داده PlantPAN دریافت شدند. همانطور که در جدول ۴ نشان داده شده است، ۳۴ تا TFBS احتمالی در ناحیه پرموتری شناسایی شد. این TFBS‌ها دارای پتانسیل تنظیم بیان ژن در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی و پاسخ به نور و بافت خاص و پاسخ به فیتوهورمون‌ها هستند. تعداد این عناصر در هر ژن متفاوت است. در میان این عناصر موجود در ناحیه پرموتری، عناصر MYB، WRKY و bZIP بیشترین تعداد را به ترتیب ۲۱۰۸، ۹۱۹ و ۷۵۷ به خود اختصاص دادند. علاوه بر این سه نوع مختلف در پاسخ به نور مانند bHLH، Dof و GATA مشاهده شد. همچنین ۵ نوع عناصر در پاسخ به هورمون شناسایی شدند که اعم از AP2 در پاسخ به اتیلن، ARF در پاسخ به اکسین، EIN3 در پاسخ به اتیلن و جاسمونیک اسید، VOZ در پاسخ به ژبیرلین، و BES1 در پاسخ به استرینگولاکتون و براسینواستروئید درگیر هستند.



شکل ۶. الگوی بیان دو ژن (StGF14h و StGF14i) در برگ و غده سیب‌زمینی تحت تنش نرمال و خشکی. همچنین بیان این دو ژن در ۴ بافت (برگ، ریشه، ساقه، غده) در سیب‌زمینی

Figure 6. The pattern of two genes (StGF14i and StGF14h) in potato leaves and tuber under control and drought. Also, the gene expression of two gene in four tissues (leaves, root, stem, and tuber) in potato

اما، MYB برای تنش محیطی، WRKY برای خشکی، HSF برای سرما و تنش گرمایی و C2H2 به تنش زیستی و غیر زیستی پاسخگو هستند. همچنین عناصر مربوط به بیان در بافت‌های خاص به AT-Hook در بافت آوندی، LOB برای ریشه، MADS برای بافت گل، WOX برای بیان در زمان و بافت خاص و TCR برای بافت زایشی و رویشی دخیل هستند. همچنین عناصر مربوط به رونویسی و بیان مانند NF-YB برای توسعه جنین، Storekeeper برای تنظیم پاتاتین و WRC برای اتصال به DNA و SOX برای تقسیم سلولی در طول رشد دخالت دارند (Saidi and Hajibarat, 2021a; Saidi et al. 2021b). عناصر مربوط به تنش‌ها به صورت قابل توجهی در بیشتر پروموتور ژن‌های ۱۴-۳-۳ حضور دارند. در حالی که عناصر مربوط به رونویسی کمترین تعداد را نسبت به دیگر عناصر به خود اختصاص می‌دهد. این نتایج نشان می‌دهد که بیشتر این ژن‌ها در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیر زیستی فعالیت دارند. در بین ژن‌های مختلف دو ژن *StGF14i* و *StGF14j* بالاترین و پایین‌ترین تعداد TFBS را در ناحیه پروموتوری داشتند. مطالعه ژن‌های ۱۴-۳-۳ بر روی سیب و پنبه نیز نشان داد که عناصر مربوط به تنش‌ها و مراحل رشد و نموای بیشترین تعداد را داشتند که این نتایج می‌تواند نشان دهد که ژن‌های ۱۴-۳-۳ دخیل در فرآیندهای چندگانه هستند (جدول ۴).

نتیجه‌گیری: در سال‌های اخیر بررسی جامع‌تری بر روی خانواده ۱۴-۳-۳ انجام شده که نشان‌دهنده عملکرد و ساختار متنوعی از اعضای این خانواده است. پروتئین‌های ۱۴-۳-۳ فرآیندهای بیولوژیکی گسترده‌ای در گیاهان را تنظیم نموده و برخی از اعضای آن نقش مهمی در مرحله رشد رویشی و زایشی دارند. همچنین این اعضا تحت تنش‌های غیرزیستی افزایش بیان نشان می‌دهند. براساس نتایج بدست‌آمده دوبرابردگی ژن ممکن است که نقش مهمی در گسترش ژنوم سیب‌زمینی داشته باشد. علاوه براین، تکامل ژنوم سیب‌زمینی با استفاده از شناسایی پارالوگ و ارتولوگ بررسی قرار گرفت. نتایج ما نشان می‌دهد که جفت ارتولوگ بین آرابیدوپ سیس و سیب‌زمینی زیادی وجود دارد. آنالیز سینتیک نشان می‌دهد که محافظت عملکردی و ساختاری از ژن‌ها زمینه ساز منشا نوسازی تکاملی را در ژنوم فراهم می‌کند. براساس آنالیز بیان ژنی در سیب‌زمینی، ژن *StGF14i* در تحمل به خشکی نقش دارد لذا این ژن به عنوان فاکتور مهم در پاسخ به خشکی در سیب‌زمینی به اصلاحگران و محققان پیشنهاد می‌شود. امید است که نتایج مطالعه حاضر در تعیین ژنوتیپ متحمل به خشکی مورد استفاده قرار گیرد.

سپاسگزاری: از موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه و بذر کرج، بخش سبزی، صیفی و حبوبات آبی برای فراهم نمودن مواد گیاهی مورد نیاز این پژوهش سپاسگزاری می‌شود.

جدول ۴. خلاصه‌ای از TFBS در پروتئین‌های StGF14 در سیب‌زمینی

Table 3. The summary of TFBS in StGF14 proteins in potato

موتیف/ فاکتور رونویسی Motif/transcription factor (TF)	Type of TFBS	StGF14 a	StGF14 b	StGF14 c	StGF14 d	StGF14 e	StGF14 f	StGF14 g	StGF14 h	StGF14 i	StGF14 j	StGF14 k	StGF14 l
مربوط بافت خاص	AT-Hook	30	25	17	27	20	18	27	28	30	12	21	25
	MADS box	15	13	10	9	10	11	18	16	15	16	16	14
related to tissue-specific	MADF	10	9	8	7	4	9	11	11	15	7	12	7
	SBP	26	17	4	33	5	32	16	35	24	3	28	32
	LOB	1	2	2	0	0	1	0	0	2	1	2	0
	WOX	7	8	3	5	6	8	8	8	7	2	5	8
	TCR	13	12	4	13	10	6	10	13	10	4	13	12
	HD-ZIP	64	67	5	60	43	63	65	55	49	37	63	63
مربوط پاسخ هورمونی related to hormonal response	AP2	49	41	34	93	64	40	37	78	35	20	106	29
	BES1	11	9	11	0	0	11	0	1	9	0	11	1
	ARF	3	4	1	6	1	2	1	6	2	1	6	6
	EIN3	4	7	3	4	1	3	2	5	3	4	5	5
	VOZ	6	4	5	4	5	4	2	6	8	4	11	5
مربوط به نور related to light	Dof	54	55	51	55	40	57	56	55	54	40	55	57
	GATA	33	26	26	28	27	29	27	29	27	28	27	26
	bHLH	61	60	59	22	7	57	14	22	63	7	63	14
مربوط به رونویسی related to translation	NF-YB	3	3	3	2	1	2	3	3	3	3	3	2
	Storekeeper	2	1	1	1	1	3	1	1	2	1	1	2
	WRC	2	2	0	1	0	2	2	2	2	0	2	1
	Sox	5	7	2	3	6	4	4	3	5	3	5	5
برای اتصال related to binding	FAR1	2	0	0	0	4	2	2	0	4	2	1	4
	SRS	4	2	2	2	1	2	2	2	1	1	3	1
	NAC	53	87	24	81	28	35	46	62	116	39	61	101
	Homeodomain	63	65	7	61	42	61	65	60	53	35	63	62
	bZIP	88	70	66	62	24	63	71	61	86	29	90	47
	Trihelix B3	18	17	13	12	11	16	16	18	23	11	18	14
	ZF-HD	32	30	10	30	17	24	26	30	30	15	32	26
	TCP	11	12	10	12	11	11	12	1	11	8	5	12
مربوط به استرس related to stress	C2H2	3	3	4	5	0	6	12	7	17	0	7	5
	C2H2	44	45	25	39	16	41	41	45	40	18	37	40
	MYB	236	223	110	179	59	189	212	219	225	100	175	181
	HSF	5	5	2	4	16	3	3	20	4	4	4	9
	WRKY	105	100	94	90	18	95	51	98	105	1	95	67
CSD	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	

References

- Bridges D, Moorhead GB (2005) 14-3-3 proteins: a number of functions for a numbered protein. *Sci STKE* 296, 1-10.
- Chen F, Li Q, Sun L, He Z (2006) The rice 14-3-3 gene family and its involvement in responses to biotic and abiotic stress. *DNA Res* 13, 53-63.
- Chevalier D, Morris ER, Walker JC (2009) 14-3-3 and FHA domains mediate phosphoprotein interactions. *Annu Rev Plant Biol* 60, 67-91.
- DeLille JM, Sehnke PC, Ferl RJ (2001) The *Arabidopsis* 14-3-3 family of signaling regulators. *Plant Physiol* 126, 35-38
- Ferl RJ, Manak M S, Reyes MF (2002) The 14-3-3s. *Genome Biol* 3, 1-7.

- Foti S, Mauromicale G, Ierna A (1995) Influence of irrigation regimes on growth and yield of potato cv. Spunta. *Potato Res* 38, 307-317.
- Ghorbani R, Zakipour Z, Alemzadeh A, Razi H (2020) Genome-wide analysis of AP2/ERF transcription factors family in *Brassica napus*. *Physiol Mol Biol Plants* 26, 1463-1476.
- Hajibarat Z, Saidi A, Mosuapour GA, Ghaffari MR, Zienalabedini M. Evaluation of Drought Tolerance of Potato (*Solanum Tuberosum* L.) Under Water Deficit. *J Crop Breed* 102-112.
- Hasanpanah D, Nikshad k, Hasani M, Aghazadeh B (2003) Potato in Ardabil Province, Ardabil Agriculture Jihad Organization. 64 PP.
- Khurana SP, Minhas JS, Pandey SK (2003) The Potato: production and utilization in sub-tropics.
- Li MY, Ren LC, Xu BY, et al. (2016) Genome-wide identification, phylogeny, and expression analyses of the 14-3-3 family reveal their involvement in the development, ripening, and abiotic stress response in banana. *Front Plant Sci.* 7, e1442.
- Li MY, Xu BY, Liu JH, et al. (2012) Identification and expression analysis of four 14-3-3 genes during fruit ripening in banana (*Musa acuminata* L. AAA group, cv. Brazilian). *Plant Cell Rep* 31, 369-378
- MacKintosh C, Meek SEM (2001) Regulation of plant NR activity by reversible phosphorylation, 14-3-3 proteins and proteolysis. *Cell Mol Life Sci* 58, 205-214.
- Mane SP, Robinet CV, Ulanov A, et al. (2008) Molecular and physiological adaptation to prolonged drought stress in the leaves of two Andean potato genotypes. *Funct Plant Biol* 35, 669-688.
- Roberts MR (2003) 14-3-3 proteins find new partners in plant cell signalling. *Trends Plant Sci* 8, 218-23.
- Saidi A, Hajibarat Z. (2021a) Phytohormones: plant switchers in developmental and growth stages in potato. *J Genet Eng Biotechnol* 19, 1-17.
- Saidi A, Hajibarat Z, Hajibarat Z (2021b) Phylogeny, gene structure and GATA genes expression in different tissues of *Solanaceae* species. *Biocatal Agric Biotechnol* 35, e102015.
- Sang N, Liu H, Ma B, et al. (2021) Roles of the 14-3-3 gene family in cotton flowering. *BMC Plant Biol* 21, 1-7.
- Sehnke PC, Chung HJ, Wu K, Ferl RJ (2001) Regulation of starch accumulation by granule-associated plant 14-3-3 proteins. *PNAS* 98,765-770.
- Tian F, Wang T, Xie Y, et al. (2015) Genome-wide identification, classification, and expression analysis of 14-3-3 gene family in *Populus*. *PLoS one* 10, e0123225.
- United Nations (2004) World population to 2300. New York, NY, USA: Dept of Economic and Social Affairs, 4-9.

- Visconti S, D'Ambrosio C, Fiorillo A, et al. (2019) Overexpression of 14-3-3 proteins enhances cold tolerance and increases levels of stress-responsive proteins of *Arabidopsis* plants. *Plant Sci* 289, e110215.
- Wang Y, Ling L, Jiang Z, et al. (2019) Genome-wide identification and expression analysis of the 14-3-3 gene family in soybean (*Glycine max*). *Peer J* 7, e7950.
- Wu S, Yan HD, Zhang AL, et al. (2016) Identification and characterization of the 14-3-3 gene family in switchgrass. *Genet Mol Res* 15, GMR15048688.
- Zuo X, Wang S, Xiang W, et al. (2021) Genome-wide identification of the 14-3-3 gene family and its participation in floral transition by interacting with TFL1/FT in apple. *BMC Genomics* 22, 1-7.

