University of Birjand

Journal homepage: https://escs.birjand.ac.ir

تنشهای محیطی در علوم زراعی
Environmental Stresses In Crop Sciences

Vol. 15, No. 4, pp. 1005-1021 (Winter 2023)

http://dx.doi.org/10.22077/escs.2021.4183.1986

Original article

Genome-wide investigation of CIPK gene family in *Aeluropus littoralis* L.

M. Arab[1], H. Najafi Zarrini[2], Gh. Nematzadeh[3], S.H. Hashemipetroudi[4*]

1. M.Sc. Student in Plant Breeding, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University (SANRU), Iran
2. Associated Professor, Department of Biotechnology, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University (SANRU), Sari, Iran
3. Professors, Department of Genetic Engineering and Biology, Genetics and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan (GABIT), Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University (SANRU). Iran
4. Assistant Professors, Department of Genetic Engineering and Biology, Genetics and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan (GABIT), Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University (SANRU), Sari, Iran

Received 1 March 2021; Accepted 10 April 2021

Extended abstract

Introduction

The CBL-CIPK signaling network, which decodes calcium signals triggered by environmental stresses, is one of the most crucial signal transduction systems in plants. Proteins bound to calcium ions serve as sensor molecules, receiving cellular calcium ion signals and transmitting messages to the downstream gene cascade. Because of its tolerance to abiotic stresses, especially salinity stress, and its relationship to cereals, many researchers are interested in the molecular mechanisms of the halophyte grass *Aeluropus littoralis*. The in-silico discovery of the AlCIPK gene family and their expression profile in responses to salinity stress were considered in this analysis due to this plant's genome sequence's availability.

Materials and methods

Using local TblastN program, the CIPK protein sequences of *Arabidopsis thaliana* gene families were blasted against *A. littoralis* genomic sequences. BlastP was used to verify all sequences after redundant sequences were removed. The detected proteins were analyzed in various protein domain databases such as Pfam, PROSITE, and InterProScan to identify, annotate, and interpret domain structures. In all of AlCIPK, the SALAD approach was used to perform similarity clustering based on motifs patterns. The exon and intron arrangement were determined by comparing the predicted CDS against AlCIPK genomic sequences in the gene structure display server (GSDS). Expasy-Prosite was used to determine the domain structure. A signal-dependent software based on SignalP 5.0 was used to identify signal peptides in proteins. Exploring the expression pattern of AtCIPK genes at various growth and developmental stages using Genevestigator (https://www.genevestigator.com/gv/plant.jsp) and the EFP browser (http://bar.utoronto.ca/). Transcriptome research was used to examine the expression patterns of AlCIPK genes in leaf and root tissues under salinity stress and recovery conditions.

Results and discussion

Based on sequence homology with *Arabidopsis* genes, 20 CIPK genes were discovered in the *A. littoralis* genome. The Arabidopsis AtCIPK homologous proteins were used to name the Aeluropus CIPK genes.

* Corresponding author: Seyyed Hamidreza Hashemipetroudi; E-Mail: shr.hashemi@sanru.ac.ir

© 2022, The Author(s). Published by University of Birjand. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0).

According to subcellular localization analysis, these proteins are active in a specific cellular compartment. The phylogenetic tree of 20 AlCIPK, 26 AtCIPK, and 33 OsCIPK showed that these 79 CIPKs are closely related. Exon/intron structure analysis was used to separate all AlCIPK into intron-poor and intron-rich classes. The expression of 25 AtCBL gene family members in 68 samples under salinity stress was compared using Genevestigator tools, which revealed that all 25 genes tested in different developmental/ environmental stages, including control and stress, had different expression patterns. A tissue-specific expression pattern was discovered after analyzing these AtCBL genes' expression pattern in both root and shoot tissues. In salinity stress and recovery conditions, the expression profile pattern of AlCIPK genes in leaf and root tissues was distinct. The distinct expression profiles of the AlCIPK gene family confirmed their functional and structural convergence.

Conclusion

Systematic study of members of this gene family revealed that CIPKs in Halophyte grass, i.e., *A. littoralis*, share main CIPK family characteristics with other monocotyledonous and dicotyledonous plants, which are likely important factors in this species' adaptation and stress tolerance. The lack of homologous AtCIPK24 genes in the Aeluropus genome is a key finding in this study, suggesting that the CBL-CIPK gene network in this plant has a distinct regulatory function, necessitating further studies. Future studies using the RT-qPCR method to examine the expression of AlCBL and AlCIPK gene family genes under different abiotic stresses could aid in understanding the mechanism of SOS-related gene expression regulation. This study's findings reveal the functional characteristics of the calcium gene family and provide essential information for future research on their functional roles.

***Keywords*:** Calcium sensor, CBL-CIPK, CBL-interacting protein kinase, Salt stress, Signaling network

تنشهای محیطی در علوم زراعی
Environmental Stresses in Crop Sciences
جلد پانزدهم، شماره چهارم، زمستان ۱۴۰۱

http://dx.doi.org/10.22077/escs.2021.4183.1986

مقاله پژوهشی

بررسی گستره ژنومی خانواده ژنی CIPK در گیاه هالوفیت آلوروپوس لیتورالیس (*Aeluropus littoralis* L.)

مژده عرب[۱]، حمید نجفی زرینی[۲]، قربانعلی نعمت‌زاده[۳]، سیدحمیدرضا هاشمی‌پطرودی[۴*]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ایران
۲. دانشیار گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران
۳. استاد گروه مهندسی ژنتیک و بیولوژی، پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران
۴. استادیار گروه مهندسی ژنتیک و بیولوژی، پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران

مشخصات مقاله

واژه‌های کلیدی:
تنش شوری
شبکه سیگنالینگ
پروتئین کیناز
تعامل‌کننده با CBL
CBL-CIPK
حسگر کلسیم

تاریخ دریافت:
۱۳۹۹/۱۲/۱۱

تاریخ پذیرش:
۱۴۰۰/۰۱/۲۱

تاریخ انتشار:
زمستان ۱۴۰۱

۱۵(۴): ۱۰۰۵-۱۰۲۱

چکیده

شبکه سیگنالینگ CBL-CIPK یکی از مهم‌ترین سیستم‌های انتقال سیگنال در گیاهان بوده که سیگنال‌های کلسیم ناشی از تنش‌های محیطی مختلف را رمزگشایی می‌کند. پروتئین‌های متصل به یون کلسیم به‌عنوان مولکول‌های حسگر عمل نموده و با دریافت سیگنال‌های یون کلسیم سلولی، وظیفه هدایت پیام را به آبشارهای ژنی پایین‌دست بر عهده دارند. تحمل بالقوه تنش‌های غیرزنده خصوصاً تنش شوری و قرابت آن به غلات، انگیزه اصلی بسیار از محققین برای مطالعه مکانیسم‌های مولکولی گونه هالوفیت *Aeluropus littoralis* است. در این تحقیق با توجه به در دسترس قرار گرفتن توالی ژنومی این گیاه، شناسایی این‌سیلیکو اعضای خانواده ژنی *AlCIPK* و ارزیابی پاسخ‌های بیانی آن‌ها در برابر تنش شوری مدنظر قرار گرفت. بر مبنای همولوژی با ژن‌های آرابیدوپسیس، ۲۰ ژن CIPK در ژنوم *A. littoralis* شناسایی شد. تجزیه‌وتحلیل جانمایی پروتئین‌ها نشان داد که این پروتئین‌ها در بخش‌های مختلف سلولی فعال هستند. درخت فیلوژنتیک بر مبنای توالی پروتئینی ۲۰ AlCIPK، ۲۶ AtCIPK و ۳۳ OsCIPK، نشان داد که ۷۹ CIPK موردبررسی از رابطه ارتولوژیکی قوی برخوردارند. آنالیز فیلوژنتیکی بر اساس تجزیه‌وتحلیل ساختار اگزون / اینترون، همه *AlCIPK*ها را به دو گروه کم-اینترون و غنی- اینترون تقسیم نمودند. الگوهای بیان متمایز اعضای خانواده ژنی *AlCIPK* انشقاق عملکردی و ساختاری این ژن‌ها را در طی تکامل تأیید می‌کند. یافته‌های این بررسی ضمن ارائه برخی خصوصیات عملکردی خانواده ژنی سنسورهای کلسیم، اطلاعات پایه‌ای را برای تحقیقات آتی در مورد کارکرد بیولوژیکی این ژن‌ها فراهم می‌سازد.

مقدمه

هر چند اغلب گیاهان در طول چرخه زندگی، تحت شرایط مختلف محیطی نظیر خشک‌سالی، شوری خاک، درجه حرارت شدید و عوامل بیماری‌زا قرار می‌گیرند ولی به لطف وجود و تکامل مکانیسم‌های پیچیده فیزیولوژیکی و ژنتیکی، تحمل شرایط نامساعد محیطی برای گیاهان میسر گردیده است (Su et al., 2020). تحقیقات چند دهه اخیر نشان داده است که سیگنالینگ کلسیم به‌عنوان یک فرآیند حیاتی، گیاهان را قادر ساخته به محرک‌های خارجی متعدد پاسخ داده و فرایندهای اساسی سلول نظیر فعال‌سازی کانال‌ها، پمپ‌ها و انتقال‌دهنده‌های خاص که در غشاهای مختلف سلولی قرار دارند را هماهنگ و تنظیم نمایند (Dodd et al., 2010). یکی از مهم‌ترین اعضای خانواده ژنی سنسورهای

* نگارنده پاسخگو: سیدحمیدرضا هاشمی‌پطرودی. پست الکترونیک: shr.hashemi@sanru.ac.ir

کلسیم، کیناز پروتئین‌های تعامل‌کننده با CBL [1] (CIPK) بوده که بسیاری از آن‌ها در پاسخ و سازگاری با تنش‌های مختلف زیستی و غیرزیستی نقش دارند (Zhao et al., 2019). شبکه CBL–CIPK نمونه مهمی از مسیر سیگنالینگ کلسیم در گیاهان است (Zhang et al., 2014). در این شبکه ژنی، پروتئین‌های متصل به یون کلسیم به‌عنوان مولکول‌های حسگر عمل نموده و به‌طور اختصاصی با دریافت سیگنال‌های یون کلسیم سلولی، آن را به مسیرهای فرودست آبشار ژنی منتقل می‌کنند (Li et al., 2016; Yin et al., 2017).

مسیر سیگنالی CBL-CIPK برای اولین بار در گیاه آرابیدوپسیس تالیانا به‌واسطه کشف مسیر SOS شناسایی شد که خود شامل AtCBL4 (SOS3)، AtCIPK24 (SOS2) و آنتی‌پورتر Na^+/H^+ (SOS1) مکان‌نمایی شده در غشای پلاسمایی است. در القای تحمل به تنش شوری، ژن *AtCIPK24* در تعامل با CBLها عمل کرده، درحالی‌که SOS1 در مسیر ژنی مستقر در تونوپلاست توسط CBL10-CIPK24 فعال می‌شود (Kim et al., 2007; Monihan et al., 2016). CIPK متعلق به خانواده پروتئینی SnRK3 بوده که از یک دمین کینازی Ser/Thr (سرین-تریونین) برخوردارند (Shi et al., 1999). از مهم‌ترین کارکردهای مهم CIPK، می‌توان به فسفریله‌نمودن اسیدآمینه سرین در جایگاه موتیف حفاظت‌شده PFPF، پروتئین‌های CBL اشاره نمود. این پروتئین‌ها غالباً از یک دمین حفاظت‌شده در انتهای آمینی، دمین کینازی سرین-تریونین، موتیف NAF / FISL و نهایتاً یک دمین تنظیمی در انتهای کربوکسیلی برخوردارند (Albrecht et al., 2003؛ Ma et al., 2019). علاوه بر این دمین‌ها، در انتهای کربوکسیلی CIPKها یک دمین تعامل پروتئین-فسفاتاز (PPI) وجود داشته که نقش تعامل با پروتئین فسفاتاز (PP2C) را بر عهده دارد. از این تعامل موجود بین CBL و CIPK در سیستم رمزگذاری یون کلسیم، تحت عنوان شبکه CBL-CIPK یاد می‌شود (Ma et al., 2019).

در مطالعات پیشین نشان داده‌شده که شبکه CBL-CIPK در فرایند تنظیمی انتقال یون‌های سدیم (Na^+)، پتاسیم (K^+)، منیزیم (Mg^{2+}) و نیترات (NO_3^-) در غشای پلاسمایی (PM) یا غشای واکوئولی (تونوپلاست) نقش دارد. این شبکه همچنین نقش مهمی در تنظیم اکسین، سیگنالینگ ABA و باز و بسته شدن روزنه ایفا می‌کند. تنش‌های غیرزنده مانند تنش یونی، تنش اسمزی و دمای شدید منجر به فعال شدن مسیر سیگنالی فوق حساسیت به شوری [2] (SOS) و گونه‌های اکسیژن فعال [3] (ROS) می‌شود که خود فعال‌شدن فاکتورهای رونویسی [4] پاسخگو به تنش‌های غیرزنده را در پی دارد (Kim et al., 2007; Monihan et al., 2016). در تحقیقات پیشین به کمک آنالیز ژنومیکس مقایسه‌ای ژن‌های CBL/ CIPK، اطلاعات زیادی در خصوص عملکرد، پیچیدگی و محافظت‌شدگی توالی خانواده CBL/CIPK خصوصاً تکامل شبکه سیگنالینگ-CBL CIPK در گیاهان مختلف، از جلبک تا گیاهان چوبی ارائه داده شده است (Yu et al., 2014) که مؤید نقش کمپلکس‌های CBL-CIPK در تنظیمات پاسخ به تنش‌های مختلف غیرزنده و آبشارهای سیگنالینگ مواد مغذی بود. به‌عنوان نمونه می‌توان به مسیر ژنی SOS در آرابیدوپسیس اشاره نمود که در تحمل به تنش شوری نقش ایفا می‌نماید (Ji et al., 2013).

آلوروپوس لیتورالیس (*Aeluropus littoralis*) گیاهی هالوفیت از تیره گندمیان (Poaceae) بوده که از سازگاری بالایی با محیط‌های شوره‌زار برخوردار است (Hashemi-Petroudi et al., 2019; Younesi-Melerdi et al., 2020). به‌عنوان یک گیاه مدل هالوفیت، *A. littoralis* قادر است در شوری بیش از ۸۰۰ میلی‌مولار (NaCl) زنده مانده و به رشد و نمو خود ادامه دهد. این گیاه با تعداد کروموزوم 2n = 2X = 20، از ژنومی کوچک (354 Mbp) برخوردار بوده که به‌عنوان یک منبع ژنتیکی غنی از ژن‌های متحمل، برای بهبود تحمل به تنش شوری و خشکی گیاهان زراعی مطرح است (Barhoumi et al., 2007; Ben-Saad et al., 2012). با توجه به تعیین توالی مبتنی بر NGS توالی ژنومی این گیاه (Hashemi et al., 2022) و در دسترس بودن توالی آن، امکان بررسی خصوصیات خانواده‌های ژنی درگیر در تنش‌های مختلف غیرزیستی خصوصاً تنش شوری و خشکی فراهم گشته است. از آنجائی که تاکنون، هیچ تجزیه‌وتحلیل سیستماتیک از اعضای خانواده ژنی CIPK در گیاهان هالوفیت تک‌لپه گزارش نشده است. در این تحقیق، بررسی

[1]. CBL-Interacting Protein Kinases
[2]. Salt Overly Sensitive
[3]. Reactive Oxygen Species
[4]. Transcription Factors

این‌سیلیکوسنسورهای کلسیم زیرخانواده CIPK، در این گونه شورپسند[5] موردبررسی قرار خواهد گرفت.

مواد و روش‌ها

شناسایی و بررسی روابط فیلوژنتیکی خانواده ژنی AlCIPK

با توجه به تعیین‌توالی ژنوم کامل گیاه آلوروپوس لیتورالیس، توالی آن از پایگاه اطلاعاتی e!DAL (https://edal.ipk-gatersleben.de/) اخذ گردید. توالی پپتیدی اعضای خانواده ژنی CIPK در گیاهان آرابیدوپسیس و برنج به ترتیب از پایگاه‌های UniPort (http://www.uniprot.org/) و NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/) دریافت شد. بدین ترتیب که با استفاده از ابزار جستجوی مبتنی بر مدل (HMMER: http://hmmer.janelia.org/) local Hidden Markov و بر مبنای پروفایل HMM ساخته‌شده از CIPKهای شناخته‌شده، شناسایی ژن‌های CIPK در ژنوم آلوروپوس انجام شد. علاوه بر این، با استفاده از ابزار جستجوی tBLASTn Local و توالی‌های پروتئینی خانواده ژنی AtCIPK به‌عنوان Query و ژنوم آلوروپوس به‌عنوان subject، شناسایی و AlCIPKها مجدداً موردبررسی قرار گرفت (Hall et al., 2011). ژن‌هایی که در بانک دمین CDD دارای هر دو دمین محافظت‌شده Pkinase و NAF بودند (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd/) به‌عنوان ژن‌های AlCIPK برای آنالیزهای بعدی انتخاب گردیدند. مطالعات تکمیلی دمین‌های این خانواده ژنی نیز به ترتیب در پایگاه‌های Pfam (El-Gebali et al., 2019)، InterProScan (Jones et al., 2014)، Prosite (Hulo et al., 2006) و SMART (Letunic et al., 2018) صورت گرفت. آنالیز هم‌ردیفی چندگانه جهت شناسایی نقاط محافظت‌شده ژنی با استفاده از نرم‌افزار ClustalW انجام و درخت فیلوژنتیک آن‌ها بر اساس روش اتصال همسایه و با انجام آزمون بوت‌استرپ (Felsenstein, 1985) با ۱۰۰۰ تکرار توسط نرم‌افزار فیلوژنتیکی MEGA6 ترسیم شد (Tamura et al., 2013).

بررسی خصوصیات پروتئین و آنالیز ساختار ژنی

با استفاده از ابزار ProtParam در سایت Expasy (http://expasy.org/) خواص فیزیکوشیمیایی پروتئین‌های CIPK مانند تعداد اسیدآمینه، وزن مولکولی و نقطه ایزوالکتریک (www.web.expasy.org/protparam/) محاسبه شد (Gasteiger et al., 2005). موتیف‌های حفاظت‌شده در برنامه MEME (http://meme-suite.org/tools/meme/) با پارامترهای تعیین‌شده (انتخاب موتیف‌ها در این برنامه بدون توجه به‌دفعات تکرار، شناسایی حداکثر ۱۰ موتیف، E-value کمتر از ۰,۰۰۰۱ و کمترین و بیشترین طول موتیف‌ها به ترتیب ۶ و ۵۰ اسیدآمینه) شناسایی شد (Bailey et al., 2009). جایگاه سلولی پروتئین‌ها با استفاده از برنامه WoLF PSORT (https://wolfpsort.hgc.jp/) پیش‌بینی شد (Horton et al., 2007). شناسایی موتیف‌های palmitoylation و Myristoylaton به ترتیب با استفاده از نرم‌افزار CSS-Palm 3.0 و PlantsP (http://mendel.imp.ac.at/myristate/SUPLpredictor.htm) صورت گرفت.

شناسایی ساختار ژنی با استفاده از برنامه GSDS (http://gsds.cbi.pku.edu.cn/) انجام گرفت (B. Hu et al., 2014). ساختار دمین با استفاده از Expasy-Prosite شناسایی و ترسیم شد (Sigrist et al., 2012). شناسایی پپتیدهای سیگنالی در پروتئین‌ها با استفاده از برنامه مبتنی بر شبکه SignalP 5.0 صورت گرفت (Armenteros et al., 2019). برای بررسی الگوی بیان ژن‌های AtCIPK در مراحل مختلف رشدی، بافتی و نموی، برنامه‌های Genevestigator (https://www.genevestigator.com/gv/plant.jsp) و efp browser (http://bar.utoronto.ca/) استفاده شد. بررسی پروفایل بیان ژن‌های CIPK در آلوروپوس لیتورالیس با استفاده از داده‌های RNA-seq انجام شد (S. Hashemi-Petroudi et al., 2020). به‌این‌ترتیب که بیان ژن‌ها در دو بافت برگ و ریشه و در دو شرایط تنش شوری (۶۰۰ میلی‌مولار نمک کلرید سدیم) و شرایط بازیابی (انتقال گیاهان تنش دیده به محیط هیدروپونیک فاقد نمک) صورت گرفت. آنالیز تفاوت بیان ژن‌ها به‌صورت Log2FC اجرا و پس از تشکیل ماتریس بیان ژن که حاوی ژن‌ها و سطح بیان آن‌ها

[5]. Halophyte

بود، بیان ژن‌های AlCBL موردبررسی قرار گرفت و نتایج در قالب نمودار Heatmap، با استفاده از نرم‌افزار CIMminer (https://discover.nci.nih.gov/cimminer/home.do) ارائه شد (Scherf et al., 2000).

نتایج و بحث

شناسایی اعضای خانواده ژنی CIPK در گیاه آلوروپوس لیتورالیس

در بررسی گسترده ژنومی خانواده ژنی AlCIPK، آنالیز همولوژی بر مبنای پروتئین‌های خانواده CIPK گیاه آرابیدوپسیس با ژنوم آلوروپوس صورت گرفت که در ابتدا با حذف توالی‌های تکراری، ۲۵ جایگاه ژنی کاندید CIPK در ژنوم آلوروپوس شناسایی شد که برای اطمینان از وجود دمین‌های NAF و KINASE، توالی‌های شناسایی‌شده از طریق پایگاه‌های InterProScan، Pfam و SMART ارزیابی گردید که نهایتاً ۲۰ ژن با توجه به دمین‌های شناسایی‌شده به‌عنوان اعضای خانواده CIPK در گیاه آلوروپوس شناسایی شد (جدول ۱). تمام ژن‌ها در دو پایگاه Pfam و InterProScan دارای دمین‌های NAF و KINASE به ترتیب به شماره دسترسی PF03822، PF00069 و IPR004041، IPR000719 بودند. در نرم‌افزار Prosite نیز در همه ژن‌های موردبررسی (به‌جز AlCIPK10.6) دمین‌های NAF و KINASE مشاهده شد. لازم به ذکر است برای پروتئین AlCIPK10.6 در نرم‌افزار Prosite، نمای شماتیکی از دمین NAF ارائه نشد. بررسی در سایت SMART نیز نشان داد تمام ژن‌ها دارای دمین S-TKc بودند. نام‌گذاری ژن‌های CIPK با توجه به همولوژی این توالی‌ها با ژن‌های اورتولوگ آرابیدوپسیس صورت گرفت. بدین‌صورت که ابتدا پیشوند Al به ابتدای هر ژن اضافه گردیده، در ادامه شماره هر ژن بر مبنای شماره ژن همولوگ آن در آرابیدوپسیس انتخاب شد. در صورت وجود بیش از یک ژن آلوروپوس برای هر ژن هومولوگ آرابیدوپسیس، شماره‌گذاری ورژن هر ژن بر اساس میزان همسانی[6] ژن‌ها به اورتولوگ‌شان در آرابیدوپسیس به ترتیب از یک انجام شد. ژن‌های Alg4127 و Alg7902 به ژن AT3G17510.1 (AtCIPK1) به ترتیب با درجه همسانی ٪۵۶/۳۹ و ٪۵۵/۵۳ شباهت داشتند که به ترتیب به‌صورت AlCIPK1.1 و AlCIPK1.2 نام‌گذاری شدند. ژن‌های Alg7566 و Alg12052 به ژن AT2G269.1 (AtCIPK3) به ترتیب با همسانی ۷۵/۵۱، ۷۰/۵۹ درصد، شباهت داشتند که به ترتیب AlCIPK3.1 و AlCIPK3.2 نامیده شدند. ژن‌های Alg12300، Alg9524، Alg4701، Alg3308، Alg13906 و Alg9805 به ژن AT5G58380.1 (AtCIPK10) به ترتیب با همسانی ۶۱/۱۴، ۵۹/۸۷، ۵۸/۷۶، ۵۸/۷۲، ۵۶/۲۶ و ۴۹/۴۵ درصد، تشابه داشتند که به ترتیب از AlCIPK10.1 الی AlCIPK10.6 نام‌گذاری و نهایتا ژن Alg8115، Alg10559 وAlg11449 به AT4G18700.1 (AtCIPK12)) به ترتیب با درجه همسانی ۶۵/۴۸، ۵۹/۰۲، ۵۱/۲۷ درصد، شباهت داشتند که به‌ترتیب AlCIPK12.1 الی AlCIPK12.3 نامگذاری شدند. ژن Alg15044 به ژن AT4G14580.1 (AtCIPK4) آرابیدوپسیس با همسانی ٪۵۰/۴۷، ژن Alg5583 به ژن AT5G10930.1 (AtCIPK5) آرابیدوپسیس با همسانی ٪۵۴/۸۸، ژن Alg2698 به ژن AT2G30360.1 (AtCIPK11) آرابیدوپسیس با همسانی ٪۴۵/۶۵، ژن Alg11347 به ژن AT5G45820.1 (AtCIPK20) آرابیدوپسیس با همسانی ٪۵۰/۴۷، ژن Alg8711 به ژن At5G57630.1 (AtCIPK21) آرابیدوپسیس با همسانی ٪۵۴/۸۸، ژن Alg1003 به ژن AT1G30270.1 (AtCIPK23) آرابیدوپسیس با همسانی ٪۸۱/۴۶ و ژن Alg7179 به ژن AT5G21326.1 (AtCIPK26) آرابیدوپسیس با همسانی ٪۷۱/۶۶ دارای همولوژی بودند که به ترتیب به AlCIPK4، AlCIPK5، AlCIPK11، AlCIPK20، AlCIPK21، AlCIPK23 و AlCIPK26 نام‌گذاری شدند.

بررسی منابع نشان می‌دهد تعداد ژن‌های شناسایی‌شده CIPK در گیاهان دیگر نظیر آرابیدوپسیس (Kolukisaoglu et al., 2004)، برنج (Zhang et al., 2014)، ارزن دم‌روباهی (Zhao et al., 2019)، کازاوا (W. Hu et al., 2015) و نیشکر وحشی (Su et al., 2020) به ترتیب ۲۶، ۳۴، ۳۵ و ۴۸ متغیر است (Yin et al., 2017).

[6] Identity

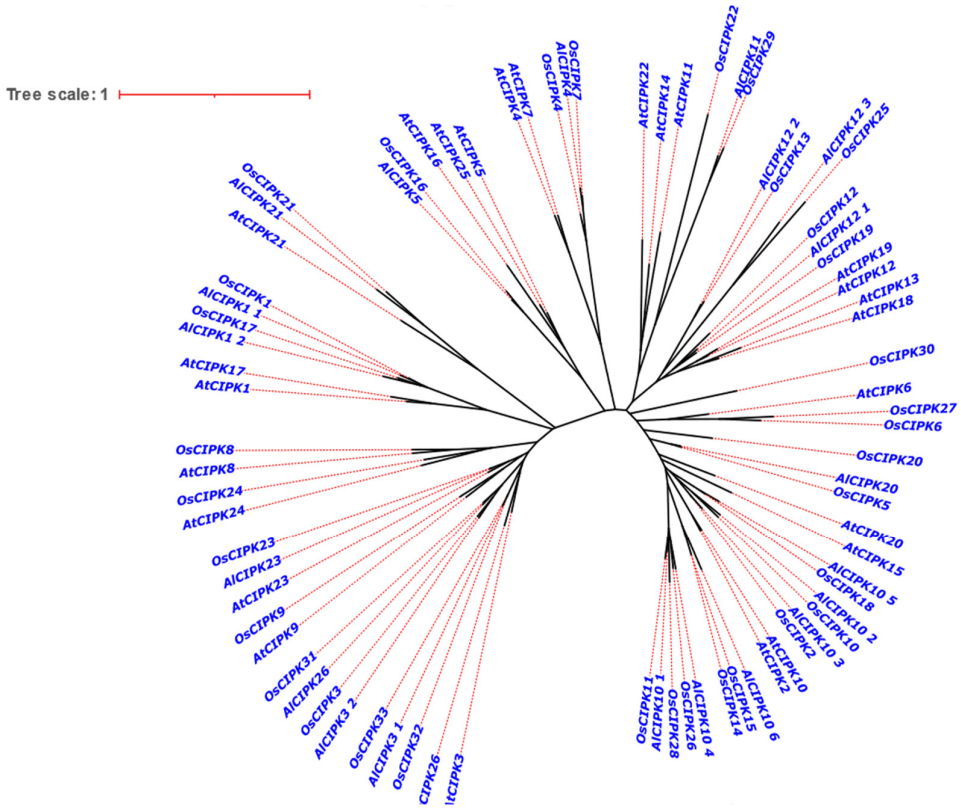
بررسی روابط فیلوژنتیکی خانواده ژنی *AlCIPK*، *AtCIPK* و *OsCIPK*

برای تعیین منشأ تکاملی AlCIPKها، درخت فیلوژنتیکی AlCIPKهای آلوروپوس با دیگر گونه‌ها یعنی آرابیدوپسیس (۲۶ پروتئین) و برنج (۳۳ پروتئین) با استفاده از نرم‌افزار ClustalW 2.0 و MEGA 6.0 بر اساس توالی‌های پروتئینی (پروتئین‌هایی با طول کامل) صورت گرفت. همان‌گونه که در شکل ۱ نشان داده شده، تقریباً تمام ژن‌های همولوگ سه گونه موردبررسی، در کنار هم و در درون زیرگروه‌های متمایز دسته‌بندی شدند که نشان‌دهنده‌ی روابط اورتولوژیک این ژن‌ها و مشابه بودن منشأ تکاملی این ژن‌هاست، مثلاً قرار گرفتن همه CIPK21ها در یک گروه.

جدول ۱. خصوصیات دمین‌های شناسایی‌شده در خانواده ژنی *AlCIPK*

Table 1. Characteristics of domains identified in the *AlCIPK* gene family.

اسم ژن Gene Name	همولوژی با آرابیدوپسیس تالیانا Homology parameter to Arabidopsis thaliana					سازمان‌دهی دمین Domain organization				
						Pfam			SMART (SM00220)	PROSITEE
	کد دسترسی Accession no.	کد دسترسی Accession no.	٪ همسانی Identity %	٪ همپوشانی %Coverage	مجموع امتیاز Total Score	PF02149 KA	PF03822 Naf	PF00069 PKinase	Ps50816	(PS50011)
AlCIPK1.1	Alg4127	AT3G17510.1	56.39%	94%	507					
AlCIPK1.2	Alg7902	AT3G17510.1	55.53%	90%	473					
AlCIPK3.1	Alg7566	AT2G26980.4	75.51%	98%	701					
ALCIPK3.2	Alg12052	AT2G26980.4	70.59%	94%	655					
AlCIPK4	Alg15044	AT4G14580.1	50.47%	97%	404					
AlCIPK5	Alg5583	AT5G10930.1	54.88%	95%	507					
AlCIPK10.1	Alg12300	AT5G58380.1	61.14%	%84	594					
ALCIPK10.2	Alg9524	AT5G58380.1	59.87%	100%	572					
AlCIPK10.3	Alg4701	AT5G58380.1	58.76%	%97	545					
AlCIPK10.4	Alg3308	AT5G58380.1	58.72%	%91	581					
AlCIPK10.5	Alg13906	AT5G58380.1	56.26%	%95	499					
AlCIPK10.6	ALg9805	AT5G58380.1	49.45%	%98	432					
AlCIPK11	Alg2698	AT2G30360.1	45.65%	95%	365					
AlCIPK12.1	Alg8115	AT4G18700.1	65.48%	92%	652					
AlCIPK12.2	Alg10559	AT4G18700.1	59.02%	94%	583					
AlCIPK12.3	Alg11449	AT4G18700.1	51.27%	96%	478					
AlCIPK20	Alg11347	AT5G45820.1	64.79%	96%	599					
AlCIPK21	Alg8711	AT5G57630.1	53.63%	95%	434					
AlCIPK23	Alg1003	AT1G30270.1	81.46%	94%	740					
AllCIPK26	Alg7179	AT5G21326.1	71.66%	96%	662					



شکل ۱. بررسی روابط فیلوژنتیکی پروتئین‌های CIPK (۷۹توالی پروتئینی) در گیاهان آلوروپوس، آرابیدوپسیس و برنج

Fig. 1. Investigation of phylogenetic relationships of CIPK proteins (79 protein sequences) in Aeluropus, Arabidopsis and rice

از منظر دیگر، تمام CIPKهای سه گونه موردبررسی را می‌توان به دو گروه اصلی تقسیم نمود (شکل ۱) که این دسته‌بندی فیلوژنتیکی همبستگی بالایی با دندروگرام رسم شده بر مبنای ساختار ژنی خانواده CIPKهای آلوروپوس نشان می‌دهد (شکل ۲) بر مبنای وجود تعداد زیاد اینترون یا عدم (یا تعداد کم) اینترون بوده است. همان‌گونه که در شکل ۱ مشخص است همه ژن‌های AlCIPK10.1، AlCIPK10.2، AlCIPK10.3، AlCIPK10.4، AlCIPK10.5، AlCIPK10.6، AlCIPK12.1، AlCIPK12.2، AlCIPK12.3، AlCIPK4، AlCIPK11، AlCIPK5، AlCIPK20 و اوتولوگ آن‌ها در آرابیدوپسیس و برنج که در بخش راست دندروگرام قرار گرفتند اصطلاحاً کم-اینترون بودند درحالی‌که مابقی ژن‌هایی AlCIPK، AtCIPK و OsCIPK که در قسمت چپ دندروگرام قرار گرفتند حداقل از ۱۱ اینترون برخوردارند. بررسی روابط فیلوژنتیکی در نهاندانگان دولپه و تک‌لپه نظیر برنج، آرابیدوپسیس، ذرت، سورگوم و ارزن دم‌روباهی نشان می‌دهد که پروتئین‌های CIPK در این گونه‌ها را می‌توان بسته به تعداد اینترون بالا یا عدم وجود اینترون (تعداد کم) به دو گروه اصلی تقسیم نمود (Zhao et al., 2019) درحالی‌که در جلبک‌ها و خزه‌ها، این دسته‌بندی تنها به وجود CIPKهایی با تعداد بالای اینترون منحصر می‌شود. این موضوع نشان‌دهنده بالا بودن میزان ایجاد اینترون در دوره‌های اولیه تکامل گیاهان بوده است (W. Hu et al., 2015). به‌عبارت‌دیگر نحوه گروه‌بندی فیلوژنتیکی اعضای این خانواده ژنی و تطابق و ارتباط آن به وجود/ عدم اینترون در این ژن‌ها، خود تائید کننده این فرضیه بوده که این دو گروه پروتئینی احتمالاً قبل از انشقاق[۷] نهاندانگان و بازدانگان در ۳۰۰ میلیون سال پیش تکوین یافته‌اند (Bowe et al., 2000).

[7] Divergence

جدول ۲. خصوصیات فیزیکوشیمیایی پروتئین‌های CIPK در گیاه آلوروپوس لیتورالیس.

Table 2. Physicochemical properties of CIPK proteins in *A. littoralis*.

نام ژن Gene Name	طول پروتئین Protein length (aa)	تعداد اگزون Exon no.	تعداد اینترون Intron no.	وزن مولکولی Molecular weight (kDa)	شاخص ناپایداری instability index	شاخص آلیپاتیک Aliphatic index	نقطه ایزوالکتریک Isoelectric point	GRAVY	N-Myristoylation	palmitoylation
AlCIPK10.2	438	1	0	49.716	33.20	95.71	9.28	-0.260	5 MVDKGNILMQKY	-----
AlCIPK12.1	516	1	0	57.364	44.07	79.19	8.64	-0.341	-----	446 RRKDWRVCLEGTREG
AlCIPK26	448	14	13	50.437	29.56	86.43	8.40	-0.395	-----	-----
AlCIPK10.6	67	2	1	42.040X	3.42	6.35	8.99X	0.480	5 MECRGKILMERY	3 MECRGKILM
AlCIPK5	444	1	0	48.192X	2.98	7.21	.52X	0.054	9 ARGREADGGEPPRKL	449 PAAAILGCA
AlCIPK3.1	442	14	13	50.760	38.66	83.55	7.64	-0.460	-----	-----
AlCIPK23	449	14	13	50.510	36.84	86.19	9.16	-0.371	6 MSVAVGRTRVGRY	233 IFKADFSCPSWFSTS
AlCIPK11	433	1	0	47.398	39.14	89.24	8.95	-0.151	-----	-----
AlCIPK10.4	478	1	0	54.659	42.80	84.46	9.13	-0.514	10 DRRTILMGRYEIGRQ	-----
AlCIPK10.1	523	1	0	58.971	48.45	85.22	9.03	-0.503	3 MDGRRTILMD	-----
AlCIPK10.3	421	1	0	47.985X	2.48	4.73	9.03X	0.400	-----	207 IGKAEFKCPGWFSTD 425 KQQQQQSC
AlCIPK1.1	473	13	12	53.481X	46.07	9.62	6.52X	0.372	4 MVKGEAEAECT	10 KGEAEAECTRSSLLG 396 KLKVMKNCKSFKNPK
AlCIPK3.2	448	14	13	50.638	33.40	85.29	8.23	-0.407	-----	-----
AlCIPK10.5	410	2	1	45.994	35.30	88.68	8.93	-0.307	-----	317 KLEDVATCSKLTVKK
AlCIPK12.3	490	1	0	54.065	45.71	85.98	8.84	-0.254	-----	255 RLIRGLLCPDPARRI
AlCIPK1.2	454	12	11	50.693	36.53	93.19	6.62	-0.320	4 MVSGGKGELAL 5 MVSGGKGELALE 7 MVSGGKGELALEAA	-----
AlCIPK4	427	1	0	46.344	49.80	93.72	8.59	-0.115	-----	-----
AlCIPK21	430	14	13	48.541	35.57	89.09	6.21	-0.303	2 MGFTESVGK	-----
AlCIPK20	456	1	0	51.639	36.45	85.50	9.08	-0.422	-----	-----
AlCIPK12.2	515	1	0	57.476	44.04	79.57	8.06	-0.374	5 MASKGASNGGGR 9 ASKGASNGGGREAKK 10 SKGASNGGGREAKKP	-----

پایش ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی پروتئین‌ها در گیاه آلوروپوس

پایش ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی پروتئین‌ها می‌تواند در تعیین فرایندهای بیولوژیکی، کارکرد مولکولی و مکان‌نمایی[8] آن‌ها در سلول تأثیرگذار باشد. همان‌طور که در جدول ۲ دیده می‌شود ارزیابی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی در پروتئین‌های CIPK به آشکارسازی وزن مولکولی متغیر در محدودهٔ ۴۲ الی ۵۸/۹ کیلو دالتون، محدودهٔ pH ایزوالکتریک اسیدی، شاخص ناپایدار ۲۹تا ۴۹ درصد و شاخص آلیفاتیک ۷۹ تا ۹۵ منجر شد. پروتئین AlCIPK10.1 بیشترین وزن مولکولی و AlCIPK10.4 منفی‌ترین بار الکتریکی را دارد. بیشترین و کمترین شاخص آلیفاتیک به ترتیب AlCIPK10.2 و AlCIPK12.1 و بیشترین و کمترین شاخص ناپایداری به ترتیب به AlCIPK4 و AlCIPK26 تعلق داشت. شاخص آلیفاتیک حجم نسبی زنجیره آلیفاتیک در آمینواسیدهای آلانین، لوسین و گلیسین پروتئین است که اثر مثبتی بر افزایش مقاومت حرارتی پروتئین‌های کروی دارد (Jalili et al., 2019). طول پروتئین‌های این خانواده از ۳۸۳ (AlCIPK10.6) الی ۵۲۳ اسیدآمینه (AlCIPK10.1) و وزن مولکولی آن‌ها نیز از ۴۲ الی ۵۸/۹ کیلو دالتون متغیر بود. دامنه نقطه ایزوالکتریک این پروتئین‌ها از ۶/۲۱ در AlCIPK21 تا ۹/۲۸ در AlCIPK10.2 متغیر بود.

[8] Sub-cellular localization

کوچک‌ترین و بزرگ‌ترین اندازه پپتیدی که در گیاه آلوروپوس مشاهده‌شده به ترتیب به دو ژن AlCIPK10.6 و AlCCIPK10.1 تعلق داشت. در بررسی خصوصیات فیزیکوشیمیایی نیشکر وحشی (Su et al., 2020) نیز اندازه پلی‌پپتیدی ۱۰ ژن ScCIPK از ۳۶۹ (ScCIPK17) تا ۵۱۳ آمینواسید متغیر بود. MW پروتئین‌های ScCIPK نیز از ۴۱/۵۸ (ScCIPK17) تا ۵۷/۹۰ (ScCIPK15) کیلو دالتون متغیر بود. در ضمن PI اکثر پروتئین‌ها (۷ پروتئین) نیز اسیدی بود.

تغییرات پس از ترجمه

در سنسورهای پروتئینی کلسیم، تنظیمات پس از ترجمه میریستویلاسیون[9] و پالمیتوئیلاسیون[10] نقش مهمی در هدایت و تبادل پیام، مکان‌نمایی پروتئین‌ها و متابولیسم دارند (Mohanta et al., 2017). با بررسی توالی پروتئینی CIPK، موتیف‌های میریستویلاسیون و پالمیتوئیلاسیون در برخی از اعضای خانواده ژنی شناسایی شد. ژن‌های AlCIPK1.1، AlCIPK10.1، AlCIPK10.2، AlCIPK10.4، AlCIPK10.6، AlCIPK5، AlCIPK21 و AlCIPK23 دارای یک موتیف میریستویلاسیون می‌باشند و ژن‌های AlCIPK1.2 و AlCIPK12.2 دارای سه موتیف میریستویلاسیون می‌باشند. ژن‌های AlCIPK12.1، AlCIPK10.6، AlCIPK5، AlCIPK23، AlCIPK10.5، AlCIPK12.3 دارای یک موتیف پالمیتوئیلاسیون می‌باشند و دو ژن AlCIPK1.1 و AlCIPK10.3 دارای دو موتیف پالمیتوئیلاسیون هستند. ضمناً ژن‌های AlCIPK1.1، AlCIPK10.6، AlCIPK5 و AlCIPK23 دارای هر دو موتیف میریستویلاسیون و پالمیتوئیلاسیون هستند. در گیاه نیشکر وحشی تنها در پروتئین ScCIPK2، یک جایگاه پالمیتوئیلاسیون شناسایی شد درحالی‌که جایگاه میریستویلاسیون در پروتئین‌های ScCIPK17 و ScCIPK28 (یک جایگاه)، ScCIPK15 (دو جایگاه) و ScCIPK20 (چهار جایگاه) مشاهده شد (Su et al., 2020). با تنظیمات لیپیدی در قالب میریستویلاسیون و پالمیتوئیلاسیون (S-acylation) بر روی موتیف انتهای آمینی پروتئین‌های CIPK (موتیف MGCXXS / T)، امکان هدایت و مکان‌نمایی کمپلکس‌های CBL / CIPK در سلول میسر می‌شود (Zhang et al., 2014). ضمن اینکه در بسیاری از سیستم‌های بیولوژیکی، میریستویلاسیون باعث ایجاد تعاملات پروتئین-پروتئین یا پروتئین-غشا می‌شود (Kolukisaoglu et al., 2004). لازم به ذکر است میریستویلاسیون به‌عنوان یکی از تغییرات پس از ترجمه پروتئین، از ماهیت برگشت‌ناپذیر برخوردار بوده و در قارچ‌ها، یوکاریوت‌های عالی و ویروس‌ها مشاهده می‌شود. میریستویلاسیون علاوه بر اینکه نقشی حیاتی در شناسایی غشا و انتقال سیگنال پاسخ به تنش محیطی در گیاهان داشته، می‌تواند بر پایداری ساختاری پروتئین‌ها و همچنین توانایی آن‌ها در تعامل با غشاها یا دمین‌های آب‌گریز سایر پروتئین‌ها اثر نماید (Podell et al., 2004).

شناسایی موتیف‌های حفاظت‌شده پروتئین‌های AlCIPK

برای شناسایی موتیف‌های حفاظت‌شده و تعیین موقعیت این موتیف‌ها در دمین‌های KINAS,NAF، تمام پروتئین‌های CIPK آلوروپوس با استفاده از نرم‌افزار MEME مورد آنالیز قرار گرفتند (شکل ۲). تجزیه‌وتحلیل MEME با توجه به پارامترهای پیش‌فرض نرم‌افزار نشان داد که CaCIPKها دارای ۱۰ موتیف متفاوت حفاظت‌شده بوده که به‌صورت Motif-1 تا Motif-10 نام‌گذاری شده‌اند (شکل ۲- الف). نتایج نشان می‌دهد توزیع مکانی موتیف‌ها در پروتئین‌های موردبررسی، تقریباً یکسان بود (شکل ۲- ب). همه ۱۰ موتیف شناسایی‌شده، در پروتئین‌های AlCIPK3.1، AlCIPK3.2، AlCIPK10.1، AlCIPK10.2، AlCIPK10.4، AlCIPK20، AlCIPK23 و AlCIPK26 مشاهده شد درحالی‌که پروتئین‌های AlCIPK1.1، AlCIPK12.1، AlCIPK12.2 و AlCIPK12.3 دارای همه موتیف‌ها به‌جز موتیف ۱۰ بودند. پروتئین AlCIPK4، فاقد موتیف ۵ و پروتئین AlCIPK5، فاقد موتیف ۴ و پروتئین AlCIPK10.3 فاقد موتیف ۱ و پروتئین AlCIPK10.5 فاقد موتیف ۲ می‌باشند. در پروتئین AlCIPK1.2، موتیف‌های ۱۰ و ۳، در پروتئین AlCIPK11، موتیف‌های ۱۰ و ۶، در پروتئین AlCIPK10.6، موتیف‌های ۳ و ۸ و در پروتئین AlCIPK21، موتیف‌های ۱۰ و ۴ موجود نمی‌باشند. این نتیجه بیانگر این مطلب بوده که موتیف‌های اصلی

[9] N-myristoylation

[10] palmitolyation

(حفظ‌شده) نقش مهمی در عملکرد پروتئین‌های CIPK دارند.

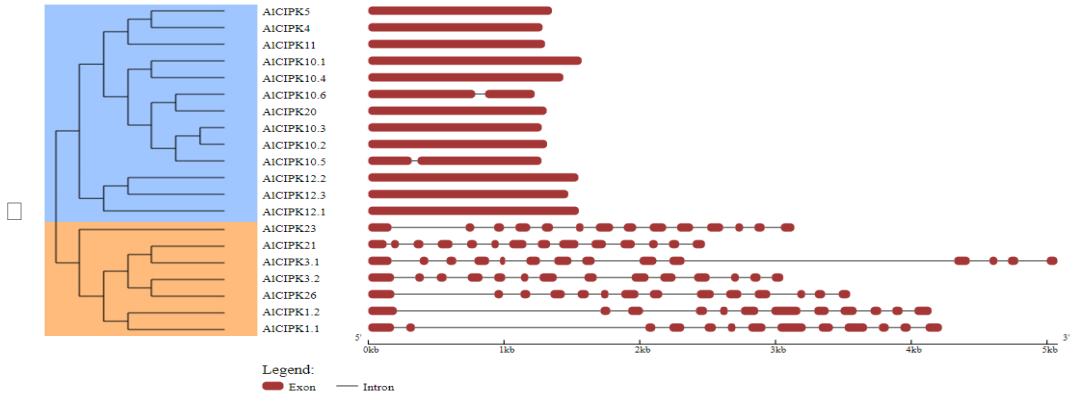
شناسایی ساختار ژنی و روابط فیلوژنتیکی

بر مبنای ترسیم درخت فیلوژنتیکی با استفاده از برنامه MEGA ۶,۰ به روش اتصال همسایه، همه CIPKها به دو خوشه بزرگ تقسیم و طبقه‌بندی‌شده به‌نحوی‌که تقریباً تمام AlCIPKهایی که فاقد اینترون یا دارای یک اینترون می‌باشند در گروه اول قرار گرفتند. درحالی‌که همه AlCIPK هایی که دارای اینترون زیاد هستند در گروه دوم جا گرفتند (شکل ۳). بررسی ساختار اگزون- اینترونی خانواده ژنی CIPK نشان می‌دهد که ۶۰ درصد ژن‌های CIPK آلوروپوس دارای یک اگزون و بدون اینترون، حدود ۲۰ درصد ژن‌ها دارای ۱۴ اگزون و ۱۳ اینترون و حدود ۱۰ درصد ژن‌ها دارای ۲ اگزون و ۱ اینترون، حدود ۵ درصد ژن‌ها دارای ۱۳ اگزون و ۱۲ اینترون و حدود ۵ درصد ژن‌ها دارای ۱۲ اگزون و ۱۱ اینترون هستند. طویل‌ترین طول ژن، مربوط به ژن AlCIPK3.1 و کوتاه‌ترین طول ژن، مربوط به AlCIPK10.6 است (جدول ۱). تجزیه‌وتحلیل ساختار اگزون/ اینترون در ارزن دم‌روباهی نیز نشان داد که ژن‌های SiCIPK نیز به‌طور مشخص به دو کلاستر یعنی کلاستر کم-اینترون[11] (<۳ اینترون در هر ژن) و کلاستر غنی-اینترون[12] (< ۱۰ اینترون در هر ژن) تقسیم شدند (Zhao et al., 2019). همان‌گونه که پیش‌تر اشاره‌شده این خصوصیت، ویژگی بارز خانواده ژنی CIPK در گیاهان است. مطابق نظر نوروزمن و همکاران (Nuruzzaman et al., 2010)، پس از مضاعف‌شدگی بخشی[13]، میزان از دست دادن اینترون سریع‌تر از میزان افزایش اینترون بوده، ازاین‌رو این احتمال وجود دارد که گروه I نشان‌دهنده ژن‌های اولیه خانواده CIPK باشد.

شکل ۲. آنالیز موتیف و جستجوی دمین در توالی‌های پروتئینی AlCIPK. (الف) نمایش موتیف لوگو توالی پروتئین‌های AlCIPK در برنامه MEME. اندازه هر اسیدآمینه، بیانگر فراوانی آن در دمین مربوطه است. (ب) نحوه توزیع موتیف‌های شناسایی‌شده در توالی پروتئینی.

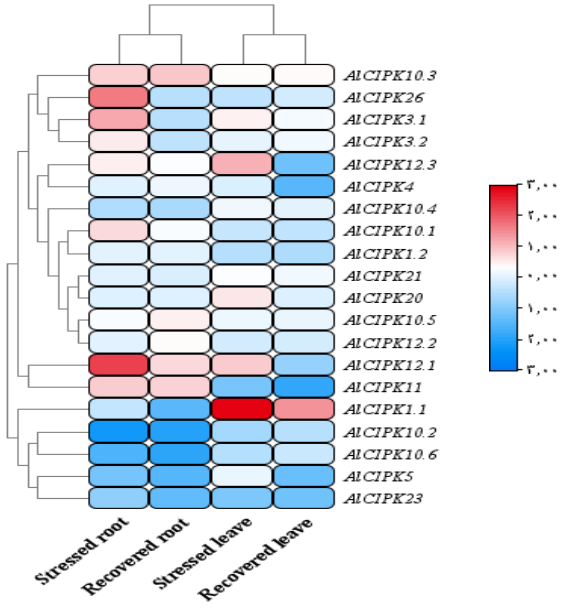
Fig. 2. Motif analysis and domain search in AlCIPK protein sequences. (A) Motif logo of AlCIPK protein in the MEME program. The size of each amino acid indicates its frequency in the respective domain. (B) the distribution of identified motifs in each protein sequence.

[11] Intron-poor
[12] Intron-rich
[13] Segmental duplication



شکل ۳. آنالیز ساختار ژنی و درخت فیلوژنتیکی اعضای خانواده *AlCIPK*

Fig. 3. Analysis of gene structure and phylogenetic tree of *AlCIPK* gene family



شکل ۴. نمایش Heatmap و خوشه‌بندی سلسله مراتبی خانواده ژنی *AlCIPK*.

Fig. 4. Heatmap and hierarchical clustering of the *AlCIPK* gene family.

آنالیز بیان اعضای خانواده ژنی AlCIPK و AtCIPK

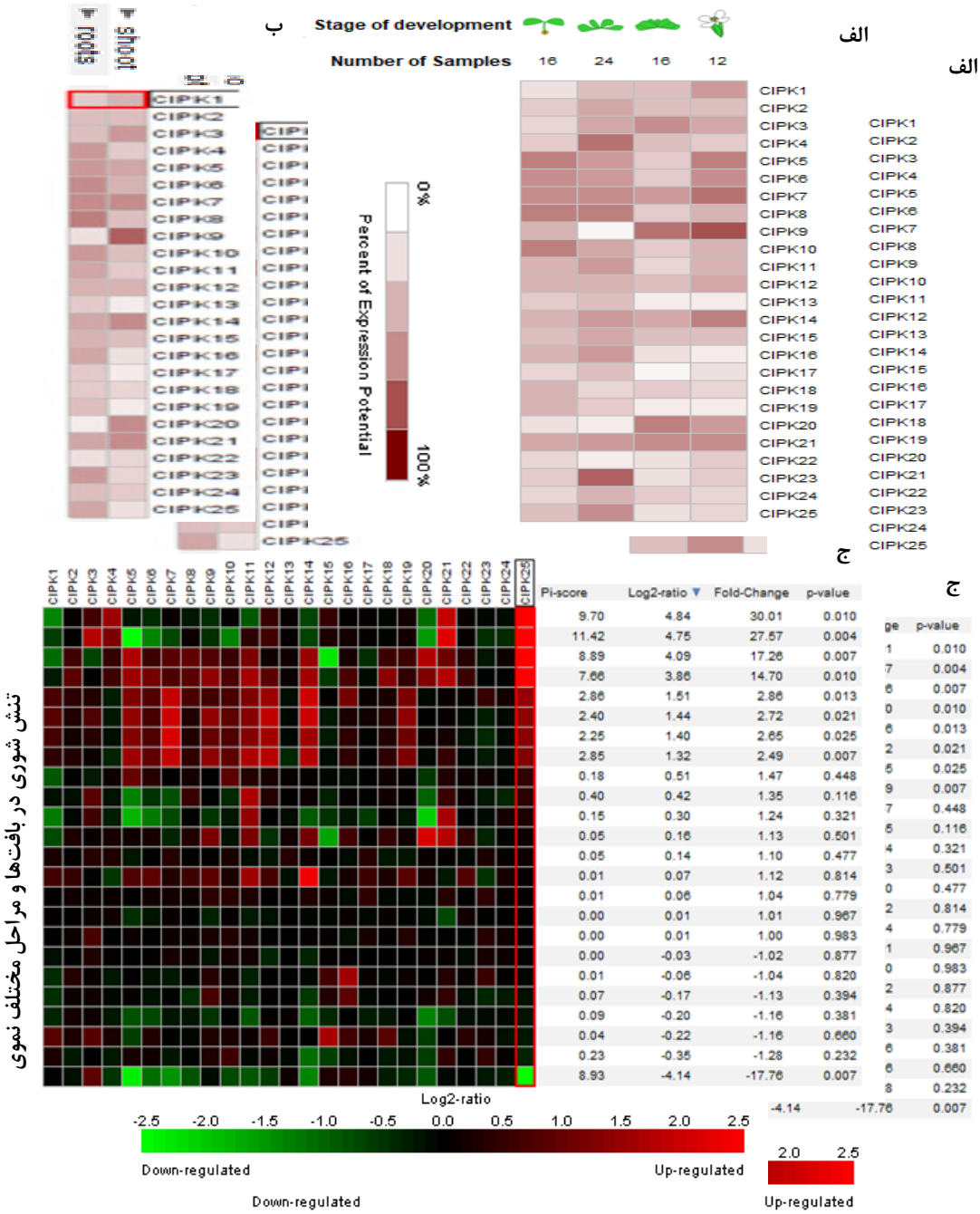
مطالعه پروفایل بیانی خانواده ژنی می‌تواند اطلاعات مهمی برای درک کارکرد آن‌ها فراهم آورد (Mao et al., 2012). در این تحقیق برای بررسی بیان ژن‌های AlCIPK در بافت‌های برگ و ریشه آلوروپوس در شرایط تنش شوری و بازیابی نیز از داده‌های تعیین‌توالی RNA استفاده‌شده و نمودار Heatmap این خانواده ژنی در مقیاس log2FC ترسیم شد (شکل ۴). الگوی پروفایل بیانی ژن‌های AlCIPK در دو بافت برگ و ریشه در تنش شوری و شرایط بازیابی متفاوت بود. در بافت برگ گیاه آلوروپوس و در تنش شوری، بیشترین بیان به ژن AlCIPK1.1 اختصاص داشت و کمترین بیان نیز در شرایط ریکاوری به ترتیب در ژن‌های AlCIPK11، AlCIPK4 و AlCIPK12.3 مشاهده شد. در بافت ریشه آلوروپوس، بیشترین بیان پس از یک هفته تنش شوری به ترتیب در ژن‌های AlCIPK12.1 و AlCIPK26 دیده شد. کمترین بیان در بافت ریشه در تنش شوری به ژن AlCIPK10.2 و در شرایط بازیابی به ژن‌های AlCIPK10.2 و AlCIPK10.6 اختصاص داشت. همان‌گونه که در شکل ۴ نشان داده شده است خوشه‌بندی اعضای خانواده ژنی AlCIPK در Heatmap تطابق کمی با خوشه‌بندی صورت گرفته بر مبنای روابط فیلوژنتیکی و ساختار ژنی داشت. از آنجائی که این خوشه‌بندی بر مبنای

عملکرد و تظاهر بیانی این ژن‌ها صورت گرفته می‌توان اشاره نمود که دستکم در تنش‌های موردبررسی همبستگی کمی بین ساختار پروتئینی و سطح بیان این ژن‌ها وجود دارد. تجزیه‌وتحلیل‌های بیوانفورماتیکی نشان می‌دهد تعاملات متمایز و درعین‌حال وابسته به تنش در میان این اعضای شبکه ژنی CBL-CIPK حاکم است (Evrard, 2013). شناسایی اولین مورد از تعاملات ژنی در قالب شبکه CBL-CIPK در فنوتیپ‌های فوق حساس به نمک (SOS) صورت گرفت بدین‌صورت که ژن AtCBL4 تحت عنوان SOS3 با تعامل با ژن AtCIPK24 تحت عنوان SOS2 تعامل دارد و این تعامل باعث فعال‌سازی کینازها در غشای پلاسمایی شده که به‌نوبه خود فعال‌سازی آنتی‌پورترهای Na^+/H^+ تحت عنوان SOS1 و H^+-ATPase واکوئلی را جهت افزایش تحمل به تنش در پی دارد (Yang et al., 2019; Ma et al., 2020). جهت بررسی پروفایل بیانی همولوگ‌های AtCIPK در آرابیدوپسیس نیز از داده‌های ریزآرایه چیپ افی‌ماتریکس ATH1 آرابیدوپسیس (ATLAS Niolabs GmbH, Berlin, Germany) استفاده شد. چیپ ATH1 یکی از غنی‌ترین آرایه‌های افی‌ماتریکس بوده که جهت بررسی بیان در سطح ترانسکریپتوم مورداستفاده قرار می‌گیرد، به‌نحوی‌که این آرایه امکان بررسی هم‌زمان ۲۲/۳۹۲ ژن منحصربه‌فرد را در تیمارهای موردبررسی فراهم می‌کند. بررسی بیان مقایسه‌ای ۲۵ عضو خانواده ژنی AtCBL در ۶۸ نمونه تحت تنش شوری با استفاده از نرم‌افزار genevestigator نشان داد (شکل ۵) که هر ۲۵ ژن موردبررسی در هر ۴ مرحله نموی در تمام شرایط اعم از کنترل و تنش از بیان قابل‌ملاحظه‌ای برخوردار بوده هرچند که شدت بیان در میان این ژن‌ها متفاوت بود (شکل ۵ - الف). در بررسی الگوی بیان این ژن‌ها در دو بافت ریشه و شاخساره نیز، الگوی بیان بافت- اختصاصی مشاهده شد ضمن اینکه رویکرد بیان اختصاصی متنوع اعضای این خانواده ژنی مشهود بود. هرچند اعضای این خانواده به لحاظ همولوژی توالی، از شباهت بالایی برخوردار می‌باشند ولی همان‌گونه که در شکل (۵-ج) مشاهده می‌شود از الگوی بیان متفاوتی در تنش‌های شوری برخوردارند. به نظر می‌رسد این تنوع بیان احتمالاً به دلیل وجود مکانیسم‌های تنظیمی متفاوت در تنظیمات بیان این ژن‌هاست. امروز آنالیز بیش بیان و بررسی موتانت‌های cbl و cipk کمک بسزایی در درک ما از عملکرد این ژن‌ها نموده است. در این تجزیه‌وتحلیل‌ها ثابت‌شده که این ژن‌ها در القا تحمل به تنش‌های مختلف در گیاهان از نقش کلیدی برخوردارند درنتیجه قادرند به گیاه حامل این ژن‌ها سازگاری به شرایط نامساعد محیطی اعطا نمایند.

تجزیه‌وتحلیل تکاملی همولوگ‌های ژنی در آلوروپوس، برنج و آرابیدوپسیس نشان‌دهنده یک رابطه نزدیک بین این گیاهان مدل تک‌لپه و دولپه بوده که با درک فعلی از نحوه تکامل این گیاهان همخوانی دارد. علاوه بر این، در کنار هم قرار گرفتن همولوگ‌های ژنی اورتولوگ CIPK به دلیل شباهت بالای توالی آن‌ها نشان می‌دهد که این ژن‌ها احتمالاً از نقش‌های عملکردی مشابهی در روند سازگاری یا تکاملشان برخوردار بودند. گزارش‌های متعددی از ژن‌های همولوگ اورتولوگ با عملکردهای مولکولی و بیولوژیکی مشابه در گیاهان وجود دارد. به‌عنوان‌مثال، هر یک از ژن‌های MdCIPK6L، MdSOS2، ZmCIPK16 و SiCIPK24 که اورتوگ ژن AtCIPK24 / AtSOS2 هستند، نظیر AtSOS2، در افزایش تحمل به نمک با مکانیسمی مشابه نقش دارند (Zhao et al., 2019).

ژن AtCIPK8 که اورتولوگ ژن MeCIPK8 بوده، در تنظیم پاسخ به نیترات نقش دارد (Mo et al., 2018). یا ژن AtCIPK21 که شباهت زیادی به ژن AlCIPK21 آلوروپوس دارد، نقش مثبتی در پاسخ به دو تنش اسمزی و نمکی ایفا می‌نماید (Pandey et al., 2015). داشتن عملکرد مشابه ژن‌های اوتولوگ در گونه‌های مختلف خود گویای این واقعیت بوده که ضمن پیش‌بینی نقش‌های احتمالی AlCIPK، سرنخی برای مطالعات عملکردی آینده ژن‌های AlCIPK در پاسخ به تنش را فراهم آورد.

تحمل بالقوه تنش‌های غیرزنده خصوصاً تنش شوری توسط آلوروپوس لیتورالیس، انگیزه اصلی بسیاری از محققین برای مطالعه مکانیسم‌های مولکولی در این گونه است (Fatemi et al., 2019; Hashemi-petroudi et al., 2020). در این تحقیق با توجه به در دسترس قرار گرفتن توالی ژنومی این گیاه، شناسایی اعضای خانواده ژنی AlCIPK و ارزیابی پاسخ‌های آن‌ها در برابر تنش شوری مدنظر قرار گرفت. در این مطالعه، ضمن شناسایی ۲۰ ژن CIPK در ژنوم آلوروپوس لیتورالیس، ساختار ژنی، دمین‌ها و موتیف‌ها محافظت‌شده و روابط تکاملی ژن‌های همولوگ مورد تجزیه‌وتحلیل قرار گرفت. همچنین پروفایل بیان ژن AlCIPKs تحت تنش شوری بررسی گردید. تجزیه‌وتحلیل



شکل ۵. بررسی پروفایل بیان خانواده ژنی *AtCIPK* در گیاه مدل آرابیدوپسیس با استفاده از نرم‌افزار Genevestigator. تجزیه‌وتحلیل بیان ریزآرایه ژن‌های *AtCIPK1* الی *AtCIPK25* (الف) در ۴ مرحله مختلف نموی، (ب) در ۲ بافت ریشه و شاخساره و (ج) در تنش‌های مختلف شوری.

Fig. 5. Investigation of *AtCIPK* gene family expression profile in Arabidopsis model plant using Genevestigator. Microarray expression analysis of *AtCIPK1* to *AtCIPK25* genes (a) in 4 different developmental stages, (b) root and shoot tissues, (c) in different salinity stresses

سیستماتیک اعضای این خانواده ژنی نشان داد که CIPKها در گونه هالوفیت آلوروپوس نیز همانند دیگر گونه‌های تک‌لپه و دولپه، ویژگی‌های کلیدی اعضای خانواده CIPK را دارا می‌باشند که احتمالاً از عوامل مهم در سازگاری و تحمل به

تنش این گونه به شمار می‌روند. نکته حائز اهمیت در این بررسی عدم شناسایی ژن‌های همولوگ AtCIPK24 در ژنوم آلوروپوس شناسایی بوده که خود بیانگر متفاوت بودن ساختار تنظیمی شبکه ژنی CBL-CIPK در این گیاه است که لزوم اجرای تحقیقات بیشتر در این زمینه را بیشتر می‌نماید. مطالعات تکمیلی بیان ژن‌های خانواده ژنی AlCBL و AlCIPK تحت تنش‌های غیرزیستی مختلف به روش RT-qPCR در تحقیقات آتی می‌تواند در درک مکانیسم تنظیمات بیان ژن‌های مرتبط با مسیر SOS مفید باشد. ژن‌های AlCIPK گزارش‌شده در این تحقیق ضمن ارائه اطلاعات اولیه، زمینه‌ای را برای شناسایی عملکردها و سازوکارهای پاسخ به تنش خصوصاً پاسخ‌های مرتبط با مسیر CBL / CIPK در گیاه آلوروپوس لیتورالیس فراهم می‌آورد.

سپاسگزاری

این پژوهش با حمایت پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری و از محل طرح تحقیقاتی مصوب حمایت از پایان‌نامه دانشجویی انجام شده است که بدین وسیله قدردانی می‌گردد.

منابع

Albrecht, V., Weinl, S., Blazevic, D., D'angelo, C., Batistic, O., Kolukisaoglu, Ü., Bock, R., Schulz, B., Harter, K., Kudla, J., 2003. The calcium sensor CBL1 integrates plant responses to abiotic stresses. The Plant Journal. 36, 457-470.

Armenteros, J.J.A., Tsirigos, K.D., Sønderby, C.K., Petersen, T.N., Winther, O., Brunak, S., Von Heijne, G., Nielsen, H., 2019. SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. Nature biotechnology. 37, 420-423.

Bailey, T.L., Boden, M., Buske, F.A., Frith, M., Grant, C.E., Clementi, L., Ren, J., Li, W.W., Noble, W.S., 2009. MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. Nucleic Acids Research. 37, 202-208.

Barhoumi, Z., Djebali, W., Smaoui, A., Chaïbi, W., Abdelly, C., 2007. Contribution of NaCl excretion to salt resistance of Aeluropus littoralis (Willd) Parl. Journal of Plant Physiology. 164, 842-850.

Ben-Saad, R., Ben-Ramdhan, W., Zouari, N., Azaza, J., Mieulet, D., Guiderdoni, E., Ellouz, R., Hassairi, A., 2012. Marker-free transgenic durum wheat cv. Karim expressing the AlSAP gene exhibits a high level of tolerance to salinity and dehydration stresses. Molecular Breeding. 30, 521-533.

Bowe, L.M., Coat, G., Depamphilis, C.W., 2000. Phylogeny of seed plants based on all three genomic compartments: extant gymnosperms are monophyletic and Gnetales' closest relatives are conifers. Proceedings of the National Academy of Sciences. 97, 4092-4097.

Dodd, A.N., Kudla, J., Sanders, D., 2010. The language of calcium signaling. Annual Review of Plant Biology. 61, 593-620.

El-Gebali, S., Mistry, J., Bateman, A., Eddy, S.R., Luciani, A., Potter, S.C., Qureshi, M., Richardson, L.J., Salazar, G.A., Smart, A., 2019. The Pfam protein families database in 2019. Nucleic acids research. 47, D427-D432.

Evrard, A., 2013. Cell type-specific transcriptional responses of plants to salinity Doctoral Thesis. Faculty of Sciences, the University of Adelaide and Montpellier SupAgro, USA.

Fatemi, F., Hashemi-Petroudi, S.H., Nematzadeh, G., Askari, H., Abdollahi, M.R., 2019. Exploiting differential gene expression to discover ionic and osmotic-associated transcripts in the halophyte grass Aeluropus littoralis. Biological Procedures Online. 21, 1-6.

Felsenstein, J., 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution. 39, 783-791.

Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Wilkins, M.R., Appel, R.D., Bairoch, A., 2005. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In: Walker, J.M. (ed.), The proteomics protocols handbook. Humana Press, New York, United States, pp. 571-607.

Hall, T., Biosciences, I., Carlsbad, C., 2011. BioEdit: an important software for molecular biology. GERF Bull Biosci. 2, 60-61.

Hashemi-Petroudi, S., Nematzadeh, G., Mohammadi, S., Kuhlmann, M., 2020. Expression pattern analysis of heat shock

transcription factors (HSFs) gene family in Aeluropus littoralis under salinity stress. Environmental Stresses in Crop Sciences. 13(2), 571-81. [In Persian with English summary].

Hashemi-Petroudi, S.H., Mohammadi, S., 2020. Identification of the ERF gene family in Aeluropus littoralis halophyte plant and analysis of their expression pattern in response to salt stress. Crop Biotechnology. 9, 53-66. [In Persian with English summary].

Hashemi-Petroudi, S.H., Nematzadeh, G., Kuhlmann, M., 2019. Identification and analysis of a DEVIL paralog gene cluster in Aeluropus littoralis by a comparative genomic approach. Crop Biotechnology. 9, 75-87. [In Persian with English summary].

Hashemi, S.H., Arab, M., Dolatabadi, B., Kuo, Y.-T., Baez, M.A., Himmelbach, A., Nematzadeh, G., Maibody, S.a.M.M., Schmutzer, T., Mälzer, M., 2022. Initial Description of the Genome of *Aeluropus Littoralis*, a Halophile Grass. Frontiers in Plant Science. 13, 906462

Horton, P., Park, K.-J., Obayashi, T., Fujita, N., Harada, H., Adams-Collier, C., Nakai, K., 2007. WoLF PSORT: protein localization predictor. Nucleic Acids Research. 35, 585-587.

Hu, B., Jin, J., Guo, A.-Y., Zhang, H., Luo, J., Gao, G., 2014. GSDS 2.0: an upgraded gene feature visualization server. Bioinformatics. 31, 1296-1297.

Hu, W., Xia, Z., Yan, Y., Ding, Z., Tie, W., Wang, L., Zou, M., Wei, Y., Lu, C., Hou, X., 2015. Genome-wide gene phylogeny of CIPK family in cassava and expression analysis of partial drought-induced genes. Frontiers in Plant Science. 6, 914.

Hulo, N., Bairoch, A., Bulliard, V., Cerutti, L., De Castro, E., Langendijk-Genevaux, P.S., Pagni, M., Sigrist, C.J., 2006. The PROSITE database. Nucleic Acids Research. 34(suppl_1), D227-D230.

Jalili, M.M., Haddad, M.A., Housaindokht, M.R., 2019. Biocomputational investigations of dtructural and functional properties of cry proteins for malaria biocontrol. Biological Journal of Microorganism. 8(29), 25-40.

Ji, H., Pardo, J.M., Batelli, G., Van Oosten, M.J., Bressan, R.A., Li, X., 2013. The Salt Overly Sensitive (SOS) pathway: established and emerging roles. Molecular plant. 6, 275-286.

Jones, P., Binns, D., Chang, H.-Y., Fraser, M., Li, W., Mcanulla, C., Mcwilliam, H., Maslen, J., Mitchell, A., Nuka, G., 2014. InterProScan 5: genome-scale protein function classification. Bioinformatics. 30, 1236-1240.

Kim, B.G., Waadt, R., Cheong, Y.H., Pandey, G.K., Dominguez-Solis, J.R., Schültke, S., Lee, S.C., Kudla, J., Luan, S., 2007. The calcium sensor CBL10 mediates salt tolerance by regulating ion homeostasis in Arabidopsis. The Plant Journal. 52, 473-484.

Kolukisaoglu, Ü., Weinl, S., Blazevic, D., Batistic, O., Kudla, J., 2004. Calcium sensors and their interacting protein kinases: genomics of the Arabidopsis and rice CBL-CIPK signaling networks. Plant Physiology. 134, 43-58.

Letunic, I., Bork, P., 2018. 20 years of the SMART protein domain annotation resource. Nucleic Acids Research. 46, D493-D496.

Li, J., Jiang, M.-M., Ren, L., Liu, Y., Chen, H.-Y., 2016. Identification and characterization of CBL and CIPK gene families in eggplant (*Solanum melongena* L.). Molecular Genetics and Genomics. 291, 1769-1781.

Ma, X., Gai, W.-X., Qiao, Y.-M., Ali, M., Wei, A.-M., Luo, D.-X., Li, Q.-H., Gong, Z.-H., 2019. Identification of CBL and CIPK gene families and functional characterization of CaCIPK1 under Phytophthora capsici in pepper (*Capsicum annuum* L.). BMC Genomics. 20, 775.

Ma, X., Li, Q.-H., Yu, Y.-N., Qiao, Y.-M., Gong, Z.-H., 2020. The CBL–CIPK Pathway in Plant Response to Stress Signals. International Journal of Molecular Sciences. 21, 5668.

Mao, D., Chen, C., 2012. Colinearity and similar expression pattern of rice DREB1s reveal their functional conservation in the cold-responsive pathway. PloS one. 7, e47275.

Mo, C., Wan, S., Xia, Y., Ren, N., Zhou, Y., Jiang, X., 2018. Expression patterns and identified protein-protein interactions suggest that cassava CBL-CIPK signal networks function in responses to abiotic stresses. Frontiers in Plant Science. 9, 269.

Mohanta, T.K., Kumar, P., Bae, H., 2017. Genomics and evolutionary aspect of calcium signaling event in calmodulin and calmodulin-like proteins in plants. BMC Plant Biology. 17, 38.

Monihan, S.M., Magness, C.A., Yadegari, R., Smith, S.E., Schumaker, K.S., 2016. Arabidopsis CALCINEURIN B-LIKE10 functions independently of the SOS pathway during reproductive development in saline conditions. Plant Physiology. 171, 369-379.

Nuruzzaman, M., Manimekalai, R., Sharoni, A.M., Satoh, K., Kondoh, H., Ooka, H., Kikuchi, S., 2010. Genome-wide analysis of NAC transcription factor family in rice. Gene. 465, 30-44.

Pandey, G.K., Kanwar, P., Singh, A., Steinhorst, L., Pandey, A., Yadav, A.K., Tokas, I., Sanyal, S.K., Kim, B.-G., Lee, S.-C., 2015. Calcineurin B-like protein-interacting protein kinase CIPK21 regulates osmotic and salt stress responses in Arabidopsis. Plant Physiology. 169, 780-792.

Podell, S., Gribskov, M., 2004. Predicting N-terminal myristoylation sites in plant proteins. BMC Genomics. 5, 37.

Scherf, U., Ross, D.T., Waltham, M., Smith, L.H., Lee, J.K., Tanabe, L., Kohn, K.W., Reinhold, W.C., Myers, T.G., Andrews, D.T., 2000. A gene expression database for the molecular pharmacology of cancer. Nature Genetic. 24, 236.

Shi, J., Kim, K.-N., Ritz, O., Albrecht, V., Gupta, R., Harter, K., Luan, S., Kudla, J., 1999. Novel protein kinases associated with calcineurin B–like calcium sensors in Arabidopsis. The Plant Cell. 11, 2393-2405.

Sigrist, C.J., De Castro, E., Cerutti, L., Cuche, B.A., Hulo, N., Bridge, A., Bougueleret, L., Xenarios, I., 2012. New and continuing developments at PROSITE. Nucleic Acids Research. 41, D344-D347.

Su, W., Ren, Y., Wang, D., Huang, L., Fu, X., Ling, H., Su, Y., Huang, N., Tang, H., Xu, L., 2020. New insights into the evolution and functional divergence of the CIPK gene family in Saccharum. BMC Genomics. 21, 1-20.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S., 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Molecular Biology and Evolution. 30, 2725-2729.

Yang, Y., Zhang, C., Tang, R.-J., Xu, H.-X., Lan, W.-Z., Zhao, F., Luan, S., 2019. Calcineurin B-Like proteins CBL4 and CBL10 mediate two independent salt tolerance pathways in Arabidopsis. International Journal of Molecular Sciences. 20, 2421.

Yin, X., Wang, Q., Chen, Q., Xiang, N., Yang, Y., Yang, Y., 2017. Genome-wide identification and functional analysis of the calcineurin B-like protein and calcineurin B-like protein-interacting protein kinase gene families in turnip (*Brassica rapa* var. rapa). Frontiers in Plant Science. 8, 1191.

Younesi-Melerdi, E., Nematzadeh, G., Pakdin-Parizi, A., 2020. Expression analysis of some genes involved in signaling networks of *Aeluropus littoralis* (Gouan) Parl. under salinity stress. Environmental Stresses in Crop Sciences. 13, 1259-1270. [In Persian with English summary].

Yu, Q., An, L., Li, W., 2014. The CBL–CIPK network mediates different signaling pathways in plants. Plant cell reports. 33, 203-214.

Zhang, H., Yang, B., Liu, W.-Z., Li, H., Wang, L., Wang, B., Deng, M., Liang, W., Deyholos, M.K., Jiang, Y.-Q., 2014. Identification and characterization of CBL and CIPK gene families in canola (*Brassica napus* L.). BMC Plant Biology. 14, 8.

Zhao, J., Yu, A., Du, Y., Wang, G., Li, Y., Zhao, G., Wang, X., Zhang, W., Cheng, K., Liu, X., 2019. Foxtail millet (*Setaria italica* L.) P. Beauv) CIPKs are responsive to ABA and abiotic stresses. Plos one. 14, e0225091.