

«مقاله پژوهشی»

بررسی مقایسه‌ای عناصر تنظیمی سیس در نواحی پروموتوری ژن‌های شبه کالسینورین B (CBLs) در گیاهان آلورپوس، آرابیدوپسیس و برنج

مژده عرب^۱، حمید نجفی‌زرین^۲، قربانعلی نعمت‌زاده^۳، سیدحمیدرضا هاشمی‌پطرودی^{۴*}

۱. دانشجوی کارشناسی‌ارشد 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، ایران.

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

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۲/۸ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۶/۲۷)

Comparative study of cis-regulatory elements in the promoter regions of calcineurin B-like genes (CBLs) of Aeluropus, Arabidopsis and rice plants

Mozhdeh Arab¹, Hamid Najafi Zarrini¹, Ghorbanali Nematzadeh², Seyed Hamidreza Hashemipetroodi^{2*}

1. M.Sc. Student in Plant Breeding, Sari Agricultural Sciences & Natural Resources University (SANRU), Sari, Iran.

2. Associate Professor, Department of Biotechnology, Sari Agricultural Sciences & Natural Resources University (SANRU), Sari, Iran.

3. Professor, Department of Genetic Engineering and Biology, Genetics and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan (GABIT), Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University (SANRU), Sari, 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: Apr. 28, 2021 - Accepted: Sep. 18, 2021)

Abstract

The calcineurin B-like protein (CBL) is an essential calcium sensor that plays a crucial role in plant growth, development and stress responses. The identification of a cis-acting element in the promoter region of the CBL gene family in three plants, including *Oryza sativa* (*OsCBL*), *Arabidopsis thaliana* (*AtCBL*), and *Arabidopsis littoralis* (*AtCBL*), was investigated because of their importance and involvement in signal transduction under abiotic and biological stresses. Sub-cellular localization of 10 *AtCBL*, 10 *OsCBL* and six *AiCBL* genes showed that *AtCBL4*, *AtCBL10*, *AiCBL4.2*, *AiCBL4.3* and *AiCBL10* proteins were located in the plasma membrane. 26 CBLs were identified and grouped into two major groups based on their orthologous relatedness in the phylogenetic tree. According to a comparative analysis of the gene structure of the CBLs gene family, about 66 percent of *AiCBL* genes, 60 percent of *AtCBL* genes, and 80 percent of *OsCBL* genes had eight exons and seven introns. Cis-regulatory elements were identified and grouped into eight distinct classes. The ABRE, ARE, GC motif, MBS, DRE, STRE, and LTR motifs were essential stress-related elements. Different regulatory mechanisms in the promoter region of *AtCBLs* are responsible for their distinct expression patterns, which are regulated by numerous tissue-specific and stress-specific cis-elements. The functional analysis of *AiCBL4.2* (which contains six as-1 motifs) will provide useful information about this gene's regulatory processes due to its tissue-specific and enhancer feature of as-1 motif.

Keywords: as-1 motif, calcium sensor, CBL, halophyte, promoter, stress.

E-mail: shr.hashemi@sanru.ac.ir

چکیده

پروتئین‌های شبه‌کالسینورین B (CBL) یکی از اجزای کلیدی حسگرهای کلسیم بوده که در فرایندهای مختلف رشد و نمو و همچنین تنش‌های محیطی مشارکت دارند. در این تحقیق به دلیل نقش و کارکرد ژن‌های CBL در هدایت پیام در تنش‌های غیرزیستی و زیستی، شناسایی عناصر سیس این خانواده ژنی در گیاهان *Oryza sativa* (*OsCBL*)، *Arabidopsis thaliana* (*AtCBL*) و *Arabidopsis littoralis* (*AiCBL*) مدنظر قرار گرفت. در مکان‌یابی ده ژن *AtCBL*، ده ژن *OsCBL* و شش ژن *AiCBL*، پروتئین‌های *AtCBL4*، *AtCBL10*، *AiCBL4.2*، *AiCBL4.3* و *AiCBL10* در غشای پلاسمایی قرار گرفتند. بر اساس درخت فیلوژنتیکی، ۲۶ ژن CBL مورد بررسی به دو گروه اصلی تقسیم شدند به نحوی که تقریباً همه CBLها در مجاورت با ژن‌های ارتولوگشان طبقه‌بندی شدند. در بررسی مقایسه‌ای ساختار ژنی خانواده ژنی CBLها مشاهده گردید که حدود ۶۶ درصد ژن‌های *AiCBL*، ۶۰ درصد ژن‌های *AtCBL* و ۸۰ درصد ژن‌های *OsCBL* دارای هشت اکزون و هفت اینترون بودند. شناسایی و طبقه‌بندی عناصر تنظیمی سیس در هشت گروه مختلف صورت گرفت که از مهمترین عناصر سیس مرتبط به تنش می‌توان به موتیف‌های ARE، ABRE، GC-موتیف، MBS، DRE، STRE و LTR اشاره نمود. تنوع مشاهده شده در بیان اعضای خانواده ژنی به دلیل وجود مکانیسم‌های تنظیمی متفاوت در تنظیمات بیان این ژن‌ها بوده که به دلیل وجود عناصر تنظیمی اختصاصی بافت و اختصاصی تنش در پروموتور اعضای این خانواده است. بررسی عملکردی ژن *AiCBL4.2* به دلیل دارا بودن شش موتیف as-1 با توجه به ماهیت بیان اختصاصی و بیان افزاینده این موتیف می‌تواند اطلاعات با اهمیتی را در خصوص فرایندهای تنظیمی این ژن ارائه نماید.

واژه‌های کلیدی: پروموتور، تنش، حسگر کلسیم، هالوفیت، CBL.

موتیف as-1.

* نویسنده مسئول: سیدحمیدرضا هاشمی‌پطرودی

مقدمه

درک تنش توسط گیاه و رمزنگاری آن در قالب پیام زیستی مرحله کلیدی جهت فعال‌سازی یکسری از پاسخ‌های دفاعی در پاسخ به تنش‌های مختلف می‌باشد که یون کلسیم (Ca^{2+}) به‌عنوان یک مولکول پیام‌رسان ثانویه، نقش مهمی در دریافت، رمزگذاری و انتقال آن ایفا می‌نماید (Dodd et al., 2010; Mali et al., 2020). در شبکه‌های تنظیم ژنی، پروتئین‌های متصل به کلسیم به‌عنوان مولکول‌های حسگر در مواجهه با محرک‌های مختلف محیطی (مانند شوری، خشکی، شدت نور بالا، شوک حرارتی، سرما و آلودگی‌های شیمیایی) عمل نموده (Arab et al., 2021b) و باعث ایجاد یکسری پاسخ‌های دفاعی نظیر فعال‌سازی کانال‌ها، پمپ‌ها و انتقال‌دهنده‌های خاص که در غشاهای مختلف سلولی قرار دارند، می‌شوند (Mohanta et al., 2017; Hussain et al., 2020). پروتئین‌های شبه کالسی‌نئورین B ($CBLs$)^۱ به گروه منحصربه‌فردی از حسگرهای کلسیم^۲ در گیاهان تعلق داشته که پیام^۳ کلسیم بواسطه دمین‌های EF hand آنها دریافت و با اتصال آنها به دمین NAF/FISL موجود در CIPKها منتقل می‌شوند (Atif et al., 2019; Ma et al., 2020). بررسی مطالعات گذشته نشان می‌دهد که ژن‌های CBL به همراه ژن‌های CIPK در القای تحمل به تنش‌های مختلف مشارکت داشته و در سازگاری گیاهان به شرایط نامساعد محیطی نقش کلیدی ایفا می‌نمایند (Mo et al., 2018). با این حال، اطلاعات کمی در مورد مکانیسم مولکولی تنظیم بیان ژن‌های CBL ارائه شده است. مطالعه تنظیم بیان ژن‌های CBL یک گام مهم در درک مکانیسم‌های مولکولی پاسخ به تنش در گیاه می‌باشد. بر همین اساس

شناسایی و تعیین مشخصه‌سازی^۴ توالی پروموتری گیاهان می‌تواند اطلاعات حائز اهمیت را در خصوص فرایندهای تنظیمی حاکم بر بیان این ژن‌ها ارائه نماید (Shahriari et al., 2018).

تنظیم رونویسی ژن‌های درگیر در پاسخ دفاعی عموماً به‌واسطه تعامل عوامل رونویسی^۵ و عناصر تنظیمی سیس (CARE)^۶ مستقر در پروموتر ژن هدف صورت می‌گیرد (Ladan Moghdam, 2020; Mohammadian, 2020). CAREها موتیف‌های تنظیمی کوچک (20 ± 5 جفت‌باز) در مناطق پروموتر ژن‌های هدف بوده که نقش کلیدی در کنترل بیان ژن دارند (Kaur et al., 2017). برای بیان عادی/اختصاصی در بافت و یا زمان خاص، وجود CAREهای متعددی نظیر جعبه TATA، جعبه GC، جعبه CAAT جهت اتصال فاکتورهای رونویسی، افزایشدهنده‌ها و کاهنده‌های بیان مورد نیاز می‌باشد (Wittkopp et al., 2012; Davarpanah et al., 2018). ضمن اینکه وجود عناصر تنظیمی سیس اختصاصی تنش، در نواحی پروموتری برای بیان و فعال‌شدن ژن‌های پاسخگو به تنش بسیار مهم می‌باشد (Kaur et al., 2017). پیشرفت‌های اخیر در تکنیک‌های مطالعه بیان ژن نظیر RNA مداخله‌گر^۷، ریزآرایه‌ها و سایر موارد به شناسایی و بررسی عملکرد پروموتر ژن‌های هدف کمک نموده ولی با ظهور تکنولوژی توالی‌یابی نسل جدید و در دسترس قرار گرفتن اطلاعات ژنومی (WGS)^۸ اکثر گیاهان زراعی و مدل در کنار اطلاعات بیانی آنها (RNA-Seq)، امکان جستجو و بررسی مناطق پروموتری جهت شناسایی عناصر تنظیمی سیس و ارتباط آنها با الگوی بیان در تنش‌های مختلف بیش از پیش فراهم شده است. از

4. Characterization
5. Transcription factors
6. Cis regulatory elements
7. RNA interference
8. Whole genome sequencing

1. Calcineurin B-like Proteins
2. Calcium sensors
3. Message

CBL در گیاه مدل تک‌لپه برنج و گیاه مدل دولپه آرابیدوپسیس، به ترتیب از پایگاه‌های داده RGAP (Yamazaki *et al.*, 2010) و TAIR (Lamesch *et al.*, 2012) اخذ گردید. با توجه به ارائه ۱۵۹۱۶ مدل ژن پیش‌بینی‌شده در تعیین توالی WGS (با پوشش ۸۵ درصدی از ژنوم) ژنوم آلوروپوس لیتورالیس، توالی پروتئینی، ژنومی و CDS این گیاه از سایت e!DAL (Arend *et al.*, 2014) دریافت شد. برای شناسایی اعضای خانواده ژنی *CBL* در گیاه آلوروپوس لیتورالیس، آنالیز جستجوی *tblastn* در نرم‌افزار BioEdit (Hall, 1999) با E-value کمتر از $1e-10$ انجام شد. در ادامه، توالی‌های پروتئینی برای تأیید حضور دمین‌های EF-hand با استفاده از پایگاه InterProScan (www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequences) (Jones *et al.*, 2014) مورد آنالیز اولیه قرار گرفتند. نقشه ژن‌های *AtCBL* و *OsCBL* بر روی کروموزوم، به ترتیب در پایگاه‌های اطلاعاتی TAIR (www.arabidopsis.org/jsp/Chromosome) و Oryzabase (Map/tool.jsp) و (www.viewer.shigen.info/oryzavw/maptool) صورت گرفت. جهت نامگذاری ژن‌های *CBL* آلوروپوس، شناسایی ژن‌های اورتولوگ آن در گیاه آرابیدوپسیس تالیانا با ابزار *blastp* (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>) صورت گرفت (Xiao *et al.*, 2019). بر این اساس همولوژی هر پروتئین در پایگاه پروتئینی swissprot و با جستجو در پروتئوم گیاه آرابیدوپسیس تالیانا (taxid:3702) انجام و یک رکورد با بالاترین امتیاز بعنوان ژن اورتولوگ در آرابیدوپسیس تالیانا انتخاب گردید. در ادامه پیشوند AI به ابتدای *CBL* اضافه و شماره هر ژن بر مبنای شماره ژن همولوگ آن در آرابیدوپسیس نامگذاری شد. شناسایی ساختار اگزون-اینترون

سوی دیگر با بکارگیری این عناصر امکان تغییر الگوی بیان ژن هدف میسر شده که به نوبه خود امکان دستورزی ژنتیکی گیاهان را به منظور محافظت در برابر تنش‌های زیستی و غیرزیستی فراهم می‌کند (Kaur *et al.*, 2016; Kaur *et al.*, 2017).

تحقیقات پیشین نشان می‌دهد توانایی تحمل به شرایط نامساعد محیطی در گیاهان هالوفیت در اثر فرآیندهای تکاملی تثبیت گردیده است (Faraji *et al.*, 2020; Dolatabadi *et al.*, 2018). این گیاهان به دلیل ایجاد و توسعه مکانیسم‌های خاص مقابله با شوری نظیر جذب، انتقال و هومئوستازی یون‌ها، تنظیم اسمزی و دفع نمک از برگ‌ها در مطالعات بررسی سازوکارهای تحمل به تنش شوری بسیار مورد توجه می‌باشند (Hashemi *et al.*, 2012; Fatemi *et al.*, 2014; Ardestani *et al.*, 2014; Hashemi *et al.*, 2014). در این تحقیق گیاه هالوفیت آلوروپوس لیتورالیس (*Aeluropus littoralis*)، به دلیل تحمل بالای آن به تنش شوری و همچنین در دسترس بودن توالی ژنومی آن به منظور بررسی خصوصیات توالی تنظیمی ژن‌های درگیر در تنش شوری مدنظر قرار گرفت (Hashemi *et al.*, 2020).

در مطالعه حاضر به منظور شناسایی عناصر تنظیمی سیس، توالی پروموتور ژن‌های خانواده *CBL* در گیاه مدل گلیکوفیت تک‌لپه *Oryza sativa*، گلیکوفیت دولپه *Arabidopsis thaliana* و گیاه هالوفیت تک‌لپه *Aeluropus littoralis* مورد بررسی قرار گرفت. بررسی مقایسه‌ای ساختار اینترون/اگزون ژن‌های *AtCBL*، *OsCBL* و *AICBL* در کنار بررسی الگوی بیان در بافت‌ها و شرایط تنشی مختلف از اهداف دیگر تحقیق حاضر بود.

مواد و روش‌ها

شناسایی توالی‌های *CBL*

ابتدا توالی‌های ژنومی، پروتئینی و CDS ژن‌های

مراحل مختلف رشد و نمو و تنش آراییدوپسیس در پلنفرم ریزآرایه و با استفاده از داده‌های چیپ ATH1 (ATLAS Niolabs GmbH, Berlin, Germany) ارائه شده در برنامه Genevestigator (<https://www.genevestigator.com/gv/plant.jsp>) (Schmid *et al.*, 2005). مراحل رشد و نمو بررسی شده شامل ریشه و برگ ۲۱ روزه، روزت و مراحل مختلف گل‌دهی می‌باشد. اعمال تنش‌های غیرزنده در گیاهچه‌های ۱۸ روزه و در سه تکرار بیولوژیکی و در شرایط نوری $60 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ شوری (150 mM NaCl)، سرما (38 °C for 3 h)، UV (1.18 W m⁻²)، آسیب بافتی (پانچ برگی)، اکسیداتیو (10 μM Methyl viologen)، گرما (۳۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ ساعت) و خشکی (کاهش ۱۰ درصد وزن تر گیاه) در دو بافت برگ و ریشه و در زمان ۲۴ ساعت پس از اعمال تنش مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت آنالیز بیان ژن‌ها به صورت Log2 و در قالب نقشه حرارتی^۲ ارائه گردید (Scherf *et al.*, 2000).

نتایج و بحث

شناسایی اعضای خانواده ژنی *CBL* در برنج، آراییدوپسیس و آلوروپوس و مقایسه ساختار ژنی آنها توالی پروتئینی، ژنومی و ۱۰ CDS ژن *AtCBL* و *OsCBL*، به ترتیب از پایگاه‌های TAIR و RGAP دریافت شد. بر اساس همولوژی توالی‌ها با ژن‌های آراییدوپسیس و برنج، شش ژن *CBL* در گیاه آلوروپوس شناسایی شد. بررسی اعضای خانواده ژنی *AICBL* در پایگاه‌های اختصاصی دمین نشان داد که همه ژن‌های مورد بررسی با توجه به دارا بودن چند دمین EF-hand به خانواده ژنی *CBL* تعلق دارند. جهت تعیین میزان پراکنش این ژن‌های *CBL* در

بصورت مقایسه‌ای در سه خانواده *AtCBL*، *AICBL* و *OsCBL* در برنامه GSDS (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>) صورت گرفت. جهت ترسیم درخت فیلوژنتیکی، آنالیز هم‌ردیفی و رسم درخت با استفاده از نرم‌افزار MEGA 7.0 (Tamura *et al.*, 2013) بر مبنای روش اتصال همسایه^۱ (NJ) صورت گرفت. جایگاه سلولی پروتئین‌ها نیز با استفاده از برنامه آنالین-Plant-PLoc (www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Cell-PLoc/) تعیین گردید.

شناسایی عناصر سیس

برای جستجوی عناصر تنظیمی سیس در پروموتورهای خانواده *AtCBL*، *AICBL* و *OsCBL*، توالی‌های پروموتور این ژن‌ها به طول ۱۵۰۰ نوکلئوتید (بالادست سایت شروع ترجمه) از پایگاه داده مربوطه دریافت شد. بررسی موتیف‌های تنظیمی سیس در پایگاه تخصصی بررسی پروموتورهای گیاهی و با ابزار PlantCare صورت گرفت (Lescot *et al.*, 2002). شناسایی و طبقه‌بندی این عناصر در هشت گروه شامل عناصر مرتبط با پاسخ هورمونی، جایگاه‌های اتصال فاکتور رونویسی، عناصر مرتبط با تنش زنده/غیرزنده، عناصر مرتبط با بیان اختصاصی بافت^۲، عناصر مرتبط با رشد و نمو، عناصر مرتبط با پاسخ نوری، عناصر عمومی پروموتورها و عناصر با عملکرد نامشخص صورت گرفت. جهت شناسایی جایگاه موتیف‌ها و پراکنش آن در نواحی پروموتوری از ابزار PlantPAN (www.plantpan2.itps.ncku.edu.tw/) استفاده شد.

آنالیز ریزآرایه ژن‌های *AtCBL*

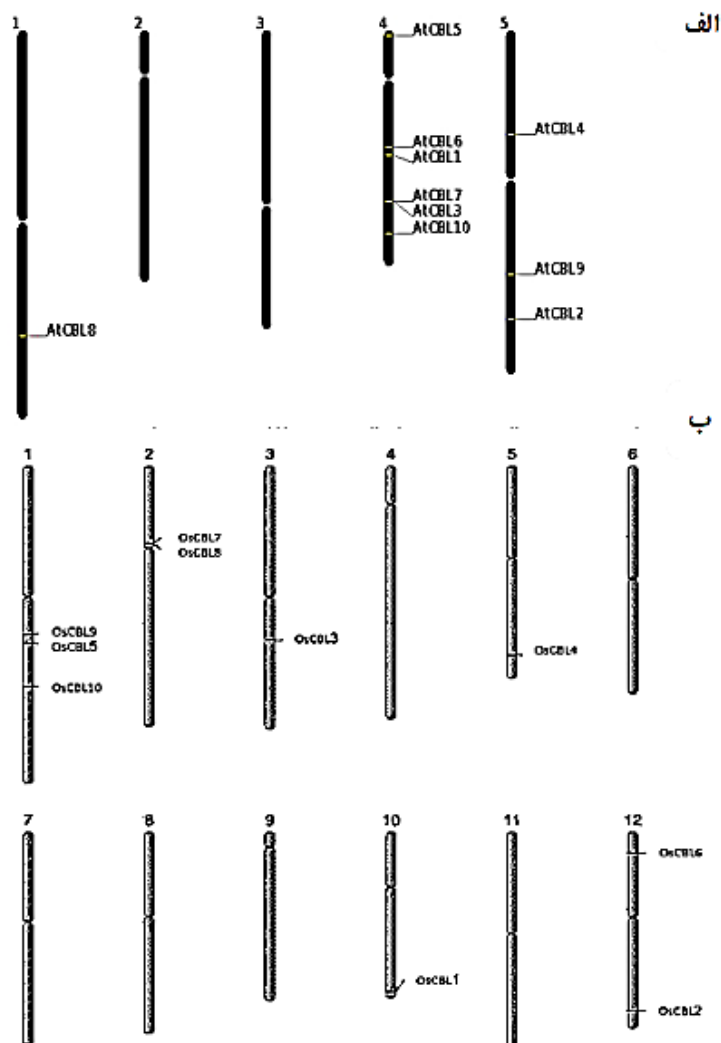
بررسی الگوی بیانی خانواده ژنی *AtCBL* در

3. Heat map

1. Neighbor Joining
2. Tissue-specific

CBL در گونه‌های آلوروپوس، آراییدوپسیس و برنج، توالی‌های آمینواسیدی ۲۶ پروتئین در ابتدا مورد آنالیز هم‌ردیفی چندگانه قرار گرفت، سپس درخت فیلوژنتیکی بر مبنای روش اتصال همسایه ترسیم گردید. همانگونه که در شکل ۲-الف نشان داده شد، بر اساس درخت ترسیم شده همه CBLها به دو گروه اصلی تقسیم شدند به نحوی که تقریباً همه CBLها در مجاورت با ژن‌های ارتولوگ‌شان طبقه‌بندی شدند. در بررسی مقایسه‌ای *AtCBL* با *BrrCBL*ها نیز ژن‌های اورتولوگ دو گونه در مجاورت یکدیگر خوشه‌بندی شدند (Yin et al., 2017).

کروموزوم‌های مختلف، جایگاه کروموزومی این ژن‌ها تعیین گردید. همان‌گونه که در شکل ۱ نشان داده شد، ژن‌های *AtCBL* و *OsCBL*، به ترتیب در سه کروموزوم (از مجموع پنج کروموزوم) و در شش کروموزوم (از مجموع ۱۲ کروموزوم) توزیع شدند. در آراییدوپسیس، کروموزوم ۴ دارای شش ژن CBL بود، در حالی که در کروموزوم ۲ و ۳ هیچ ژن CBL مشاهده نشد. در برنج نیز، کروموزوم ۱ دارای سه ژن و کروموزوم ۲ و ۱۲ هر کدام دارای دو ژن بودند. کروموزوم‌های ۴، ۶، ۷، ۸، ۹ و ۱۱ نیز فاقد ژن CBL بودند. جهت بررسی روابط تکاملی ژن‌های



شکل ۱. توزیع مکانی ژن‌های *AtCBL* و *OsCBL* به ترتیب در کروموزوم‌های مختلف آراییدوپسیس (الف) و برنج (ب).

۱۴ گیاه دیگر از تیره غلات، از ۱۵۲ ژن مورد بررسی، ۵۵ درصد ژن‌ها نیز دارای هفت اینترون بود که خود دلالت بر وجود یک مدل حفاظت‌شده در فرایندهای تکاملی و سازماندهی ساختار ژنی اینترون/اگزون CBLها داشت (Jiang *et al.*, 2020). لازم بذکر است در این تحقیق ارتباطی بین موقعیت اگزون‌ها/اینترون‌ها و گروه‌بندی بر اساس روابط فیلوژنتیکی پروتئین‌ها مشاهده نگردید.

بررسی پروتئین‌های CBL بر اساس مکان‌یابی سلولی نشان داد ژن *CBL2* برنج و آرابیدوپسیس، در سیتوپلاسم سلول فعال می‌باشد. مکان‌یابی ژن‌های *AICBL2*، *AICBL4.1* و *AICBL4.4* و ژن‌های *OsCBL4* و *OsCBL10* نیز در کلروپلاست بود. پیام‌رسان‌های کلسیم بر مبنای مکان‌یابی در سلول، به پنج دسته غشای پلاسمایی، سیتوپلاستی، میتوکندری، کلروپلاستی و ER طبقه‌بندی می‌شوند هر چند که مطالعات اندکی در خصوص فعالیت آنها در میتوکندری، کلروپلاست و ER در شرایط *in vivo* صورت گرفته است (Demidchik *et al.*, 2018). ولی نقش کلروپلاست‌ها در پیام‌رسانی یون کلسیم و ROS در تحقیقات پیشین تایید گردید (Edel *et al.*, 2017). ژن‌های *AtCBL4*، *AtCBL10*، *AICBL2*، *AICBL4.3* و *AICBL10* در غشای پلاسمایی مکان‌یابی شدند که نشان‌دهنده روابط ارتولوژی و تکاملی در این ژن‌ها و کارکرد آنها در انتقال پیام بود. پیش‌بینی موقعیت CBL‌های پنبه نیز حاکی از قرارگیری همه آنها (به‌جز *GhCBL3.6*) در غشای سلولی بود. خصوصیات کاملاً متفاوت *GhCBL3.6* یعنی قرارگیری در هسته با عملکرد خاص ژن *GhCBL3.6* در پنبه مرتبط دانسته شد (Lu *et al.*, 2017). در کلزا نیز ژن‌های اورتولوگ با *AtCBL1*، *AtCBL4* و *AtCBL9* به دلیل وجود موتیف

از ۲۶ ژن CBL در این بررسی، ۱۵ ژن در گروه اول، ۱۱ ژن در گروه دوم قرار گرفتند. در گروه اول که خود به دو خوشه کوچکتر تقسیم شد، ژن‌های *OsCBL10*، *AtCBL10*، *AICBL10* و ژن‌های *CBL3* و *CBL6* در دو گیاه برنج و آرابیدوپسیس در خوشه اول و ژن‌های *OsCBL10*، *AtCBL10*، *AICBL10* و ژن‌های *CBL1* و *CBL9* در دو گیاه آرابیدوپسیس و برنج در خوشه دوم قرار گرفتند. در گروه دوم، ژن‌های *OsCBL4*، *AtCBL4*، *AICBL4* و ژن‌های *CBL5* و *CBL8* دو گیاه برنج و آرابیدوپسیس قرار داشتند.

بررسی‌ها نشان می‌دهد موقعیت اگزون‌ها/اینترون‌ها و نحوه توزیع فاز اینترونیک از ویژگی‌های مهم تجزیه و تحلیل ساختار ژن محسوب می‌شوند (Kaur *et al.*, 2017) طبقه‌بندی اینترون‌ها در سه فاز مختلف صورت می‌گیرد اینترون‌های فاز صفر (0) بین دو کدون متوالی وجود دارند، اینترون‌های فاز یک (1) بین نوکلئوتید اول و دوم یک کدون و نهایتاً اینترون‌های فاز دو (2) بین نوکلئوتید دوم و سوم یک کدون وجود دارند (Kaur *et al.*, 2017; Kaur *et al.*, 2016). در شکل ۲-ب آرایش ساختار اگزون-اینترون و ترتیب فازهای اینترون ژن‌های *AtCBL*، *OsCBL* و *AICBL* نشان داده شد. اکثر ژن‌های *AtCBL*، *OsCBL* و *AICBL* دارای اینترون فاز یک بودند و ژن‌های *AtCBL7*، *OsCBL9* و ژن‌های *CBL10* در هر سه گیاه مورد بررسی، دارای اینترون فاز صفر بودند. بررسی ساختار اگزون-اینترونی خانواده ژنی CBL نشان داد که طول‌ترین طول ژن مربوط به ژن *OsCBL1* و کوتاه‌ترین طول ژن مربوط به *AtCBL7* و *AICBL4.4* بود. در بررسی و مقایسه ساختار ژنی اگزون-اینترونی خانواده ژنی CBLها مشاهده گردید که حدود ۶۶ درصد ژن‌های *AICBL*، ۶۰ درصد ژن‌های *AtCBL* و ۸۰ درصد ژن‌های *OsCBL* دارای هشت اگزون و هفت اینترون بودند. در مقایسه ساختار ژنی اگزون/اینترون CBL در برنج و

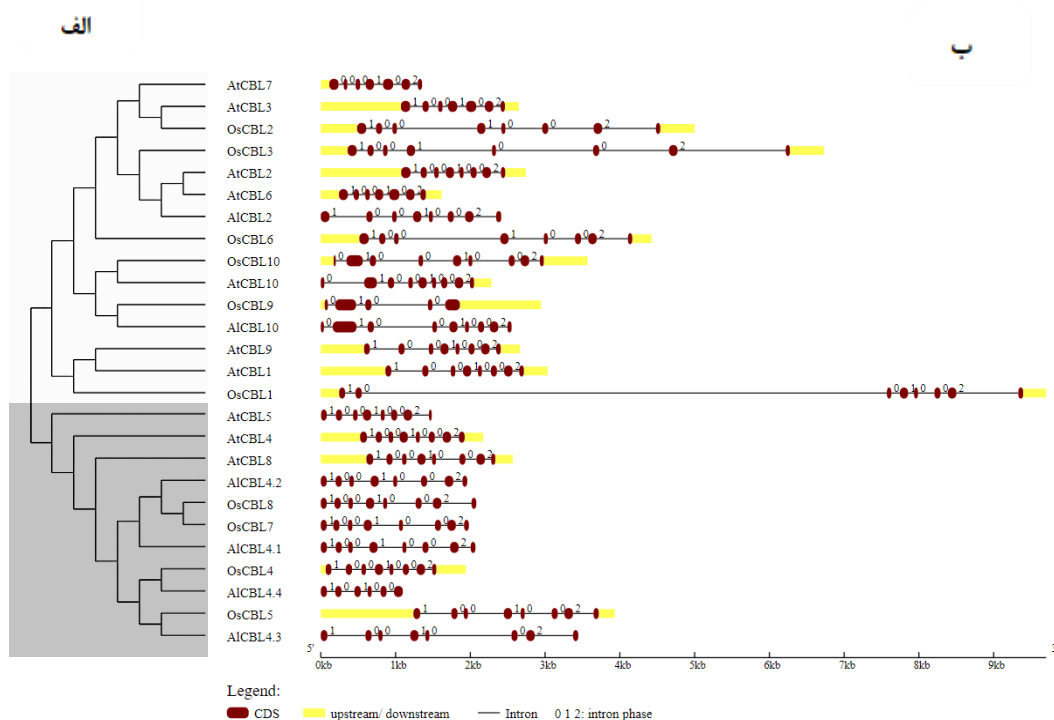
شناسایی عناصر سیس در پروموت‌های *AICBL*، *OsCBL* و *AtCBL*

به منظور بررسی مقایسه‌ای عناصر در پروموت‌ ژن‌های *CBL*، توالی‌های پروموت‌ در بالادست جایگاه شروع ترجمه (۱۵۰۰ جفت باز) ژن‌های *AICBL*، *OsCBL* و *AtCBL* دریافت گردید.

همان‌گونه که در شکل ۳ مشاهده می‌شود. تعداد کل عناصر شناسایی شده در گیاه برنج، آرابیدوپسیس و آلورپوس به ترتیب ۱۱۳۴، ۱۱۴۷ و ۵۱۴ بود که به دلیل کم‌بودن تعداد ژن‌های *CBL* در آلورپوس، میانگین عناصر شناسایی شده به ازای هر ژن به ترتیب ۱۱۳/۴، ۱۱۴/۷ و ۵۸/۶۶ محاسبه گردید. این تعداد کم موتیف‌های شناسایی شده در گیاه آلورپوس لیتورالیس را می‌توان به اطلاعات و انوتیشن^۲ بهتر دو گیاه مدل آرابیدوپسیس و برنج مرتبط دانست که بخش اعظمی از داده‌های موجود در پایگاه‌های بررسی پروموت‌ به اطلاعات موتیف این گیاهان مدل اختصاص دارد.

عناصر عمومی مرتبط با پروموت‌ در *AtCBL* با ۶۱ درصد بیشترین و عناصر عمومی مرتبط با پروموت‌ در *AICBL* با ۳۳ درصد کمترین میزان را دارا بودند در حالی که عناصر عمومی مرتبط با پروموت‌ در *OsCBL* ۴۴ درصد بود. در مقایسه عناصر سیس با عملکرد نامشخص همان‌گونه که در شکل ۳ مشاهده می‌شود، در *AICBL* با ۲۴ درصد بیشترین و عناصر با عملکرد نامشخص مرتبط با پروموت‌ در *AtCBL* با ۷ درصد، کمترین میزان را دارا بودند که این مطلب نشان‌دهنده مطالعات و بررسی‌های گسترده انجام شده در گیاه آرابیدوپسیس می‌باشد.

مریستولاسیون^۱ در انتهای آمینی آنها در غشای پلاسمایی مکان‌یابی شد که بواسطه آن در هدایت کمپلکس پیام‌رسانی CBL1-CIPK1 در غشای سلولی نقش ایفا می‌نماید (Zhang et al., 2014). مریستولاسیون در واقع فرآیند پس از ترجمه بوده که در حسگرهای پروتئینی کلسیم (بجز پروتئین‌های کالمادولین) به منظور هدایت و مکان‌یابی پروتئین‌ها در سلول صورت می‌گیرد (Mohanta et al., 2017). در تحقیق صورت گرفته بر روی خصوصیات پروتئینی *AICBL*ها، اگرچه موتیف مریستولاسیون تنها در *AICBL4*ها شناسایی گردید (Arab et al., 2021a) ولی در این تحقیق مکان‌یابی در سیتوپلاسم تنها برای *AICBL4.2*، *AICBL4.3* و *AICBL10* مشاهده شد که از یک سو بیانگر عدم ارتباط این موتیف و جایگاه سلولی است و از سوی دیگر بیانگر تطابق عملکردی بیشتر دو ژن *AICBL4.2* و *AICBL4.3* نسبت به *AtCBL4* (*SOS3*) در جایگاه هدف سلولی است. مطالعات نشان می‌دهد برخی از مسیرهای پیام‌رسانی CBL-CIPK در گونه‌های مختلف گیاهی حفاظت شده می‌باشد. به‌عنوان مثال، مسیر پیام‌رسانی SOS در برنج نیز حفاظت شده بوده و از عملکرد مشابهی برخوردار است (Martínez-Atienza et al., 2007). ژن همسانه‌سازی شده *PeSOS1* از گیاه *Populus euphratica*، از عملکرد مشابهی با ژن *AtSOS1* برخوردار بود (Wu et al., 2007) و یا ژن همولوگ *AtCBL4* در ذرت، در تحمل به تنش شوری نقش دارد (Wang et al., 2007).



شکل ۲. ساختار ژنی ژن‌های CBL در برنج، آلورپوس و آراییدوپسیس. بخش‌های قرمز و زرد رنگ به ترتیب معرف ناحیه آگزون و ناحیه های 5' UTR و 3' UTR، و خط‌های سیاه نشان‌دهنده اینترون‌ها می‌باشد.

از مهمترین عناصر سیس شناسایی شده، شامل ABRE (تنش خشکی)، ARE (القای بی‌هوازی)، موتیف GC- (میتیل جاسمونات)، موتیف LTR (پاسخگویی در دمای القای پایین)، MBS (محل اتصال MYB در گیر در القا خشکی)، عناصر SARE، TCA (پاسخ به اسید سالیسیلیک)، موتیف DRE (تنش شوری) و STRE (تنش خشکی) در نواحی پروموتوری شناسایی شدند.

عناصر سیس مرتبط با هورمون عناصر پاسخ‌دهنده هورمون، مانند عناصر پاسخ‌دهنده به اسید آبسزیک (ABA)، عناصر پاسخ‌گو به میتیل جاسمات (MeJA)، موتیف‌های مرتبط با جیبرلین (GA)، موتیف‌های مرتبط با اسید سالیسیلیک (SA)، عناصر پاسخ‌دهنده به اکسین (Auxin)، موتیف‌های پاسخ‌دهنده به اتیلن (ERE) در توالی پروموتوری شناسایی شدند (Kaur et al., 2016; Kaur et al., 2019).

در این مطالعه، پراکنش این عناصر در ناحیه بالادست ژن‌های CBL در آلورپوس، آراییدوپسیس و برنج در شکل ۴-الف نشان داده شد. در مقایسه عناصر سیس مرتبط با هورمون در سه گیاه مورد بررسی همان‌گونه که در شکل ۳ مشاهده می‌شود، در *AtCBL* با ۷ درصد کمترین و عناصر سیس مرتبط با هورمون‌ها در *AICBL*‌ها با ۱۳ درصد بیشترین میزان را دارا بودند در حالی که عناصر سیس مرتبط با هورمون برای ژن *OsCBL*، ۹ درصد شناسایی گردید. موتیف میتیل جاسمات و اسید آبسزیک در همه *AICBL*‌ها مشاهده شد در حالی که موتیف ERE فقط در *AICBL4.1* شناسایی شد. با توجه به نتایج حاصل شده، عناصر مهم مرتبط با ABA، در همه ژن‌های CBL بجز در ژن‌های *AtCBL6*، *AtCBL7*، *OsCBL8* و *OsCBL9* شناسایی شد. موتیف میتیل جاسمات در همه ژن‌های CBL سه گیاه مورد بررسی بجز *OsCBL3*، *OsCBL9* و *AtCBL5* شناسایی

عناصر سیس مرتبط با هورمون عناصر پاسخ‌دهنده هورمون، مانند عناصر پاسخ‌دهنده به اسید آبسزیک (ABA)، عناصر پاسخ‌گو به میتیل جاسمات (MeJA)، موتیف‌های مرتبط با جیبرلین (GA)، موتیف‌های مرتبط با اسید سالیسیلیک (SA)، عناصر پاسخ‌دهنده به اکسین (Auxin)، موتیف‌های پاسخ‌دهنده به اتیلن (ERE) در توالی پروموتوری شناسایی شدند (Kaur et al., 2016; Kaur et al., 2019).

عناصر سیس مرتبط با هورمون عناصر پاسخ‌دهنده هورمون، مانند عناصر پاسخ‌دهنده به اسید آبسزیک (ABA)، عناصر پاسخ‌گو به میتیل جاسمات (MeJA)، موتیف‌های مرتبط با جیبرلین (GA)، موتیف‌های مرتبط با اسید سالیسیلیک (SA)، عناصر پاسخ‌دهنده به اکسین (Auxin)، موتیف‌های پاسخ‌دهنده به اتیلن (ERE) در توالی پروموتوری شناسایی شدند (Kaur et al., 2016; Kaur et al., 2019).

موتیف WRE3 در پروموتور خود بود و همه ژن‌ها بجز ژن *AICBL2*، موتیف MBS در مناطق پروموتور خود داشتند. سه ژن *AICBL2*، *AICBL4.2* و *AICBL1* حاوی موتیف DRE در نواحی پروموتور خود بودند. عناصر DRE، STRE و LTR به‌طور کلی در نواحی مختلف پروموتورهای گیاهی یافت می‌شوند که به ترتیب در تنش شوری، خشکی و سرما نقش دارند (Jung et al., 2017).

به‌منظور شناسایی فرایندهای تنظیمی ژن زینگ-فینگر A20/AN1 (*AISAP*) بعنوان پروتئین مرتبط با تنش، ناحیه بالادست این ژن (قطعه ژنومی ۵۸۶ جفت باز) از گیاه آلوروپوس لیتورالیس جداسازی گردید. بررسی کارکردهای عملکردی و تنظیمی این پروموتور در گیاه توتون تراریخت، موید القا این ژن تحت تنش‌های مختلف غیرزیستی، محرک‌های هورمونی و بیان اختصاصی در بافت و مراحل نموی بود (Saad et al., 2011). در بیان هترولوگ ژن *AISAP* در لاین‌های گندم (نسل ۳) نیز بهبود نرخ جوانه‌زنی و افزایش زیست توده^۲ تحت شرایط شوری شدید و اسمرزی مشاهده گردید (Saad et al., 2011).

جایگاه اتصال فاکتور رونویسی

در بررسی عناصر سیس پروموتور ژن *CBL* سه گیاه مورد بررسی، عناصر مرتبط با TF در شکل ۳، در *CBL* برنج با ۷ درصد کمترین و در *CBL* آلوروپوس با ۱۱ درصد بیشترین بوده ضمن اینکه میزان TFها در آرآیدوپسیس ۹ درصد تعیین گردید. در مجموع عناصر شناسایی شده مرتبط با TF شامل AP-2-like، MYC، MYB، CCAAT-box، W box و WRKY بودند. همه ژن‌های *CBL* آلوروپوس دارای موتیف MYB به تعداد بالا در مناطق پروموتور خود بودند که در بین آن‌ها ژن‌های

گردید. جهت شناسایی نحوه عملکرد این موتیف‌ها تحقیقات گسترده‌ای صورت گرفته است. بعنوان نمونه با استفاده از طراحی پروموتور سنتتیک که بر اساس الحاق عناصر مرتبط با بیماری‌زایی (PRE)، عناصر پاسخ‌دهنده اتیلن (ERE)، عناصر پاسخگو به اسید جاسمونیک (JAR) و عناصر پاسخگو به اسید سالیسیلیک (SARE) به پروموتور حداقلی^۱ ساخته شده بود کارکرد این عناصر در سیستم دفاعی گیاه در مواجهه با عوامل بیماری‌زا تعیین گردید (Liu et al., 2013).

عناصر مرتبط با تنش

از مهمترین عناصر پاسخ دهنده به تنش شناسایی شده در پروموتور ژن‌های *CBL* عبارتند از عناصر پاسخ‌دهنده به تنش خشکی (ABRE) (Yamaguchi-Shinozaki et al., 1994)، عناصر واکنش‌دهنده به تنش شوری (DRE) (Dubouzet et al., 2003)، عناصر واکنش‌دهنده به تنش خشکی (STRE) (Chen et al., 2002)، عناصر واکنش‌دهنده به سرما (MBS) (Jaspers et al., 2009) و نهایتاً عناصر پاسخ‌دهنده به سرما (LTRE) (Gu et al., 2008) بودند. در مقایسه فراوانی عناصر سیس مرتبط با تنش در ژن‌های *CBL* سه گیاه آلوروپوس، آرآیدوپسیس و برنج همان‌گونه که در شکل ۳ نشان داده شد، عناصر سیس مرتبط با تنش‌ها در *AtCBL* ۵ درصد و در *AICBL* ۶ درصد و عناصر سیس مرتبط با تنش در *OsCBL* ۷ درصد بودند. در شکل ۴-ب نیز پراکنش عناصر سیس مرتبط با تنش در ناحیه بالادست ژن‌های *CBL* در آلوروپوس، آرآیدوپسیس و برنج نشان داده شد. تجزیه و تحلیل توالی نشان داد که همه ژن‌های *AICBL* دارای موتیف STRE در مناطق پروموتور خود بودند. ژن *AICBL2* دارای

CBL های *Doct* و *GCN4_motif* بودند. همه ژن‌های *CBL* آلوروپوس دارای موتیف *as-1* بودند. *AICBL2* و *AICBL4.3* به ترتیب دارای موتیف *Doct* و *HD-Zip* در نواحی پروموتور خود بودند.

عناصر مرتبط با رشد و نمو

عناصر سیس مرتبط با رشد و نمو در پروموتور ژن *CBL* در هر سه گیاه مورد بررسی در شکل ۳ ارائه شد، در ژن‌های *AICBL*، *OsCBL* و *AtCBL* به ترتیب با ۲، ۱ و ۰/۴۵ درصد شناسایی گردید. موتیف‌های شناسایی شده از عناصر سیس مرتبط با رشد و نمو *OCT*، *circadian*، *MSA-like*، *O2-site*، *MBSI*، *NON* می‌باشند. ژن‌های *AICBL2*، *AICBL4.3* و *AICBL4.4* دارای موتیف *Circadian* در مناطق پروموتور خود بودند. ژن *AICBL2* دارای هر سه موتیف *Circadian* و *NON* و *O2-site* در نواحی پروموتور خود بود.

آنالیز بیان ژن‌های *AtCBL* و *OsCBL*

در این تحقیق به منظور اطلاع از کارکرد بیانی اعضای خانواده ژنی *AtCBL*، الگوی بیانی این ژن‌ها (به جز *AtCBL10* به دلیل عدم وجود در چیپ *ATH1*) در هشت مرحله نمو و هفت تنش غیرزنده مورد بررسی قرار گرفت. همان‌گونه که در شکل ۵-الف نمای نقشه حرارتی و خوشه‌بندی سلسله مراتبی ژن‌های *AtCBL* نشان داده شد، همه نه *AtCBL* مورد بررسی در مراحل مختلف رشد و نمو از بیان برخوردار بوده، هر چند که شدت بیان در میان این ژن‌ها متفاوت بود. این بدان معنی است که این ژن‌ها نقش حیاتی در اکثر فرآیندهای بیولوژیکی رشد و نمو دارند.

در گروه‌بندی صورت گرفته بر مبنای داده‌های بیانی، *AtCBL* های ۲، ۳، ۱ و ۹ در گروه اول (با شدت بیان بیشتر) و مابقی *AtCBL* ها در گروه دوم (گروه با شدت بیان کمتر) قرار گرفتند. در بررسی پروفایل بیان (*RNA-Seq*) ژن‌های *CBL*

AICBL2 و *AICBL4.3* بیشترین تعداد موتیف *MYB* را در پروموتور خود داشتند. ژن‌های *AICBL2*، *AICBL4.1* و *AICBL4.3* فقط یک موتیف را دارا می‌باشند که به ترتیب *AICBL2* دارای موتیف *W box* و *AICBL4.1* دارای موتیف *AP2-like* و *ATBP-1* در پروموتور خود بودند. موتیف *MYB* عمدتاً به همراه *MYC* در همه ژن‌های *CBL* (به جز *OsCBL7*) شناسایی شد. در گیاه آلوروپوس در ژن‌های *CBL2*، *CBL10* و *CBL4.4* موتیف *MYB* به تنهایی و در ژن‌های *AICBL4.1*، *AICBL4.2* و *AICBL4.3* به همراه موتیف *MYC* شناسایی شد.

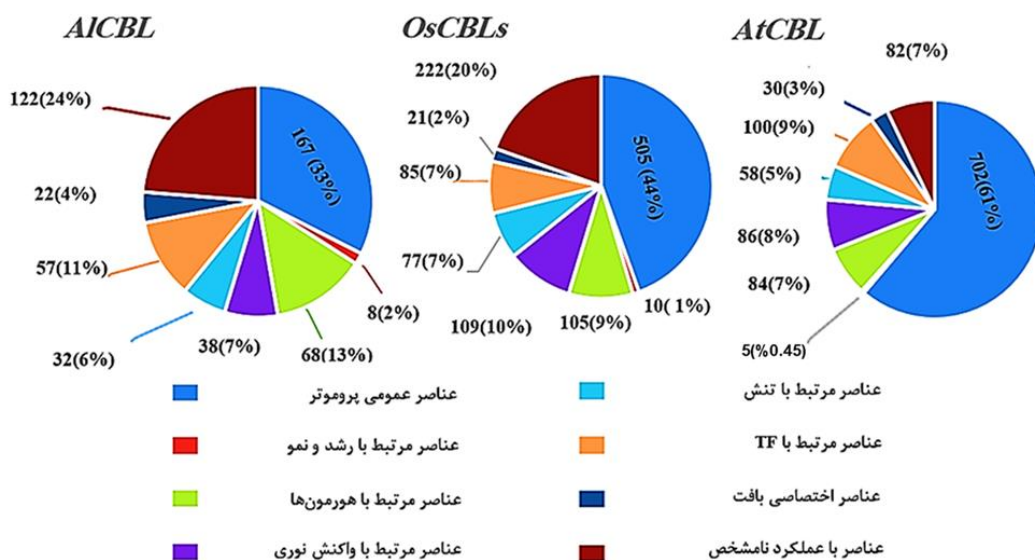
مطالعات نشان می‌دهد پروتئین‌های *MYC* و *MYB* به عنوان فعال‌کننده رونویسی در تنظیمات ژن *rd22* نقش دارند این پروتئین‌ها با اتصال به موتیف‌های *MYC* و *MYB* که در بالادست این ژن‌ها قرار دارند بیان آن را در تنش خشکی و مسیرهای مرتبط با *ABA* کنترل می‌نمایند (Abe et al., 1997). تاکنون تحقیقات مختلفی جهت شناسایی کارکرد و کاربرد موتیف‌های تنظیمی سیس (نظیر *MYB*، *MYC*، *DRE/CRT*، *as1*، *ABRE*، *G-box*) که در نواحی بالادست پروموتورهای القایی ژن‌های پاسخگو به تنش قرار دارند صورت گرفت (Aysha et al., 2018) که می‌توان به طراحی و ساخت پروموتورهای سنتتیک اختصاصی تنش در آراییدوپسیس تالیانا اشاره نمود (Hou et al., 2012).

عناصر مرتبط با بیان اختصاصی بافت

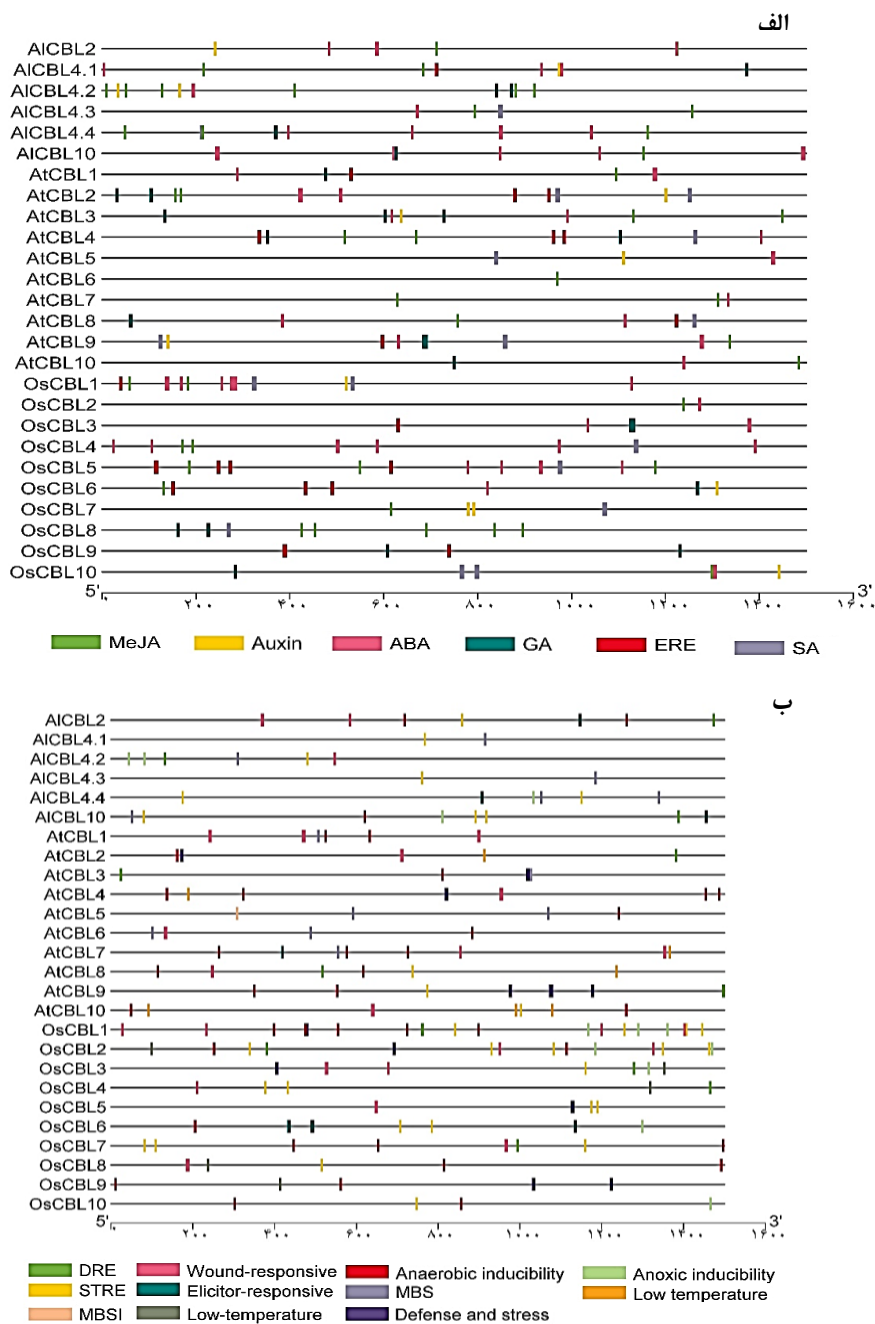
عناصر سیس مرتبط با بیان اختصاصی بافت در پروموتور ژن *CBL* هر سه گیاه موردنظر، همان‌طور که در شکل ۳ نشان داده شده، در *AICBL*، *AtCBL* و *OsCBL* به ترتیب با ۴، ۳ و ۲ درصد شناسایی گردید. عناصر سیس شناسایی شده با بیان بافت اختصاصی در پروموتور *CBL* ها شامل موتیف‌های *as-1*، *AC-I*، *CAT-box*،

ریشه به‌عنوان خط نخست مواجه با انواع شرایط تنش خشکی و شوری دارد. بررسی عناصر تنظیمی سیس مرتبط به بیان اختصاصی بافت ریشه نشان می‌دهد که موتیف اختصاصی ریشه as-1 در همه *AtCBL*ها به جز *AtCBL5* وجود دارد. ضمن اینکه موتیف اختصاصی ریشه as-1 در *AtCBL*های ۲، ۳، ۴ و ۷ به تعداد دو عدد وجود دارد. صرف‌نظر از بیان بافت اختصاصی، یکی از مهمترین کارکردهای موتیف as-1، افزایش بیان ژن می‌باشد (Lam *et al.*, 1989) که به همین دلیل از آن به‌طور گسترده در نواحی تنظیمی پروموتورهای سنتتیک استفاده می‌شود.

CIPK در اندام‌های مختلف گیاه آناناس نیز نتایج مشابه‌ای مشاهده گردید و ژن‌ها بر اساس میزان شدت بیان به دو دسته با شدت بیان کمتر (شامل دو گروه) و شدت بیان بیشتر (یک گروه) طبقه‌بندی گردیدند (Aslam *et al.*, 2019). ژن *AtCBL4* به‌عنوان یکی از اجزای کلیدی شبکه SOS، در بافت ریشه از بیان بیشتری برخوردار بود. بررسی داده‌های بیانی در مراحل نمو مختلف نشان می‌دهد همه *AtCBL*ها (به جز *AtCBL5*) از بیان بالاتری در بافت ریشه نسبت به دیگر بافت‌ها برخوردار بودند که حکایت از جایگاه اصلی فعالیت این ژن‌ها در بافت



شکل ۳. طبقه‌بندی عناصر سیس شناسایی شده در پروموتور ژن‌های CBL سه گیاه برنج، آرابیدوپسیس و آلوروپوس. تعداد هر یک از عناصر به‌صورت درصد و عدد در نمودار بیان شده است.



شکل ۴. توزیع عناصر مرتبط با هورمون (الف) و مرتبط با تنش (ب) در ناحیه بالادست (۱۵۰۰ جفت باز)

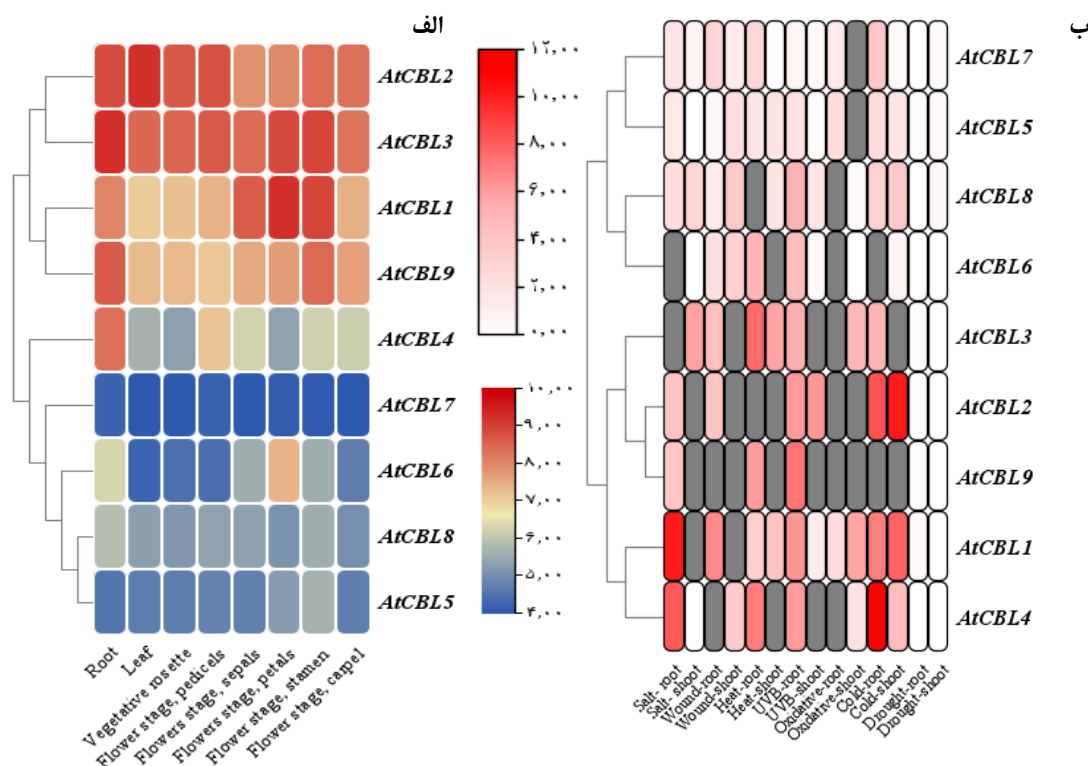
ژن‌های *OsCBL* و *AtCBL*، *AICBL*

در مهندسی ژنتیک و بیان اختصاصی پروتئین‌های *Nitz et al.*, (2001). بررسی حضور موتیف as-1 در پروموتورهای *CBL* آلروپوس نشان داد که هر کدام از ژن‌های *AICBL2*، *AICBL4.1*، *AICBL4.3* دارای دو موتیف as-1، ژن *AICBL4.2* دارای ۶ موتیف، ژن

به عنوان مثال می‌توان به حضور تکراردار موتیف‌های as-1 در یکی از پروموتورهای تجاری مهم یعنی CaMV35S اشاره نمود که از قدرت بیانی بسیار بالایی برخوردار است (Benfey et al., 1990). پروموتورهای خاص ریشه به دلیل کاربرد گسترده آنها

که در ژن‌های *AtCBL10* به تعداد سه، *AtCBL2* به تعداد یک، *AtCBL4* به تعداد یک، *AtCBL7* به تعداد یک و *AtCBL8* به تعداد یک عدد شناسایی شدند. بررسی مطالعات گذشته نشان می‌دهد کمپلکس CBL-CIPK از نقش اساسی در تنظیم پاسخ گیاه به تنش‌های غیرزنده مختلف مانند سرما و شوری برخوردار است (Gu et al., 2008). سطح بیان نسبتاً پایین اعضای *AtCBL* در تنش خشکی نشان می‌دهد شدت بالای بیان مشاهده شده در تنش شوری احتمالاً ناشی از اثرات یونی بوده تا اثرات اسمزی. تفاوت الگوی بیانی در تنش‌ها در دو بافت ریشه و اندام هوایی، بیانگر رویکرد اختصاصی بافت اعضای این خانواده ژنی علی‌رغم همولوژی بالای توالی آنهاست. تعاملات متمایز و در عین حال وابسته به تنش در میان این اعضای شبکه ژنی CBL-CIPK حاکم است (Evrard, 2013). آنتی‌پورتر غشای پلاسمایی Na^+/H^+ با کنترل هموستازی یون سدیم و احتمالاً کمک به حس تنش شوری، نقش مهمی در تحمل نمک در گیاه برنج ایفا می‌کند (El Mahi et al., 2019). شناسایی اولین مورد از تعاملات ژنی در قالب شبکه CBL-CIPK در فنوتیپ‌های فوق حساس به نمک (SOS) صورت گرفت بدین صورت که ژن *AtCBL4* تحت عنوان SOS3 با تعامل با ژن *AtCIPK24* تحت عنوان SOS2، باعث فعال‌سازی کینازها در غشای پلاسمایی شد، که به نوبه خود فعال‌سازی آنتی‌پورترهای Na^+/H^+ تحت عنوان SOS1 و H^+ -ATPase واکوئلی را جهت افزایش تحمل به تنش در پی داشت (Yang et al., 2019; Ma et al., 2020).

AICBL4.4 دارای ۳ موتیف و ژن *AICBL10* دارای یک موتیف as-1 می‌باشند. به نظر می‌رسد تفاوت معنی‌دار در تعداد بیشتر موتیف‌های as-1 شناسایی شده در پروموتورهای *AICBL* (۱۶ عدد به ازای ۱۰ ژن) نسبت به *AtCBL*‌ها (۱۳ عدد به ازای ۱۰ ژن) و *OsCBL*‌ها (۱۶ عدد به ازای ۱۰ ژن) می‌تواند دلیلی بر نقش ویژه ژن‌های *AICBL* در مکانیسم‌های پاسخ به تنش باشد. آنالیز بیان *AICBL*‌ها و بررسی همبستگی شدت بیان این ژن‌ها با موتیف as-1 می‌تواند در این زمینه راه‌گشا باشد. در شکل ۵-ب شمای بیانی ژن‌های *AtCBL* تحت شرایط تنش شوری، گرما، اکسیداتیو، سرما، خشکی، UV و آسیب بافتی در دو بافت ریشه و اندام هوایی ارائه شد. گروه‌بندی بر مبنای داده‌های بیان تحت شرایط تنش مشابه گروه‌بندی ژن‌ها در مراحل نموی بود با این تفاوت که ژن *AtCBL4* به گروه ژن‌هایی با شدت بیان بیشتر اضافه گردید. همان‌گونه که در نمودار نقشه حرارتی نشان داده شد، الگوی متفاوتی از بیان، هم در بین اعضای خانواده ژنی و هم در پاسخ متفاوت هر ژن در تنش‌های مختلف مشاهده گردید. به نظر می‌رسد این تنوع بیان احتمالاً به دلیل وجود مکانیسم‌های تنظیمی متفاوت در تنظیمات بیان این ژن‌ها باشد ضمن اینکه با توجه به وجود عناصر تنظیمی سیس متفاوت در پروموتورها این ژن‌ها می‌تواند دلیلی بر بیان اختصاصی اعضای این خانواده در بافت و البته تنش خاص تلقی شود. بیشترین بیان به ژن‌های *AtCBL1*، *AtCBL2* و *AtCBL4* اختصاص داشت که در تنش‌های شوری و سرما مشاهده شد. با توجه به بیان قابل ملاحظه ژن‌های CBL در تنش سرما، می‌تواند به حضور موتیف‌های LTR در پروموتور این ژن‌ها مرتبط باشد



شکل ۵. نمایش Heatmap بیان اعضای خانواده ژنی *AtCBL* و *OsCBL*. الگوی بیانی و خوشه‌بندی سلسله مراتبی. رنگ قرمز نشان‌دهنده افزایش بیان و رنگ آبی نشان‌دهنده کاهش بیان می‌باشد. ژن‌های *AtCBL* در مراحل مختلف نموی (الف) و تنش‌های مختلف غیر زنده (ب).

حرارت پایین، خشکی و تنش شوری فعال می‌شود (Jaspers *et al.*, 2009). لازم بذکر است پاسخ‌های بیانی مرتبط با تنش منوط به وجود عناصر تنظیمی سیس پاسخ‌گو به تنش بوده که فعال‌سازی این عناصر به نوع بافت، مرحله رشدی و یا زمینه ژنتیکی بستگی دارد. در نتیجه الگوهای متنوع در بیان و کارکرد ژن‌های ارتولوگ در گونه‌های مختلف قابل انتظار می‌باشد (Sun *et al.*, 2015).

با توجه به تعیین توالی ژنوم گیاه آلوروپوس لیتورالیس به عنوان یک منبع ژنتیکی سرشار از ژن‌های درگیر در تنش شوری، خشکی و گرما (Zouari *et al.*, 2007)، فرصتی برای تجزیه و تحلیل نواحی تنظیمی ژن‌های پاسخ‌گو به تنش در یک گونه هالوفیت فراهم گردید. به دلیل نقش و کارکرد ژن‌های CBL در هدایت پیام در تنش‌های غیرزیستی و زیستی، الگوهای بیان اعضای این خانواده ژنی در بسیاری از گیاهان مورد بررسی قرار گرفت. تحقیق حاضر، با تجزیه و تحلیل

وجود عناصر DRE (*AtCBL4.2*, *AtCBL10*)، *AtCBL2* (در همه *AtCBL*ها)، و MBS (در همه *AtCBL*ها بجز *AtCBL2*) و همچنین عدم حضور موتیف‌های LTR در مناطق مختلف پروموتری *AtCBL*ها حاکی از چینش متفاوت این عناصر پروموتری در گیاه هالوفیت آلوروپوس بوده که احتمالاً از کارکرد متفاوتی نیز برخوردار هستند. وجود موتیف‌های حفاظت‌شده در میان اعضای یک خانواده ژنی، شواهدی در خصوص کارکرد و عملکرد این ژن‌ها به لحاظ عملکرد مولکولی و مسیر بیولوژیکی ارائه می‌دهد. به نظر می‌رسد ژن‌هایی که از ترکیب موتیف مشابهی برخوردارند احتمالاً عملکردهای مشابهی را نیز بروز می‌دهند (El-Gebali *et al.*, 2019). بررسی‌ها نشان می‌دهد عناصر DRE و STRE به ترتیب در تنش شوری (Dubouzet *et al.*, 2003) و تنش خشکی (Chen *et al.*, 2002) نقشی کلیدی ایفا می‌کنند در حالی که موتیف MBS در پاسخ به درجه

ماهیت بیان اختصاصی و بیان افزایشنده این موتیف در فرایندهای تنظیم بیان این ژن بسیار حائز اهمیت می‌باشد. بنظر می‌رسد بررسی الگوی بیانی خانواده ژنی *AICBL* در مطالعات آتی می‌تواند اطلاعات تکاملی و کارکردی موردنیاز این خانواده ژنی را ارائه نماید. نتایج این تحقیق در کنار بررسی عملکردی ژن‌های *AICBL* می‌تواند زمینه درک مسیرهای مهم پیام‌رسانی را در گیاهان فراهم آورد.

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 می‌شود.

REFERENCES

- Abe H, Yamaguchi-Shinozaki K, Urao T, Iwasaki T, Hosokawa D, Shinozaki K (1997) Role of Arabidopsis MYC and MYB homologs in drought-and abscisic acid-regulated gene expression. *The Plant Cell*. 9(10): 1859-1868.
- Arab M, Najafi-Zarrini H, Nematzadeh G, Hashemi SH (2021a) In silico analysis of CBL gene family in the halophyte plant *Aeluropus littoralis* and the model plant *Arabidopsis thaliana*. *Crop Biotechnology*. 10(32): 17-35.
- Arab M, Najafi Zarrini H, Nematzadeh G, Hashemipetroudi SH (2021b) Bioinformatic analysis of calcium-dependent protein kinase (CPK) in *Aeluropus littoralis* L. *Crop Biotechnology*. 11(33): 1-17.
- Arend D, Lange M, Chen J, Colmsee C, Flemming S, Hecht D, Scholz U (2014) e! DAL-a framework to store, share and publish research data. *BMC bioinformatics*. 15(1): 1-13.
- Aslam M, Fakher B, Jakada BH, Zhao L, Cao S, Cheng Y, Qin Y (2019) Genome-wide identification and expression profiling of CBL-CIPK gene family in pineapple (*Ananas comosus*) and the role of AcCBL1 in abiotic and biotic stress response. *Biomolecules*. 9(7): 293.
- Atif RM, Shahid L, Waqas M, Ali B, Rashid MaR, Azeem F, Nawaz MA, Wani SH, Chung G (2019) Insights on calcium-dependent protein kinases (CPKs) signaling for abiotic stress tolerance in plants. *International journal of molecular sciences*. 20(21): 5298.
- Aysha J, Noman M, Wang F, Liu W, Zhou Y, Li H, Li X (2018) Synthetic promoters: designing the cis regulatory modules for controlled gene

- expression. *Molecular biotechnology*. 60(8): 608-620.
- Benfey PN, Ren L, Chua N-H (1990) Tissue-specific expression from CaMV 35S enhancer subdomains in early stages of plant development. *The EMBO journal*. 9(6): 1677-1684.
- Chen W, Provart NJ, Glazebrook J, Katagiri F, Chang H-S, Eulgem T, Mauch F, Luan S, Zou G, Whitham SA (2002) Expression profile matrix of Arabidopsis transcription factor genes suggests their putative functions in response to environmental stresses. *The Plant Cell*. 14(3): 559-574.
- Davarpanah SJ, Dana M, Bakhshi Khaniki G, Mokhtarieh AA (2018) Generation of fungal laccase producing transgenic tobacco plants using a root-specific expression promoter. *Crop Biotechnology*. 8(24): 47-58.
- Demidchik V, Shabala S, Isayenkov S, Cuin TA, Pottosin I (2018) Calcium transport across plant membranes: mechanisms and functions. *New Phytologist*. 220(1): 49-69.
- Dodd AN, Kudla J, Sanders D (2010) The language of calcium signaling. *Annual review of plant biology*. 61: 593-620.
- Dolatabadi B, Ranjbar GA, Najafi-Zarrini H, Hashemi-Petroudi SH (2020) Characterization and Role of the Dehydrin Proteins Family in Abiotic Stress Tolerance in *Aeluropus littoralis*. *Crop Biotechnology*. 10(31): 101-115.
- Dubouzet JG, Sakuma Y, Ito Y, Kasuga M, Dubouzet EG, Miura S, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2003) OsDREB genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought-, high-salt- and cold-responsive gene expression. *The Plant Journal*. 33(4): 751-763.
- Edel KH, Marchadier E, Brownlee C, Kudla J, Hetherington AM (2017) The evolution of calcium-based signalling in plants. *Current Biology*. 27(13): R667-R679.
- El-Gebali S, Mistry J, Bateman A, Eddy SR, Luciani A, Potter SC, Qureshi M, Richardson LJ, Salazar GA, Smart A (2019) The Pfam protein families database in 2019. *Nucleic acids research*. 47(D1): D427-D432.
- El Mahi H, Pérez-Hormaeche J, De Luca A, Villalta I, Espartero J, Gámez-Arjona F, Fernández JL, Bundó M, Mendoza I, Mieulet D (2019) A critical role of sodium flux via the plasma membrane Na⁺/H⁺ exchanger SOS1 in the salt tolerance of rice. *Plant physiology*. 180(2): 1046-1065.
- Evrard A (2013) Cell type-specific transcriptional responses of plants to salinity.
- Faraji S, Hashemi-Petroudi SH, Najafi-Zarrini H, Ranjbar G (2018) Characterization and expression profiling of AIPKL gene in response to salinity stress and recovery conditions in halophyte *Aeluropus littoralis*. *Crop Biotechnology*. 7(20): 13-27.
- Fatemi Ardestani SF, Nematzadeh G, Askari H, Hashemi H (2014) Identification and isolation of transcripts in response to KCl from *Aeluropus littoralis*. *Crop Biotechnology*. 4(6): 73-83.
- Gu Z, Ma B, Jiang Y, Chen Z, Su X, Zhang H (2008) Expression analysis of the calcineurin B-like gene family in rice (*Oryza sativa* L.) under environmental stresses. *Gene*. 415(1-2): 1-12.
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. 41: 95-98.
- Hashemi SH, Arab M, Dolatabadi B, Kuo Y-T, Baez MA, Himmelbach A, Nematzadeh G, Maibody SaMM, Schmutzer T, Mälzer M (2020) Initial Description of the Genome of *Aeluropus Littoralis*, a Halophile Grass.
- Hashemi SH, Nematzadeh G, Askari H, Ghahary S (2014) Involvement of Cytosine DNA methylation in

- different developmental stages of *Aeluropus littoralis*. *Journal of Plant Molecular Breeding*. 2(2): 56-67.
- Hashemi SH, Nematzadeh G, Askari H, Ghasemi Y (2012) Pattern of DNA cytosine methylation in *Aeluropus littoralis* during temperature stress. *Journal of Plant Molecular Breeding*. 1(1): 16-24.
- Hou L, Chen L, Wang J, Xu D, Dai L, Zhang H, Zhao Y (2012) Construction of stress responsive synthetic promoters and analysis of their activity in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant molecular biology reporter*. 30(6): 1496-1506.
- Hussain J, Bibi G, Shafiq S (2020) Calcium Dependent Protein Kinases in Plants. *Protein Kinases and Stress Signaling in Plants: Functional Genomic Perspective*. 192-225.
- Jaspers P, Blomster T, Brosché M, Salojärvi J, Ahlfors R, Vainonen JP, Reddy RA, Immink R, Angenent G, Turck F (2009) Unequally redundant RCD1 and SRO1 mediate stress and developmental responses and interact with transcription factors. *The Plant Journal*. 60(2): 268-279.
- Jiang M, Zhao C, Zhao M, Li Y, Wen G (2020) Phylogeny and Evolution of Calcineurin B-Like (CBL) Gene Family in Grass and Functional Analyses of Rice CBLs. *Journal of Plant Biology*. 1-14.
- 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(9): 1236-1240.
- Jung H-J, Kayum MA, Thamilarasan SK, Nath UK, Park J-I, Chung M-Y, Hur Y, Nou I-S (2017) Molecular characterisation and expression profiling of calcineurin B-like (CBL) genes in Chinese cabbage under abiotic stresses. *Functional Plant Biology*. 44(7): 739-750.
- Kaur A, Pati PK, Pati AM, Nagpal AK (2017) In-silico analysis of cis-acting regulatory elements of pathogenesis-related proteins of *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa*. *PloS one*. 12(9): e0184523.
- Kaur G, Pati PK (2016) Analysis of cis-acting regulatory elements of respiratory burst oxidase homolog (Rboh) gene families in *Arabidopsis* and rice provides clues for their diverse functions. *Computational biology and chemistry*. 62: 104-118.
- Ladan Moghdam A (2020) Genome wide bioinformatics analysis BES1 gene family in *Vitis vinifera* L. *Crop Biotechnology*. 10(30): 71-86.
- Lam E, Benfey PN, Gilmartin PM, Fang R-X, Chua N-H (1989) Site-specific mutations alter in vitro factor binding and change promoter expression pattern in transgenic plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 86(20): 7890-7894.
- Lamesch P, Berardini TZ, Li D, Swarbreck D, Wilks C, Sasidharan R, Muller R, Dreher K, Alexander DL, Garcia-Hernandez M (2012) The *Arabidopsis* Information Resource (TAIR): improved gene annotation and new tools. *Nucleic acids research*. 40(D1): D1202-D1210.
- Lescot M, Déhais P, Thijs G, Marchal K, Moreau Y, Van De Peer Y, Rouzé P, Rombauts S (2002) PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. *Nucleic acids research*. 30(1): 325-327.
- Liu W, Mazarei M, Rudis MR, Fethe MH, Peng Y, Millwood RJ, Schoene G, Burris JN, Stewart Jr CN (2013) Bacterial pathogen phyto-sensing in transgenic tobacco and *Arabidopsis* plants. *Plant biotechnology journal*. 11(1): 43-52.
- Lu T, Zhang G, Sun L, Wang J, Hao F (2017) Genome-wide identification of CBL family and expression analysis of

- CBLs in response to potassium deficiency in cotton. *PeerJ*. 5: e3653.
- Lu Y, Sun J, Yang Z, Zhao C, Zhu M, Ma D, Dong T, Zhou Z, Liu M, Yang D (2019) Genome-wide identification and expression analysis of glycine-rich RNA-binding protein family in sweet potato wild relative *Ipomoea trifida*. *Gene*. 686: 177-186.
- 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(16): 5668.
- Mali KV, Kumar A, Singh A (2020) Regulation of Stress Responses in Plants by Calcium Dependent Protein Kinases. *Protein Kinases and Stress Signaling in Plants: Functional Genomic Perspective*. 226-247.
- Martínez-Atienza J, Jiang X, Garcíadeblas B, Mendoza I, Zhu J-K, Pardo JM, Quintero FJ (2007) Conservation of the salt overly sensitive pathway in rice. *Plant physiology*. 143(2): 1001-1012.
- 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.
- Mohammadian N (2020) Phylogenetic, structure and expression analysis of growth regulatory factors (GRF) genes in wheat (*Triticum aestivum* L.) using in silico methods. *Crop Biotechnology*. 10(31): 45-60.
- Mohanta TK, 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(1): 38.
- Nitz I, Berkefeld H, Puzio PS, Grundler FM (2001) *Pyk10*, a seedling and root specific gene and promoter from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science*. 161(2): 337-346.
- Saad RB, Romdhan WB, Zouari N, Azaza J, Mieulet D, Verdeil J-L, Guiderdoni E, Hassairi A (2011) Promoter of the *ALSAP* gene from the halophyte grass *Aeluropus litoralis* directs developmental-regulated, stress-inducible, and organ-specific gene expression in transgenic tobacco. *Transgenic research*. 20(5): 1003-1018.
- Scherf U, Ross DT, Waltham M, Smith LH, Lee JK, Tanabe L, Kohn KW, Reinhold WC, Myers TG, Andrews DT (2000) A gene expression database for the molecular pharmacology of cancer. *Nature genetics*. 24(3): 236.
- Schmid M, Davison TS, Henz SR, Pape UJ, Demar M, Vingron M, Schölkopf B, Weigel D, Lohmann JU (2005) A gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development. *Nature genetics*. 37(5): 501-506.
- Shahriari AG, Tahmasebi A, Sazegari S (2018) Regulatory Network Identification, Promoter and Expression Analysis of *Arabidopsis thaliana* *NPR1* in Defense Responses against Stresses. *Notulae Scientia Biologicae* 10(3): 333-339.
- Sun T, Wang Y, Wang M, Li T, Zhou Y, Wang X, Wei S, He G, Yang G (2015) Identification and comprehensive analyses of the CBL and CIPK gene families in wheat (*Triticum aestivum* L.). *BMC plant biology*. 15(1): 269.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipinski A, Kumar S (2013) MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution*. 30(12): 2725-2729.
- Wang M, Gu D, Liu T, Wang Z, Guo X, Hou W, Bai Y, Chen X, Wang G (2007) Overexpression of a putative maize calcineurin B-like protein in *Arabidopsis* confers salt tolerance. *Plant Molecular Biology*. 65(6): 733-746.
- Wittkopp PJ, Kalay G (2012) Cis-regulatory elements: molecular mechanisms and evolutionary processes underlying divergence. *Nature Reviews Genetics*. 13(1): 59-69.
- Wu Y, Ding N, Zhao X, Zhao M, Chang Z, Liu J, Zhang L (2007) Molecular

- characterization of PeSOS1: the putative Na⁺/H⁺ antiporter of *Populus euphratica*. *Plant molecular biology*. 65(1-2): 1.
- Xiao J, Hu R, Gu T, Han J, Qiu D, Su P, Feng J, Chang J, Yang G, He G (2019) Genome-wide identification and expression profiling of trihelix gene family under abiotic stresses in wheat. *BMC genomics*. 20(1): 1-14.
- Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1994) A novel cis-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. *The Plant Cell* 6(2): 251-264.
- Yamazaki Y, Tsuchiya R, Takahashi Y, Asanuma T, Shidahara Y, Sakaniwa S (2010) Rice Genes in Oryzabase. *Nature Precedings*. 1-1.
- 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(10): 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.
- Zhang H, Yang B, Liu W-Z, Li H, Wang L, Wang B, Deng M, Liang W, Deyholos MK, Jiang Y-Q (2014) Identification and characterization of CBL and CIPK gene families in canola (*Brassica napus* L.). *BMC plant biology*. 14(1): 8.
- Zouari N, Saad RB, Legavre T, Azaza J, Sabau X, Jaoua M, Masmoudi K, Hassairi A (2007) Identification and sequencing of ESTs from the halophyte grass *Aeluropus litoralis*. *Gene*. 404(1): 61-69.
- Scherf U, Ross DT, Waltham M, Smith LH, Lee JK, Tanabe L, Kohn KW, Reinhold WC, Myers TG, Andrews DT (2000) A gene expression database for the molecular pharmacology of cancer. *Nature Genetics* 24(3): 236.
- Schmid M, Davison TS, Henz SR, Pape UJ, Demar M, Vingron M, Schölkopf B, Weigel D, Lohmann JU (2005) A gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development. *Nature Genetics* 37(5): 501-506.
- Shahriari AG, Tahmasebi A, Sazegari S (2018) Regulatory network identification, promoter and expression analysis of *Arabidopsis thaliana* npr1 in defense responses against stresses. *Notulae Scientia Biologicae* 10(3): 333-339.
- Sun T, Wang Y, Wang M, Li T, Zhou Y, Wang X, Wei S, He G, Yang G (2015) Identification and comprehensive analyses of the cbl and cipk gene families in wheat (*Triticum aestivum* L.). *BMC Plant Biology* 15(1): 269.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipinski A, Kumar S (2013) Mega6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*. 30(12). 2725-2729.
- Wang M, Gu D, Liu T, Wang Z, Guo X, Hou W, Bai Y, Chen X, Wang G (2007) Overexpression of a putative maize calcineurin B-like protein in *Arabidopsis* confers salt tolerance. *Plant Molecular Biology* 65(6): 733-746.
- Wittkopp PJ, Kalay G (2012) Cis-regulatory elements: Molecular mechanisms and evolutionary processes underlying divergence. *Nature Reviews Genetics* 13(1): 59-69.
- Wu Y, Ding N, Zhao X, Zhao M, Chang Z, Liu J, Zhang L (2007) Molecular characterization of pesos1: The putative NA⁺/H⁺ antiporter of *Populus euphratica*. *Plant Molecular Biology* 65(1-2): 1.
- Xiao J, Hu R, Gu T, Han J, Qiu D, Su P,

- Feng J, Chang J, Yang G, He G (2019) Genome-wide identification and expression profiling of trihelix gene family under abiotic stresses in wheat. *BMC Genomics* 20(1): 1-14.
- Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1994) A novel cis-acting element in an arabidopsis gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. *The Plant Cell* 6(2): 251-264.
- 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(10): 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.
- Zhang H, Yang B, Liu W-Z, Li H, Wang L, Wang B, Deng M, Liang W, Deyholos MK, Jiang Y-Q (2014) Identification and characterization of cbl and cipk gene families in canola (*Brassica napus* L.). *BMC Plant Biology* 14(1): 8.
- Zouari N, Saad RB, Legavre T, Azaza J, Sabau X, Jaoua M, Masmoudi K, Hassairi A (2007) Identification and sequencing of ests from the halophyte grass *Aeluropus littoralis*. *Gene* 404(1): 61-69.