

مطالعه بیوانفورماتیکی خانواده ژنی آنتی پورترهای کلسیم/کاتیون (*CaCAs*) در ذرت (*Zea mays* L.)بهناز کریمی لاکه¹، محمدمهدی سوهانی²، امین عابدی^{3*}

1. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.

2. دانشیار، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.

3. دانش‌آموخته دکترای بیوتکنولوژی کشاورزی-گیاهی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.

(تاریخ دریافت: 1399/1/15 - تاریخ پذیرش: 1399/3/22)

Bioinformatical study of Calcium/cation (*CaCA*) antiporters gene family in maize (*Zea mays* L.)Behnaz Karami Lake¹, Mohammad Mehdi Sohani², Amin Abedi^{3*}

1. M.Sc. Graduated, Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

2. Associate Professor, Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture Science, University of Guilan, Rasht, Iran

3. PhD Graduated, Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

(Received: Apr. 3, 2020 - Accepted: Jun. 11, 2020)

Abstract

The Ca^{2+} /cation antiporters (*CaCA*) superfamily proteins play vital function in Ca^{2+} ion homeostasis, which is an important event during development and defense response. In the present study, using related database, 14 *CaCA* genes were identified in the maize genome and classified according to their structural organization and evolutionary association with the identified CAX, CCX and MHX proteins. Most of the *ZmCaCA* proteins had two Na_Ca_ex domains. All of the identified genes had at least one functional motif and gene structure of each *CaCA* subgroup is highly conserved. In the prediction of reactive *miRNAs* relative to *CaCA* genes in maize, 33 different *miRNA* variants were identified that regulate the expression of 13 *CaCA* genes through cleavage or inhibition of translation. In addition, several cis-acting regulatory elements in *ZmCaCA* genes were found to be related to hormones stress responses. The variable expression of most *ZmCaCA* genes at different stages of development indicates their distinct role in development. Expression of these genes in abiotic stresses (cold, salt, and drought) indicates their role in stress response. The greatest high expression and down regulation of gene expression is related to *CAX* genes. The results of this study provide basic data about phylogeny and putative function of these genes for future studies on the role of *CaCA* genes in maize.

Keywords: Bioinformatics, Microarray, Phylogenetic analysis, Promoter.

چکیده

پروتئین‌های خانواده آنتی پورتر یون کلسیم/کاتیون (*CaCA*) نقش حیاتی در هموستازی یون کلسیم دارند که یک رویداد مهم در طول نمو و پاسخ دفاعی گیاه است. در مطالعه حاضر با استفاده از داده‌های بانک‌های اطلاعاتی مرتبط، 14 ژن *CaCAs* در ژنوم ذرت شناسایی و براساس سازماندهی ساختاری و ارتباط تکاملی آن‌ها با پروتئین‌های شناسایی شده به سه گروه *CAX*، *CCX* و *MHX* طبقه‌بندی شدند. بیشتر پروتئین‌های *ZmCaCA* دارای دو دمین *Na_Ca_ex* بودند. تمامی ژن‌های شناسایی شده دارای حداقل یک موتیف کارکردی بوده و ساختار ژنی هر زیر گروه *CaCA* بسیار حفاظت شده است. در پیش‌بینی مولکول‌های *miRNA* واکنش‌گر نسبت به ژن‌های *CaCA* در ذرت 33 نوع *miRNA* متفاوت شناسایی شد که در تنظیم بیان پس از رونویسی 13 ژن *CaCAs* از طریق برش mRNA یا ممانعت از ترجمه دخالت دارند. علاوه بر این، چندین عنصر تنظیمی *cis* پاسخ به تنش‌ها و هورمون‌ها در پیش‌بر این ژن‌ها شناسایی شد. بیان متغیر اکثر ژن‌های *ZmCaCA* در مراحل مختلف رشد و نمو، نقش مشخص آن‌ها در نمو ذرت را نشان می‌دهد. همچنین القاء بیان این ژن‌ها در پاسخ به تنش‌های غیر زیستی (سرما، شوری، خشکی) کارکرد دفاعی ژن‌های *ZmCaCA* را مشخص نمود. بیشترین افزایش و کاهش بیان ژن مربوط به ژن‌های *CAX* است. نتایج این مطالعه اطلاعات پایه در مورد روابط فیلوژنی و کارکردهای احتمالی ژن‌های *CaCA* ذرت را برای پژوهش‌های آتی فراهم می‌سازد.

واژه‌های کلیدی: بررسی فیلوژنتیکی، بیوانفورماتیک، پیش‌بر، ریزآرایه.

مقدمه

فرآیندهای بیولوژیکی در گیاهان در سطوح سلول، اندام و یا کل سیستم به صورت مستقیم یا غیر مستقیم نیازمند مشارکت کاتیون‌هایی مانند Na^+ ، Ca^{2+} ، K^+ و Mg^{2+} است. غلظت فیزیولوژیکی این عناصر در خارج سلول، سیتوزول و ارگانل‌ها براساس نیاز سلول به شدت از طریق کانال‌ها، ترانسپورترها و پمپ‌ها کنترل می‌شود (Giladi *et al.*, 2016). به عنوان مثال غلظت کلسیم سیتوپلاسم در سطح 50 تا 150 نانومول حفظ می‌شود حتی اگر سلول در محیطی با غلظت بسیار بالای کلسیم (0.1 تا 1 میلی‌مول) احاطه شده باشد (Demidchik *et al.*, 2018). کلسیم یک عنصر حیاتی در گیاهان است که به‌عنوان یک ماده مغذی ضروری و یک پیام‌بر ثانویه نقش ایفا می‌کند (Hirschi, 2004; Case *et al.*, 2007). این عنصر در انتقال پیام در واکنش به محرک‌های مختلف داخلی و یا خارجی دخالت دارد (Dodd *et al.*, 2010; Spalding and Harper, 2011). غلظت یون کلسیم در هنگام تحریک گیاه به‌وسیله محرک‌ها افزایش یافته و توسط پروتئین‌های متصل شده به کلسیم یا پروتئین‌های حساس این افزایش غلظت درک می‌شود. این پروتئین‌ها پیام پایین‌دست را برای انتقال آبخار فسفریلاسیون انتقال می‌دهند که در نهایت منجر به تنظیم بیان ژن می‌شود (Tuteja and Mahajan, 2007). افزایش غلظت یون کلسیم در داخل سلول هم‌چنین در پاسخ به تنظیم‌کننده‌های رشد، مواد مغذی گیاهی، پاتوژن‌ها و تنش‌های غیرزنده گزارش شده است، که نشان‌دهنده نقش پیام‌رسانی کلسیم در طول رشد و پاسخ گیاهان به تنش‌ها می‌باشد (Kader and Lindberg, 2010; Zhang *et al.*, 2014). تغییر در غلظت یون کلسیم در غشای سلول اساساً توسط سه گروه از انتقال‌دهنده‌ها شامل Ca^{2+} -ATPases

(PMCA)، کانال‌های نفوذپذیر یون کلسیم، و آنتی‌پورترهای یون کلسیم/کاتیون (CaCAs)، که در ترکیب با یکدیگر عمل می‌کنند انجام می‌شود (Axelsen and Palmgren, 2001). پروتئین‌های خانواده آنتی‌پورترهای یون کلسیم/کاتیون در گروه‌های متنوعی از موجودات زنده از گیاهان عالی تا حیوانات گزارش شده است. این پروتئین‌ها معمولاً جریان خروج کلسیم در خلاف شیب غلظت و در مقابل ورود کاتیون‌های مونوالانت مانند سدیم، پتاسیم و هیدروژن را تسهیل می‌کنند (Pittman and Hirschi, 2016). پروتئین‌های کلسیم/کاتیون اساساً تشکیل ابرخانواده می‌دهند، که شامل پنج خانواده مختلف از پروتئین‌های انتقال‌دهنده شامل $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger proteins-YRBG، $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ ، K^+ (NCX) exchanger cation/ Ca^{2+} (NCKX) exchanger و H^+ /cation exchanger (CCX) exchanger (CAX) می‌باشد که براساس عملکرد و رابطه خویشاوندی طبقه‌بندی می‌شوند (Taneja *et al.*, 2016). مطالعات نشان دادند که تمام پروتئین‌های ابر خانواده کلسیم/کاتیون به دلیل داشتن دمین عملکردی سدیم/کلسیم و رابطه تکاملی بسیار نزدیک به عنوان یک خانواده سدیم/کلسیم در نظر گرفته شوند (Singh *et al.*, 2015)، با این وجود با استفاده از تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی و مدل‌سازی ساختار سوم این پروتئین‌ها تأکید شد که اعضای ابر خانواده کاتیون/کلسیم دارای ویژگی‌های ساختاری و عملکردی متنوعی هستند و همه آن‌ها نمی‌توانند در گروه پروتئین NCX طبقه‌بندی شوند (Amagaya *et al.*, 2019). تجزیه و تحلیل ژنوم در تعداد زیادی از آرکئی، باکتری، قارچ، جلبک، گیاهان زراعی و حیوانات نشان داد که پروتئین‌های YBRG منحصرراً در پروکاریوت‌ها حضور دارند، پروتئین‌های CAX در

آراییدوپسیس نسبت به گیاهان شاهد افزایش داد (Corso et al., 2018).

ذرت از مهم‌ترین محصولات غلات در جهان و یک گیاه زراعی مهم در صنعت خوراک و مواد غذایی و همچنین یک سیستم مدل برای مطالعه ژنتیکی گیاهان تک‌لپه است که توالی یابی ژنوم آن کامل شده است (Schnable et al., 2009). موجود بودن اطلاعات ژنومی امکان تجزیه و تحلیل خانواده ژنی *CaCA* با هدف درک تاریخ تکاملی، مکانیسم‌های عملکردی اعضای آن و شناسایی ژن‌های مؤثر این خانواده در فرآیندهای زیستی فراهم کرده است. در این مطالعه مشخصات کلی پروتئین‌ها، جایگاه سلولی، مکانیسم تنظیم بیان پس از رونویسی از طریق مولکول‌های *miRNA* و الگوی بیانی این ژن‌ها در مراحل مختلف نمو و در پاسخ به تنش‌های غیر زیستی بررسی شد. نتایج این بررسی می‌تواند در پژوهش‌های آتی در مورد استفاده از ژن‌های *CaCA* ذرت در تنظیم، بهبود و تغییر پیام‌رسانی وابسته به کلسیم و تولید گیاهان مقاوم و نیز پر محصول مورد استفاده قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

شناسایی اعضای خانواده ژنی *CaCA* در گیاه ذرت به‌منظور شناسایی پروتئین‌های خانواده ژنی *CaCA* در ذرت دو روش استفاده شد. در روش اول ابتدا توالی پروتئینی ژن‌های *CaCA* در آراییدوبسیس و برنج براساس مطالعات انجام‌شده (Pittman and Hirschi, 2016) از پایگاه داده‌های ژنوم آراییدوپسیس (Lamesch et al., 2012) و برنج (Kawahara et al., 2013) دریافت و با استفاده از الگوریتم tBLASTn (Gertz et al., 2006) برای شناسایی کلیه ژن‌های *CaCA* ژنوم ذرت در پایگاه داده فایتوزوم با E-Value 0/01 استفاده شد (Goodstein et al., 2012). در روش دوم پروفایل

همه موجودات زنده شناسایی شده‌اند و CCXها در همه یوکاریوت‌ها به‌جز پروکاریوت‌ها وجود دارند. همچنین که پروتئین‌های NCX و NCKX در سلول‌های جانوری و جلبک‌ها وجود داشته اما در گیاهان عالی حضور ندارند (Pittman and Hirschi, 2016). پروتئین‌های خانواده کاتیون/کلسیم در چندین گونه گیاهی شناسایی شده‌اند که شامل تعداد 13 ژن کد کننده *CaCAs* در آراییدوپسیس، 15 ژن در برنج (Pittman and Hirschi, 2016) و 34 ژن در گندم نان است (Taneja et al., 2016). گزارش‌های مختلف حاکی از عملکرد چندگانه ژن‌های خانواده کلسیم/کاتیون در گیاهان است. دو خانواده CAX و NCL در پاسخ به تنش غیر زیستی و پیام‌رسانی¹ هورمونی و گل‌دهی می‌توانند نقش داشته باشند (Amagaya et al., 2020). ژن *LeCAX2* گوجه‌فرنگی در انتقال یون کلسیم و منیزیم نقش دارد (Edmond et al., 2009). از آنجایی‌که پروتئین‌های کلسیم/کاتیون توانایی جذب یون فلزی را دارند، لذا برای تولید گیاهان زراعی تقویت‌شده از نظر ریز مغذی‌های مورد نیاز انسان و دام و نیز گیاه پالایی مفید به حساب می‌آیند (Park et al., 2009). علاوه بر این، آنالیز گیاهان جهش‌یافته نشان داده است که ژن *CAX1* در تحمل تنش فلزات سنگین در گیاهان براسیکاسه و خویشاوندان دیپلوئید گندم نقش دارد (Navarro-León et al., 2019; Qiao et al., 2019). تغییرات بیان این ژن‌ها در گیاهان مختلف در طول تنش‌ها مشاهده شده است، که نشان‌دهنده نقش آن‌ها در پاسخ به استرس است (Li et al., 2016). فرابیان ژن *AtCCX2* رشد ریشه‌های اصلی و جانبی و شاخساره را در شرایط تنش شوری و اسمزی در گیاهان تراریخته

1. Signaling

و رسم درخت فیلوژنتیکی با نرم‌افزار MEGA7 نزدیک‌ترین همسایه‌ها² (NJ) و آزمون بوت‌استرپ با تکرار 1000 انجام شد (Felsenstein, 1985).
شناسایی موتیف‌های حفاظت‌شده و ساختار اگزون-اینترونی

به‌منظور شناسایی موتیف‌های اختصاصی این خانواده از سرور MEME (Timothy et al., 2009) استفاده شد. پارامترهای مورد استفاده شامل تعداد 10 موتیف و کوتاه‌ترین و بلندترین موتیف‌ها به ترتیب شامل 6 و 50 اسید آمینه بود. از پایگاه داده Pfam و برنامه SMART برای بررسی کارکرد موتیف‌های شناسایی‌شده استفاده شد (Finn et al., 2013; Letunic and Bork, 2018). بررسی ساختار ژنی (اگزون-اینترونی) خانواده CaCA ذرت با استفاده از سرور GSDS2.0 انجام شد (Hu et al., 2015).

بررسی ناحیه پیش‌بر و پیش‌بینی مولکول‌های miRNA واکنش‌گر به ژن‌های CaCA

وجود عناصر cis مختلف در ناحیه تنظیمی هر ژن نقش مهمی در پاسخ ژن به محرک‌های محیطی و زیستی دارد بنابراین، بررسی پیش‌بر اعضای خانواده ژنی CaCAs در ذرت می‌تواند در درک الگوی بیان و کارکرد این ژن‌ها در شرایط مختلف زیستی مفید باشد. برای شناسایی عناصر تنظیمی ناحیه پیش‌بری ژن‌های CaCA، 1500 جفت باز در بالادست کدون شروع ژن‌ها (Zhou et al., 2016) از سایت فایتوزوم (Goodstein et al., 2012) دریافت و شناسایی عناصر تنظیمی مربوط به تنش‌ها و پاسخ به هورمون‌ها با استفاده از وب‌سایت PlantCARE انجام شد (Lescot et al., 2002). توالی‌های

HMM دمین Na_Ca_ex (PF1699) از پایگاه داده Pfam (Bateman et al., 2004) دریافت و از طریق ابزار HMMsearch (Finn et al., 2011) برای جستجوی پروتئین‌های CaCA ذرت در پایگاه Ensemble Plants (Bolser et al., 2016) پارامترهای پیش‌فرض (0/01 E. Value) استفاده شد. توالی‌های تکراری حذف و درنهایت وجود دمین در توالی‌های شناسایی‌شده با استفاده از پایگاه داده Pfam و hmmscan تایید شد (Finn et al., 2011, 2014). وزن مولکولی، طول پروتئین و نقطه ایزو الکتریک محاسبه شده پروتئین‌های CaCA با استفاده از ابزار ProtParam سایت ExPASy محاسبه شد (Gasteiger et al., 2005). برای شناسایی جایگاه سلولی پروتئین‌ها از سرورهای برخط ProtComp (Eric and Lynda, 2005) و CELLO (Yu et al., 2006) استفاده شد. در نام‌گذاری ژن‌های CaCA ذرت، ابتدا پسوند Zm از Zea mays و سپس نام زیر خانواده‌ها (CCX، CAX، NCL، MHX) و درنهایت شماره‌گذاری براساس ترتیب قرار گرفتن ژن‌ها روی کروموزوم انجام شد. تعداد دمین‌های بین‌غشائی¹ پروتئین‌های شناسایی‌شده با استفاده از سرور TMHMM انجام شد (Krogh et al., 2001).

تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی خانواده CaCA در ذرت برای رسم درخت فیلوژنتیکی، از توالی‌های پروتئینی ژن‌های CaCA در آرکیدوپسیس، برنج و ذرت استفاده شد. هم‌ردیف‌سازی پروتئین‌ها براساس پارامترهای پیش‌فرض (جریمه ایجاد gap 15 و جریمه بسط gap 6/66) با استفاده از نرم‌افزار ClustalX 2.0.8 (Larkin et al., 2007) براساس

2. Neighbor Joining

1. Transmembrane

کروموزوم‌های 2، 4، 8 و 9 قرار داشتند. (جدول 1). میانگین تعداد اعضای خانواده ژنی کلسیم/کاتیون در گیاهان 13/5 ژن و برای جلبک‌ها 5/8 ژن است، لذا تعداد اعضای این خانواده ژنی در ذرت تقریباً برابر با میانگین تعداد آن در گیاهان می‌باشد. همچنین همانند سایر گیاهان هیچ عضوی از ژن‌های زیر گروه YRBG در ذرت شناسایی نشد و این زیر گروه اختصاصی پروکاریوت‌ها معرفی می‌شود (Emery et al., 2012).

مطالعات فیزیوشیمیایی این خانواده ژنی با استفاده از ابزار تجزیه و تحلیل پروتئین ExPASy (Artimo et al., 2012) نشان داد که این ژن‌ها از نظر تعداد اسیدهای آمینه، وزن مولکولی و pI باهم تفاوت دارند. طول پروتئین‌های این خانواده از 417 تا 676 اسیدآمینه و وزن مولکولی آن‌ها از 45/2 تا 74/7 کیلودالتون متغیر است. دامنه نقطه ایزوالکتریک این پروتئین‌ها نیز از 4/84 در *ZmCAX4* تا 9/25 در *ZmCCX3* متفاوت است (جدول 1). تجزیه و تحلیل جایگاه سلولی اختلاف بزرگی را در پیش‌بینی ابزارهای مختلف نشان داد. سرور CELLO جایگاه هر پروتئین را در غشای پلاسمایی، ProtComp اکثر آن‌ها را در واکوئل پیش‌بینی کرد (جدول 1). با این حال، ابزارهای دیگر نتایج متنوعی را نشان دادند. ناسازگاری در پیش‌بینی این سرورها در مطالعات دیگر نیز گزارش شده است (Vaid et al., 2012). براساس نتایج به‌دست‌آمده از سرور TMHMM، به استثنای پروتئین‌های *ZmCAX6*، *ZmCAX3*، *ZmCAX4* و *ZmCCX1* که به ترتیب دارای 8، 10، 10، 12 و 13 دمین بین‌غشایی می‌باشند سایر اعضای این خانواده ژنی *CaCA*، حاوی 11 دمین بین‌غشایی هستند. کلاستر یک بزرگ‌ترین و شامل ژن‌های *ZmCAX3*، *ZmCAX2*، *ZmCAX1*، *ZmCAX5*، *ZmCAX6* و *ZmCAX7* همراه با شش ژن از آرآیدوبسیس و شش ژن برنج است. کلاستر دو کوچک‌ترین کلاستر درخت

mRNA ژن‌های *CaCA* در پایگاه داده psRNATarget براساس پارامترهای پیش فرض (ارزش مورد انتظار بالای 3 و جریمه ایجاد و بسط gap به ترتیب برابر 2 و 0/5) مورد بررسی قرار گرفت تا مولکول‌های miRNA واکنش‌گر به این ژن‌ها شناسایی شوند (Dai et al., 2018). ارتباط بین ژن‌ها و مولکول‌های miRNA شناسایی‌شده با نرم‌افزار cytoscape رسم شد (Shannon et al., 2003).

بررسی بیان ژن‌های *CaCA* گیاه ذرت

به‌منظور بررسی بیان ژن‌های *ZmCaCA* داده‌های مربوط به مراحل نمو ذرت و تنش‌های غیر زیستی از پایگاه داده efp Browser (Hoopes et al., 2019) دریافت شد. داده‌های نمو شامل 60 مرحله نمو متفاوت مربوط به 11 اندام ذرت شامل؛ بذر در حال جوانه‌زنی، ریشه اولیه، گیاهچه کامل، ساقه، مریستم انتهایی ساقه، چوب بلال، میانگره، مادگی، تاسل و دانه گرده، برگ، غلاف بلال و بذرمی باشد. همچنین داده‌های مربوط به تنش‌های غیرزیستی شامل گرما، سرما، شوری و خشکی می‌باشد (Sekhon et al., 2010; Li et al., 2011). از نرم‌افزار Mev4 برای خوشه‌بندی¹ داده‌های بیانی براساس روش اقلیدسی² و الگوریتم Complete Linkage و نیز رسم نقشه حرارتی³ استفاده شد (Saeed et al., 2003).

نتایج و بحث

شناسایی اعضای خانواده ژنی *CaCA* در گیاه ذرت در نتیجه جستجوی ژنوم ذرت، 14 ژن از خانواده *CaCAs* شناسایی شد که در نهایت این ژن‌ها براساس جایگاه کروموزومی نام‌گذاری شدند (جدول 1). چهار ژن روی کروموزوم شماره 1، دو ژن روی کروموزوم‌های شماره 3 و 9 و یک ژن روی هر کدام از

1. Clustering
2. Euclidean
3. Heatmap

آراییدوبسیس و دو ژن از برنج است. کلاستر چهار نیز شامل ژن‌های *ZmCCX1*، *ZmCCX2*، *ZmCCX3*، *ZmCCX4*، *ZmCCX5* و *ZmCCX6* از ذرت و پنج ژن از آراییدوبسیس و پنج ژن از برنج است (شکل 1).

فیلوژنتیکی بوده و شامل زیر خانواده NCL است که فاقد ژنی از ذرت، حاوی یک ژن از آراییدوبسیس و دو ژن از برنج است (شکل 1). کلاستر سه دارای چهار عضو که شامل ژن *ZmMHX* از ذرت و یک ژن از

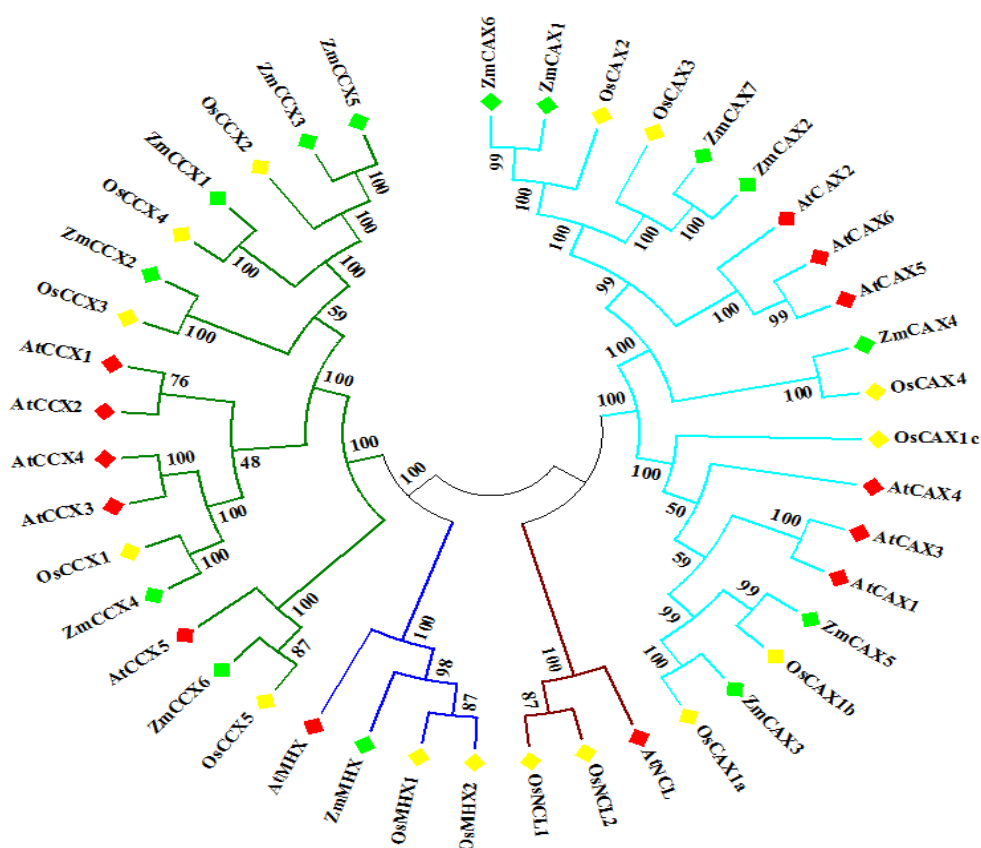
جدول 1. مشخصات ژن‌های *CaCA* شناسایی شده در ژنوم ذرت

جایگاه ژن	نام ژن	کروموزوم	طول پروتئین*	نقطه ایزوالکتریک	وزن پروتئین**	جایگاه سلولی***
GRMZM2G046480	<i>ZmCAX1</i>	1	676	9.17	74.7	غشای پلاسمایی / -
GRMZM2G040017	<i>ZmCAX2</i>	2	419	5.29	45.5	غشای پلاسمایی / واکوئل
GRMZM2G011592	<i>ZmCAX3</i>	3	535	6.37	56.8	غشای پلاسمایی / -
GRMZM2G010779	<i>ZmCAX4</i>	5	443	4.84	47	غشای پلاسمایی / واکوئل
GRMZM5G809587	<i>ZmCAX5</i>	8	506	5.57	54.2	غشای پلاسمایی / واکوئل
GRMZM2G053004	<i>ZmCAX6</i>	9	441	5.26	47.9	غشای پلاسمایی / واکوئل
GRMZM2G143356	<i>ZmCAX7</i>	10	417	5.19	45.2	غشای پلاسمایی / واکوئل
GRMZM2G168108	<i>ZmCCX1</i>	1	579	9.18	59.1	غشای پلاسمایی / واکوئل
GRMZM2G017388	<i>ZmCCX2</i>	1	639	9.25	66.4	غشای پلاسمایی / واکوئل
GRMZM2G134450	<i>ZmCCX3</i>	1	589	8.59	59.9	غشای پلاسمایی / واکوئل
GRMZM2G013728	<i>ZmCCX4</i>	3	640	5.73	68.8	غشای پلاسمایی / واکوئل
GRMZM2G340578	<i>ZmCCX5</i>	5	576	6.74	58.7	غشای پلاسمایی / واکوئل
GRMZM2G004414	<i>ZmCCX6</i>	10	494	8.4	52.5	غشای پلاسمایی / غشای پلاسمایی
GRMZM2G126601	<i>ZmMHX</i>	4	536	5.02	59	غشای پلاسمایی / -

* طول پروتئین براساس تعداد اسیدهای آمینه

** وزن پروتئین براساس کیلوالتون

*** جایگاه سلولی پروتئین‌ها براساس پیش‌بینی ابزار Cello و Protcomp



شکل 1. رابطه فیلوژنتیکی پروتئین‌های CaCA ذرت، آراییدوپسیس و برنج. هم‌رديف‌سازي چندگانه دمين CaCAs با نرم‌افزار ClustalX انجام و درخت به کمک نرم‌افزار MEGA7 براساس روش نزدیک‌ترین همسایه‌ها و آزمون بوت استرپ با تکرار 1000 انجام شد. هر یک از زیر گروه‌های CAX، NCL، MHX و CCX به ترتیب با رنگ‌های فیروزه‌ای، قهوه‌ای، آبی و سبز نشان داده شده‌اند. همچنین ژن‌های ذرت با رنگ سبز، برنج با رنگ زرد و آراییدوپسیس با رنگ قرمز مشخص هستند.

در زیر گروه CAX حداقل و حداکثر انطباق به ترتیب مربوط به جفت ژن *OsCAX1a* و *OsCAX3* (انطباق 43/8 درصد) و جفت ژن *ZmCAX2* و *ZmCAX7* (انطباق 95/2 درصد) است. در زیر گروه NCL میزان حداقل و حداکثر انطباق برابر با 60 و 66/6 درصد به ترتیب برای جفت ژن‌های *OsNCL1*، *AtNCL* و *OsNCL2* و محاسبه شد. در نهایت برای زیر گروه MHX حداقل و حداکثر انطباق برای جفت ژن‌های *OsMHX2* و *OsMHX1* (انطباق 21 درصد) و *ZmMHX* و *OsMHX1* (انطباق 79/1 درصد) می‌باشد. باید توجه داشت که دو ژن *OsCCX5* و *OsMHX2* به ترتیب دارای طول 266 و 118 اسید آمینه می‌باشند که نسبت به سایر ژن‌های این

با توجه به این‌که ذرت و برنج تک‌لپه‌ای و نسبت به آراییدوپسیس دولپه دارای روابط تکاملی نزدیک‌تری هستند، در هر چهار کلاستر درخت فیلوژنتیکی ژن‌های *CaCA* ذرت و برنج در زیرگروه‌های مشترک قرار گرفته‌اند (شکل 1). همان‌طور که مشاهده می‌شود اگرچه، پروتئین‌های NCL و MHX کلادهای مجزا را تشکیل دادند اما، رابطه فیلوژنتیکی بسیار نزدیکی به ترتیب با پروتئین‌های CAX و CCX نشان دادند. حداقل و حداکثر انطباق توالی برای زیر گروه CCX به ترتیب برای جفت ژن‌های *AtCCX3* و *OsCCX5* (انطباق¹ 15/3 درصد) و جفت ژن *ZmCCX5* و *ZmCCX3* (انطباق 86/4 درصد) می‌باشد. همچنین

1. Identity

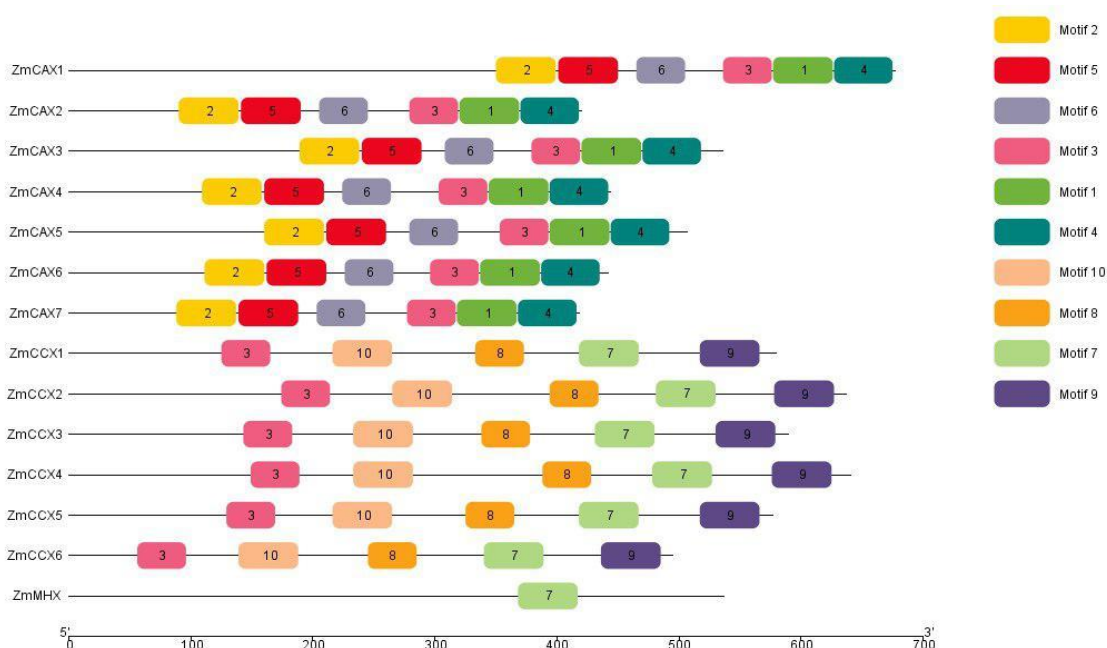
تا 10 را داشته و موتیف شماره 3 با حضور در هر دو گروه، دارای بیشترین فراوانی است. در پروتئین MHX فقط موتیف شماره 7 وجود دارد (شکل 2). همه ژن‌ها حداقل دارای یک موتیف کارکردی می‌باشند. ژن‌های *ZmCAX* دارای موتیف کارکردی یک و ژن‌های *ZmCCX* و *ZmMHX* موتیف کارکردی 7 را دارند (جدول 2). با این حال جایگاه این موتیف یکسان نیست و در ژن‌های *CAX* نزدیک به کربوکسیل و در ژن‌های *CCX* نزدیک به انتهای آمینو پروتئین قرار دارد (شکل 2).

بررسی ساختار اگزون-اینترونی اعضا خانواده ژنی *CaCA* ذرت نشان دهنده حفاظت‌شدگی بالا و الگوی اختصاصی هر زیر گروه این خانواده می‌باشد. در زیر گروه *CCX* به جز ژن *ZmCCX6* که دارای دو اگزون می‌باشد، سایر ژن‌ها فاقد اگزون بودند. همچنین ژن‌های زیر گروه *CAX* بین 9 تا 11 اگزون و ژن *ZmMHX* 8 اگزون دارند. الگوی اختصاصی موتیف‌های حفاظت‌شده و نیز ساختار اگزون-اینترونی این ژن‌ها نشان‌دهنده اختصاصی بودن مسیر تکاملی هر زیر خانواده می‌باشد (شکل 3).

خانواده ژنی کوتاه‌تر است و لذا علی‌رغم گروه‌بندی صحیح این پروتئین‌ها میزان انطباق آن‌ها کاهش یافته است. رابطه تکاملی بین پروتئین‌های *CaCA* ارتولوگ در بین گونه‌های مختلف گیاهی نیز قبلاً مشاهده شده است (Emery *et al.*, 2012; Pittman and Hirschi., 2016).

شناسایی موتیف‌های حفاظت‌شده و ساختار ژنی
برای شناسایی موتیف‌های حفاظت‌شده در توالی پروتئینی خانواده *CaCAs*، توالی پروتئین‌های این خانواده به وسیله سرور MEME ارزیابی شد. براساس این بررسی 10 موتیف حفاظت‌شده در توالی پروتئینی این ژن‌ها شناسایی شد (شکل 2). با توجه به نوع کارکرد MEME در تعیین حداقل و حداکثر طول موتیف، موتیف‌های شناسایی شده پیوسته (بدون gap) و از نوع موند می‌باشند (Wijaya *et al.*, 2007; Dinh and Rajasekaran, 2013).

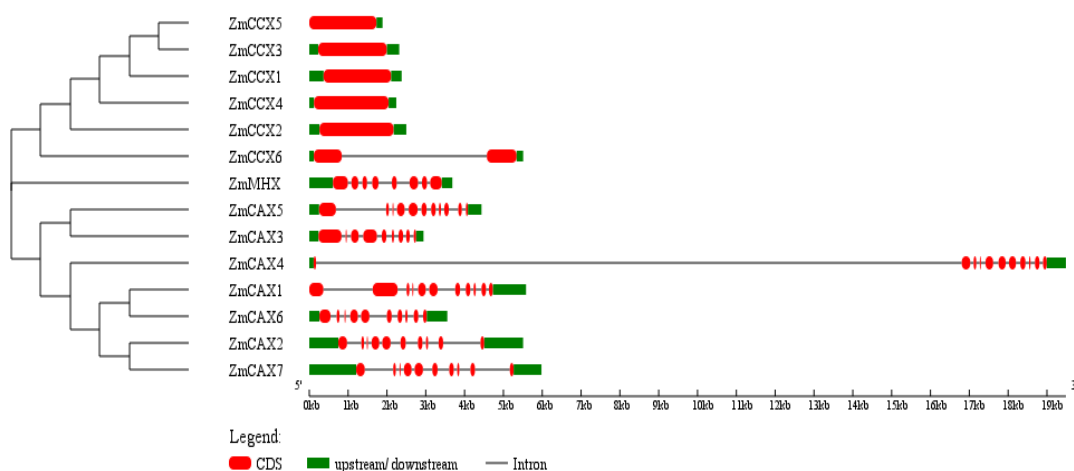
ارزیابی کارکرد موتیف‌ها با Pfam و SMART نشان داد که فقط موتیف‌های 1 و 7 اختصاصی دمین *Na_Ca_ex* هستند و سایر موتیف‌ها فاقد عملکرد می‌باشند (جدول 2). تمامی موتیف‌های شناسایی‌شده در همه پروتئین‌ها وجود ندارد. ژن‌های *CAX* موتیف‌های 1 تا 6 و ژن‌های *CCX* موتیف‌های 7



شکل 2. موتیف‌های حفاظت‌شده پروتئین‌های CaCA ذرت که با استفاده از سرور MEME شناسایی شده‌اند. هر موتیف با رنگ متفاوت مشخص شده است.

جدول 2. موتیف‌های حفاظت‌شده شناسایی شده با سرور MEME در پروتئین‌های CaCA ذرت

موتیف	طول	فراوانی	امتیاز	توالی	کارکرد موتیف
1	50	7	1.5e-189	MFAMK BKLDITLGV AIGSSTQISM FVIFPCV VIGWMMGQEMDLNFQLFET	Sodium/calcium exchanger protein
2	50	7	2.6e-167	ERLGYATEQLAIYTGPTV GLLNATFGNATEMIIAIYALKNGMIRVVQQS	نامشخص
3	50	13	1.4e-143	LSEYFVAAJEGASASLRPVAFISVILLPJVGNAAEHASAI	نامشخص
4	39	7	2.1e-117	ATLFTITVLVVAFMLQDGTSNYLKGLMLILCYLIVAASFVHVDPDSEN	نامشخص
5	50	7	2.8e-103	LGSILSNMLLVLGCAFFAGGLVHSNKDQVFNKATAVVNSGLLLMAVLGLM	نامشخص
6	41	7	3.9e-083	GKSEVALSRFSSCIMLVAYASLYFFQLKSHRNLYSPIGSEE	نامشخص
7	41	7	4.1e-068	FVMSVJWAYTJARELVALLVAIGYILGKPSVLGVTVLAWGNSLGLDVAN	Sodium/calcium exchanger protein
8	48	6	1.2e-050	ELPLYLPRRLTIPDIAGHRWSKPYAVASAAALAPVLLAFTWS	نامشخص
9	41	5	2.4e-042	PADAAA YEAVGFLGAGLAWALVLPVRGMRIDRVLGVLIAIYLCFLAVR	نامشخص
10	29	6	3.3e-043	RRGFVRDVCFLLLALCYLLAVLVSGEVTVWAAASFVSLYAVYVLLVWTSH	نامشخص



شکل 3. ساختار اگزون-اینترونی خانواده ژنی CaCA ذرت که با استفاده از سرور GSDS2.0 آنالیز شده‌اند. نواحی UTR، اگزون‌ها و

اینترن‌ها به ترتیب با رنگ سبز، قرمز و خطوط سیاه مشخص شده‌اند.

نقش ژن‌های *CaCA* در بسیاری از فرآیندهای رشدونموی و دفاعی ذرت است.

پیش‌بینی مولکول‌های *miRNA* واکنش‌گر به ژن‌های *CaCA* در گیاه ذرت

مولکول‌های *miRNA* از طریق جفت‌شدن با mRNA ژن هدف باعث شکاف mRNA یا سرکوب ترجمه می‌شوند و بنابراین آن‌ها عاملی تعیین‌کننده و مولکول‌های راهنما در سیستم خاموش ژن پس از رونوشت‌برداری عمل می‌کنند. مولکول‌های *miRNA* نقش مهمی در تخریب پروتئین، انتقال پیام، نمو گیاهان، پاسخ به تنش و تهاجم پاتوژن دارند (Umate, 2010). در نتیجه بررسی توالی mRNA ژن‌های *CaCA*، مشخص شد 33 نوع *miRNA* متفاوت توانایی تاثیرگذاری روی 13 ژن *CaCA* را دارند. از بین مولکول‌های *miRNA* شناسایی‌شده 20 مورد با برش mRNA و سایر موارد با جلوگیری از ترجمه، توانایی تنظیم بیان ژن‌های *CaCA* پس از رونویسی را دارند (شکل 4).

شناسایی عناصر تنظیمی سیس موجود در ناحیه پرموتری

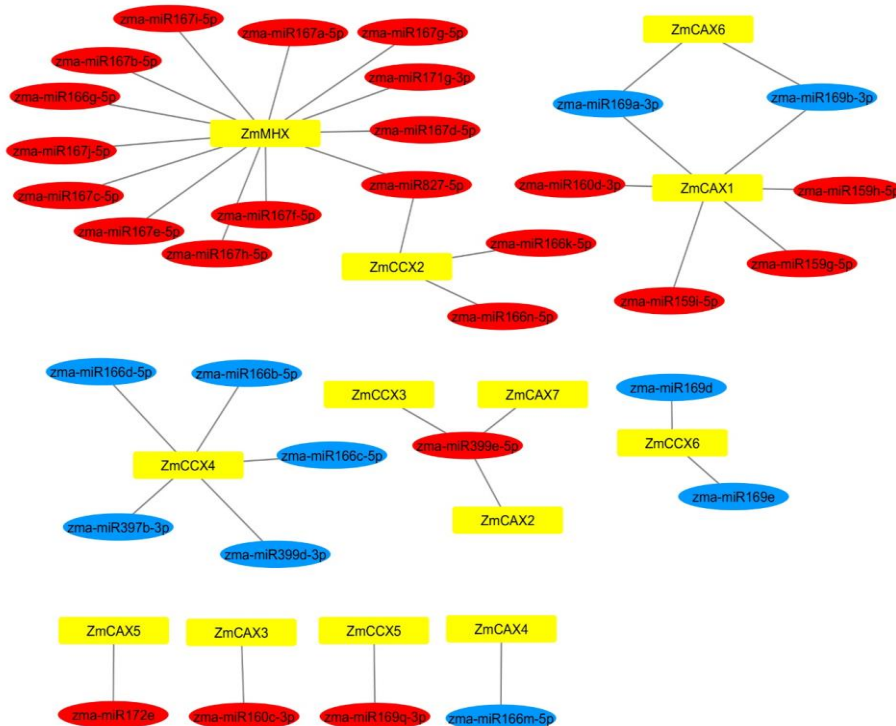
بیان ژن در یوکاریوت‌ها را عمدتاً فاکتورهای رونویسی تنظیم می‌کنند که به الگوهای حفاظت‌شده خاص در مناطق تنظیمی ژن متصل می‌شوند. تجزیه و تحلیل عناصر تنظیمی *cis* پاسخ به تنش‌ها و هورمون‌ها وجود 19 نوع از این عناصر را در ناحیه پیش‌بر خانواده *CaCAs* نشان داد (جدول 3). فراوانی این عناصر در ناحیه تنظیمی هر یک از این ژن‌ها و نیز فراوانی کلی آن‌ها بسیار متنوع است. بیشترین فراوانی کل عنصر تنظیمی مربوط به *CGTCA-motif* و *TGACG-* با فراوانی 31 جایگاه روی پیش‌برهای خانواده ژنی *CaCA* است. عناصر تنظیمی *CGTCA-motif* و *MBS* روی 12 ژن *ZmCaCAs* قرار داشته و بر این اساس، عمومی‌ترین عناصر تنظیمی پیش‌بر ژن‌های *ZmCaCA* هستند (جدول 3). وجود عناصر تنظیمی پاسخ به تنش‌های زیستی و غیر زیستی و نیز هورمون‌هایی نظیر آبسزیک اسید، متیل جاسمونات، جیبرلین، سالیسیلیک اسید و اکسین نشان‌دهنده ایفای

جدول 3. فراوانی و کارکرد عناصر تنظیمی ناحیه پیش‌بر ژن‌های *CaCA* ذرت

عناصر تنظیمی	کارکرد*	ZmCAX1	ZmCAX2	ZmCAX3	ZmCAX4	ZmCAX5	ZmCAX6	ZmCAX7	ZmCCX1	ZmCCX2	ZmCCX3	ZmCCX4	ZmCCX5	ZmCCX6	ZmMHX
ABRE	پاسخ به آبسزیک اسید	2	2	2	2	1	1			3			1	2	3
ARE	پاسخ به شرایط بی‌هوای	2		3	2	3	3	1		2	3	1	4	2	4
CGTCA-motif	پاسخ به متیل جازمونات		1					1	1	2		2			5
LTR	پاسخ به دمای پایین	2	3	1	2	2	2	2	2	1		1		1	1
MBS	پاسخ به خشکی				1					1				1	2
P-box	پاسخ به جیبرلین	1			1			1		1	2	1		1	1
TCA-element	پاسخ به سالیسیلیک اسید	1	1		1			1		1	1	1			1
TGA-element	پاسخ به اکسین	2		3	2	3	3	1		2	3	1	4	2	1
TGACG-motif	پاسخ به متیل جازمونات		1											1	5
AuxRR-core	پاسخ به اکسین	2	1	2		2		1	1		4	1	1	1	1
GC-motif	پاسخ به اکسین					1			1					2	4
GARE-motif	پاسخ به جیبرلین			1	1	2			1						1
HSE	پاسخ به شوک حرارتی				1				1						
EIRE	پاسخ به الیستور				1			2				2			
TC-rich repeats	پاسخ به تنش‌ها						1	1	1			2			1
Box-W1	پاسخ به الیستور قارچی	1							1						1

WUN-motif	پاسخ به زخم	1	4
motif IIb	پاسخ به آبسزیک اسید		
CE3	پاسخ به آبسزیک اسید و vp1		

* کارکرد هر یک از عناصر تنظیمی سپس از سرور PlantCare دریافت شد (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html>)



شکل 4. مولکول‌های *miRNA* پیش‌بینی شده نسبت به رونوشت ژن‌های CaCAs ذرت. ژن‌ها با رنگ زرد، مولکول‌های *miRNA* برش‌دهنده RNA با رنگ قرمز و مولکول‌های *miRNA* ممانعت‌کننده از ترجمه با رنگ آبی مشخص شده‌اند.

ZmCAX2 هر یک از ژن‌های mRNA *ZmCAX7*, *ZmCAX5*, *ZmCAX4*, *ZmCAX3* و *ZmCCX5* و *ZmCCX3* وجود دارد که هدف تنظیم بیان ژن پس رونویسی بوسیله مولکول‌های *miRNA* قرار می‌گیرد (شکل 4).

از جمله مولکول‌های *miRNA* شناسایی شده مؤثر بر تنظیم بیان ژن‌های کلسیم/کاتیون ذرت خانواده *zma-miR166* بودند. خانواده *zma-miR166* حفاظت شدگی بالایی داشته و نقش تنظیمی مهمی در نمو و پاسخ به تنش در ذرت ایفا می‌کنند. مطالعات نشان داده است که خانواده *miR166* در تنظیم بیان ژن‌های درگیر در پاسخ به تنش، نمو بذر و گلدهی دخالت دارد. احتمال دارد برخی از ژن‌های کلسیم/کاتیون ذرت که هدف

مطالعه انجام‌شده مشخص کرد که mRNA ژن *ZmMH* در 4 موقعیت متفاوت هدف 13 نوع *miRNA* قرار می‌گیرد که تمامی مولکول‌های *miRNA* شناسایی شده در برش mRNA این ژن نقش دارند. در مورد ژن‌های *ZmCAX1* و *ZmCCX4* تعداد موقعیت‌ها در رونوشت هر دو ژن 3 و تعداد مولکول‌های *miRNA* به ترتیب 6 و 5 نوع است که مکانیسم تنظیم بیان در ژن اول از هر دو نوع برش mRNA و جلوگیری از ترجمه و در ژن دوم از نوع جلوگیری فرآیند ترجمه بود (شکل 4). ژن *ZmCCX2* هدف سه نوع مختلف *miRNA* قرار می‌گیرد. در ژن‌های *ZmCAX6* و *ZmCCX6* نیز دو نوع *miRNA* در یک موقعیت یکسان از طریق ترجمه در بیان این ژن‌ها نقش دارند. یک موقعیت در

بسیار اندکی افزایش بیان نشان داده‌اند (شکل 5). این افزایش بیان برای *ZmCAX2* 0/93 و برای *ZmCAX7* 0/57 می‌باشد. بیان ژن‌های *ZmCAX3*، *ZmCAX5* و *ZmMHX* به طور قابل ملاحظه در بافت آندوسپرم کاهش یافته است. بیشترین کاهش بیان در بافت آندوسپرم برابر با 5/82- و برای ژن *ZmCAX3* می‌باشد. در حالی که بیان ژن‌ها در بافت برگ بیشترین افزایش را داشته است. ژن *ZmCAX4* در بذر بیشترین مقدار بیان را نشان داد (شکل 5). بیان بالای ژن‌های *CAX* در بذر برنج و آرابیدوپسیس و گندم نیز گزارش شده است (Bickerton and Pittman, 2015; Taneja et al., 2016). ژن‌های *CAX* به طور عمده در غشاهای واکوئلی حضور دارند و در تبادلات هیدروژن/کلسیم مهم هستند (Manohar et al., 2011; Pittman, 2011). بیان ژن *ZmMHX* در بافت برگ و سنبله تا حدودی تغییر کرده است، که بیان مشابه در سایر گیاهان نیز مشاهده شده است (Singh et al., 2015). تصور می‌شود که ژن *MHX* بیان بالایی در ساقه‌ها و برگ‌ها دارد و از آن جایی که یون‌های منیزیم را حمل می‌کند، در سنتز کلروفیل مهم است (Taneja et al., 2016). در گوجه‌فرنگی نیز کمترین بیان این ژن در ریشه‌ها و میوه رسیده، که حاوی کلروفیل نبودند، به دست آمد که پایین‌تر از حد میانگین بود. با این حال از آنجایی که ژن *MHX* در آرابیدوپسیس علاوه بر یون منیزیم، یون‌های روی و آهن را انتقال می‌دهد (Shaul et al., 1999) لازم است که وجود کارکردهای دیگر به غیر از سنتز کلروفیل برای این ژن بررسی شود. با توجه به این که بیشترین القا بیان در بافت‌های بذر و برگ مشاهده می‌شود می‌توان گفت که ژن‌های کلسیم/کاتیون در بیان دائمی در اندام‌های ذخیره‌ای مهم‌تر هستند (Amagaya et al., 2020).

تنش‌های زیستی و غیر زیستی مختلف روی تعداد

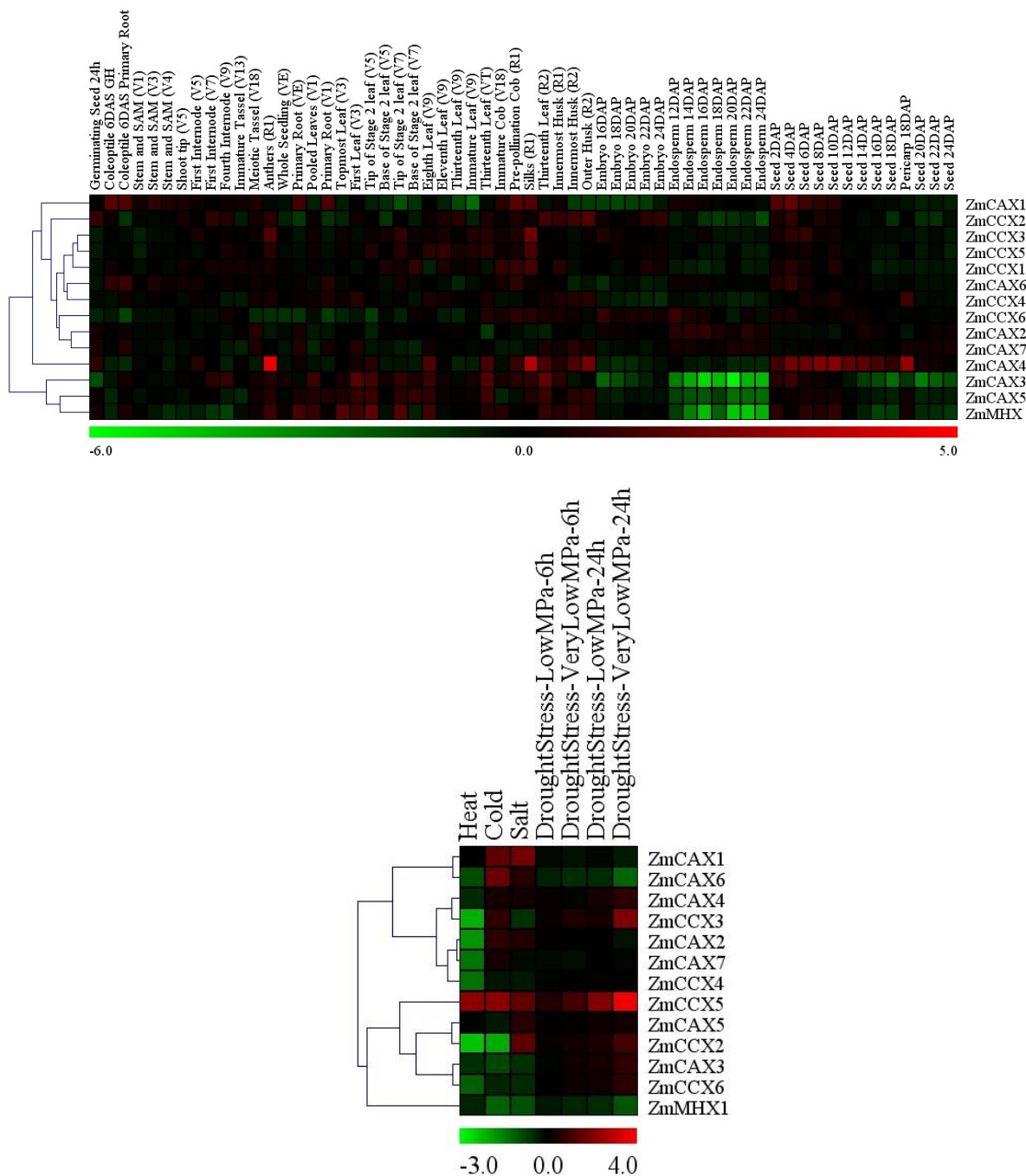
miRNA هستند در این فرآیندها دخالت داشته باشند (Sing et al., 2017). بیش‌ترین تعداد *miRNA*‌های شناسایی شده مربوط به خانواده *zma-MIR167* بود که ژن *ZmMHX* را مورد هدف قرار دادند. بیان *zma-MIR167* در زمان ذخیره سازی مواد مغذی در دانه افزایش می‌یابد، به این دلیل ممکن است در تنظیم متابولیسم بلوغ بذر نقش داشته باشد (Li et al., 2016).

مطالعات نشان داده است که مولکول‌های *miRNA* مؤثر روی ژن‌های *CaCA* نظیر *amiR160*، *amiR166*، *amiR167*، *amiR172* و *miR169* بیشتر ژن‌های درگیر در فرآیندهای متابولیسمی مانند تنظیم رونویسی و پاسخ به محرک‌ها را هدف قرار داده‌اند. هم چنین ژن‌های هدف *miR159* و *miR399* در پاسخ به محرک‌ها نقش دارند، در حالی که مشخص شد است که خانواده *miR397* علاوه بر هدف قرار دادن ژن‌های مربوط به پاسخ به محرک‌ها، در تنظیم بیان پس از رونویسی ژن-های مولتی کوپراکسیداز و اکسیدردوکتاز و نیز در فرآیندهای بیوسنتز فنیل پروپانویید، اسیدهای آمینه، ترکیبات آروماتیک و تجزیه لیگنین نقش دارند (Zhang et al., 2009). با توجه به نقش حیاتی کلسیم در بسیاری از فرآیندهای سلولی می‌توان گفت که تنظیم بیان پس از رونویسی ژن‌های *CaCA* نقش مهمی در کارکرد این ژن‌ها در شرایط مختلف نموی ذرت دارد.

بررسی بیان ژن‌های *ZmCaCA* در مراحل نموی ذرت

بررسی بیان ژن روشی برای پیش‌بینی کارکرد فرضی یک ژن ناشناخته است (Zeng et al., 2016). بیان ژن‌های *ZmCAX2* و *ZmCAX7* در بافت‌ها و مراحل مختلف نموی براساس داده‌های موجود مورد استفاده تقریباً بدون تغییر بوده و فقط در بافت آندوسپرم مقدار

زیادی مسیرهای بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی در گیاهان تأثیر می‌گذارند و در نهایت مسئول کاهش عملکرد در گیاهان است (Izadi *et al.*, 2014). برای ژن *ZmCCX1* داده بیانی مربوط به تنش‌ها یافت نشد. براساس نتایج درخت فیلوژنتیکی ژن *OsCCX3* اورتولوگ¹ *ZmCCX1* می‌باشد. میزان بیان *OsCCX3* براساس اطلاعات پایگاه داده efpBrowser در طی تنش‌های سرما، خشکی و شوری به ترتیب به میزان $-0/5$ ، $-1/4$ و $-0/57$ کاهش یافته است. لذا می‌توان گفت بیان *ZmCCX1* نیز احتمالاً در اثر تنش‌های اشاره شده کاهش یابد. ژن *ZmCCX5* تقریباً در تمام تنش‌های گرما، سرما، شوری و خشکی افزایش بیان نشان می‌دهد. بیان ژن‌های *CAX3* و *CCX6* در تنش‌های گرما، سرما و شوری القا و بیان در تنش خشکی سرکوب شد. بیان ژن *CCX2* در تنش خشکی یافته است (شکل 5).



شکل 5. پروفایل بیانی ژن‌های ذرت براساس داده‌های ریزآرایه در مراحل مختلف نمو و تنش‌های غیر زیستی. ارزش سیگنال به صورت نوار رنگی در انتهای نقشه حرارتی ارائه شده است که در آن رنگ سبز نشان‌دهنده کاهش بیان، رنگ سیاه نشان‌دهنده عدم تغییر بیان و رنگ قرمز نشان‌دهنده افزایش بیان است.

نوسان بیان ژن *CCX* در تنش گرما و خشکی در سایر گونه‌های گیاهی نیز گزارش شده است. به‌عنوان مثال *AtCCX1* (AT5G17860) و *AtCCX2* (AT5G17850) در تنش‌های مشابه افزایش بیان داشته‌اند، درحالی‌که *OsCCX4* (LOC_Os12g42910) در تنش کمبود آب القاء

نوسان بیان ژن *CCX* در تنش گرما و خشکی در سایر گونه‌های گیاهی نیز گزارش شده است. به‌عنوان مثال *AtCCX1* (AT5G17860) و *AtCCX2* (AT5G17850) در تنش‌های مشابه افزایش بیان داشته‌اند، درحالی‌که *OsCCX4* (LOC_Os12g42910) در تنش کمبود آب القاء

می‌شود و در تنش گرما کاهش بیان نشان داد (Singh *et al.*, 2015). بیان ژن *ZmMHX* در تمام تنش‌ها کاهش یافته است. کاهش بیان ژن همولوگ *ZmMHX* در تنش‌های گرما، خشکی و شوری در گندم نیز گزارش شده است (Taneja *et al.*, 2016). به‌طور کلی بیشترین میزان کاهش بیان ژن مربوط به تنش گرما است.

پروتئین‌های خانواده *CaCA* نوعی ناقل هستند که در تبادل انواع مختلف یون‌های فلزی از هموستازی یون کلسیم نقش دارند. در مطالعه حاضر 14 ژن در ذرت با استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیکی شناسایی شد که براساس سازماندهی ساختاری و ارتباط فیلوژنتیکی با پروتئین‌های شناخته شده از سایر گونه‌های گیاهی به زیر خانواده‌های *CAX* (7 ژن)، *CCX* (6 ژن) و *MHX* (1 ژن) طبقه‌بندی شدند. پروتئین‌های *ZmCaCA* دارای دو دمین

Na_Ca_ex و حداقل یک موتیف کارکردی بودند. وجود عناصر تنظیمی مربوط به پاسخ به تنش‌های زیستی، تنش‌های غیر زیستی و هورمون‌های مختلف در ناحیه تنظیمی ژن‌های *ZmCaCA* نشان‌دهنده نقش این ژن‌ها در بسیاری از فرآیندهای رشد و نمو و دفاعی ذرت است. تغییر بیان ژن‌های *CaCA* ذرت در مراحل مختلف نمو و تنش‌های غیر زیستی، نقش آن‌ها را در این فرآیندهای گیاهی نشان داد. به‌طور کلی بیشترین افزایش و کاهش بیان ژن مربوط به ژن‌های *CAX* است. مطالعه حاضر ویژگی‌های مختلفی از پروتئین‌های خانواده *CaCA* را در ذرت روشن می‌کند، با این وجود عملکرد هرکدام از این ژن‌ها از طریق تولید لاین‌های خاموش و یا فرایبان شده ژن‌های مذکور و بررسی لاین‌های جهش‌یافته در شرایط مختلف رشد و نمو در مطالعات بعدی باید مورد بررسی قرار گیرد.

REFERENCES

- Amagaya K, Shibuya T, Nishiyama M, Kato K, Kanayama Y (2020) Characterization and Expression Analysis of the Ca^{2+} /Cation Antiporter Gene Family in Tomatoes. *Plants* 9 (1): 25.
- Artimo P, Jonnalagedda M, Arnold K, Baratin D, Csardi G, De Castro E, Duvaud S, Flegel V, Fortier A, Gasteiger E (2012) ExpPASy: SIB bioinformatics resource portal. *Nucleic acids res.* 40 (W1): W597-W603.
- Axelsen KB, Palmgren MG (2001) Inventory of the superfamily of P-type ion pumps in Arabidopsis. *Plant physiol.* 126 (2): 696-706.
- Bailey TL, Boden M, Buske FA, Frith M, Grant CE, Clementi L, Ren J, Li WW, Noble WS (2009) MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. *Nucleic acids res.* 37 (suppl_2): W202-W208.
- Bateman A, Coin L, Durbin R, Finn RD, Hollich V, Griffiths-Jones S, Khanna A, Marshall M, Moxon S, Sonnhammer EL (2004) The Pfam protein families database. *Nucleic acids res.* 32 (suppl_1): D138-D141.
- Bickerton PD, Pittman JK (2015) Role of cation/proton exchangers in abiotic stress signaling and stress tolerance in plants. In: *Elucidation of Abiotic Stress Signaling in Plants*. Springer, pp 95-117.
- Bolser D, Staines DM, Pritchard E, Kersey P (2016) Ensembl plants: integrating tools for visualizing, mining, and analyzing plant genomics data. In: *Plant bioinformatics*. Springer, pp 115-140.
- Case RM, Eisner D, Gurney A, Jones O, Muallem S, Verkhatsky A (2007) Evolution of calcium homeostasis: from birth of the first cell to an omnipresent signalling system. *Cell calcium.* 42 (4-5): 345-350.

- Corso M, Doccula FG, de Melo JRF, Costa A, Verbruggen N (2018) Endoplasmic reticulum-localized CCX2 is required for osmotolerance by regulating ER and cytosolic Ca²⁺ dynamics in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 115 (15): 3966-3971.
- Dai X, Zhao PX (2011) psRNATarget: a plant small RNA target analysis server. *Nucleic acids res.* 39 (suppl_2): W155-W159.
- Demidchik V, Shabala S, Isayenkov S, Cui TA, Pottosin I (2018) Calcium transport across plant membranes: mechanisms and functions. *New Phytol.* 220 (1): 49-69.
- Dinh H, Rajasekaran S (2013) PMS: a panoptic motif search tool. *PloS one* 8 (12).
- Dodd AN, Kudla J, Sanders D (2010) The language of calcium signaling. *Annu. Rev. Plant Biol.* 61: 593-620.
- Edmond C, Shigaki T, Ewert S, Nelson MD, Connorton JM, Chalova V, Noordally Z, Pittman JK (2009) Comparative analysis of CAX2-like cation transporters indicates functional and regulatory diversity. *Biochem. J.* 418 (1): 145-154.
- Emery L, Whelan S, Hirschi KD, Pittman JK (2012) Protein phylogenetic analysis of Ca²⁺/cation antiporters and insights into their evolution in plants. *Frontiers in plant science* 3: 1.
- Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evol.* 39 (4): 783-791.
- Finn RD, Clements J, Eddy SR (2011) HMMER web server: interactive sequence similarity searching. *Nucleic acids res.* 39 (suppl_2): W29-W37.
- Finn RD, Bateman A, Clements J, Coghill P, Eberhardt RY, Eddy SR, Heger A, Hetherington K, Holm L, Mistry J (2014) Pfam: the protein families database. *Nucleic acids res.* 42 (D1): D222-D230.
- Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Wilkins MR, Appel RD, Bairoch A (2005) Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In: *The proteomics protocols handbook*. Springer, pp 571-607.
- Gertz EM, Yu YK, Agarwala R, Schäffer AA, Altschul SF (2006) Composition-based statistics and translated nucleotide searches: improving the TBLASTN module of BLAST. *BMC Biol.* 4 (1): 41.
- Giladi M, Shor R, Lisnyansky M, Khananshvilid D (2016) Structure-functional basis of ion transport in sodium-calcium exchanger (NCX) proteins. *Int. J. Mol.* 17 (11): 1949.
- Goodstein DM, Shu S, Howson R, Neupane R, Hayes RD, Fazo J, Mitros T, Dirks W, Hellsten U, Putnam N (2012) Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. *Nucleic acids res.* 40 (D1): D1178-D1186.
- Hirschi KD (2004) The calcium conundrum. Both versatile nutrient and specific signal. *Plant Physiol.* 136 (1): 2438-2442.
- Hoopes GM, Hamilton JP, Wood JC, Esteban E, Pasha A, Vaillancourt B, Provart NJ, Buell CR (2019) An updated gene atlas for maize reveals organ-specific and stress-induced genes. *PLANT J.* 97 (6): 1154-1167.
- Hu B, Jin J, Guo A-Y, Zhang H, Luo J, Gao G (2015) GSDB 2.0: an upgraded gene feature visualization server. *Bioinformatics.* 31 (8): 1296-1297.
- Kader MA, Lindberg S, behavior (2010) Cytosolic calcium and pH signaling in plants under salinity stress. *Plant signal. behav.* 5 (3): 233-238.
- Kawahara Y, de la Bastide M, Hamilton JP, Kanamori H, McCombie WR, Ouyang S, Schwartz DC, Tanaka T, Wu J, Zhou S (2013) Improvement of the *Oryza sativa* Nipponbare reference genome using next generation sequence

- and optical map data. *Rice*. 6 (1): 4.
- Klee EW, Ellis LB (2005) Evaluating eukaryotic secreted protein prediction. *BMC bioinformatics* 6 (1): 256.
- Krogh A, Larsson B, Von Heijne G, Sonnhammer EL (2001) Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J. Mol. Biol.* 305(3): 567-80.
- Kumar S, Stecher G, Tamura K (2016) MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33 (7): 1870-1874.
- 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 res.* 40 (D1): D1202-D1210.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *bioinformatics*. 23 (21): 2947-2948.
- 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 res.* 30 (1): 325-327.
- Letunic I and Bork P (2018) 20 years of the SMART protein domain annotation resource. *Nucleic acids res.* 46(D1): D493-D496.
- Li D, Liu Z, Gao L, Wang L, Gao M, Jiao Z, Qiao H, Yang J, Chen M, Yao L (2016) Genome-Wide Identification and Characterization of microRNAs in Developing Grains of *Zea mays* L. *PLoS one*. 11 (4).
- Li P, Ponnala L, Gandotra N, Wang L, Si Y, Tausta SL, Kebrom TH, Provart N, Patel R, Myers CR (2010) The developmental dynamics of the maize leaf transcriptome. *Nat. Genet.* 42 (12): 1060.
- Li P, Zhang G, Gonzales N, Guo Y, Hu H, Park S, Zhao J (2016) Ca²⁺-regulated and diurnal rhythm-regulated Na⁺/Ca²⁺ exchanger AtNCL affects flowering time and auxin signalling in Arabidopsis. *Plant, cell environ.* 39 (2): 377-392.
- Li Z, Wang X, Chen J, Gao J, Zhou X, Kuai B (2016) CCX1, a putative Cation/Ca²⁺ exchanger, participates in regulation of reactive oxygen species homeostasis and leaf senescence. *Plant Cell Physiol.* 57 (12): 2611-2619.
- Manohar M, Shigaki T, Hirschi K (2011) Plant cation/H⁺ exchangers (CAXs): biological functions and genetic manipulations. *Plant Biol* 13(4):561-569.
- Navarro-León E, Ruiz JM, Albacete A, Blasco B (2019) Effect of CAX1a TILLING mutations and calcium concentration on some primary metabolism processes in Brassica rapa plants. *J. Plant Physiol.* 237: 51-60.
- Park S, Elless MP, Park J, Jenkins A, Lim W, Chambers Iv E, Hirschi KD (2009) Sensory analysis of calcium-biofortified lettuce. *Plant Biotechnol. J.* 7 (1): 106-117.
- Paulsen IT, Nguyen L, Sliwinski MK, Rabus R, Saier Jr MH (2000) Microbial genome analyses: comparative transport capabilities in eighteen prokaryotes. *J. Mol. Biol.* 301 (1): 75-100.
- Pittman JK (2011) Vacuolar Ca²⁺ uptake. *Cell calcium* 50 (2): 139-146.
- Pittman JK, Hirschi KD (2016) Phylogenetic analysis and protein structure modelling identifies distinct Ca²⁺/Cation antiporters and conservation of gene family structure within Arabidopsis and rice species. *Rice*. 9 (1): 3.
- Qiao K, Wang F, Liang S, Hu Z, Chai T

- (2019) Heterologous expression of TuCAX1a and TuCAX1b enhances Ca^{2+} and Zn^{2+} translocation in Arabidopsis. *Plant Cell Rep.* 38 (5): 597-607.
- Saeed A, Sharov V, White J, Li J, Liang W, Bhagabati N, Braisted J, Klapa M, Currier T, Thiagarajan M, Sturn A (2003) TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *Biotechniques.* 34 (2): 374-8.
- Sekhon RS, Lin H, Childs KL, Hansey CN, Buell CR, De Leon N, Kaeppler SM (2011) Genome-wide atlas of transcription during maize development. *Plant J.* 66 (4): 553-563.
- Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, Amin N, Schwikowski B, Ideker T (2003) Cytoscape a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome res.* 13 (11): 2498-504.
- Shaul O, Hilgemann DW, de-Almeida-Engler J, Van Montagu M, Inzé D, Galili G (1999) Cloning and characterization of a novel $\text{Mg}^{2+}/\text{H}^{+}$ exchanger. *EMBO J.* 18(14):3973-3980.
- Singh A, Roy S, Singh S, Das SS, Gautam V, Yadav S, Kumar A, Singh A, Samantha S, Sarkar AK (2017) Phytohormonal crosstalk modulates the expression of miR166/165s, target Class III HD-ZIPs, and KANADI genes during root growth in Arabidopsis thaliana. *Sci. rep.* 7 (1): 1-13.
- Spalding EP, Harper JF (2011) The ins and outs of cellular Ca^{2+} transport. *Curr. Opin. Plant Biol.* 14 (6): 715-720.
- Taneja M, Tyagi S, Sharma S, Upadhyay SK (2016) Ca^{2+} /cation antiporters (CaCA): identification, characterization and expression profiling in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Front. plant sci.* 7: 1775.
- Tuteja N, Mahajan S (2007) Calcium signaling network in plants: an overview. *Plant signaling behav.* 2 (2): 79-85.
- Umate P (2010) microRNA access to the target helicases from rice. *Plant signaling behavior* 5 (10): 1171-1175.
- Vaid N, Pandey PK, Tuteja N (2012) Genome-wide analysis of lectin receptor-like kinase family from Arabidopsis and rice. *Plant Mol. Biol.* 80 (4-5): 365-388.
- Wijaya E, Rajaraman K, Yiu SM, Sung WK (2007) Detection of generic spaced motifs using submotif pattern mining. *Bioinformatics.* 23 (12): 1476-85.
- Yu CS, Chen YC, Lu CH, Hwang JK (2006) Prediction of protein subcellular localization. *Proteins: Structure, Function, Bioinformatics* 64(3):643-651.
- Zeng L, Deng R, Guo Z, Yang S, Deng X (2016) Genome-wide identification and characterization of Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes family in wheat (*Triticum aestivum*). *BMC genomics.* 17 (1): 240.
- Zhang L, Chia J-M, Kumari S, Stein JC, Liu Z, Narechania A, Maher CA, Guill K, McMullen MD, Ware D (2009) A genome-wide characterization of microRNA genes in maize. *PLoS genet.* 5 (11).
- Zhang L, Du L, Poovaiah B (2014) Calcium signaling and biotic defense responses in plants. *Plant Signal Behav.* 9 (11): e973818.
- Zhou S, Ma S, Li M, Li C, Gong X, Guan Q, Tan Y, Shao Y, Li C, Ma F (2016) Comprehensive genomic analysis and expression profiling of Argonaute gene family and examination of their regulatory roles in water-use efficiency and abiotic stress responses in apple. *Acta Physiol. Plant.* 38 (9): 231.
- Zhou X, Li S, Zhao Q, Liu X, Zhang S, Sun C, Fan Y, Zhang C, Chen R (2013) Genome-wide identification, classification and expression profiling of nicotianamine synthase (NAS) gene family in maize. *BMC genomics* 14 (1): 238.