

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

M. Arab¹, H. Najafi Zarrini², Gh. Nematzadeh³, 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



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

مژده عرب^۱، حمید نجفی زرینی^۲، قربانعلی نعمتزاده^۳، سید حمیدرضا هاشمی بطرودی^{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، ایران

۳. استاد گروه مهندسی ژنتیک و بیولوژی، پژوهشکده ژنتیک و زیستفناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ایران

۴. استادیار گروه مهندسی ژنتیک و بیولوژی، پژوهشکده ژنتیک و زیستفناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ایران

مشخصات مقاله	چکیده
واژه‌های کلیدی:	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 به عنوان مولکول‌های حسگر عمل نموده و با دریافت سیگنال‌های یون کلسیم سلولی، وظیفه هدایت پیام را به آبشارهای ژنی پایین دست بر عهده داردند. تحمل بالقوه تنش‌های غیرزندۀ خصوصاً تنش شوری و قربات آن به غلات، انگیزه اصلی بسیار از محققین برای مطالعه مکانیسم‌های مولکولی گونه هالوفیت <i>Aeluropus littoralis</i> است. در این تحقیق با توجه به در دسترس قرار گرفتن توالی ژنومی این گیاه، شناسایی این سیلیکو اعضای خانواده ژنی <i>AICIPK</i> و ارزیابی پاسخ‌های بیانی آن‌ها در برابر تنش شوری مدنظر قرار گرفت. بر مبنای همولوژی با ژن‌های آراییدوپسیس، ۲۰ ژن <i>CIPK</i> در ژنوم <i>A. littoralis</i> شد. تعزیز و تحلیل جانهایی پروتئین‌ها نشان داد که این پروتئین‌ها در بخش‌های مختلف سلولی فعال هستند. درخت فیلوزنیک بر مبنای توالی پروتئینی <i>AICIPK</i> ۲۰، <i>AtCIPK</i> ۲۶، <i>CIPK</i> ۲۲، <i>OsCIPK</i> ۷۹ نشان داد که <i>CIPK</i> موردنظری از رابطه ارتوپلوزنیکی قوی برخوردارند. آنالیز فیلوزنیکی بر اساس تعزیز و تحلیل ساختار اگزون / اینترون، همه <i>AICIPK</i> ‌ها را به دو گروه کم-اینترون و غنی-اینترون تقسیم نمودند. الگوهای بیان متمایز اعضای خانواده ژنی <i>AICIPK</i> انشقاق عملکردی و ساختاری این ژن‌ها را در طی تکامل تأثیرگذارد. 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.
تاریخ دریافت:	۱۳۹۹/۱۲/۱۱
تاریخ پذیرش:	۱۴۰۰/۰۱/۲۱
تاریخ انتشار:	۱۴۰۱/۱۲/۰۱
زمستان	۱۵(۴): ۱۰۰۵-۱۰۲۱

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 (Dodd et al., 2010). یکی از مهم‌ترین اعضای خانواده ژنی سنسورهای

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^۳ (SOS) و گونه‌های اکسیژن فعال^۴ (ROS) می‌شود که خود فعال شدن فاکتورهای رونویسی^۴ پاسخگو به تنش‌های 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 جلک 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. به عنوان نمونه می‌توان به مسیر ژنی SOS در آرابیدوپسیس اشاره نمود که در تحمل به تنش شوری نقش ایفا می‌نماید (Ji et al., 2013).

آرابیدوپس لیتورالیس (*Aeluropus littoralis*) گیاهی هالوفیت از تیره گندمیان (Poaceae) بوده که از سازگاری بالایی با محیط‌های شوره‌زار برخوردار است (Hasemi-Petroudi et al., 2019; Younesi-Melerdi et al., 2020). به عنوان یک گیاه مدل هالوفیت، *A. littoralis* است در شوری بیش از ۸۰۰ میلی‌مولار (NaCl) زنده مانده و به رشد و نمو خود ادامه دهد. این گیاه با تعداد کروموزوم ۲n = 2X = 20، از ژنومی کوچک (354 Mbp) برخوردار بوده که به عنوان یک منبع ژنتیکی غنی از ژن‌های متتحمل، 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 غیرزنده ای خصوصاً تنش شوری و خشکی فراهم گشته است. از آنجائی که تاکنون، هیچ تجزیه و تحلیل سیستماتیک از اعضای خانواده ژنی CIPK در گیاهان هالوفیت تکلیف گزارش نشده است. در این تحقیق، بررسی

کلسیم، کیناز پروتئین‌های تعامل‌کننده با CBL^۱ (CIPK) بوده که بسیاری از آن‌ها در پاسخ و سازگاری با تنش‌های Zhao et al., 2019 مختلف زیستی و غیرزنده ای نقش دارند (Zhang et al., 2014). شبکه CBL-CIPK نمونه مهمی از مسیر سیگنالینگ کلسیم در گیاهان است (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 AtCIPK24 (SOS2)، AtCBL4 (SOS3) و آنتی‌پورتر Na⁺/H⁺ (SOS1) مکان‌نمایی شده در غشاء پلاسمایی است. در القای تحمل به تنش شوری، ژن AtCIPK24 در تعامل با CBL‌ها عمل کرده، در حالی که CBL10 در مسیر ژنی مستقر در تونوپلاست توسط-SOS1 Kim et al., 2007; Monihan et al., 2016 در مسیر ژنی SOS1 اشاره نمود که در تحمل به تنش شوری نقش ایفا می‌نماید (CIPK24 SnRK3). CIPK متعلق به خانواده پروتئینی (et al., 2016) 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 (Ma et al., 2003; Albrecht et al., 2019). علاوه بر این دمین‌ها، در انتهای کربوکسیلی CIPK‌ها یک دمین تعامل پروتئین-فسفاتاز (PP2C) وجود داشته که نقش تعامل با پروتئین فسفاتاز (PP2C) را بر عهده دارد. از این تعامل موجود بین CIPK و CBL در سیستم رمزگذاری یون کلسیم، تحت عنوان شبکه CBL-CIPK یاد می‌شود (Ma et al., 2019).

در مطالعات پیشین نشان داده شده که شبکه CBL-CIPK در فرایند تنظیمی انتقال یون‌های سدیم (Na⁺), پتاسیم (K⁺), منیزیم (Mg²⁺) و نیترات (NO₃⁻) در غشاء پلاسمایی (PM) یا غشای واکوفولی (تونوپلاست) نقش دارد.

^۱. CBL-Interacting Protein Kinases

^۲. Salt Overly Sensitive

^۳. Reactive Oxygen Species

^۴. Transcription Factors

بررسی خصوصیات پروتئین و آنالیز ساختار ژنی با استفاده از ابزار ProtParam در سایت Expasy (<http://expasy.org/>) خواص فیزیکوشیمیابی پروتئین‌های CIPK مانند تعداد اسید‌آمینه، وزن مولکولی و نقطه ایزوالتکریک (<http://www.web.expasy.org/protparam/>) (Gasteiger et al., 2005) محاسبه شد (Gasteiger et al., 2005). موتیف‌های <http://meme-suite.org/tools/meme/> حفاظت‌شده در برنامه MEME با پارامترهای تعیین‌شده (انتخاب موتیف‌ها در این برنامه بدون توجه به دفعات تکرار، شناسایی حداکثر ۱۰ موتیف، E-value کمتر از ۰,۰۰۱ و کمترین و بیشترین طول موتیف‌ها به ترتیب ۶ و ۵۰ اسید‌آمینه) شناسایی شد (Bailey et al., 2009).

با استفاده از ابزار WoLF PSORT (<https://wolfpsort.hgc.jp/>) پیش‌بینی شد (Horton et al., 2007) شناسایی موتیف‌های palmitoylation و CSS-Myristoylation به ترتیب با استفاده از نرم‌افزار PlantsP و Palm ۳.۰ (http://mendel.imp.ac.at/myristate/SUPLpredicto_r.htm) صورت گرفت.

شناختار ژنی با استفاده از برنامه GSDS B. Hu et (2014) (انجام گرفت (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>)) و Expasy-Prosite (Sigrist et al., 2012). شناسایی و ترسیم شد (Armenteros et al., 2019) (SignalP 5.0 صورت گرفت) بر شبکه 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 S. Hashemi- (Petrooudi et al., 2020) با استفاده از داده‌های RNA-seq انجام شد. بهاین ترتیب 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 هیدرورپونیک فاقد نمک) صورت گرفت. آنالیز تفاوت بیان ژن‌ها به صورت Log2FC اجرا و پس از تشکیل ماتریس بیان ژن که حاوی ژن‌ها و سطح بیان آن‌ها

این سیلیکوسنسورهای کلسیم زیرخانواده CIPK، در این گونه شورپسند^۵ مورد بررسی قرار خواهد گرفت.

مواد و روش‌ها

شناسایی و بررسی روابط فیلوزنتیکی خانواده ژنی AICIPK

با توجه به تعیین‌توالی ژنوم کامل گیاه آلوروپوس لیتورالیس، توالی آن از پایگاه اطلاعاتی e!DAL (<https://edal.ipk-e!DAL.de/>) اخذ گردید. توالی پیتیدی اضافی خانواده ژنی CIPK در گیاهان آربیدوپسیس و برج ۰۰۰۱ و UniPort (<http://www.uniprot.org/>) پایگاه‌های NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>) دریافت شد. بدین ترتیب که با استفاده از ابزار جستجوی HMMER: (<http://hmmer.janelia.org/>) مبتنی بر مدل HMM local Hidden Markov ساخته شده از CIPK‌های شناخته شده، شناسایی ژن‌های CIPK در ژنوم آلوروپوس انجام شد. علاوه بر این، با استفاده از ابزار جستجوی tBLASTn Local Query و ژنوم آلوروپوس AtCIPK به عنوان tBLASTn Local Query و ژنوم آلوروپوس به عنوان AtCIPK subject، شناسایی و AlCIPK مجدداً به عنوان subject، شناسایی و AlCIPK مجدداً مورد بررسی قرار گرفت (Hall et al., 2011). ژن‌هایی که در بازک دمین CDD دارای هر دو دمین محافظت شده NAF و Pkinase بودند به عنوان ژن‌های (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd/>) برای آنالیزهای بعدی انتخاب گردیدند. مطالعات تکمیلی دمین‌های این خانواده ژنی نیز به ترتیب در پایگاه‌های InterProScan (El-Gebali et al., 2019) Pfam (Hulo et al., 2006) Prosite (Jones et al., 2014) و (Letunic et al., 2018) SMART هم‌رديفی چندگانه جهت شناسایی نقاط محافظت شده ژنی با استفاده از نرم‌افزار ClustalW انجام و درخت فیلوزنتیک آن‌ها بر اساس روش اتصال همسایه و با انجام آزمون بوتاسترپ (Felsenstein, 1985) با ۱۰۰۰ تکرار توسط Tamura et al. (2013) MEGA6 ترسیم شد.

^۵. Halophyte

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 Alg3308، Alg4701، Alg9524، Alg12300 AT5G58380.1 و Alg9805 به ژن Alg13906 (AtCIPK10) به ترتیب با همسانی ۶۱/۱۴، ۵۸/۷۶، ۵۹/۸۷ درصد، شباهت داشتند که به ترتیب از AlCIPK10.1 الی AlCIPK10.6 نامگذاری و نهایتاً ژن AT4G18700.1، Alg11449 و Alg10559 به ژن Alg8115 (AtCIPK12) به ترتیب با درجه همسانی ۵۹/۰۲، ۶۵/۴۸ درصد، شباهت داشتند که به ترتیب AlCIPK12.1 الی AlCIPK12.3 نامگذاری شدند. ژن Alg15044 به ژن AT4G14580.1 (AtCIPK4) آرابیدوپسیس با همسانی AT5G10930.1، Alg5583 به ژن Alg2698 (AtCIPK5) آرابیدوپسیس با همسانی ۵۰/۴۷٪، ۵۴/۸۸٪، ۵۴/۸۸٪ (AtCIPK11) AT2G30360.1 به ژن Alg11347 آرابیدوپسیس با همسانی AT5G45820.1 (AtCIPK20) آرابیدوپسیس با همسانی At5G57630.1، Alg8711 به ژن Alg1003 (AtCIPK23) آرابیدوپسیس با همسانی ۵۰/۴۷٪، ۵۴/۸۸٪، ۵۴/۸۸٪ (AtCIPK21) آرابیدوپسیس با همسانی ۸۱/۴۶٪ و ژن Alg7179 آرابیدوپسیس با همسانی AT5G21326.1 (AtCIPK26) آرابیدوپسیس با همسانی ۷۱/۶۶٪ دارای همولوژی بودند که به ترتیب به AlCIPK4، AlCIPK20، AlCIPK11، AlCIPK5، AlCIPK26 و AlCIPK23 نامگذاری شدند.

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

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

نتایج و بحث

شناسایی اعضای خانواده ژنی CIPK در گیاه آلو روپوس لیتوالیس

در بررسی گسترده ژنومی خانواده ژنی CIPK، آنالیز همولوژی بر مبنای پروتئین‌های خانواده CIPK گیاه آرابیدوپسیس با ژنوم آلو روپوس صورت گرفت که در ابتدا با حذف توالی‌های تکراری، ۲۵ جایگاه ژنی کاندید CIPK در ژنوم آلو روپوس شناسایی شد که برای اطمینان از وجود دمین‌های NAF و KINASE، توالی‌های شناسایی شده از SMART، InterProScan و Pfam پایگاه‌های ارزیابی گردید که نهایتاً ۲۰ ژن با توجه به دمین‌های شناسایی شده به عنوان اعضای خانواده CIPK در گیاه آلو روپوس شناسایی شد (جدول ۱). تمام ژن‌ها در دو پایگاه InterProScan و Pfam دارای دمین‌های NAF و PF03822 KINASE به ترتیب به شماره دسترسی IPR000719 و IPR004041 بودند. در نرمافزار Prosite نیز در همه ژن‌های موربدرسی (به جزء AlCIPK10.6) دمین‌های NAF و KINASE مشاهده شد. لازم به ذکر است برای پروتئین ATCIPK10.6 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. بدین صورت 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 آلو روپوس برای هر ژن همولوگ آرابیدوپسیس، شماره گذاری ورژن هر ژن بر اساس میزان همسانی^۶ 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 به صورت AlCIPK1.1 و

⁶ Identity

پروتئینی (پروتئین‌هایی با طول کامل) صورت گرفت. همان‌گونه که در شکل ۱ نشان داده شده، تقریباً تمام ژن‌های همولوگ سه گونه موردنبررسی، 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.

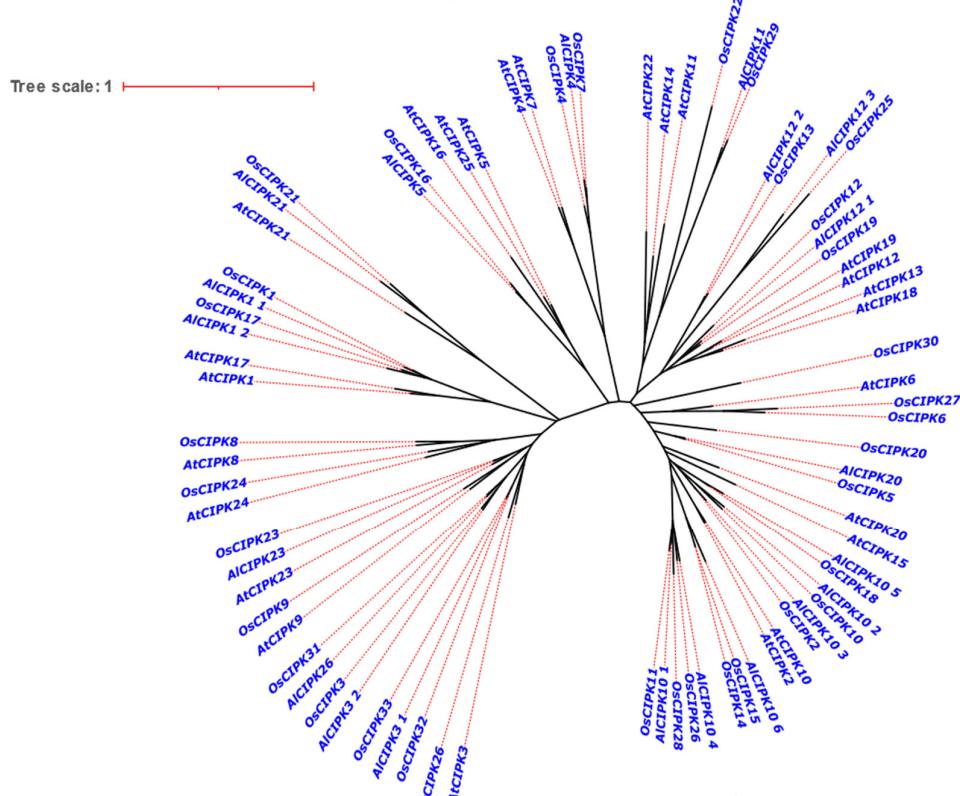
بررسی روابط فیلوجنتیکی خانواده ژنی *AICIPK*, *OsCIPK* و *AtCIPK*

برای تعیین منشأ تکاملی *AICIPK*‌ها، درخت فیلوجنتیکی *AICIPK*‌های آلوروپوس با دیگر گونه‌ها یعنی آرابیدوپسیس (۲۶ پروتئین) و برنج (۳۳ پروتئین) با استفاده از نرم‌افزار MEGA 6.0 و ClustalW 2.0

جدول ۱. خصوصیات دمین‌های شناسایی شده در خانواده ژنی *AICIPK*

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

Gene Name	Accession no.	Accession no.	Homology parameter to <i>Arabidopsis thaliana</i>			مجموع امتیاز Total Score	Pfam PF02149 KA	Pfam PF03822 Naf	Pfam PF00069 PKinase	سازمان‌دهی دمین Domain organization	
			کد دسترسي	اسم ژن	٪ همسانی Identity %					SMART (SM00220)	PROSITE (PS50011)
<i>AICIPK1.1</i>	Alg4127	AT3G17510.1	56.39%	94%	507						
<i>AICIPK1.2</i>	Alg7902	AT3G17510.1	55.53%	90%	473						
<i>AICIPK3.1</i>	Alg7566	AT2G26980.4	75.51%	98%	701						
<i>ALCIPK3.2</i>	Alg12052	AT2G26980.4	70.59%	94%	655						
<i>AICIPK4</i>	Alg15044	AT4G14580.1	50.47%	97%	404						
<i>AICIPK5</i>	Alg5583	AT5G10930.1	54.88%	95%	507						
<i>AICIPK10.1</i>	Alg12300	AT5G58380.1	61.14%	%84	594						
<i>ALCIPK10.2</i>	Alg9524	AT5G58380.1	59.87%	100%	572						
<i>AICIPK10.3</i>	Alg4701	AT5G58380.1	58.76%	%97	545						
<i>AICIPK10.4</i>	Alg3308	AT5G58380.1	58.72%	%91	581						
<i>AICIPK10.5</i>	Alg13906	AT5G58380.1	56.26%	%95	499						
<i>AICIPK10.6</i>	ALg9805	AT5G58380.1	49.45%	%98	432						
<i>AICIPK11</i>	Alg2698	AT2G30360.1	45.65%	95%	365						
<i>AICIPK12.1</i>	Alg8115	AT4G18700.1	65.48%	92%	652						
<i>AICIPK12.2</i>	Alg10559	AT4G18700.1	59.02%	94%	583						
<i>AICIPK12.3</i>	Alg11449	AT4G18700.1	51.27%	96%	478						
<i>AICIPK20</i>	Alg11347	AT5G45820.1	64.79%	96%	599						
<i>AICIPK21</i>	Alg8711	AT5G57630.1	53.63%	95%	434						
<i>AICIPK23</i>	Alg1003	AT1G30270.1	81.46%	94%	740						
<i>AICIPK26</i>	Alg7179	AT5G21326.1	71.66%	96%	662						



شکل ۱. بررسی روابط فیلوجنتیکی پروتئین‌های CIPK (۷۹ توالی پروتئین) در گیاهان آلو روپوس، آرابیدوپسیس و برنج

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

فیلوجنتیکی در نهاندانگان دولپه و تکله نظیر برنج، آرابیدوپسیس، ذرت، سورگوم و ارزن دمروبهای نشان می‌دهد که پروتئین‌های CIPK در این گونه‌ها را می‌توان بسته به تعداد اینترنون بالا یا عدم وجود اینترنون (تعداد کم) به دو گروه اصلی تقسیم نمود (Zhao et al., 2019) در حالی که در جلبک‌ها و خزه‌ها، این دسته‌بندی تنها به وجود CIPK‌های با تعداد بالای اینترنون منحصر می‌شود. این موضوع نشان‌دهنده بالا بودن میزان ایجاد اینترنون در دوره‌های اولیه (W. Hu et al., 2015) تکامل گیاهان بوده است (Bowe et al., 2000). به عبارت دیگر نحوه گروه‌بندی فیلوجنتیکی اعضای این خانواده ژنی و تطابق و ارتباط آن به وجود/عدم اینترنون 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.

از منظر دیگر، تمام CIPK‌های سه گونه مورد بررسی را می‌توان به دو گروه اصلی تقسیم نمود (شکل ۱) که این دسته‌بندی فیلوجنتیکی همبستگی بالایی با دندروگرام رسم شده بر مبنای ساختار ژنی خانواده CIPK‌های آلو روپوس نشان می‌دهد (شکل ۲) بر مبنای وجود تعداد زیاد اینترنون یا عدم (یا تعداد کم) اینترنون بوده است. همان‌گونه که در شکل ۱ مشخص است همه ژن‌های AlCIPK10.1, AlCIPK10.2, AlCIPK10.3, AlCIPK10.4, AlCIPK10.5, AlCIPK10.6, AlCIPK11, AlCIPK12.1, AlCIPK12.2, AlCIPK12.3, AlCIPK12.4, AlCIPK12.5, AlCIPK12.6, AlCIPK12.7, AlCIPK12.8, AlCIPK12.9, AlCIPK12.10, AlCIPK12.11, AlCIPK12.12, AlCIPK12.13, AlCIPK12.14, AlCIPK12.15, AlCIPK12.16, AlCIPK12.17, AlCIPK12.18, AlCIPK12.19, AlCIPK12.20, AlCIPK12.21, AlCIPK12.22, AlCIPK12.23, AlCIPK12.24, AlCIPK12.25, AlCIPK12.26, AlCIPK12.27, AlCIPK12.28, AlCIPK12.29, AlCIPK12.30, AlCIPK12.31, AlCIPK12.32, AlCIPK12.33, AlCIPK12.34, AlCIPK12.35, AlCIPK12.36, AlCIPK12.37, AlCIPK12.38, AlCIPK12.39, AlCIPK12.40, AlCIPK12.41, AlCIPK12.42, AlCIPK12.43, AlCIPK12.44, AlCIPK12.45, AlCIPK12.46, AlCIPK12.47, AlCIPK12.48, AlCIPK12.49, AlCIPK12.50, AlCIPK12.51, AlCIPK12.52, AlCIPK12.53, AlCIPK12.54, AlCIPK12.55, AlCIPK12.56, AlCIPK12.57, AlCIPK12.58, AlCIPK12.59, AlCIPK12.60, AlCIPK12.61, AlCIPK12.62, AlCIPK12.63, AlCIPK12.64, AlCIPK12.65, AlCIPK12.66, AlCIPK12.67, AlCIPK12.68, AlCIPK12.69, AlCIPK12.70, AlCIPK12.71, AlCIPK12.72, AlCIPK12.73, AlCIPK12.74, AlCIPK12.75, AlCIPK12.76, AlCIPK12.77, AlCIPK12.78, AlCIPK12.79, AlCIPK12.80, AlCIPK12.81, AlCIPK12.82, AlCIPK12.83, AlCIPK12.84, AlCIPK12.85, AlCIPK12.86, AlCIPK12.87, AlCIPK12.88, AlCIPK12.89, AlCIPK12.90, AlCIPK12.91, AlCIPK12.92, AlCIPK12.93, AlCIPK12.94, AlCIPK12.95, AlCIPK12.96, AlCIPK12.97, AlCIPK12.98, AlCIPK12.99, AlCIPK12.100, AlCIPK12.101, AlCIPK12.102, AlCIPK12.103, AlCIPK12.104, AlCIPK12.105, AlCIPK12.106, AlCIPK12.107, AlCIPK12.108, AlCIPK12.109, AlCIPK12.110, AlCIPK12.111, AlCIPK12.112, AlCIPK12.113, AlCIPK12.114, AlCIPK12.115, AlCIPK12.116, AlCIPK12.117, AlCIPK12.118, AlCIPK12.119, AlCIPK12.120, AlCIPK12.121, AlCIPK12.122, AlCIPK12.123, AlCIPK12.124, AlCIPK12.125, AlCIPK12.126, AlCIPK12.127, AlCIPK12.128, AlCIPK12.129, AlCIPK12.130, AlCIPK12.131, AlCIPK12.132, AlCIPK12.133, AlCIPK12.134, AlCIPK12.135, AlCIPK12.136, AlCIPK12.137, AlCIPK12.138, AlCIPK12.139, AlCIPK12.140, AlCIPK12.141, AlCIPK12.142, AlCIPK12.143, AlCIPK12.144, AlCIPK12.145, AlCIPK12.146, AlCIPK12.147, AlCIPK12.148, AlCIPK12.149, AlCIPK12.150, AlCIPK12.151, AlCIPK12.152, AlCIPK12.153, AlCIPK12.154, AlCIPK12.155, AlCIPK12.156, AlCIPK12.157, AlCIPK12.158, AlCIPK12.159, AlCIPK12.160, AlCIPK12.161, AlCIPK12.162, AlCIPK12.163, AlCIPK12.164, AlCIPK12.165, AlCIPK12.166, AlCIPK12.167, AlCIPK12.168, AlCIPK12.169, AlCIPK12.170, AlCIPK12.171, AlCIPK12.172, AlCIPK12.173, AlCIPK12.174, AlCIPK12.175, AlCIPK12.176, AlCIPK12.177, AlCIPK12.178, AlCIPK12.179, AlCIPK12.180, AlCIPK12.181, AlCIPK12.182, AlCIPK12.183, AlCIPK12.184, AlCIPK12.185, AlCIPK12.186, AlCIPK12.187, AlCIPK12.188, AlCIPK12.189, AlCIPK12.190, AlCIPK12.191, AlCIPK12.192, AlCIPK12.193, AlCIPK12.194, AlCIPK12.195, AlCIPK12.196, AlCIPK12.197, AlCIPK12.198, AlCIPK12.199, AlCIPK12.200, AlCIPK12.201, AlCIPK12.202, AlCIPK12.203, AlCIPK12.204, AlCIPK12.205, AlCIPK12.206, AlCIPK12.207, AlCIPK12.208, AlCIPK12.209, AlCIPK12.210, AlCIPK12.211, AlCIPK12.212, AlCIPK12.213, AlCIPK12.214, AlCIPK12.215, AlCIPK12.216, AlCIPK12.217, AlCIPK12.218, AlCIPK12.219, AlCIPK12.220, AlCIPK12.221, AlCIPK12.222, AlCIPK12.223, AlCIPK12.224, AlCIPK12.225, AlCIPK12.226, AlCIPK12.227, AlCIPK12.228, AlCIPK12.229, AlCIPK12.230, AlCIPK12.231, AlCIPK12.232, AlCIPK12.233, AlCIPK12.234, AlCIPK12.235, AlCIPK12.236, AlCIPK12.237, AlCIPK12.238, AlCIPK12.239, AlCIPK12.240, AlCIPK12.241, AlCIPK12.242, AlCIPK12.243, AlCIPK12.244, AlCIPK12.245, AlCIPK12.246, AlCIPK12.247, AlCIPK12.248, AlCIPK12.249, AlCIPK12.250, AlCIPK12.251, AlCIPK12.252, AlCIPK12.253, AlCIPK12.254, AlCIPK12.255, AlCIPK12.256, AlCIPK12.257, AlCIPK12.258, AlCIPK12.259, AlCIPK12.260, AlCIPK12.261, AlCIPK12.262, AlCIPK12.263, AlCIPK12.264, AlCIPK12.265, AlCIPK12.266, AlCIPK12.267, AlCIPK12.268, AlCIPK12.269, AlCIPK12.270, AlCIPK12.271, AlCIPK12.272, AlCIPK12.273, AlCIPK12.274, AlCIPK12.275, AlCIPK12.276, AlCIPK12.277, AlCIPK12.278, AlCIPK12.279, AlCIPK12.280, AlCIPK12.281, AlCIPK12.282, AlCIPK12.283, AlCIPK12.284, AlCIPK12.285, AlCIPK12.286, AlCIPK12.287, AlCIPK12.288, AlCIPK12.289, AlCIPK12.290, AlCIPK12.291, AlCIPK12.292, AlCIPK12.293, AlCIPK12.294, AlCIPK12.295, AlCIPK12.296, AlCIPK12.297, AlCIPK12.298, AlCIPK12.299, AlCIPK12.300, AlCIPK12.301, AlCIPK12.302, AlCIPK12.303, AlCIPK12.304, AlCIPK12.305, AlCIPK12.306, AlCIPK12.307, AlCIPK12.308, AlCIPK12.309, AlCIPK12.310, AlCIPK12.311, AlCIPK12.312, AlCIPK12.313, AlCIPK12.314, AlCIPK12.315, AlCIPK12.316, AlCIPK12.317, AlCIPK12.318, AlCIPK12.319, AlCIPK12.320, AlCIPK12.321, AlCIPK12.322, AlCIPK12.323, AlCIPK12.324, AlCIPK12.325, AlCIPK12.326, AlCIPK12.327, AlCIPK12.328, AlCIPK12.329, AlCIPK12.330, AlCIPK12.331, AlCIPK12.332, AlCIPK12.333, AlCIPK12.334, AlCIPK12.335, AlCIPK12.336, AlCIPK12.337, AlCIPK12.338, AlCIPK12.339, AlCIPK12.340, AlCIPK12.341, AlCIPK12.342, AlCIPK12.343, AlCIPK12.344, AlCIPK12.345, AlCIPK12.346, AlCIPK12.347, AlCIPK12.348, AlCIPK12.349, AlCIPK12.350, AlCIPK12.351, AlCIPK12.352, AlCIPK12.353, AlCIPK12.354, AlCIPK12.355, AlCIPK12.356, AlCIPK12.357, AlCIPK12.358, AlCIPK12.359, AlCIPK12.360, AlCIPK12.361, AlCIPK12.362, AlCIPK12.363, AlCIPK12.364, AlCIPK12.365, AlCIPK12.366, AlCIPK12.367, AlCIPK12.368, AlCIPK12.369, AlCIPK12.370, AlCIPK12.371, AlCIPK12.372, AlCIPK12.373, AlCIPK12.374, AlCIPK12.375, AlCIPK12.376, AlCIPK12.377, AlCIPK12.378, AlCIPK12.379, AlCIPK12.380, AlCIPK12.381, AlCIPK12.382, AlCIPK12.383, AlCIPK12.384, AlCIPK12.385, AlCIPK12.386, AlCIPK12.387, AlCIPK12.388, AlCIPK12.389, AlCIPK12.390, AlCIPK12.391, AlCIPK12.392, AlCIPK12.393, AlCIPK12.394, AlCIPK12.395, AlCIPK12.396, AlCIPK12.397, AlCIPK12.398, AlCIPK12.399, AlCIPK12.400, AlCIPK12.401, AlCIPK12.402, AlCIPK12.403, AlCIPK12.404, AlCIPK12.405, AlCIPK12.406, AlCIPK12.407, AlCIPK12.408, AlCIPK12.409, AlCIPK12.410, AlCIPK12.411, AlCIPK12.412, AlCIPK12.413, AlCIPK12.414, AlCIPK12.415, AlCIPK12.416, AlCIPK12.417, AlCIPK12.418, AlCIPK12.419, AlCIPK12.420, AlCIPK12.421, AlCIPK12.422, AlCIPK12.423, AlCIPK12.424, AlCIPK12.425, AlCIPK12.426, AlCIPK12.427, AlCIPK12.428, AlCIPK12.429, AlCIPK12.430, AlCIPK12.431, AlCIPK12.432, AlCIPK12.433, AlCIPK12.434, AlCIPK12.435, AlCIPK12.436, AlCIPK12.437, AlCIPK12.438, AlCIPK12.439, AlCIPK12.440, AlCIPK12.441, AlCIPK12.442, AlCIPK12.443, AlCIPK12.444, AlCIPK12.445, AlCIPK12.446, AlCIPK12.447, AlCIPK12.448, AlCIPK12.449, AlCIPK12.450, AlCIPK12.451, AlCIPK12.452, AlCIPK12.453, AlCIPK12.454, AlCIPK12.455, AlCIPK12.456, AlCIPK12.457, AlCIPK12.458, AlCIPK12.459, AlCIPK12.460, AlCIPK12.461, AlCIPK12.462, AlCIPK12.463, AlCIPK12.464, AlCIPK12.465, AlCIPK12.466, AlCIPK12.467, AlCIPK12.468, AlCIPK12.469, AlCIPK12.470, AlCIPK12.471, AlCIPK12.472, AlCIPK12.473, AlCIPK12.474, AlCIPK12.475, AlCIPK12.476, AlCIPK12.477, AlCIPK12.478, AlCIPK12.479, AlCIPK12.480, AlCIPK12.481, AlCIPK12.482, AlCIPK12.483, AlCIPK12.484, AlCIPK12.485, AlCIPK12.486, AlCIPK12.487, AlCIPK12.488, AlCIPK12.489, AlCIPK12.490, AlCIPK12.491, AlCIPK12.492, AlCIPK12.493, AlCIPK12.494, AlCIPK12.495, AlCIPK12.496, AlCIPK12.497, AlCIPK12.498, AlCIPK12.499, AlCIPK12.500, AlCIPK12.501, AlCIPK12.502, AlCIPK12.503, AlCIPK12.504, AlCIPK12.505, AlCIPK12.506, AlCIPK12.507, AlCIPK12.508, AlCIPK12.509, AlCIPK12.510, AlCIPK12.511, AlCIPK12.512, AlCIPK12.513, AlCIPK12.514, AlCIPK12.515, AlCIPK12.516, AlCIPK12.517, AlCIPK12.518, AlCIPK12.519, AlCIPK12.520, AlCIPK12.521, AlCIPK12.522, AlCIPK12.523, AlCIPK12.524, AlCIPK12.525, AlCIPK12.526, AlCIPK12.527, AlCIPK12.528, AlCIPK12.529, AlCIPK12.530, AlCIPK12.531, AlCIPK12.532, AlCIPK12.533, AlCIPK12.534, AlCIPK12.535, AlCIPK12.536, AlCIPK12.537, AlCIPK12.538, AlCIPK12.539, AlCIPK12.540, AlCIPK12.541, AlCIPK12.542, AlCIPK12.543, AlCIPK12.544, AlCIPK12.545, AlCIPK12.546, AlCIPK12.547, AlCIPK12.548, AlCIPK12.549, AlCIPK12.550, AlCIPK12.551, AlCIPK12.552, AlCIPK12.553, AlCIPK12.554, AlCIPK12.555, AlCIPK12.556, AlCIPK12.557, AlCIPK12.558, AlCIPK12.559, AlCIPK12.560, AlCIPK12.561, AlCIPK12.562, AlCIPK12.563, AlCIPK12.564, AlCIPK12.565, AlCIPK12.566, AlCIPK12.567, AlCIPK12.568, AlCIPK12.569, AlCIPK12.570, AlCIPK12.571, AlCIPK12.572, AlCIPK12.573, AlCIPK12.574, AlCIPK12.575, AlCIPK12.576, AlCIPK12.577, AlCIPK12.578, AlCIPK12.579, AlCIPK12.580, AlCIPK12.581, AlCIPK12.582, AlCIPK12.583, AlCIPK12.584, AlCIPK12.585, AlCIPK12.586, AlCIPK12.587, AlCIPK12.588, AlCIPK12.589, AlCIPK12.590, AlCIPK12.591, AlCIPK12.592, AlCIPK12.593, AlCIPK12.594, AlCIPK12.595, AlCIPK12.596, AlCIPK12.597, AlCIPK12.598, AlCIPK12.599, AlCIPK12.600, AlCIPK12.601, AlCIPK12.602, AlCIPK12.603, AlCIPK12.604, AlCIPK12.605, AlCIPK12.606, AlCIPK12.607, AlCIPK12.608, AlCIPK12.609, AlCIPK12.610, AlCIPK12.611, AlCIPK12.612, AlCIPK12.613, AlCIPK12.614, AlCIPK12.615, AlCIPK12.616, AlCIPK12.617, AlCIPK12.618, AlCIPK12.619, AlCIPK12.620, AlCIPK12.621, AlCIPK12.622, AlCIPK12.623, AlCIPK12.624, AlCIPK12.625, AlCIPK12.626, AlCIPK12.627, AlCIPK12.628, AlCIPK12.629, AlCIPK12.630, AlCIPK12.631, AlCIPK12.632, AlCIPK12.633, AlCIPK12.634, AlCIPK12.635, AlCIPK12.636, AlCIPK12.637, AlCIPK12.638, AlCIPK12.639, AlCIPK12.640, AlCIPK12.641, AlCIPK12.642, AlCIPK12.643, AlCIPK12.644, AlCIPK12.645, AlCIPK12.646, AlCIPK12.647, AlCIPK12.648, AlCIPK12.649, AlCIPK12.650, AlCIPK12.651, AlCIPK12.652, AlCIPK12.653, AlCIPK12.654, AlCIPK12.655, AlCIPK12.656, AlCIPK12.657, AlCIPK12.658, AlCIPK12.659, AlCIPK12.660, AlCIPK12.661, AlCIPK12.662, AlCIPK12.663, AlCIPK12.664, AlCIPK12.665, AlCIPK12.666, AlCIPK12.667, AlCIPK12.668, AlCIPK12.669, AlCIPK12.670, AlCIPK12.671, AlCIPK12.672, AlCIPK12.673, AlCIPK12.674, AlCIPK12.675, AlCIPK12.676, AlCIPK12.677, AlCIPK12.678, AlCIPK12.679, AlCIPK12.680, AlCIPK12.681, AlCIPK12.682, AlCIPK12.683, AlCIPK12.684, AlCIPK12.685, AlCIPK12.686, AlCIPK12.687, AlCIPK12.688, AlCIPK12.689, AlCIPK12.690, AlCIPK12.691, AlCIPK12.692, AlCIPK12.693, AlCIPK12.694, AlCIPK12.695, AlCIPK12.696, AlCIPK12.697, AlCIPK12.698, AlCIPK12.699, AlCIPK12.700, AlCIPK12.701, AlCIPK12.702, AlCIPK12.703, AlCIPK12.704, AlCIPK12.705, AlCIPK12.706, AlCIPK12.707, AlCIPK12.708, AlCIPK12.709, AlCIPK12.710, AlCIPK12.711, AlCIPK12.712, AlCIPK12.713, AlCIPK12.714, AlCIPK12.715, AlCIPK12.716, AlCIPK12.717, AlCIPK12.718, AlCIPK12.719, AlCIPK12.720, AlCIPK12.721, AlCIPK12.722, AlCIPK12.723, AlCIPK12.724, AlCIPK12.725, AlCIPK12.726, AlCIPK12.727, AlCIPK12.728, AlCIPK12.729, AlCIPK12.730, AlCIPK12.731, AlCIPK12.732, AlCIPK12.733, AlCIPK12.734, AlCIPK12.735, AlCIPK12.736, AlCIPK12.737, AlCIPK12.738, AlCIPK12.739, AlCIPK12.740, AlCIPK12.741, AlCIPK12.742, AlCIPK12.743, AlCIPK12.744, AlCIPK12.745, AlCIPK12.746, AlCIPK12.747, AlCIPK12.748, AlCIPK12.749, AlCIPK12.750, AlCIPK12.751, AlCIPK12.752, AlCIPK12.753, AlCIPK12.754, AlCIPK12.755, AlCIPK12.756, AlCIPK12.757, AlCIPK12.758, AlCIPK12.759, AlCIPK12.760, AlCIPK12.761, AlCIPK12.762, AlCIPK12.763, AlCIPK12.764, AlCIPK12.765, AlCIPK12.766, AlCIPK12.767, AlCIPK12.768, AlCIPK12.769, AlCIPK12.770, AlCIPK12.771, AlCIPK12.772, AlCIPK12.773, AlCIPK12.774, AlCIPK12.775, AlCIPK12.776, AlCIPK12.777, AlCIPK12.778, AlCIPK12.779, AlCIPK12.780, AlCIPK12.781, AlCIPK12.782, AlCIPK12.783, AlCIPK12.784, AlCIPK12.785, AlCIPK12.786, AlCIPK12.787, AlCIPK12.788, AlCIPK12.789, AlCIPK12.790, AlCIPK12.791, AlCIPK12.792, AlCIPK12.793, AlCIPK12.794, AlCIPK12.795, AlCIPK12.796, AlCIPK12.797, AlCIPK12.798, AlCIPK12.799, AlCIPK12.800, AlCIPK12.801, AlCIPK12.802, AlCIPK12.803, AlCIPK12.804, AlCIPK12.805, AlCIPK12.806, AlCIPK12.807, AlCIPK12.808, AlCIPK12.809, AlCIPK12.810, AlCIPK12.811, AlCIPK12.812, AlCIPK12.813, AlCIPK12.814, AlCIPK12.815, AlCIPK12.816, AlCIPK12.817, AlCIPK12.818, AlCIPK12.819, AlCIPK12.820, AlCIPK12.821, AlCIPK12.822, AlCIPK12.823, AlCIPK12.824, AlCIPK12.825, AlCIPK12.826, AlCIPK12.827, AlCIPK12.828, AlCIPK12.829, AlCIPK12.830, AlCIPK12.831, AlCIPK12.832, AlCIPK12.833, AlCIPK12.834, AlCIPK12.835, AlCIPK12.836, AlCIPK12.837, AlCIPK12.838, AlCIPK12.839, AlCIPK12.840, AlCIPK12.841, AlCIPK12.842, AlCIPK12.843, AlCIPK12.844, AlCIPK12.845, AlCIPK12.846, AlCIPK12.847, AlCIPK12.848, AlCIPK12.849, AlCIPK12.850, AlCIPK12.851, AlCIPK12.852, AlCIPK12.853, AlCIPK12.854, AlCIPK12.855, AlCIPK12.856, AlCIPK12.857, AlCIPK12.858, AlCIPK12.859, AlCIPK12.860, AlCIPK12.861, AlCIPK12.862, AlCIPK12.863, AlCIPK12.864, AlCIPK12.865, AlCIPK12.866, AlCIPK12.867, AlCIPK12.868, AlCIPK12.869, AlCIPK12.870, AlCIPK12.871, AlCIPK12.872, AlCIPK12.873, AlCIPK12.874, AlCIPK12.875, AlCIPK12.876, AlCIPK12.877, AlCIPK12.878, AlCIPK12.879, AlCIPK12.880, AlCIPK12.881, AlCIPK12.882, AlCIPK12.883, AlCIPK12.884, AlCIPK12.885, AlCIPK12.886, AlCIPK12.887, AlCIPK12.888, AlCIPK12.889, AlCIPK12.890, AlCIP

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

کمترین شاخص آلیفاتیک به ترتیب *AlCIPK10.2* و *AlCIPK12.1* و بیشترین و کمترین شاخص نایابداری به ترتیب *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 تا ۴۷۸ آ.ا. (al., 2019) می‌باشد. وزن مولکولی آن‌ها نیز از ۵۸/۹ کیلو دالتون تا ۵۲۳ اسید‌آمینه (*AlCIPK10.1*) و *AlCIPK10.6* (الی ۵۲۳ اسید‌آمینه) تا ۶/۲۱ در *AlCIPK21* بود. دامنه نقطه ایزواکتریک این پروتئین‌ها از ۹/۲۸ تا ۱۰ در *AlCIPK10.2* متغیر بود.

پایش ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی پروتئین‌ها در گیاه آلوروپوس

پایش ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی پروتئین‌ها می‌تواند در تعیین فرایندهای بیولوژیکی، کارکرد مولکولی و مکان‌نمایی^۸ آن‌ها در سلول تأثیرگذار باشد. همان‌طور که در جدول ۲ دیده می‌شود ارزیابی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی در پروتئین‌های CIPK به آشکارسازی وزن مولکولی متغیر در محدوده ۴۲ الی ۵۸/۹ کیلو دالتون، محدوده pH ایزاکتریک اسیدی، شاخص نایابدار ۴۹ تا ۲۹ درصد و شاخص آلیفاتیک ۹۵ تا ۷۹ منجر شد. پروتئین *AlCIPK10.1* بیشترین وزن مولکولی و *AlCIPK10.4* منفی‌ترین بار الکتریکی را دارد. بیشترین و

⁸ Sub-cellular localization

میسر می شود (Zhang et al., 2014). ضمن اینکه در بسیاری از سیستم های بیولوژیکی، میریستوپلاسیون باعث ایجاد تعاملات پروتئین-پروتئین یا پروتئین-غشا می شود (Kolukisaoglu et al., 2004). لازم به ذکر است میریستوپلاسیون به عنوان یکی از تغییرات پس از ترجمه پروتئین، از ماهیت برگشت ناپذیر برخوردار بوده و در قارچ ها، یوکاربوبت های عالی و وبروس ها مشاهده می شود. میریستوپلاسیون علاوه بر اینکه نقشی حیاتی در شناسایی غشا و انتقال سیگنال پاسخ به تنش محیطی در گیاهان داشته، می تواند بر پایداری ساختاری پروتئین ها و همچنین توانایی آن ها در تعامل با غشاها یا دمین های آب گریز سایر پروتئین ها اثر نماید (Podell et al., 2004).

شناسایی موتیف های حفاظت شده پروتئین های AlCIPK

برای شناسایی موتیف های حفاظت شده و تعیین موقعیت این موتیف ها در دمین های KINAS, NAF, CIPK آلو روپوس با استفاده از نرم افزار MEME مورد آنالیز قرار گرفتند (شکل ۲). تجزیه و تحلیل MEME با توجه به پارامتر های پیش فرض نرم افزار نشان داد که CaCIPK دارای ۱۰ موتیف متفاوت حفاظت شده بود که به صورت Motif-1 تا Motif-10 نام گذاری شده اند (شکل ۲-الف). نتایج نشان می دهد توزیع مکانی موتیف ها در پروتئین های شناسایی شده، در پروتئین های AlCIPK3.2, AlCIPK3.1, AlCIPK10.4, AlCIPK10.2, AlCIPK10.1, AlCIPK20, AlCIPK26, AlCIPK23, AlCIPK20, AlCIPK12.1, AlCIPK1.1, AlCIPK12.3, AlCIPK12.2, AlCIPK4 و AlCIPK5 موتیف ۱۰ بودند. پروتئین ۴, AlCIPK10.3, AlCIPK10.5, AlCIPK11, AlCIPK12.2, AlCIPK1.2, AlCIPK10.6, AlCIPK1.1, AlCIPK28 و AlCIPK17 در حالی که موتیف ۲ می باشند. در پروتئین های AlCIPK21, AlCIPK10.6, AlCIPK10.5, AlCIPK10.3, AlCIPK12.3, AlCIPK12.2, AlCIPK1.2, AlCIPK1.1, AlCIPK20, AlCIPK28 و AlCIPK17 (چهار جایگاه) مشاهده شد (Su et al., 2020). با تنظیمات لیپیدی در قالب میریستوپلاسیون و پالمیتوپلاسیون (S-acylation) بر روی موتیف انتهایی آمینی پروتئین های CIPK (موتیف MGCXXS / T / CIPK)، امکان هدایت و مکان نمایی کمپلکس های CBL / CIPK در سلول

کوچک ترین و بزرگ ترین اندازه پیتیدی که در گیاه آلو روپوس مشاهده شده به ترتیب به دو ژن AlCIPK10.6 و AlCCIPK10.1 تعلق داشت. در بررسی خصوصیات فیزیکوشیمیابی نیشکر و حشی (Su et al., 2020) نیز اندازه پلی پیتیدی ۱۰ ژن از ScCIPK17 (ScCIPK ۲۶۹) تا ۵۱۳ (ScCIPK17) ۱۰ ژن از ScCIPK (ScCIPK15) تا ۵۷/۹۰ (ScCIPK17) کیلو دالتون آمینو اسید متغیر بود. MW پروتئین های ScCIPK نیز از متغیر بود. در ضمن PI اکثر پروتئین ها (۷ پروتئین) نیز آسیدی بود.

تغییرات پس از ترجمه

در سنسورهای پروتئینی کلسیم، تنظیمات پس از ترجمه میریستوپلاسیون^۹ و پالمیتوپلاسیون^{۱۰} نقش مهمی در هدایت و تبادل پیام، مکان نمایی پروتئین ها و متابولیسم داردند (Mohanta et al., 2017). با بررسی توالی پروتئینی CIPK، موتیف های میریستوپلاسیون و پالمیتوپلاسیون در برخی از اعضای خانواده ژنی شناسایی شد. ژن های AlCIPK1.1, AlCIPK10.4, AlCIPK10.2, AlCIPK10.1, AlCIPK23, AlCIPK5, AlCIPK10.6, AlCIPK21, AlCIPK12.2, AlCIPK12.1, AlCIPK12.3, AlCIPK12.2, AlCIPK1.2, AlCIPK1.1, AlCIPK10.3, AlCIPK10.6, AlCIPK1.1, AlCIPK23, AlCIPK28 و AlCIPK17 دارای یک موتیف میریستوپلاسیون می باشند و ژن های AlCIPK12.1, AlCIPK5, AlCIPK10.6, AlCIPK1.1, AlCIPK10.3, AlCIPK10.6, AlCIPK1.1, AlCIPK23, AlCIPK28 و AlCIPK17 دارای دو موتیف پالمیتوپلاسیون هستند. ضمناً ژن های AlCIPK5, AlCIPK10.6, AlCIPK1.1, AlCIPK23, AlCIPK28 و AlCIPK17 دارای هر دو موتیف میریستوپلاسیون و پالمیتوپلاسیون هستند. در گیاه نیشکر و حشی تنها در ScCIPK2، یک جایگاه پالمیتوپلاسیون شناسایی شد در حالی که جایگاه میریستوپلاسیون در پروتئین های ScCIPK15 (یک جایگاه)، ScCIPK28 و ScCIPK17 (چهار جایگاه) مشاهده شد (Su et al., 2020). با تنظیمات لیپیدی در قالب میریستوپلاسیون و پالمیتوپلاسیون (S-acylation) بر روی موتیف انتهایی آمینی پروتئین های CIPK (موتیف MGCXXS / T / CIPK)، امکان هدایت و مکان نمایی کمپلکس های CBL / CIPK در سلول

^{۱۰} palmitoylation

^۹ N-myristylation

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. طول‌ترین طول ژن، مربوط به ژن AlCIPK3.1 و کوتاه‌ترین طول ژن، مربوط به AlCIPK10.6 است (جدول ۱). تجزیه و تحلیل ساختار اگزون/ اینترون در ارزش دمروباھی نیز نشان داد که ژن‌های ScCIPK نیز به طور مشخص به دو کلاستر یعنی کلاستر کم- اینترون^{۱۱} (>3 اینترون در هر ژن) و کلاستر غنی- اینترون^{۱۲} (<10 اینترون در هر ژن) تقسیم شدند (Zhao et al., 2019). همان‌گونه که پیش‌تر اشاره شده این خصوصیت، ویژگی بارز خانواده ژنی CIPK در گیاهان است. مطابق نظر نوروزمن و همکاران (Nuruzzaman et al., 2010)، پس از مضاعف‌شدنگی بخشی^{۱۳}، میزان از دست دادن اینترون سریع‌تر از میزان افزایش اینترون بوده، ازین‌رو این احتمال وجود دارد که گروه I نشان‌دهنده ژن‌های اولیه خانواده CIPK باشد.

(حفظشده) نقش مهمی در عملکرد پروتئین‌های CIPK دارد.

شناسایی ساختار ژنی و روابط فیلوجنتیکی

بر مبنای ترسیم درخت فیلوجنتیکی با استفاده از برنامه MEGA به روش اتصال همسایه، همه CIPK‌ها به دو خوشه بزرگ تقسیم و طبقه‌بندی شده بهنحوی که تقریباً تمام AlCIPK‌هایی که فاقد اینترون یا دارای یک اینترون AlCIPK می‌باشند در گروه اول قرار گرفتند. در حالی که همه CIPK‌هایی 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



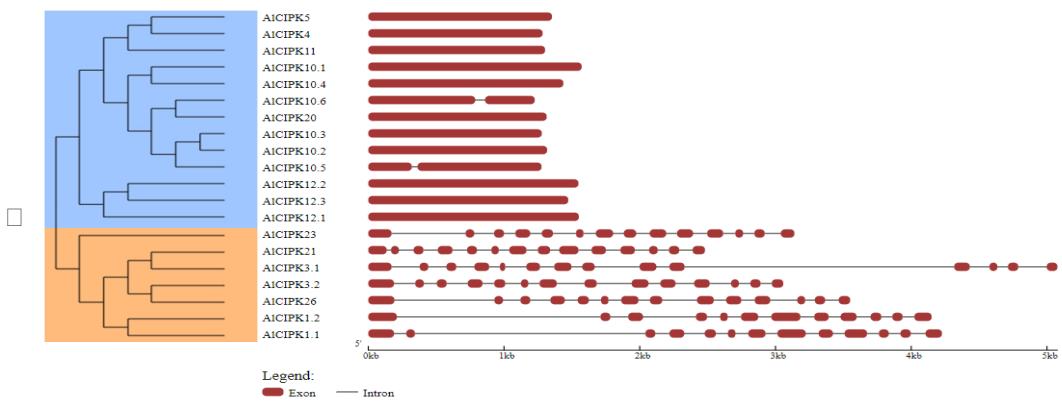
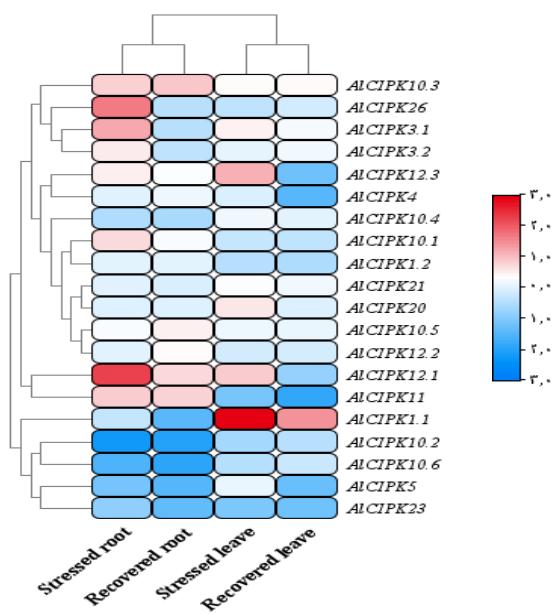
شکل ۲. آنالیز موتیف و جستجوی دمین در توالی‌های پروتئینی AlCIPK. (الف) نمایش موتیف لوگو توالی پروتئین‌های AlCIPK در برنامه MEME. اندازه هر اسید‌آمینه، بیانگر فراوانی آن در دمین مربوطه است. (ب) نحوه توزیع موتیف‌های شناسایی شده در توالی پروتئینی.

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.

¹³ Segmental duplication

¹¹ Intron-poor

¹² Intron-rich

شکل ۳. آنالیز ساختار ژنی و درخت فیلوجنتیکی اعضای خانواده *AlCIPK*Fig. 3. Analysis of gene structure and phylogenetic tree of *AlCIPK* gene familyشکل ۴. نمایش Heatmap و خوشبندی سلسله مراتبی خانواده ژنی *AlCIPK*Fig. 4. Heatmap and hierarchical clustering of the *AlCIPK* gene family.

کمترین بیان نیز در شرایط ریکاوری به ترتیب در ژن‌های AlCIPK4، AlCIPK11 و AlCIPK12.3 بافت ریشه آلوروپوس، بیشترین بیان پس از یک هفته تنش شوری به ترتیب در ژن‌های AlCIPK26 و AlCIPK12.1 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 است خوشبندی اعضای خانواده ژنی *AlCIPK* در Heatmap تطابق کمی با خوشبندی صورت گرفته بر مبنای روابط فیلوجنتیکی و ساختار ژنی داشت. از آنجایی که این خوشبندی بر مبنای

آنالیز بیان اعضای خانواده ژنی *AtCIPK* و *AlCIPK* 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 استفاده شده 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

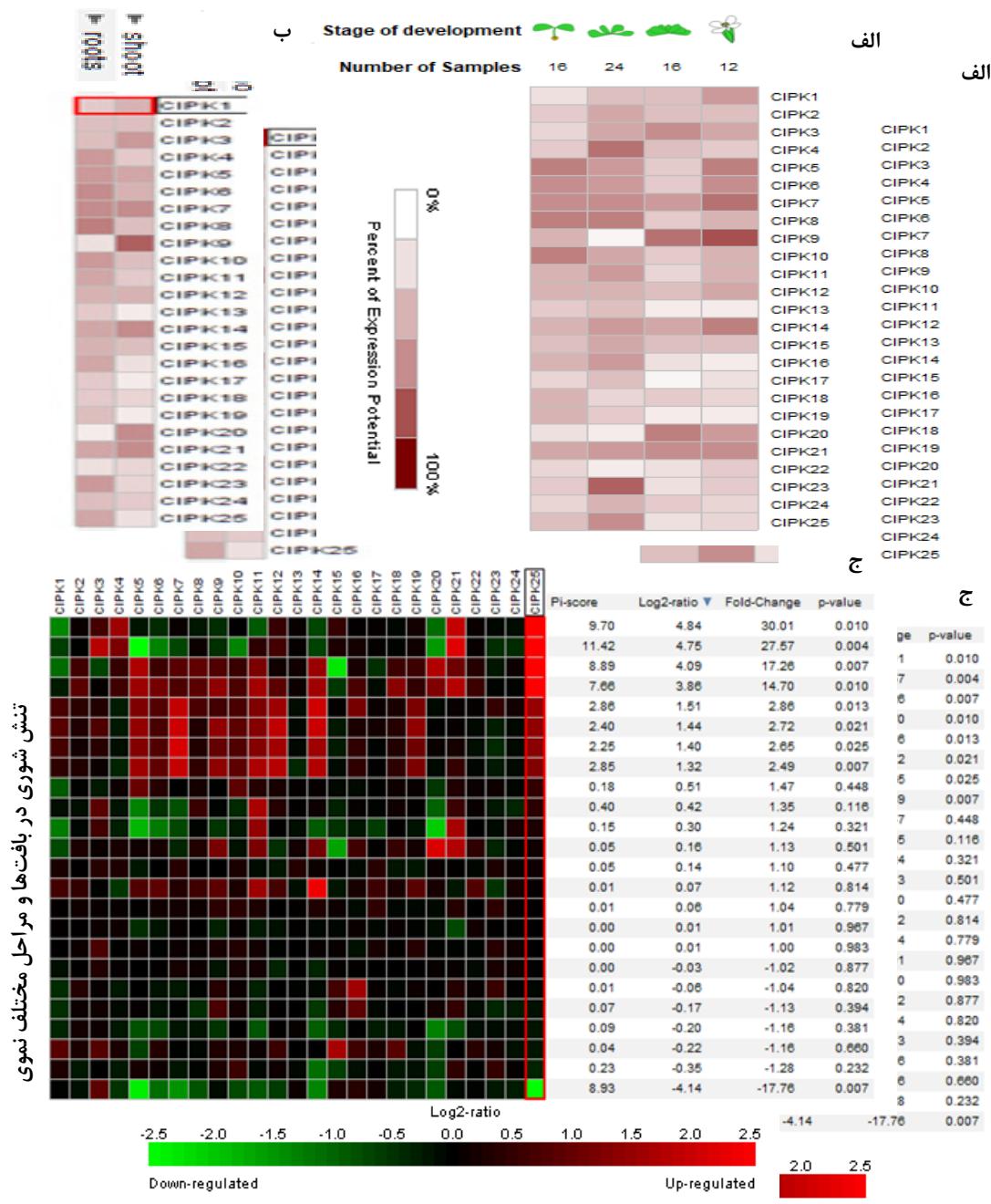
در القا تحمل به تنش‌های مختلف در گیاهان از نقش کلیدی برخوردارند درنتیجه قادرند به گیاه حامل این ژن‌ها سازگاری به شرایط نامساعد محیطی اعطای نمایند.

تجزیه و تحلیل تکاملی همولوگ‌های ژنی در آلوروپوس، برج و آرابیدوپسیس نشان دهنده یک رابطه نزدیک بین این گیاهان مدل تکلیف و دولپه بوده که با درک فعلی از نعروه 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. به عنوان مثال، هر یک از ژن‌های SiCIPK24، ZmCIPK16، MdSOS2، MdCIPK6L، AtCIPK24 / AtSOS2 که اورتولوگ ژن 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 AtCIPK21 آلوروپوس دارد، نقش مثبتی در پاسخ به دو تنش اسمزی و نمکی ایفا می‌نماید (Pandey et al., 2015). داشتن عملکرد مشابه ژن‌های اورتولوگ 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 منظر قرار گرفت. در این مطالعه، ضمن شناسایی ۲۰ ژن CIPK در ژنوم آلوروپوس لیتورالیس، ساختار ژنی، دمین‌ها و موتفیف‌ها محافظت شده و روابط تکاملی ژن‌های همولوگ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. همچنین پروفایل بیان ژن AlCIPKs تحت تنش شوری بررسی گردید. تجزیه و تحلیل

عملکرد و ظاهر 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. تجزیه و تحلیل‌های بیوانفورماتیکی نشان می‌دهد تعاملات متمایز و در عین حال وابسته به تنش در میان این اعضای شبکه ژنی CBL-CIPK حاکم است (Evrard, 2013). CBL شناسایی اولین مورد از تعاملات ژنی در قالب شبکه CIPK در فوتیپ‌های فوق حساس به نمک (SOS) صورت گرفت بدین صورت که ژن AtCBL4 تحت عنوان SOS3 با تعامل با ژن AtCIPK24 تحت عنوان SOS2 تعامل دارد و این تعامل باعث فعال‌سازی کینازها در غشاء پلاسمایی شده که به‌نوبه خود فعال‌سازی آنتیپورتھای Na^+/H^+ تحت عنوان SOS1 و H^+-ATPase واکوئلی را جهت افزایش Yang et al., 2019; Ma et al., 2020 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 ATLAS Niolabs افی‌ماتریکس ATH1 آرابیدوپسیس (ATH1 (GmbH, Berlin, Germany) استفاده شد. چیپ ATH1 یکی از غنی‌ترین آرایه‌های افی‌ماتریکس بوده که جهت بررسی بیان در سطح ترانسکریپتوم مورداستفاده قرار می‌گیرد، بهنحوی که این آرایه امکان بررسی همزمان ۲۲/۳۹۲ ژن منحصر به‌فرد 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 قابل ملاحظه‌ای 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 شاخصاره 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 تجزیه و تحلیل‌ها ثابت شده که این ژن‌ها



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

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

و دولپه، ویژگی‌های کلیدی اعضای خانواده CIPK را دارا می‌باشند که احتمالاً از عوامل مهم در سازگاری و تحمل به

سیستماتیک اعضای این خانواده ژنی نشان داد که CIPK‌ها در گونه هالوفیت آلو روپوس نیز همانند دیگر گونه‌های تک‌لپه

اولیه، زمینه‌ای را برای شناسایی عملکردها و سازوکارهای CBL 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.

تنش این گونه به شمار می‌روند. نکته حائز اهمیت در این بررسی عدم شناسایی ژن‌های همولوگ AtCIPK24 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 RT-PCR تحت تنش‌های غیرزیستی مختلف به روش qPCR در تحقیقات آنی می‌تواند در درک مکانیسم تنظیمات بیان ژن‌های مرتبط با مسیر SOS مفید باشد. ژن‌های ALCIPK گزارش شده در این تحقیق ضمن ارائه اطلاعات

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-Ramdhane, W., Zouari, N., Azaza, J., Mieulet, D., Guiderdoni, E., Ellouz, R., Hassairi, A., 2012. Marker-free transgenic durum wheat cv. Karim expressing the AISAP 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., Schmutz, 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 structural 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., Schüttke, 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 myristylation 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. Beauvois CIPKs are responsive to ABA and abiotic stresses. *Plos one*. 14, e0225091.