

The investigation of gene expression of Myosin genes under drought stress in potato different tissues

Z. Hajibarat, A. Saidi*

Department of Plant Sciences and Biotechnology, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

Received 27 February 2022; Accepted 17 May 2022

Extended abstract

Introduction

Potato (*Solanum tuberosum* L.) is an economic crop that is grown and consumed worldwide. Potato is considered as the fourth important crop for human consumption after maize, wheat, and rice. Potato contain more carbohydrates, proteins, minerals, and vitamins per unit area than cereals. However, this crops exposed environmental stresses during growth and developmental stages particularly, drought stress. Potato is sensitive to drought condition because of narrow root system. As a result, it is necessary the investigation of molecular mechanism involved in drought stress in potato. Drought stress affected on the integrity and structure maintain of biological membrane. The actin-based myosin is necessary for the growth and organization of the endomembrane system. Given that myosin genes allow to move intercellular and intracellular providing the possibility of repair of damaged membrane areas under drought stress in plants. In eukaryotic cells, organelle movement, positioning and communications are critical for maintaining cellular functions and are highly regulated by intracellular trafficking. Directional movement of motor proteins along the cytoskeleton is one of the key regulators of such trafficking. Most plants have developed a unique actin–myosin system for intracellular trafficking. Myosins participate in a different cellular processes, endocytosis, containing cell polarization, intracellular and organellar transport, transcriptional regulation, and signal transduction. Motions are as molecular motors in biological systems. These can bind to filamentous actin and produce physical forces through hydrolyzing ATP. Myosins is one of the most diverse and largest protein families in eukaryote. Class XI and VIII motor proteins are characterized as a slow and fast motor proteins. Myosin XI possess many genes in Angiosperms. Whereas, myosin-VIII contain fewer members against class XI. Further, molecular size of myosin-VIII is smaller than myosin-XI.

Materials and methods

Protein file of *A.thaliana* was downloaded and matrix file of hidden Markov Model (HMM) of myosin gene family was used. Here, phylogenetic analysis, gene structure, and gene expression were surveyed. Gene expression of two genes (StMyoXI-F and StMyoXI-B) was performed in different tissues (root, stem, leaves, and tuber). For analysis of expression in different tissues (leaves, stem, and root), sampling was performed 2 weeks after mother tuber growth. However, tubers were sampled 6 weeks after cultivated in Karaj. To evaluate expression under drought stress, after 6 weeks of growth, the water stress was induced by irrigation suppression in 2 weeks while, daily irrigation was maintained for control plants. Leaves and tuber sampling were performed under two conditions.

* Corresponding author: Abbas Saidi; E-Mail: abbas.saidi@gmail.com



Results and discussion

The seven StMyo genes were unevenly distributed in the two subgroups. The seven StMyo genes were unevenly distributed in the two subgroups. Class XI was the largest subfamily, which class VIII had the lowest subfamily. Drought treatment significantly increased expression of StMyoXI-B and StMyoXI-F genes by 80 and 8 fold compared to the control treatment, respectively. Under control conditions, StMyoXI-B and StMyoXI-F enhanced expression in root by 25 and 20 fold while, it showed low expression in leaves under control conditions. Under control conditions, StMyoXI-F gene showed the 3 and 4 fold change higher mean relative expression than the reference gene. The relative expression of StMyoXI-B gene has been increased 5 and 10 fold change in leaves and stem under non-stress conditions as compared to the reference gene. Among myosin genes, the number of exons varied from 1 to 39. Most of class-VIII proteins had fewer introns whereas, class-XI proteins possess more proteins than class VIII. This results indicated that occurred splicing process in the myosin genes.

Conclusion

Based on the obtained results, it is considered that these genes highly do not influenced in stem development. However, it had significantly affected in root, leaves, and tuber development. It seems this gene can be potentially a good candidate for drought tolerance breeding programs in potato.

Keywords: Actin, Bioinformatics, Cytoskeleton, Phylogeny, Tuber

<https://dx.doi.org/10.22077/ESCS.2023.5171.2114>

مقاله پژوهشی

بررسی بیان ژن‌های مایوزین تحت تنش خشکی در برگ و غده سیب‌زمینی

زهرا حاجی‌برات، عباس سعیدی*

گروه علوم و زیست‌فناوری گیاهی، دانشکده علوم زیستی و بیوتکنولوژی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران

مشخصات مقاله	چکیده
واژه‌های کلیدی: اسکلت سیتوپلاسمی اکتین بیوانفورماتیک غده فیلولژی	سیب‌زمینی یکی از اقتصادی‌ترین محصولات زراعی است که در مناطق مختلف جهان کشت شده و مورد مصرف بشر قرار می‌گیرد. تنش خشکی حفظ ساختار و یکپارچگی غشاهای بیولوژیک را تحت تأثیر قرار می‌دهد. در سلول‌های گیاهی، جایجایی اندامک‌ها، موقعیت و ارتباطات برای حفظ عملکرد سلولی حیاتی است و توسط نقل و انتقالات داخل سلولی تنظیم می‌شوند. حرکت جهت‌دار پروتئین‌های حرکتی در امتداد اسکلت سلولی یکی از تنظیم‌کننده‌های کلیدی نقل و انتقالات در درون سلول است. مایوزین‌ها دسته‌ای از پروتئین‌ها هستند که از توانایی جایجایی درون و بین سلولی برخوردارند و امکان ترمیم نواحی غشایی آسیب‌دیده تحت تنش خشکی را در گیاهان امکان‌پذیر می‌کنند. اکثر گیاهان یک سیستم اکتین مایوزین منحصربه‌فرد را برای انتقال درون سلولی ایجاد کرده‌اند؛ اما مطالعات کمی بر روی خانواده ژنی مایوزین در گیاهان مخصوصاً در سیب‌زمینی انجام شده است. در این مطالعه با استفاده از برنامه‌های بیوانفورماتیک، ژن‌های مایوزین در گیاه سیب‌زمینی شناسایی شد. علاوه بر این آنالیز فیلولژی، ساختار ژنی و بررسی بیان ژن مایوزین انجام شد. در این راستا، الگوی بیان دو ژن مایوزین (StMyoXI-B و StMyoXI-F) در اندام‌های مختلف (ریشه، ساقه، برگ و غده) با روش Real-time PCR بررسی شد. بیان ژن StMyoXI-F در برگ و غده تحت تنش خشکی به ترتیب افزایش معنی‌دار ۶ و ۸ برابری را نسبت به شرایط کنترل نشان داد. ژن StMyoXI-F تحت شرایط کنترل در برگ و ساقه به میزان ۴ و ۳ برابر افزایش میانگین بیان نسبی نسبت به ژن مرجع نشان داد. بیان نسبی ژن StMyoXI-B در برگ و ساقه تحت شرایط بدون تنش حدود ۵ و ۱۰ برابر افزایش نسبت به ژن مرجع نشان داد. بر اساس نتایج به‌دست آمده به نظر می‌رسد که این دو ژن احتمالاً در توسعه ساقه تأثیر زیادی نداشته ولی در توسعه ریشه، برگ و غده تأثیر زیادی داشته‌اند. بدین منظور این دو ژن مایوزین می‌توانند کاندیدای مناسبی برای اصلاح و دست‌ورزی گیاهان در افزایش عملکرد سیب‌زمینی تحت تنش خشکی باشند.
تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۲/۰۸	
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۲/۲۷	
تاریخ انتشار: زمستان ۱۴۰۲	
۹۲۹-۹۱۹: ۱۶(۴)	

مقدمه

به کاهش عملکرد و کیفیت غده می‌شود (Foti et al. 1995, Saidi and Hajibarat, 2020). واریته‌های موجود سیب-زمینی به استرس خشکی حساس می‌باشند و بنابراین اصلاح برای تحمل به خشکی ضروری تلقی می‌شود. تنش خشکی در سیب‌زمینی باعث کاهش عملکرد شده و می‌تواند به کیفیت محصول آسیب برساند (Mane et al., 2008). با توجه به تغییرات اقلیمی جهانی، انتخاب ارقام با تحمل به خشکی و پتانسیل عملکرد بالا از اهمیت حیاتی برخوردار است. این مسئله در ایران به‌طور جدی مورد توجه محققان قرار

سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum* L.) یکی از مهم‌ترین محصولات در جهان است و بیشترین سهم را در میزان تولید محصولات غذایی بعد از ذرت، برنج و گندم را به خود اختصاص داده است. سیب‌زمینی مواد مورد نیاز انسان اعم از کربوهیدرات، املاح معدنی، اسیدهای آلی، آنزیم، ویتامین، پتاسیم و غیره را تأمین می‌کند (Camire et al., 2009). سیب‌زمینی با دارا بودن سیستم ریشه‌ای کم‌عمق، حساس به استرس‌های غیرزیستی از جمله خشکی است. تنش خشکی، تنش رایج در مناطق تولیدکننده سیب‌زمینی بوده که منجر

مایوزین‌های گیاهی به‌طور معمول به سه دسته: مایوزین-های کلاس XIII جلبکی و دو دسته مایوزین‌های گیاهی گل‌دار، VIII و XI تقسیم می‌شوند. با توالی‌یابی کامل ژنوم جلبک‌های سبز، خزها، دولپه‌ای و تک‌لپه‌ای‌ها بینش عمیق‌تر در مورد تکامل و طبقه‌بندی مایوزین‌ها امکان‌پذیر شد (Avisar et al., 2008). مشخص شده است که گیاهان گل‌دار به‌طور کلی دارای خانواده‌های بزرگی از ژن‌های مایوزین هستند. برای مثال آرآبیدوپسیس دارای ۱۳ موتورهای پروتئینی مایوزین XI درحالی‌که خزها تنها دو موتور پروتئینی مایوزین دارد (Vidal et al., 2010). مایوزین‌های XI سریع‌ترین موتورهای پردازشی شناخته‌شده هستند (Shimmen and Yokota, 2004). با استفاده از مهارکننده‌های دارویی مشخص شد که جابجایی اندامک‌ها عمدتاً به کمک سیستم حرکتی اکتومیوزین انجام می‌شود (Lee and Liu, 2004); اما اهمیت بیولوژیکی جابجایی اندامک و سایر فرآیندهای وابسته به مایوزین در گیاهان به‌خوبی شناخته نشده است. پیشرفت اخیر در تحقیقات مایوزین‌های گیاهی با استفاده از تکنیک تداخل RNA و رویکردهای مهارکنندگی منفی غالب (Avisar et al., 2008; Sparkes et al., 2009; Natesan et al., 2009; Sattarzadeh et al., 2009) و همچنین فناوری حذف ژنی مشاهده شده است (Ojangu et al., 2007; Peremyslov et al., 2008, 2010; Prokhnevsky et al., 2008; Ueda et al., 2010). با حذف ژن مایوزین فنوتیپ قابل‌مشاهده‌ای در آرآبیدوپسیس تحت شرایط بهینه رشدی مشاهده نشد (Peremyslov et al., 2008); اما آنالیز دقیق‌تر از گیاهان موتانت آرآبیدوپسیس نشان داد که تنها دو ژن غیرفعال شده XI-K و MYA2 از ۱۳ ژن موتانت کلاس XI ریشه موین کوتاه‌تری تحت شرایط نرمال داشتند (Peremyslov et al., 2008). بر اساس نتایج مطالعه پرمیسلو و همکاران (Peremyslov et al., 2008)، این دو ژن در انتقال توده‌های گلزی، پرواکسی‌زوم و میتوکندری دخالت دارند. بر اساس نتایج مطالعه انجام‌گرفته بر روی آرآبیدوپسیس مشخص شد که غیرفعال‌سازی هم‌زمان دو ژن XI-1 و XI-B کاهش ارتفاع بوته را به همراه داشته است (Prokhnevsky et al., 2008). در مطالعه دیگری که بر روی آرآبیدوپسیس انجام شد مشاهده شد که حذف سه‌گانه و چهارگانه در XI-K، XI-1، XI-2 و XI-I که بیان بالا و نقش مهمی در گسترش سلول و برای رشد و نمو گیاهان دارند. نتایج این مطالعه نشان داد که

گرفته است به دلیل آنکه جزء منطقه خشک و نیمه‌خشک است. بدین‌صورت لازم است مکانیسم‌های مولکولی مقاومت گیاه تحت تنش خشکی با استفاده از ژن‌های مقاوم/متحمل به خشکی در سیب‌زمینی شناسایی گردد. در این صورت ایجاد سیب‌زمینی متحمل به خشکی تسهیل خواهد شد (Hasanpanah et al., 2003).

یکی از بارزترین ویژگی بیولوژی سلول گیاهی پویایی گسترده داخل سلول است. این پویایی شامل جابجایی اندامک‌های مختلف است که از جمله شبکه آندوپلاسمی، میتوکندری، پرواکسی‌زوم، توده‌های گلزی و وزیکول‌های غشایی که مجموعاً جریان سیتوپلاسمی نامیده می‌شوند (Shimmen and Yokota, 2004). با استفاده از مهارکننده‌های دارویی مشخص شد که جابجایی اندامک‌ها عمدتاً به کمک سیستم حرکتی اکتومیوزین انجام می‌شود (Sparkes, 2010). مایوزین‌ها به‌عنوان موتور مولکولی هستند که با اکتین متصل می‌شوند و نقش مهمی در فعالیت‌های فیزیولوژیکی از قبیل تقسیم سلولی، حرکت و مورفولوژی دارند. این موتورهای مولکولی می‌توانند آدنوزین تری‌فسفات (ATP) را از فرم انرژی شیمیایی به انرژی فیزیکی تبدیل کنند (Haraguchi et al., 2022) آن‌ها می‌توانند محموله‌های مختلف درون سلولی از جمله اندامک‌های غشایی، کمپلکس‌های پروتئینی و mRNA را انتقال دهند (Syamaladevi et al., 2012; Titus, 2018). مایوزین‌ها معمولاً دارای سه بخش اساسی هستند: قسمت سر دمین که در انتهای N-قرارگرفته و با اکتین متصل شده و ATP را هیدرولیز می‌کند؛ ناحیه تنظیم‌کننده «گردن» که دربرگیرنده موتیف‌های isoleucine-glutamine (IQ) است و به زنجیره‌های سبک مثل کالمودالین متصل می‌شود؛ در قسمت انتهای C-، «دم» دمین قرار گرفته که در اتصالات به محموله‌ها مثل پروتئین‌ها و لیپیدها نقش دارد (Sparkes, 2010). بخش موتور وابسته به هیدرولیز ATP است که اولین قسمت دمین و در بالای پروتئین قرار دارد. یک بخش گردن مانند که به‌عنوان بازوی اهرمی که حرکت کوچک درون حوزه دمین موتور را به یک گام بزرگ‌تر تبدیل می‌کند. بخش سوم یک دمین دایمریزاسیون به دو یا چند موتور اجازه می‌دهد تا به‌عنوان یک واحد عمل کنند. درنهایت یک دمین اتصال محموله، موتور را با سایر اجزای سلولی که توسط موتور حرکت می‌کنند جفت می‌کند (Nebenführ and Dixit, 2018).

به‌عنوان StMyo پروتئینی در نظر گرفته شدند. توالی‌های پروتئینی با استفاده از CLUSTALW هم‌ردیف شدند و ترسیم درخت فیلوژنتیکی به کمک نرم‌افزار MEGA 6.0 انجام شد.

مکان کروموزومی ژن‌های StMyo و آنالیز ساختار ژنی

توالی پروتئینی اعضای خانواده ژنی سیب‌زمینی در مقابل ژنوم سیب‌زمینی در پایگاه NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) مورد جستجو قرار گرفتند و مکان هر ژن روی کروموزوم به‌صورت شماتیک توسط نرم‌افزار Mapchart به دست آورده شد. ساختار ژنی به‌منظور تعیین الگوی اگزون-اینترون هریک از اعضا، خانواده مایوزین از طریق بارگذاری توالی‌های cDNA و ژنومی به‌دست‌آمده در (GSDS 2.0 Gene structure display server) تعیین شد.

آنالیز بیان ژن

رشد گیاه، اعمال تنش خشکی و مطالعات مولکولی

با توجه به مطالعات انجام‌شده قبلی (Hajibarat et al., 2021)، نمونه‌های کلون سیب‌زمینی از موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر واقع در کرج تهیه شد و کشت نمونه‌ها در موسسه صورت گرفت. آبیاری گیاهان در شش هفته بعد از کشت برای مراحل تنش و نرمال به‌صورت یکسان انجام شد. غده‌ها برای هر تیمار نرمال و تنش خشکی به‌صورت سه تکرار کشت شدند. بعد از گذشت شش هفته میزان آبیاری برای نمونه‌های تحت تنش خشکی نصف میزان آبیاری نرمال لحاظ شد و کنترل میزان آب آبیاری از طریق کنتور نصب‌شده در هر بلوک تنظیم شد. میزان آب مصرفی برای تیمار نرمال ۹۰۰۰ مترمکعب و برای تنش ۴۵۰۰ در نظر گرفته شد. جهت کشت غده‌ها، پشته‌هایی به فاصله ۷۵ سانتی‌متر و غده‌ها به فاصله ۲۵ سانتی‌متری از یکدیگر کشت شدند. نمونه‌برداری از غده و برگ تحت تنش نرمال و خشکی انجام شد. این اعمال تنش به مدت دو هفته صورت گرفت. نمونه‌برداری از برگ و غده تحت تنش نرمال و خشکی بعد از هشت هفته از کشت و رشد جوانه‌ها که مقارن با دو هفته بعد از اعمال تنش انجام شد و در این مرحله ظرفیت زراعی ۵۰ درصد اندازه‌گیری شد. درحالی‌که برای بررسی بیان در اندام‌های مختلف گیاه (ریشه، ساقه، برگ) تحت شرایط نرمال دو هفته بعد از رشد غده‌ها

غیرفعال‌سازی این مایوزین‌ها باعث توقف رشد و همچنین تأخیر در گلدهی و کاهش چشمگیر در اندازه سلول در ریشه می‌شود (Peremyslov et al., 2010). درمجموع این نتایج نشان می‌دهد که مایوزین‌ها فرآیندهای مختلفی را در گیاهان تحت تأثیر قرار می‌دهند. شناخت نقش‌های عملکردی ژن‌های مایوزین در گیاهان نیاز به حذف ژن‌های متعدد این خانواده دارد. تشریح و توصیف عملکردی ژن‌های مایوزین در شرایط آزمایشگاهی به دلیل اندازه بزرگ خانواده ژنی مایوزین و وجود پارالوگ‌های مختلف تا حد زیادی با مشکل روبرو شدند (Peremyslov et al., 2011; Wang et al., 2014). بنابراین محققان به برنامه‌های بیوانفورماتیکی روی آوردند. بررسی آنالیز گستره ژنوم مایوزین برای اولین بار در آرابدوپسیس انجام شد (Peremyslov et al., 2011). شناسایی و آنالیز بیوانفورماتیکی ژن‌های مایوزین اطلاعات مفیدی را در زمینه خصوصیات عملکردی آن‌ها فراهم می‌کند که می‌توان از آن در سایر گونه‌های خانواده بهره برد. در این مطالعه، تجزیه و تحلیل دمین‌های محافظت‌شده، الگوهای ساختاری اینترون اگزون، مکان کروموزومی، بررسی بیان مایوزین در اندام‌های مختلف تحت شرایط نرمال و نیز بیان این دو ژن تحت تنش خشکی در برگ و غده سیب‌زمینی با استفاده از برنامه‌های بیوانفورماتیک انجام شد. این بررسی می‌تواند پایه تئوریک برای آنالیز عملکردی ژن‌های مایوزین را فراهم کند.

مواد و روش‌ها

شناسایی ژن‌های StMyoX14 در سیب‌زمینی

برای شناسایی توالی‌های مایوزین در سیب‌زمینی، توالی‌های پروتئین مایوزین از گیاهان مدل آرابدوپسیس و برنج از سایت (TAIR, www.arabidopsis.org) و (RAP-DB, <https://rapdb.dna.affrc.go.jp/>) گرفته شد. بعدازآن، بر اساس BLASTP توالی‌های پروتئینی آرابدوپسیس در مقابل توالی ژنوم سیب‌زمینی در NCBI قرار گرفته شد. توالی‌های مایوزینی که دارای دمین مربوطه بودند انتخاب شدند. همچنین برای تأیید توالی‌های منتسب به اعضای مایوزین در سیب‌زمینی از سایت Ensemble Plant (<http://plants.ensembl.org/index.html>) استفاده شد تا صحت توالی‌های منتخب‌شده مشخص شود. توالی‌ها مزبور به سیب‌زمینی با استفاده از Pfam و interproscan تأیید شد. از مجموعه توالی‌ها، ۷ توالی

نمونه‌برداری انجام شد. سپس نمونه‌ها در نیتروژن مایع غوطه‌ور شدند و تا زمان استخراج RNA در فریزر ۸۰- نگهداری شدند.

استخراج RNA از اندام‌های ریشه، ساقه، برگ و غده تحت شرایط نرمال انجام شد که به منظور مقایسه الگوی بیان دو ژن انتخابی در بین اندام‌ها صورت گرفت و همچنین از نمونه برگ و غده تحت شرایط نرمال و خشکی استخراج RNA با استفاده از کیت شرکت سیناکلون انجام شد. برای حذف DNA از نمونه‌های RNA از آنزیم DNaseI استفاده شد. کمیت و کیفیت RNA با استفاده از ژل ۱ درصد و نانو درآپ مورد تأیید قرار گرفت. سپس سنتز cDNA با استفاده از کیت Easy cDNA Synthesis انجام شد. برای هر نمونه سه تکرار بیولوژیکی و تکنیکی استفاده شد و ژن کنترل داخلی StEF-1 α بود. همه پرایمرها در جدول ۱ فهرست شده‌اند. توالی نوکلئوتیدی ژن‌های مورد نظر StMyoXI-F و StMyoXI-B و ژن StEF-1 α به عنوان کنترل داخلی از بانک ژن NCBI تهیه و آغازگرهای اختصاصی با استفاده از نرم‌افزار Vector NTI طراحی شدند. الگوی بیان ژن‌ها با روش Real-time PCR با استفاده از BIO-RAD Supermix مورد بررسی قرار گرفتند. میزان بیان ژن‌ها تحت شرایط تنش خشکی با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Livak) (Schmittgen, 2001) محاسبه گردید؛ اما برای بررسی بیان ژن‌ها تحت تنش نرمال در چهار اندام با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ محاسبه گردید.

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-[\Delta Ct (treatment) - \Delta Ct (Control)]} \quad [1]$$

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-[Ct (treatment) - Ct (StEF\alpha 1)] - [Ct (Control) - Ct (StEF\alpha 1)]} \quad [2]$$

$$Ct (treatment) = \text{میانگین } Ct \text{ برای ژن هدف} \quad [3]$$

$$Ct (StEF\alpha 1) = \text{میانگین } Ct \text{ برای ژن رفرنس} \quad [4]$$

$$\Delta Ct (treatment) = \text{نمونه‌های تیمار} \quad [5]$$

$$\Delta Ct (Control) = \text{نمونه‌های کنترل} \quad [6]$$

نتایج و بحث

شناسایی اعضای خانواده ژنی مایوزین

برای شناسایی اعضای خانواده ژنی مایوزین، tBlastn بر اساس توالی‌های حفاظت‌شده این خانواده در سیب‌زمینی در پایگاه اطلاعاتی Ensemble Plant و جستجو بر اساس مدل مخفی مارکوف انجام شد که منجر به شناسایی ۷ توالی شد (جدول ۲).

جدول ۱. توالی‌های پرایمر استفاده‌شده برای ریل‌تایم در این مطالعه.

Table 1. Primer sequences used for Real time in this study.

No.	Name gene	Sequence primer
شماره	نام ژن	توالی پرایمر
1	F:EF1 α R:EF1 α	AGATGGTCAGACCCGTGAAC CCTGGAGTACTTCGGGGTG
2	F: StMyoXI-F R: StMyoXI-F	CTATGTTCTGGGACGACAAA ATGCTGCTGCCTGCAGCAG
3	F: StMyoXI-B R: StMyoXI-B	ACCACCATCAACTAGACCGTTG GACGCAGCATTCCATTCTCTG

جدول ۲. مشخصات ژن‌های StMyo در سیب‌زمینی.

Table 2. Characterization of the StMyo genes in potato.

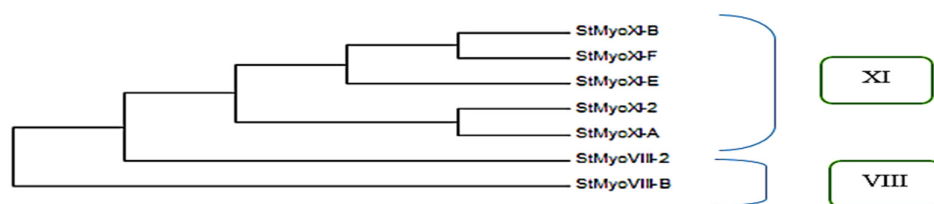
شماره	نام علمی	طول کروموزومی	شماره دسترسی
No.	Scientific name	Chromosomal length	Accession
1	PGSC0003DMG400031124	Chromosome 1:67189254-67202002	StMyoXI-F
2	PGSC0003DMG400014709	Chromosome 6:1945555-1957734	StMyoXI-2
3	PGSC0003DMG400020458	Chromosome 6:45623715-45624614	StMyoXI-A
4	PGSC0003DMG400020947	Chromosome 7:37444050-37462795	StMyoXI-B
5	PGSC0003DMG400019284	Chromosome 7:53728011-53733726	StMyoVIII-B
6	PGSC0003DMG400022027	Chromosome 9:45709284-45730781	StMyoXI-E
7	PGSC0003DMG400025028	Chromosome 10:1747821-1750926	StMyoVIII-2

نسبت به سیب‌زمینی و برنج و ذرت بیشتر بود که نشان می‌دهد در طول تکامل تعداد ژن‌های مایوزین کاهش یافته است.

تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک و آنالیز ساختار ژنی

درخت فیلوژنی بر پایه دمین حفاظت‌شده اعضای شناسایی شده از خانواده مایوزین به دست آمد و بر اساس شباهت‌های ساختاری به کاررفته برای گروه‌بندی خانواده ژنی طبقه‌بندی شدند (شکل ۱).

توالی مربوط به هر پروتئین از هر ژن بر اساس توالی‌هایی که منتسب به دمین‌های حفاظت‌شده آن است نام‌گذاری می‌شود. این بدین معنی است که هر پروتئین مبتنی بر دمین حفاظت‌شده مربوطه به عنوان اعضای مایوزین نام‌گذاری شدند. ۱۴ مایوزین در ژنوم برنج و ذرت، ۱۷ عدد در آرابیدوپسیس و ۲۹ عدد در سویا مشاهده شد که تقریباً با سطح پلوئیدی هر گیاه سازگار است. این بدین معنی است که با گسترش ژنوم تعداد ژن‌های مربوط به این خانواده افزایش یافته است اما تعداد ژن‌های مایوزین در ژنوم آرابیدوپسیس

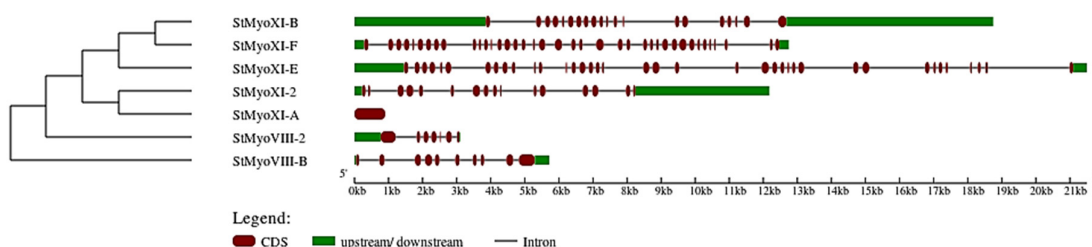


شکل ۱. بررسی روابط فیلوژنتیک پروتئین‌های StMyo در سیب‌زمینی با استفاده از نرم‌افزار MEGA 6.0.

Fig. 1. Investigation of phylogenetic relationships of StMyo proteins in potato.

مشاهده شد که حداکثر تعداد اگزون ۵۲ عدد بوده که علت احتمالی آن را می‌توان با بزرگ‌تر بودن ژنوم پنبه نسبت به ژنوم سیب‌زمینی مرتبط دانست. اخیراً در مطالعه دیگر مشاهده شده است که تعداد اگزون و اینترون در هر خانواده ژنی می‌تواند متغیر باشد و همبستگی بین پروتئین و طول ژن وجود ندارد (Ma et al., 2020).

در میان ژن‌های مایوزین، تعداد اگزون در هر عضو بین ۱ تا ۳۹ عدد متغیر بود. اغلب پروتئین‌هایی که در کلاس VIII قرار گرفتند، از تعداد اینترون کمتری برخوردار بودند (شکل ۲) در حالی که پروتئین‌هایی که در گروه XI قرار داشتند تعداد اینترون بیشتری داشتند که می‌تواند به خاطر پدیده اسپلاسینگ باشد (Ma et al., 2020). بر اساس مطالعه‌ای که بر روی ژن‌های مایوزین در پنبه انجام گرفت



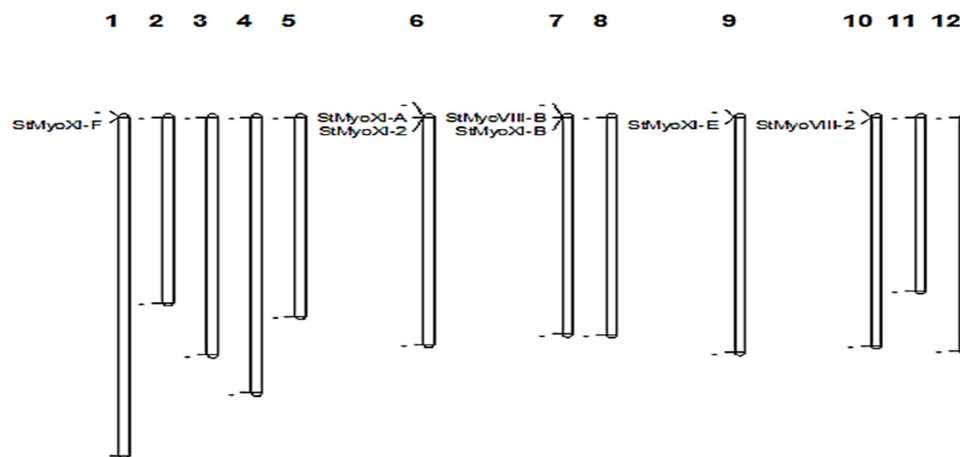
شکل ۲. توزیع دمین‌های محافظت‌شده در ژن‌های StMyo در سیب‌زمینی با استفاده از برنامه GS2.0.

Fig. 2. Distribution of conserved domains in StMyo genes in potato using GS2.0 program.

و ۱۰ یک ژن مایوزین وجود دارد (شکل ۳) در حالی که کروموزوم‌های ۶ و ۷ سیب‌زمینی هرکدام حاوی دو ژن مایوزین بودند (شکل ۳).

مکان کروموزومی ژن‌های خانواده مایوزین

نتایج حاصل از بررسی بیوانفورماتیکی روی داده‌های ژنوم سیب‌زمینی نشان داد بر روی هر یک از کروموزوم‌های ۱ و ۹



شکل ۳. بررسی توزیع ژن‌های StMyo بر روی کروموزوم‌های سیب‌زمینی با استفاده از نرم‌افزار Mapchart v 2.2. **Fig. 3. Investigation of the distribution of StMyo genes on potato chromosomes using Mapchart v 2.2 software.**

برابر نسبت به تیمار عدم تنش شد. الگوی بیان این ژن در غده‌های تحت تنش نیز به میزان ۸ برابر نسبت به تیمار بدون تنش مشاهده شد. میزان بیان ژن StMyoXI-B در غده تحت تنش خشکی به میزان ۸۰ برابر نسبت به تیمار عدم تنش نشان داد. درحالی‌که بیان این ژن در برگ تحت تیمار تحت خشکی نسبت به تیمار عدم تنش به میزان ۴ برابر مشاهده شد که افزایش معنی‌داری قابل قبولی به لحاظ آماری نداشت. (شکل 4c).

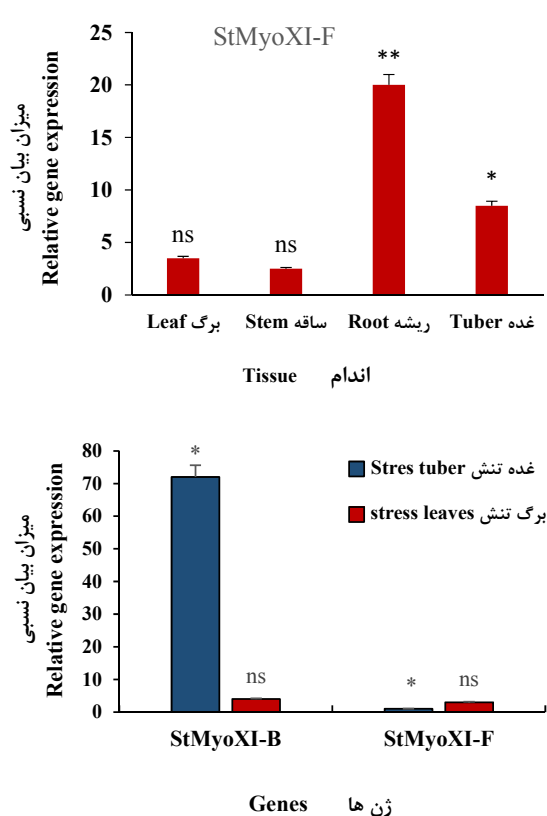
همچنین بررسی و مقایسه بیان این دو ژن (StMyoXI-F و StMyoXI-B) در شکل 4b و 4a و در اندام ریشه، ساقه، برگ و غده تحت شرایط نرمال انجام شد. نتایج نشان داد که هر دو ژن (StMyoXI-B و StMyoXI-F) در ریشه به میزان ۲۰ و ۲۵ برابر به ترتیب افزایش بیان داشته درحالی‌که ژن StMyoXI-F در ساقه، پایین‌ترین بیان را در میان چهار اندام به میزان ۳ برابر داشت و ژن StMyoXI-B در برگ پایین‌ترین بیان را به میزان ۵ برابر در میان چهار اندام نشان داد. علاوه بر این، ژن StMyoXI-B بیان بالاتری را نسبت به ژن StMyoXI-F در ریشه داشته است (شکل 4).

در ذرت، بیشتر ژن‌های مایوزین در ریشه بیان شدند. مطالعه‌ای که بر روی بیان ژن‌های مایوزین در آرآیدوپسیس انجام شد نشان داد که این ژن‌ها در ریشه بیشتر بیان می‌شوند (Prokhnovsky et al., 2008).

در مطالعه‌ای که بر روی ژن‌های مایوزین در ذرت صورت گرفت مشاهده شد که بیشتر ژن‌های مایوزین بر روی کروموزوم ۵ بود درحالی‌که در سیب‌زمینی هیچ‌کدام از ژن‌های مایوزین بر روی کروموزوم ۵ قرار نداشتند (Wang et al., 2014). این در حالی است که ذرت از جد اتوترپلوئاید منشأ گرفته و دستخوش دوبرابردگی کل ژنوم قرار گرفته است (Jiang et al., 2004, Li et al., 2015, Haraguchi et al., 2018; Hajibarat et al., 2022). همه نتایج تکاملی نشان می‌دهد که خانواده مایوزین در طول گسترش گونه‌ها بسیار محافظه‌کارانه و سخت‌گیرانه عمل کرده است که ممکن است به حفظ عملکردهای مهم آن‌ها چه در گیاهان و چه در حیوانات مانند تمایز سلولی، جریان سیتوپلاسمی و سازمان‌دهی اکتین مربوط باشند (Peremyslov et al., 2015, Tingler et al., 2018; Hajibarat et al., 2018).

آنالیز بیان ژن‌های مایوزین در اندام و تحت تنش خشکی

برای آنالیز بیشتر ویژگی‌ها و عملکرد ژن‌های مایوزین، الگوی بیان دو ژن StMyoXI-B و StMyoXI-F در چهار اندام ریشه، ساقه، برگ و غده با استفاده از qPCR بررسی شد. همچنین آنالیز بیان در برگ و غده تحت تیمار تنش خشکی با استفاده از دو ژن انجام شد. نتایج نشان داد که بیان رونوشت StMyoXI-F در برگ تحت تنش خشکی افزایش بیان ۶



شکل ۴. بیان دو ژن StMyoXI-F و StMyoXI-B در چهار اندام (ریشه، برگ، ساقه و غده) در سه تکرار. بیان تحت تنش خشکی در برگ و غده تحت شرایط خشکی در سه تکرار.

Fig. 4. Expression of two genes StMyoXI-B and StMyoXI-F in four tissues (root, leaf, stem, and tuber) in three repeat. Expression under drought stress in leaves and tubers under normal conditions and drought stress in three repeat.

(ساقه، برگ و غده) دارد. همچنین ژن‌های مایوزین تحت تنش خشکی افزایش بیان داشتند. بر اساس مطالعه دیگر ژن‌های مایوزین تحت تنش خشکی کاهش بیان داشتند که یکی از دلایل احتمالی آن است که کاهش تکثیر سلول و تشکیل دیواره سلولی در گیاه تحت تنش رخ داده است (George, 2011). مطالعه دیگری نشان داد که مایوزین به دلیل ترمیم غشای بیولوژیکی که تحت تأثیر تنش خشکی آسیب دیده فعالیت دارند و به تبع آن در سلول با افزایش رونوشت مایوزین مواجه خواهیم بود (Ghosh and Xu, 2014) که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت داشت. این نتایج حاکی از آن است که بررسی خصوصیات عملکردی ژن‌های مایوزین برای رشد و توسعه در گیاه و همچنین تحت تنش نیاز به مطالعه بیشتری دارد.

برخلاف کلاس XI مایوزین، ویژگی‌های کلاس VIII کمتر شناخته شده است (Reddy et al., 2001). ATM1 ژن دیگر مایوزین است که به‌عنوان سنسور مولد در انواع ساختارهای درون‌سلولی مانند کورتکس سلول، دیواره سلولی تازه شکل‌گرفته، پلاسمودسماتا و پلاستیدها عمل می‌کند (Haraguchi et al., 2014). بسیاری از مطالعات نشان می‌دهند که پروتئین مایوزین VIII می‌تواند مرتبط با الگوی پروتئومال از اندوسیتوز، سیتوکینز و پلاسمودسمال باشد. مایوزین XI نیز نقش مهمی در انتشار یا پلازیده‌کردن الگوی رشد سلولی دارد (Wu et al., 2011).

نتیجه‌گیری نهایی

بر اساس یافته‌های این تحقیق می‌توان نتیجه‌گیری نمود که مایوزین‌ها بیان بیشتری در اندام ریشه نسبت به سه اندام

منابع

Avisar, D., Prokhnevsky, A. I., Makarova, K. S., Koonin, E.V., Dolja, V.V., 2008. Myosin XI-K

is required for rapid trafficking of Golgi stacks, peroxisomes, and mitochondria in leaf cells of

- Nicotiana benthamiana. Plant Physiology. 146, 1098-1108.
- Camire, M.E., Kubow, S., Donnelly, D.J., 2009. Potatoes and human health. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 49, 823-840.
- Foti, S., Mauromicale, G., Ierna, A., 1995. Influence of irrigation regimes on growth and yield of potato cv. Spunta. Potato research. 38, 307-317.
- George, B.A., 2011. Stress effects on Myosin mutant root length in *Arabidopsis thaliana*. MSc dissertation, Faculty of University of Tennessee, Knoxville Knoxville, Tennessee, United States
- Ghosh, D., Xu, J., 2014. Abiotic stress responses in plant roots: a proteomics perspective. Frontiers in Plant Science. 5, 1-13
- Hajibarat, Z., Saidi, A., Hajibarat, Z., 2018. Bioinformatics analysis of MADS-box in *Brachypodium distachyon*. Crop Biotechnology. 8, 1-15. [In Persian with Wnglish summary].
- Hajibarat, Z., Saidi, A., Zeinalabedini, M., Gorji, A.M., Ghaffari, M.R., Shariati, V., Ahmadvand, R., 2022. Genome-wide identification of StU-box gene family and assessment of their expression in developmental stages of *Solanum tuberosum*. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology. 20, 1-21.
- Haraguchi, T., Ito, K., Duan, Z., Rula, S., Takahashi, K., Shibuya, Y., Hagino, N., Miyatake, Y., Nakano, A., Tominaga, M., 2018. Functional diversity of class XI myosins in *Arabidopsis thaliana*. Plant and Cell Physiology. 59, 2268-2277.
- Haraguchi, T., Tamanaha, M., Suzuki, K., Yoshimura, K., Imi, T., Tominaga, M., Sakayama, H., Nishiyama, T., Murata, T., Ito, K., 2022. Discovery of ultrafast myosin, its amino acid sequence, and structural features. Proceedings of the National Academy of Sciences. 119, 2120962119.
- Haraguchi, T., Tominaga, M., Matsumoto, R., Sato, K., Nakano, A., Yamamoto, K., Ito, K., 2014. Molecular characterization and subcellular localization of Arabidopsis class VIII Myosin, ATM1. Journal of Biological Chemistry. 289, 12343-12355.
- Hasanpanah, D., Nikshad, k., Hasani, M., Aghazadeh, B., 2003. Potato in Ardabil Province, Ardabil Agriculture Jihad Organization. 64p. [In Persian].
- Jiang, S., Ramachandran, S., 2004. Identification and molecular characterization of myosin gene family in *Oryza sativa* genome. Plant and Cell Physiology. 45, 590-599.
- Lee, Y.R.J., Liu, B., 2004. Cytoskeletal motors in Arabidopsis: sixty-one kinesins and seventeen myosins. Plant Physiology. 136, 3877-3883.
- Li, F., Fan, G., Lu, C., Xiao, G., Zou, C., Kohel, R.J., Ma, Z., Shang, H., Ma, X., Wu, J., Liang, X., 2015. Genome sequence of cultivated Upland cotton (*Gossypium hirsutum* TM-1) provides insights into genome evolution. Nature Biotechnology. 33, 524-530.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. Methods. 25, 402-408.
- Ma, C., Zhao, Z., Wang, N., Azhar, M.T., Du, X., 2020. Genome-wide identification and comparative analysis of myosin gene family in four major cotton species. Genes. 11, 731.
- Mane, S.P., Robinet, C.V., Ulanov, A., Schafleitner, R., Tincopa, L., Gaudin, A., Nomberto, G., Alvarado, C., Solis, C., Bolivar, L.A., Blas, R., 2008. Molecular and physiological adaptation to prolonged drought stress in the leaves of two Andean potato genotypes. Functional Plant Biology. 35, 669-688.
- Natesan, S.K.A., Sullivan, J.A., Gray, J.C., 2009. Myosin XI is required for actin-associated movement of plastid stromules. Molecular Plant. 2, 1262-1272.
- Nebenführ, A., Dixit, R., 2018. Kinesins and myosins: molecular motors that coordinate cellular functions in plants. Annual Review of Plant Biology. 69, 329-361.
- Ojangu, E.L., Järve, K., Paves, H. and Truve, E., 2007. Arabidopsis thaliana myosin XIX is involved in root hair as well as trichome morphogenesis on stems and leaves. Protoplasma. 230, 193-202
- Peremyslov, V.V., Prokhnovsky, A.I., Dolja, V.V., 2010. Class XI myosins are required for development, cell expansion, and F-actin organization in Arabidopsis. Plant Cell. 22, 1883-1897
- Peremyslov, V.V., Cole, R.A., Fowler, J.E., Dolja, V.V., 2015. Myosin-powered membrane compartment drives cytoplasmic streaming,

- cell expansion and plant development. *PLoS One*. 10, 1-19.
- Peremyslov, V.V., Prokhnevsky, A.I., Dolja, V.V., 2010. Class XI myosins are required for development, cell expansion, and F-Actin organization in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. 22, 1883-1897.
- Peremyslov, V.V., Mockler, T.C., Filichkin, S.A., Fox, S.E., Jaiswal, P., Makarova, K.S., Koonin, E.V. and Dolja, V.V., 2011. Expression, splicing, and evolution of the myosin gene family in plants. *Plant Physiology*. 155, 1191-1204.
- Peremyslov, V.V., Prokhnevsky, A.I., Avisar, D., Dolja, V.V., 2008a. Two class XI myosins function in organelle trafficking and root hair development in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 146, 1109-1116.
- Prokhnevsky, A.I., Peremyslov, V.V., Dolja, V.V., 2008. Overlapping functions of the four class XI myosins in *Arabidopsis* growth, root hair elongation, and organelle motility. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 105, 19744-19749.
- Reddy, A.S., Day, I.S., 2001. Analysis of the myosins encoded in the recently completed *Arabidopsis thaliana* genome sequence. *Genome Biology*. 2, 1-19.
- Saidi, A., Hajibarat, Z., 2020. In-silico analysis of eukaryotic translation initiation factors (eIFs) in response to environmental stresses in rice (*Oryza sativa*). *Biologia*. 75, 731-738.
- Sattarzadeh, A., Krahmer, J., Germain, A.D., Hanson, M.R., 2009. A myosin XI tail domain homologous to the yeast myosin vacuole-binding domain interacts with plastids and stromules in *Nicotiana benthamiana*. *Molecular Plant*. 2, 1351-1358.
- Shimmen, T., Yokota, E., 2004. Cytoplasmic streaming in plants. *Current Opinion in Cell Biology*. 16, 68-72.
- Sparkes, I.A., Teanby, N.A., Hawes, C., 2008. Truncated myosin XI tail fusions inhibit peroxisome, golgi, and mitochondrial movement in tobacco leaf epidermal cells: a genetic tool for the next generation. *Journal of Experimental Botany*. 59, 2499-2512.
- Sparkes, I.A., 2010. Motoring around the plant cell: insights from plant myosins. *Biochemical Society Transactions*. 38, 833-838.
- Syamaladevi, D.P., Spudich, J.A., Sowdhamini, R., 2012. Structural and functional insights on the Myosin superfamily. *Bioinformatics and Biology Insights*, 6, S8451.
- Tingler, M., Kurz, S., Maerker, M., Ott, T., Fuhl, F., Schweickert, A., LeBlanc-Straceski, J.M., Noselli, S., Blum, M., 2018. A conserved role of the unconventional myosin 1d in laterality determination. *Current Biology*. 28, 810-816.
- Titus, M.A., 2018. Myosin-driven intracellular transport. Harbor Laboratory Press. Minnesota pp.10. <https://dx.doi.org/0.1101/cshperspect.a021972>
- Ueda, H., Yokota, E., Kutsuna, N., Shimada, T., Tamura, K., Shimmen, T., Hasezawa, S., Dolja, V.V., Hara-Nishimura, I., 2010. Myosin-dependent endoplasmic reticulum motility and F-actin organization in plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 107, 6894-6899.
- Vidali, L., Burkart, G.M., Augustine, R.C., Kerdauid, E., Tüzel, E., Bezanilla, M., 2010. Myosin XI is essential for tip growth in *Physcomitrella patens*. *The Plant Cell*. 22, 1868-1882.
- Wang, G., Zhong, M., Wang, J., Zhang, J., Tang, Y., Wang, G., Song, R., 2014. Genome-wide identification, splicing, and expression analysis of the myosin gene family in maize (*Zea mays*). *Journal of Experimental Botany*. 65, 923-938.
- Wu, S.Z., Ritchie, J.A., Pan, A.H., Quatrano, R.S., Bezanilla, M., 2011. Myosin VIII regulates protonemal patterning and developmental timing in the moss *Physcomitrella patens*. *Molecular Plant*. 4, 909-921.