

آنالیز این‌سیلیکو اعضای خانواده ژنی CBL در گیاه هالوفیت آلوروپوس لیتورالیس و گیاه مدل آرابیدوپسیس تالیانا

مژده عرب^۱، حمید نجفی زرینی^۲، قربانعلی نعمت‌زاده^۳، سیدحمیدرضا هاشمی‌پطروودی^{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، 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: ۱۳۹۹/۹/۲۷ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۲/۲۱)

In silico analysis of CBL gene family in the halophyte plant *Aeluropus littoralis* and the model plant *Arabidopsis thaliana*

Mozhdeh Arab¹, Hamid Najafi Zarrini², Ghorbanali Nematzadeh³, Seyyed Hamidreza Hashemipetroodi^{4*}

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

2. Associated Professor, Department of Biotechnology, Sari Agricultural Sciences and 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 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.

(Received: 18 Dec. 2020 - Accepted: 12 Mar. 2022)

Abstract

Calcineurin B-like proteins (CBLs), which act as a secondary messenger molecule in the subfamily of the calcium sensor gene family, play a key role in regulating physiological processes, plant growth and development. In order to identification and comparison of proteins involving in calcium signaling in two model of halophyte and glycophyte plants, *in silico* analysis of the CBL gene family were done in *Aeluropus littoralis* and *Arabidopsis thaliana*. Based on sequence homology and orthological relationships with *Arabidopsis* genes, 6 genes identified in *Aeluropus* were classified into three protein groups: *AICBL4*, *AICBL2* and *AICBL10*. Multiple sequence allignment of the CBL gene family in *Aeluropus littoralis* confirmed the presence of four EF-hand domains in all genes, which provide a structure for calcium ion binding. The high similarity of the physicochemical properties of most *Aeluropus* proteins to *Arabidopsis* as well as the strong orthological relationship with each other may indicate the preservation of the function of these genes in the evolutionary process. Analysis of *AtCBLs* expression patterns in different organs/ abiotic stresses showed that these genes have unique expression profiles due to functional and structural convergent. Different expression profiles of *AICBLs* in *Aeluropus* transcriptome would be an evidence for the functional divergent of these genes. The results obtained from this study can provide valuable information about the properties of this gene family and their functional roles in tolerating to abiotic stresses for future studies.

Keywords: Calcium sensor, CBL, Gene family, Halophyte, *In silico* analysis.

چکیده

پروتئین‌های شبه‌کالسنینورین B (CBLs) به‌عنوان یک مولکول پیام‌رسان ثانویه زیرخانواده گروه حس‌گرهای کلسیم بوده، و در تنظیم فرآیندهای فیزیولوژیکی و رشد و نمو گیاهان نقش مهمی دارند. در این مطالعه به منظور بررسی این‌سیلیکو و مقایسه خصوصیات پروتئین‌های دخیل در پیام‌رسانی کلسیم در گیاهان شورپسند و شیرین‌پسند، اعضای زیرخانواده ژنی CBL در دو گیاه آلوروپوس لیتورالیس و آرابیدوپسیس تالیانا مورد مطالعه قرار گرفت. بر اساس همولوژی توالی و روابط اورتولوژی با ژن‌های آرابیدوپسیس، شش ژن شناسایی شده در ژنوم آلوروپوس در قالب سه گروه پروتئینی *AICBL2* *AICBL4* و *AICBL10* دسته‌بندی شدند. بررسی خانواده ژنی *AICBL* بر مبنای هم‌مدیفی چندگانه در گیاه آلوروپوس لیتورالیس موید حضور چهار دمین EF-hand در تمام این ژن‌ها بوده که ساختاری را برای اتصال یون کلسیم فراهم می‌نماید. شباهت بالای خصوصیات فیزیوشیمیایی اکثر پروتئین‌های آلوروپوس به آرابیدوپسیس و داشتن رابطه قوی اورتولوژی با یکدیگر ممکن است دلالت بر محفوظ ماندن کارکرد و عملکرد این ژن‌ها در فرایند تکاملی بوده باشد. تجزیه و تحلیل الگوهای بیانی *AtCBLs* در اندام‌های مختلف و تحت تنش‌های غیر زنده مختلف نشان داد به دلیل انشقاق عملکردی و ساختاری، این ژن‌ها از الگوی بیان منحصرفردی برخوردارند. الگوی بیانی متفاوت در داده‌های ترانسکریپتوم *AICBLs* نیز دلیلی بر الگوی عملکردی متفاوت این ژن‌هاست. نتایج بدست آمده در این تحقیق می‌تواند اطلاعات ارزشمندی در مورد نقش این خانواده ژنی و سازوکارهای عملکردی آنها در تحمل به تنش‌های غیر زیستی برای مطالعات آتی مهیا سازد.

واژه‌های کلیدی: آنالیز این‌سیلیکو، حس‌گر کلسیم، خانواده ژنی، هالوفیت، CBL.

مقدمه

گیاهان در طی مراحل رشد و نمو در معرض شرایط محیطی مختلف و تنش‌های زنده و غیرزنده قرار می‌گیرند. برای مواجهه با محرک‌های محیطی، گیاهان مجموعه‌ای از سازوکارهای پیچیده انتقال پیام^۱ را به منظور دریافت، انتقال و پاسخ به تنش‌های مختلف تکامل داده‌اند (Yin *et al.*, 2017). یون کلسیم (Ca^{2+}) به‌عنوان یک مولکول پیام‌رسان ثانویه، در تنظیم فرآیندهای فیزیولوژیکی و رشد و نمو در گیاهان نقش کلیدی داشته به نحوی که با اعمال تنش زنده و غیرزنده به گیاهان، مقدار یون کلسیم به‌عنوان یک عامل تنظیمی نوسان می‌نماید (Luan, 2009; Pandey *et al.*, 2014; Kudla *et al.*, 2018). پیام کلسیم^۲ در واقع به مجموعه‌ای از تغییرات القاء‌شده در یون کلسیم در سلول‌ها در پاسخ به محرک‌های مختلف اطلاق شده، که به نوبه خود به فعال‌سازی کانال‌ها، پمپ‌ها و انتقال‌دهنده‌های خاص که در غشاهای مختلف سلولی قرار دارند، منتج می‌شود (Dodd *et al.*, 2010; Karami Lake *et al.*, 2020). به‌عبارت دیگر در شبکه‌های ژنی تنظیم‌کننده کلسیم، پروتئین‌های متصل به کلسیم به‌عنوان مولکول‌های حس‌گر عمل نموده و به‌طور خاص پیام‌های کلسیم سلولی را دریافت می‌نمایند و این پیام‌ها را به مسیرهای فرودست منتقل می‌کنند (Li *et al.*, 2016; Yin *et al.*, 2017). تغییرات در غلظت یون کلسیم داخل سلولی توسط حس‌گرهای کلسیم شامل کالمادولین‌ها^۳ (CAM)، کیناز پروتئین‌های وابسته به کلسیم^۴ (CDPKs) و پروتئین‌های شبه کالسیئینورین^۵ (CBLs) دریافت شده، که به نوبه خود مسیرهای انتقال پیام درگیر در

رشد و نمو گیاهان را تنظیم می‌نمایند (Pandey *et al.*, 2014).

پروتئین‌های شبه کالسیئینورین^۶ (CBLs) به گروه منحصر به فردی از حس‌گرهای کلسیم در گیاهان تعلق دارند. بررسی‌ها نشان می‌دهد، پروتئین‌های CBL شباهت زیادی به زیر واحد تنظیمی B کالسیئینورین (CNB) و پروتئین‌های حس‌گر عصبی کلسیم (NCS) در حیوانات و مخمر دارند (Kudla *et al.*, 1999). پیام کلسیم می‌تواند توسط دمین^۷ EF hand پروتئین‌های CBL دریافت شود. به لحاظ ساختاری جهت اتصال یون کلسیم، CBLها حداکثر دارای چهار دمین EF-hand بوده که می‌توانند حداکثر به چهار یون کلسیم متصل شوند (Nagae *et al.*, 2003; Sánchez-Barrena *et al.*, 2005). EF-hand در واقع یک موتیف هلیکس-لوپ-هلیکس مشتمل بر ۱۲ اسیدآمینو از X•+Y•+Z•-Y•-X••-Z حروف در آن نمایانگر لیگاندهای درگیر در پیوند کوردیناسیونی بین فلز و لیگاند بوده و نقاط نمایانگر اسیدآمینوهای حائل^۸ هستند (Lewit-Bentley *et al.*, 2000). لازم به‌ذکر است که CBLها جهت انتقال پیام کلسیم، اختصاصاً به گروهی کینازهای سرین/تریئونین مرتبط با SNF1 (ساکارز غیرتخمیری ۱)، گروه ۳ (SnRK3) به نام CIPKها متصل می‌شوند (Kudla *et al.*, 1999; Shi *et al.*, 1999). به‌عبارت دیگر پروتئین‌های CBL با اتصال به دمین NAF/FISL که در انتهای کربوکسیلی CIPKها (کینازهای پروتئینی متعامل‌کننده با CBL) قرار دارند با یکدیگر تعامل می‌کنند. از این تعامل موجود بین CBL و CIPK در سیستم رمزنگاری یون کلسیم، شبکه CBL-CIPK اطلاق می‌شود (Ma *et al.*, 2019). ژن‌های CBL و

1. Signal
2. Calcium signal
3. Calmodulins
4. Calcium-Dependent Protein Kinases
5. Calcineurin B-Like Proteins

6. Calcineurin B-Like Proteins
7. Elongation factor (EF) hand domains
8. Intervening Residues

امکان بررسی خصوصیات خانواده‌های ژنی درگیر در تنش‌های مختلف غیرزیستی خصوصاً تنش شوری و خشکی فراهم گشته است (Hashemi *et al.*, 2020). تاکنون، هیچ تجزیه و تحلیل سیستماتیک از اعضای خانواده ژنی CBL یا ژن‌های خانواده CIPK در گیاهان هالوفیت تک‌لپه گزارش نشده است. در این تحقیق، بررسی این سیلیکو حس‌گرهای کلسیم زیرخانواده CBL در دو گونه شورپسند^۱ آلروپوس لیتورالیس و شیرین‌پسند^۲ آراییدوپسیس تالیانا مورد بررسی قرار خواهد گرفت.

مواد و روش‌ها

شناسایی اعضای خانواده ژنی CBL آلروپوس لیتورالیس

برای شناسایی ژن‌های همولوگ CBL در گیاه آلروپوس لیتورالیس (*AICBL*)، ابتدا توالی‌های پروتئینی خانواده ژنی CBL گیاه آراییدوپسیس تالیانا (*AtCBL*) از سایت Tair اخذ و در ادامه با استفاده از این توالی به‌عنوان Query، جستجوی با ابزار Local tBLASTn در توالی ژنوم گیاه آلروپوس لیتورالیس با نرم‌افزار BioEdit (Hall *et al.*, 2011) صورت گرفت. دمن‌های این خانواده ژنی به‌ترتیب در پایگاه‌های Pfam (El-Gebali *et al.*, 2019)، InterProScan (Jones *et al.*, 2014)، SMART (Hulo *et al.*, 2006) و Expasy (ProtParam) (al., 2018) در سایت Expasy خواص فیزیکوشیمیایی پروتئین‌های CBL مانند تعداد اسیدآمین، وزن مولکولی و نقطه ایزوالکتریک (<https://web.expasy.org/protparam/>) محاسبه شد (Gasteiger *et al.*, 2005). جایگاه سلولی پروتئین‌ها با استفاده از برنامه WoLF PSORT

CIPK در بسیاری از گونه‌ها نظیر آراییدوپسیس تالیانا، گندم، برنج، ذرت، کلزا، بادمجان (*Solanum melongena*) صنوبر کالیفرنایی (*Populus trichocarpa*)، خزه (*Physcomitrella patens*) و گیاه *Selaginella moellendorffii* شناسایی شده‌اند (Yin *et al.*, 2017).

امروز آنالیز بیش‌بیین و بررسی جهش‌یافته‌های CBL و CIPK کمک به‌سزایی در درک ما از عملکرد این ژن‌ها نموده است. در این تجزیه و تحلیل‌ها ثابت شده که این ژن‌ها در القا تحمل به تنش‌های مختلف در گیاهان از نقش کلیدی برخوردارند در نتیجه قادرند به گیاه حامل این ژن‌ها سازگاری به شرایط نامساعد محیطی اعطا نمایند. به‌عنوان مثال، بیان ژن *CBL1* در شرایط شوری شدید، سرما، قرارگرفتن در معرض ABA، زخم و خشکسالی القا می‌شود (Cheong *et al.*, 2003; Pandey *et al.*, 2004; Yin *et al.*, 2017). جهش‌یافته *cbl1* نسبت به تنش‌های غیر زنده خشکسالی، شوری شدید و تنش فوق اسموتیک از حساسیت بسیار بالایی برخوردار بود (Pandey *et al.*, 2004). به همین ترتیب ژن *CBL9*، در انتقال پیام ABA و مسیرهای بیوستنز ABA ناشی از تنش، نقش دارد (Pandey *et al.*, 2004; Sun *et al.*, 2008; Yin *et al.*, 2017). گیاه آلروپوس لیتورالیس (*Aeluropus littoralis*) هالوفیت علفی از خانواده گندمیان (Poaceae) بوده که در محیط‌هایی با غلظت‌های بالای نمک رشد می‌کند (Fatemi *et al.*, 2019; Hashemi-petroudi *et al.*, 2019). تحمل به شوری در این گیاهان از طریق تعدادی از سازوکارها شامل جذب و انتقال انتخابی یون‌ها، تنظیم اسمزی، هومئوستازی یون‌ها و دفع نمک از برگ‌ها می‌باشد (Barhoumi *et al.*, 2007; Barhoumi *et al.*, 2008; Ghorbani *et al.*, 2017). با توجه به تعیین توالی مبتنی بر NGS توالی ژنومی این گیاه و در دسترس بودن توالی آن،

1. Halophyte
2. Glycophyte

بررسی (<http://bar.utoronto.ca>) استفاده شد. بررسی الگوی بیان اعضای خانواده ژنی *AICBL* با استفاده از داده‌های RNA-seq آلوروپوس لیتورالیس انجام شد (Hashemi-petroudi *et al.*, 2020b). نمونه‌برداری از دو بافت برگ و ریشه یک هفته پس از اعمال تنش شوری (۶۰۰ میلی‌مولار نمک کلرید سدیم) بوده و در ادامه بازیابی گیاهان باقیمانده با انتقال به محیط هیدروپونیک فاقد نمک صورت گرفت. یک هفته پس از انتقال به شرایط بازیابی، نمونه‌برداری از بافت‌های برگ و ریشه انجام شد. آنالیز تفاوت بیان ژن‌ها به صورت Log2FC اجرا و پس از تشکیل ماتریس بیان ژن که حاوی ژن‌ها و سطح بیان آن‌ها بود، بیان ژن‌های *AICBL* مورد بررسی قرار گرفت و نتایج در قالب نمودار Heatmap، با استفاده از نرم‌افزار CIMminer ([https://discover.nci.nih.gov/](https://discover.nci.nih.gov/cimminer/)) (Scherf *et al.*, 2000) ارائه شد.

نتایج و بحث

شناسایی اعضای خانواده ژنی *CBL* در گیاه آلوروپوس لیتورالیس در این مطالعه با استفاده از الگوریتم tBLASTn و توالی‌های پروتئینی خانواده *CBL* آرآیدوپسیس، در ژنوم آلوروپوس لیتورالیس برای شناسایی اعضای خانواده ژنی *CBL* جستجو شد. در نهایت، با حذف توالی‌های تکراری، ۸ جایگاه ژنی کاندید *CBL* در ژنوم آلوروپوس شناسایی شد. برای اطمینان از وجود دمین EF-hand، توالی‌های شناسایی شده از طریق پایگاه‌های InterProScan، Pfam، SMART و ارزیابی گردید. با بررسی همولوژی این توالی‌ها با ژن‌های آرآیدوپسیس، ۶ ژن به‌عنوان اعضای خانواده *CBL* در گیاه آلوروپوس شناسایی شد. نام‌گذاری ژن‌های *CBL* با توجه به روابط فیلوژنتیک و مشابهت توالی آنها با ژن‌های اورتولوگ آرآیدوپسیس صورت گرفت (Hashemi-petroudi *et al.*, 2020).

پیش‌بینی (<https://wolfsort.hgc.jp/>) شناسایی موتیف‌های Myristoylation و palmitoylation به‌ترتیب با استفاده از نرم‌افزار CSS-Palm 3.0 و PlantsP (<http://mendel.imp.ac.at/myristate/SUPL>) (predictor.htm) صورت گرفت. شناسایی پپتیدهای پیامی در پروتئین‌ها با استفاده از برنامه مبتنی بر شبکه SignalP 5.0 صورت گرفت (Armenteros *et al.*, 2019).

شناسایی ساختار ژنی، موتیف‌های پروتئینی و روابط فیلوژنتیکی *AICBL* و *AtCBL*

هم‌ردیفی توالی‌های پروتئینی *CBL* به‌دست‌آمده در آلوروپوس با استفاده از نرم‌افزار ClustalW انجام و درخت فیلوژنتیک آن‌ها بر اساس روش اتصال همسایه و با انجام آزمون بوت‌استرپ (Felsenstein, 1985) با ۱۰۰۰ تکرار توسط نرم‌افزار فیلوژنتیکی MEGA 6.0 ترسیم شد (Tamura *et al.*, 2013). شناسایی ساختار ژنی با استفاده از برنامه GSDS (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>) انجام گرفت (Hu *et al.*, 2014). ساختار دمین با استفاده از Expasy-Prosites (<http://prosites.expasy.org/>) و ترسیم شد (Sigrist *et al.*, 2012). موتیف‌های حفاظت‌شده در برنامه MEME (<http://meme-suite.org/tools/meme/>) با پارامترهای تعیین‌شده (انتخاب موتیف‌ها در این برنامه بدون توجه به دفعات تکرار، شناسایی حداکثر ۱۰ موتیف، E-value کمتر از ۰/۰۰۰۱ و کمترین و بیشترین طول موتیف‌ها به‌ترتیب ۶ و ۵۰ اسیدآمین) شناسایی شد (Bailey *et al.*, 2009).

بررسی الگوی بیان *AICBL* و *AtCBL*

برای بررسی الگوی بیان ژن‌های *AtCBL* در مراحل مختلف رشدی، بافتی و نموی، برنامه‌های Genevestigator (<https://www.genevestigator.com/gv/plant.jsp>) و efp browser

InterProScan دارای دمین EF-hand به ترتیب به شماره دسترسی PF13499 و IPR002048 بودند. اگرچه برای دو پروتئین AtCBL7 و AtCBL9 در نرم افزار Pfam، نمای شماتیکی از دمین EF-hand ارائه نشد ولی در اطلاعات ارائه شده وجود دمین EF-hand1 و EF-hand7 در AtCBL7 و دمین EF-hand1، EF-hand6، EF-hand7 در AtCBL9 مورد تأیید قرار گرفت. بررسی در سایت SMART نشان داد تمام ژن‌ها (به جز Alg13204 که دارای دو دمین بود) دارای سه دمین EF-hand بودند. در گیاه آرابیدوپسیس تالیانا نیز ژن *CBL7*، دارای دو دمین بوده، در صورتی که تمامی ژن‌های دیگر دارای سه دمین بودند. در سایت PROSITE علاوه بر شناسایی دمین‌های EF-hand2، EF-hand3 و EF-hand4 و موقعیت ژنی آنها، برخی از جایگاه اختصاصی متصل‌شونده به یون کلسیم در این دمین‌ها نیز شناسایی شد که اطلاعات توالی آن در جدول ۱ ارائه شده است. الگوی توالی این جایگاه در دمین‌های مختلف EF-hand ژن‌ها متفاوت بوده و از الگوی مشابهی برخوردار نمی‌باشد.

ژن *AICBL10* دارای یک جایگاه اتصال کلسیم در دمین EF-hand4، ژن *AICBL4.1* دارای یک جایگاه اتصال کلسیم در EF-hand4، ژن‌های *AtCBL1* و *AtCBL9* هر کدام دارای دو جایگاه اتصال کلسیم در EF-hand3 و EF-hand4، ژن *AtCBL7* دارای یک جایگاه اتصال کلسیم در EF-hand2، ژن‌های *AtCBL8* و *AtCBL10* هر کدام دارای یک جایگاه اتصال کلسیم در EF-hand4 بودند. در بررسی اعضای خانواده ژنی *AICBL* و *AtCBL* در پایگاه‌های اختصاصی دمین اعم از Pfam، InterProScan، Prosite و SMART، اگرچه تعلق همه ژن‌های مورد بررسی به خانواده ژنی CBL مورد تأیید قرار گرفت ولی نتایج متفاوتی از بابت تعداد دمین EF-hand شناسایی شده بین پایگاه‌های مختلف مشاهده گردید.

بدین صورت که ابتدا پیشوند AI به ابتدای هر ژن اضافه گردید و در ادامه شماره هر ژن بر مبنای شماره ژن همولوگ آن در آرابیدوپسیس انتخاب شد. در صورت وجود بیش از یک ژن آرابیدوپس برای هر ژن همولوگ آرابیدوپسیس، شماره‌گذاری ورژن هر ژن بر اساس میزان همسانی^۱ ژن‌ها به اورتولوگ‌شان در آرابیدوپسیس به ترتیب از یک انجام شد. ژن *Alg5886* به ژن *AtCBL10* با کد دسترسی AT4G33000.1 با درجه همسانی ۴۶/۵۳، ژن‌های *Alg15558*، *Alg11525*، *Alg8494* و *Alg13204* به ژن *AtCBL4* با کد دسترسی AT5G24270.1 به ترتیب با همسانی ۶۱/۷۱، ۶۱/۷۱، ۵۶/۷۶ و ۴۵/۰۵ و نهایتاً ژن *Alg14121* به ژن *AtCBL2* با کد دسترسی AT5G55990.1 با درجه همسانی ۵۹/۸۳ شباهت داشت. در این تحقیق نامگذاری دو ژن *Alg15558* و *Alg11525* با توجه به داشتن درصد همسانی مشابه، با توجه به جایگاه این ژن‌ها در درخت فیلوژنتیکی به ترتیب *ALCBL4.1* و *ALCBL4.2* صورت گرفت. بررسی منابع نشان می‌دهد تعداد ژن‌های شناسایی شده *CBL* در آرابیدوپسیس (Kolukisaoglu et al., 2004)، برنج (Jiang et al., 2020)، بادمجان (Li et al., 2016) و کلزا (Zhang et al., 2014) به ترتیب ۱۰، ۱۰، ۵ و ۶ می‌باشد.

تجزیه و تحلیل دمین‌ها و موتیف‌های حفاظت‌شده پروتئین‌های *AICBL* و *AtCBL*

بررسی اعضای خانواده ژنی *AICBL* و *AtCBL* در پایگاه‌های اختصاصی دمین اعم از Pfam، InterProScan، Prosite و SMART نشان داد که همه ژن‌های مورد بررسی با توجه به دارا بودن چند دمین EF-hand به خانواده ژنی CBL تعلق دارند (جدول ۱). تمام ژن‌ها در دو پایگاه Pfam و

جدول ۱. دمین‌های EF-hand شناسایی شده در خانواده ژنی *CBL* در دو گیاه آلوروپوس لیتورالیس و آرابیدوپسیس تالیانا. توالی سبز رنگ، بیانگر جایگاه اتصال به یون کلسیم می‌باشد.

سازماندهی دمین (Domain organization)	SMART (SM00054)	Pfam (PF13499)	نام ژن (Name Gene)	شماره دسترسی (Accession number)
PROSITE (PS50222)				
160-195: GANLFLDRVFDLDFDEKKNVIEFDEFIHALSIFHP 197-232: PMEDKINFAFKLYDLRQTGFIEREEVKQMLIALmE 241-276: LLEAIIDKTFEDA DADKDGKINQLEW KEFVLrNPn			SOS3-LIKE	<i>AICBL10</i> Alg5886
68-103: KKNLFADRIFDLFDQKCNVIEFGFVRSLSNiFHpD 105 - 140: PIAEKIAFAFRLYDLRGTGFIEREELKEMVLaLLnE 149-184: AVEQIVDQTFKQA DANGDGKIDPEEW KYFACtNPAL			SOS3	<i>AICBLA.1</i> Alg15558
67-102: RKNLFADRIFDLFDLKRNGVIDFGFVRSLSNiFHpD 104 - 139: PVTEKITFAFRLYDLRGTGCIEREELKEMVLaLLn 148 183: AVEQIVDQTFKQADINDDGKIDHDEWVKALASKnPaL			SOS3	<i>AICBLA.2</i> Alg11525
69 - 104: KQNLFDVDRVFDLFDQKRNVIIEFGFVRSLSvFHpD 106 - 141: PEEQKIAFAFRLYDLRHTGFIERHELKEMVLaLLe 150-185: AVALLIVDRTFDQADTKGDGKIDQEEWNEFAKnpYV 56-75: KNGVIDFGFVRSLSiFHpK 77-112: PTSEKTTFAFKLYDLRGTGYIEKEELREMLaLLdE 121-156: TVEAIVDHTFSQADANDDGKIDPKWEDFVKkNPsa			SOS3	<i>AICBLA.3</i> Alg8494
84-114: ADRVFDLFDNTKSRGLDFDFARALSVFHpD 116-151: PVNNKIHFALYDLRKNQGFIERAELKQMMaTLAE 160-195: VTESIIDKTFEADTKKDGKIDLEEWFTLVNaHPsL			SOS3-LIKE-SCABP1	<i>AICBL2</i> Alg14121
67-102: RENIFANRIFDMFDVRRKGVDFGDFVRSLSvFHpN 104-139: SLEDKIDFTFRLY DMDCTGYIERQEV KQMLLaLLe 148-183: TIEIILDKTFEDA DVNQDGKIDKLEW SDFVnKNPsl			SOS3-LIKE-SCABP5	<i>AtCBL1</i> AT4G17615.1
82-117: KESLFAFDRVFDLFDTKHNGILGFEEFARALSVFHpN 119-154: PIDDKIHFSFQLYDLKQGGFIERQEVKQMVVaTLAE 163-198: VIEDIIDKTFEADTKHDGKIDKEEWRSLVrHPsL			SOS3-LIKE-SCABP1	<i>AtCBL2</i> AT5G55990.1
64-82: DGLINKKEEFQALALFKTNkK 86-121: FADRYQSQVFDLFDTKHNGILGFEEFARALSVFHpN 123-158: PIEDKIDFSFQLYDLKQGGFIERQEVKQMVVaTLAE			---	<i>AtCBL3</i> AT4G26570.2
71-106: RRNLFAFDRIFDVFDVRRKGVIEFGFVRSLSvFHpS 108-143: PVHEKVKFAFKLYDLRGTGFIEREELKEMVLaLLhE 152-187: MIEVMVDKAFVQADRKNDDGKIDIDWKFVSNPsl			SOS3	<i>AtCBL4</i> AT5G24270.1
66-101: KRSLSAERIFGLFDMRNDGAIIDFGFVHTLVNiFHpN 103-138: SPRDKAIFAFRLYDLRGTGFIEREELKEMVLaLLe 147-182: IIDSIVSKTFEEADWKKDGIIDLEEWENFVAtYPIT			---	<i>AtCBL5</i> AT4G01420.1
76-111: TRSLFAFDRVFDLFDTKNTGILDPEAFARALSVFHpN 113-148: KFEDKIEFSFKLYDLNQQGYIKRQEVKQMVVrTLAE 157-192: VIESIIDKTFEADTKLDGKIDKEEWRSLVrHPsL			SOS3-LIKE-SCABP2	<i>AtCBL6</i> AT4G16350.1
70-105: NESLFSERVFDLFD DTNHGLLGFEEF ARALSVFHp 107-142: PIDDKIDLSFQLYDLKQGGFIERQGVKQLVLaTLAE 151-186: IVESIIDKTFVQADTKHEGMIDEEWMDLVFrHPIL			SOS3-LIKE	<i>AtCBL7</i> AT4G26560.1
71-106: MQNLFAFDRVVFYMFDRKRNVIIEFGFVRSLSiFHpY3 108-143: PEHEKSAFMFKLYDLRGTGFIEPHELKMKMGaLLgE 152-187: SIEAIVQTMLEV DTNKDGKIDEEEW KELVakNPs			-	<i>AtCBL8</i> AT1G64480.1
67-102: KENLFANRIFDLFDVRRKGVDFGDFVRSLSvFHpN6 104-139: SLEEKTDFTFRLY DMDCTGFIERQEV KQMLIALLCE 148-183: TIEIILDQTFEDA DVDRDGKIDKTEW SNFVIKNPsl			SOS3	<i>AtCBL9</i> AT5G47100.1
113 - 148: GENLFLDRVFDLDFDEKKNVIEFDEFIHALSvFHpY 150 - 185: SIQEKTDFAFRLYDLRQTGFIEREEVQQMVsaLLIE 194-229: LLTMIIDKTFADA DSDKDGKISKDE WNVYVhKHPsL			SOS3-LIKE	<i>AtCBL10</i> AT4G33000

ژن‌ها دارای چهار موتیف EF-hand بوده، که ساختاری را برای اتصال یون‌های کلسیم فراهم می‌کنند (Sanyal *et al.*, 2016)، در گیاه آلوروپوس لیتورالیس، هم‌ردیفی چندگانه موید داشتن چهار دمین EF-hand در بین اعضای خانواده ژنی CBL بود. بررسی منابع علمی نشان می‌دهد توالی‌های EF-2، EF-3 و EF-4 از ساختار توالی مشابه‌ای با EF-handهای کلاسیک برخوردارند درحالی‌که EF-1 از ساختار متفاوت و غیرعادی برخوردار هستند، به‌عبارت دیگر EF-1 فاقد اسید آمینه بسیار محافظت شده Asp در جایگاه X بوده، ضمن این‌که سه اسید آمینه

هر چند این تفاوت محدودی با توجه به نوع داده‌های متفاوت مورد استفاده در پایگاه‌های تخصصی بررسی دمین توجیه می‌گردد. ولی مقایسه با مطالعات پیشین بر روی آرابیدوپسیس نشان می‌دهد که هیچ‌کدام از پایگاه‌ها مورد اشاره از قدرت لازم جهت برآورد تعداد دقیق دمین‌ها خصوصاً دمین EF-hand1 برخوردار نبودند. درحالی‌که بررسی خانواده ژنی CBL در گیاه آرابیدوپسیس (Kim *et al.*, 2000)، (Kolukisaoglu *et al.*, 2004)، (Zhang *et al.*, 2014) و فلفل (Ma *et al.*, 2019) نشان داد که بر مبنای هم‌ردیفی چندگانه این

گروه CBL4 (SOS3) می‌باشند. شاخص آلیفاتیک حجم نسبی زنجیره آلیفاتیک در آمینو اسیدهای آلانین، والین، لوسین و ایزولوسین پروتئین است که اثر مثبتی بر افزایش مقاومت حرارتی پروتئین‌های کروی دارد (Jalili *et al.*, 2019). طول پروتئین‌های این خانواده از ۱۶۶ (AICBL4.4) الی ۳۰۳ اسید آمینه (AICBL10) و وزن مولکولی آن‌ها نیز از ۱۸۷۰۱/۱۵ الی ۳۴۶۶۶/۵۴ دالتون متغیر بود. دامنه نقطه ایزوالکتریک این پروتئین‌ها از ۴/۷۱ در AICBL4.1 تا ۵/۲۸ در AICBL10 متغیر بود. بررسی اندازه پروتئین‌های CBL در شلغم نشان می‌دهد که اندازه این پروتئین‌ها از ۱۹۴ (BrrCBL5) تا ۲۴۹ (BrrCBL10.1) اسید آمینه متغیر می‌باشد، به جز پروتئین BrrCBL3.3 که از ۴۴۹ اسید آمینه برخوردار بود که این دامنه تنوع، حکایت از خصوصیت بیوشیمیایی BrrCIPK داشت (Yin *et al.*, 2017). در بررسی خواص فیزیوشیمیایی خانواده ژنی CBL در گیاه آرآبیدوپسیس تالیانا نیز، طول پروتئین‌ها از ۲۰۳ (AtCBL10) تا ۲۳۰ اسید آمینه (AtCBL3) و وزن مولکولی آن‌ها نیز از ۲۳۵۱۸/۰۳ الی ۲۶۵۳۸/۰۶ دالتون متغیر بود. دامنه نقطه ایزوالکتریک این پروتئین‌ها نیز از ۴/۵۸ در AtCBL9 الی ۵/۵۶ در AtCBL6 متغیر بود. بیشترین وزن مولکولی به پروتئین AtCBL10، منفی‌ترین بار الکتریکی به AtCBL7، بیشترین و کمترین شاخص آلیفاتیک به ترتیب AtCBL5 و AtCBL7 و بیشترین و کمترین شاخص ناپایداری به ترتیب به AtCBL3 و AtCBL9 تعلق داشت. شباهت بالای خصوصیات فیزیوشیمیایی اکثر پروتئین‌های آلورپوس به آرآبیدوپسیس و داشتن رابطه قوی اورتولوژی با یکدیگر ممکن است دلالت بر محفوظ ماندن کارکرد و عملکرد این ژن‌ها در فرایند تکاملی بوده باشد. در بررسی گونه‌های مختلف پنبه نیز شباهت بسیار

نیز بین جایگاه‌های X و Y قرار دارند (Nagae *et al.*, 2003). همانند سایر حس‌گرهای کلسیم، CBLها دارای دمین‌های متصل‌شونده EF-hand جهت اتصال یون Ca^{2+} بوده که هر مولکول CBL در قالب یک دمین ساختاری ماریچ-حلقه-ماریچ فعالیت می‌نماید. اساساً CBLها را می‌توان به‌عنوان ساختارهای دو دمینی در نظر گرفت، که هر دمین از یک جفت دست EF-hand تشکیل شده که توسط یک رابط کوتاه به هم متصل می‌شوند (Kolukisaoglu *et al.*, 2004). دمین‌ها از یک ساختار α ماریچ متشکل از نه ماریچ α ، دو ماریچ- β و چهار رشته کوتاه β تشکیل شده است (Sanyal *et al.*, 2016).

پایش ویژگی‌های فیزیوشیمیایی پروتئین‌ها در گیاه آلورپوس

پایش ویژگی‌های فیزیوشیمیایی پروتئین‌ها می‌تواند در تعیین فرایندهای بیولوژیکی، کارکرد مولکولی و جانمایی آن‌ها در سلول تأثیرگذار باشد. ارزیابی ویژگی‌های فیزیوشیمیایی در پروتئین‌های CBL به آشکارسازی وزن مولکولی متغیر در محدوده ۱۸۷۰۱ الی ۳۴۶۶۶ دالتون، محدوده pH ایزوالکتریک اسیدی، شاخص ناپایداری ۲۷/۸۶ تا ۴۷/۵۷ درصد و شاخص آلیفاتیک ۷۹/۳۴ تا ۹۳/۴۳ منجر شد (جدول ۱). همان‌طور که در جدول ۱ دیده می‌شود پروتئین AICBL10 بیشترین وزن مولکولی را داشته، منفی‌ترین بار الکتریکی به AICBL4.4 (SOS3) و تنها پروتئین با بار الکتریکی مثبت به AICBL10 اختصاص داشت. بیشترین و کمترین شاخص آلیفاتیک به ترتیب AICBL4.2 و AICBL4.4 و بیشترین و کمترین شاخص ناپایداری به ترتیب به AICBL4.3 و AICBL4.2 تعلق داشت، که از

بالایی در خصوصیات این پروتئین‌ها مشاهده شد که به حفاظت‌شدگی بالای عملکرد این ژن‌ها تفسیر گردید (Lu et al., 2017). در بررسی روابط تکاملی و فیلوژنتیک خانواده ژنی CBL در برنج و دیگر گونه‌های خانواده غلات، تنوع بالایی در میان وزن مولکولی پروتئین مشاهده شده که از ۱۲/۳ کیلودالتون در SiCBL7 ارزن دم‌روباهی الی ۸۰/۱۱۵ کیلودالتون در PeCBL1-4 بامبو متغیر بود. در شاخص ایزوالکتریک نیز، از PI اسیدی ۴/۲۶ در SiCBL7 تا PI ۱۰/۱۳ در SiCBL1 متغیر بود (Jiang et al., 2020). لازم به‌ذکر است اندازه پپتید CBL2 در هر دو گیاه آلورپوس و آرابیدوپسیس یکسان بوده که حاکی از حفاظت‌شدگی بالای توالی این ژن در طول تکامل خصوصاً از بعد اندازه پروتئین است. کوچکترین و بزرگترین اندازه پپتید نیز در گیاه آلورپوس مشاهده شده که به ترتیب به دو ژن *AICBL4.4* و *AICBL10* تعلق داشت.

تغییرات پس از ترجمه میریستویلاسیون و پالمیتویلاسیون

وقایع پس از ترجمه نقش مهمی در انتقال پیام، جابجایی، جانمایی، متابولیسم و تنظیم پروتئین‌ها دارند. میریستویلاسیون^۱ و پالمیتویلاسیون^۲ دو فرآیند پس از ترجمه بوده که در حس‌گرهای پروتئینی کلسیم (به‌جز پروتئین‌های کالمادولین) به منظور هدایت و جانمایی پروتئین‌ها در سلول صورت می‌گیرد (Mohanta et al., 2017). میریستویلاسیون نقشی حیاتی در شناسایی غشا و انتقال پیام پاسخ به تنش محیطی در گیاهان داشته، ضمن این‌که می‌تواند بر پایداری ساختاری پروتئین‌ها و همچنین توانایی آنها در تعامل با غشاها یا دمین‌های آگریز سایر پروتئین‌ها اثر گذارد (Podell

۲۰۰۴). با بررسی توالی پروتئینی CBL، موتیف‌های میریستویلاسیون و پالمیتویلاسیون در برخی از اعضای خانواده ژنی شناسایی شدند. موتیف میریستویلاسیون در همه CBL4های آلورپوس و آرابیدوپسیس مشاهده شد. درحالی‌که دو ژن CBL2 و CBL10 در هر دو گیاه، فاقد این موتیف بودند. در گیاه آرابیدوپسیس، CBL1، CBL5، CBL9، دارای موتیف میریستویلاسیون می‌باشند. موتیف پالمیتویلاسیون در همه پروتئین‌های CBL هر دو گیاه وجود دارد، به‌جز پروتئین CBL10 که در هر دو گیاه فاقد موتیف پالمیتویلاسیون می‌باشد. موتیف N-terminal MGCXXS/T در واقع تغییرات لیپیدی را با استفاده از میریستویلاسیون^۳ و پالمیتویلاسیون^۴ (S-acylation) هدایت نموده که امکان جانمایی کمپلکس‌های CBL/CIPK را در سلول ممکن می‌سازد (Zhang et al., 2014). در شلغم ۱۱ پروتئین BrCBL با یک موتیف محافظت شده میریستویلاسیون N (GXXXS/T) شروع شده است که احتمالاً در هدف‌یابی غشایی کمپلکس‌های CBL-CIPK از نقش کلیدی برخوردار باشند (Jung et al., 2017). درحالی‌که شش BrCBL فاقد این توالی موتیفی هستند. به‌نظر می‌رسد موتیف آمینی میریستویلاسیون برای عملکرد مسیرهای SOS3 ضروری باشد (Wang et al., 2007). ضمن این‌که هر یک از پروتئین‌های BrCBL1.1، ۱/۲-، ۴/۱-، ۴/۲-، ۳/۴-، ۴-، ۹/۱- و ۹/۲- دارای یک موتیف N-myristoylation و palmitoylation (MGCXXS/T) محافظت شده بوده که احتمالاً ارتباط غشایی این پروتئین‌ها را واسطه‌گری می‌کنند (Yin et al., 2017). میریستویلاسیون به‌عنوان یکی از تغییرات پس از ترجمه پروتئین، از ماهیت برگشت‌ناپذیر برخوردار بوده و در قارچ‌ها،

۱. N-myristoylation
۲. palmitoylation

3. N-myristoylation
4. palmitoylation

1. N-myristoylation
2. palmitoylation

دارای همه موتیف‌ها به جز موتیف ۹ و ۱۰ می‌باشند. پروتئین AICBL4.4 علاوه بر این که فاقد موتیف‌های ۹ و ۱۰ می‌باشد، موتیف‌های ۴، ۵ و ۶ را دارا نمی‌باشد، AICBL10 هم فاقد موتیف‌های ۸، ۹ و ۱۰ می‌باشد. در گیاه آرابیدوپسیس AtCBL1، AtCBL4 و AtCBL9 فاقد موتیف‌های ۹ و ۱۰ بوده و AtCBL2 و AtCBL6 فاقد موتیف‌های ۸ و ۱۰ می‌باشند. AtCBL8 و AtCBL3 فاقد موتیف‌های ۸ و ۹؛ AtCBL5 فاقد موتیف‌های ۵، ۹ و ۱۰؛ AtCBL7 فاقد موتیف‌های ۳، ۹ و ۱۰ و نهایتاً AtCBL10 فاقد موتیف‌های ۸، ۹ و ۱۰ می‌باشد. پروتئین CBL10 از میان ۱۰ موتیف شناسایی شده در دو گیاه آرابیدوپسیس و آلورپوس، فاقد سه موتیف ۸، ۹ و ۱۰ بودند در حالی که در پروتئین CBL4 (به جز AICBL4.4) نیز به جز دو موتیف ۹ و ۱۰، بقیه موتیف‌ها مشاهده شد. 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 پروتئین‌هایی که از ترکیب موتیف مشابه‌ای برخوردارند احتمالاً عملکردهای مشابهی را بروز می‌دهند (El-Gebali *et al.*, 2019). در ادامه با مقایسه و تطبیق موتیف‌های شناسایی‌شده (شکل ۱) با اطلاعات دامین‌های EFhand (جدول ۱) انوتیشن موتیف‌ها بررسی شد. موتیف ۳ و ۴ در محدوده دامین EFhand1 قرار داشتند به جز دو ژن AICBL4.4 و AtCBL7 که به ترتیب فاقد موتیف ۴ و ۳ بودند. موتیف‌های یک و شش در محدوده دامین EFhand2 قرار داشتند به جز ژن AtCBL9 که فاقد موتیف ۶ بود. موتیف ۱ و موتیف ۲ به ترتیب اختصاص به EFhand3 و EFhand4 داشتند. این نتیجه بیانگر این مطلب بوده که این موتیف‌های اصلی نقش مهمی در عملکرد پروتئین‌های CBL دارند. به نظر

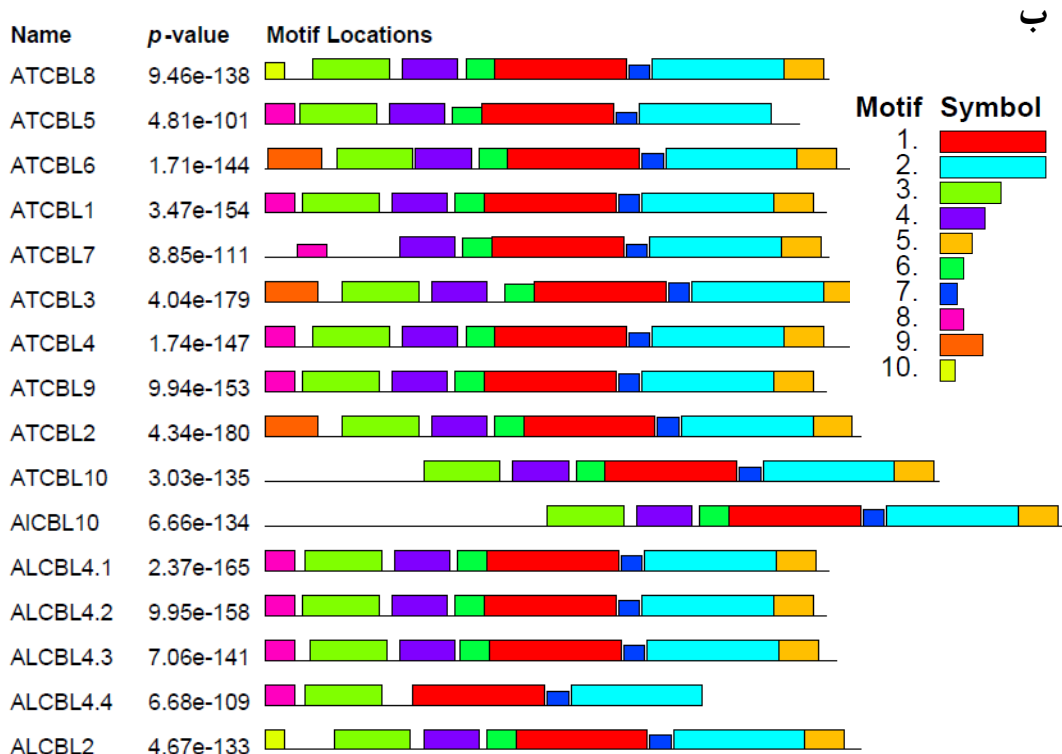
یوکاریوت‌های عالی و ویروس‌ها مشاهده می‌شود. پروتئین‌های AtCBL1، AtCBL4، AtCBL5 و AtCBL9 بواسطه موتیف GXXXS/T می‌توانند در غشای پلاسمایی جانمایی شده و به همین ترتیب در هدایت سایر پروتئین‌ها به غشای پلاسمایی نقش ایفا نمایند (Batistič *et al.*, 2010). نتیجه تحقیقات پیشین نشان می‌دهد موتیف میریستویلاسیون پروتئین AtCBL4 برای تنظیم هموستازی یون و تحمل نمک در گیاهان مورد نیاز است. فسفریلاسیون اسیدآمینو سرین ۱۱۳۸ در SOS1، موجب فعال‌سازی کمپلکس AtCBL4-AtCIPK24 در مجاورت غشای پلاسمایی شده که به نوبه خود سبب افزایش تحمل به شوری می‌شود (Ma *et al.*, 2020). به عبارت دیگر بیش‌بیاں *SOS1* باعث کاهش یون سدیم در شرایط شوری شدید شده که افزایش تحمل به تنش نمکی را موجب می‌شود، که نشان‌دهنده اهمیت محدود نمودن تجمع یون سدیم در سلول‌های گیاهی برای تحمل به شوری است (Batistič *et al.*, 2010).

شناسایی موتیف‌های حفاظت‌شده پروتئین‌های AICBL

برای شناسایی موتیف‌های حفاظت‌شده و تعیین موقعیت این موتیف‌ها در دامین‌های EF-hand، تمام پروتئین‌های CBL آلورپوس و آرابیدوپسیس با استفاده از نرم‌افزار MEME مورد آنالیز قرار گرفتند (شکل ۱). تجزیه و تحلیل MEME با توجه به پارامترهای پیش‌فرض نرم‌افزار نشان داد که CaCBL‌ها دارای ۱۰ موتیف متفاوت حفاظت‌شده بوده که به صورت Motif-1 تا Motif-10 نامگذاری شده‌اند. توزیع مکانی موتیف‌ها، در پروتئین‌های دو گونه مورد بررسی، تقریباً یکسان بود (شکل ۱-ب). در گیاه آلورپوس، AICBL2 فاقد موتیف‌های ۸ و ۹، AICBL4.1، AICBL4.2 و AICBL4.3

علی‌رغم تشابه نسبتاً بالا با موتیف میریستویلاسیون در برنامه MGCXXS/T، در برنامه PlantsP فاقد جایگاه میریستویلاسیون بود.

می‌رسد موتیف‌های میریستویلاسیون شناسایی شده در برنامه PlantsP (جدول ۲) با موتیف شماره ۸ در برنامه MEME مرتبط باشد به جز ژن *AtCBL7* که



شکل ۱. آنالیز موتیف و جستجوی دمین در توالی‌های پروتئینی CBL. (الف) نمایش موتیف لوگو توالی پروتئین‌های AICBL و AtCBL در برنامه MEME. اندازه هر اسیدآمین، بیانگر فراوانی آن در دمین مربوطه می‌باشد. (ب) موتیف‌های شناسایی شده در توالی پروتئینی.

جدول ۲. خصوصیات خانواده ژنی CBL در آلوروپوس لیتورالیس و آرآیدوپسیس تالیانا

Palmitoylation	N-Myristoylation: MGXXXS/T	Gravy	شاخص آلیاتیک Aliphatic index	شاخص ناپایداری Instability index	نقطه ایزوالکتریک Isoelectric point	وزن مولکولی Molecularweight (kDa)	تعداد اینترون Intron No.	تعداد اگزون Exon No.	طول پروتئین Protein length	نام ژن Genename
-	-	0.133	87.59	46.99	5.28	34666.54	8	9	303	<i>AtCBL10</i>
****MGCVSSKQFK	MGCVSSKQF	-0.196	89.39	37.02	4.71	24352.70	7	8	214	<i>AtCBLA.1</i>
****MGCVSSKQFN	MGCVSSKQF	-0.259	93.43	27.86	4.94	24330.66	7	8	213	<i>AtCBLA.2</i>
****MGCLPTKHAN	MGCLPTKHA	-0.299	86.27	47.57	5.19	24884.23	7	8	217	<i>AtCBLA.3</i>
****MGCASSKQFG	MGCASSKQF	-0.341	79.34	39.36	4.78	18701.15	5	6	166	<i>AtCBLA.4</i>
*MVAFWWCIAKAARL KAARLLTCCNPATM AARLLTCCNPATMD ARLLTCCNPATMDG	-	-0.219	85.49	32.69	4.98	25872.49	7	8	226	<i>AtCBL2</i>
****MGC FHSKAAK	MGC FHSKAA	-0.197	86.95	39.58	4.74	24553.98	7	8	213	<i>AtCBL1</i>
****MSQCVDGKHL VDGKHLCTSVLGCFL LCTSVLGCFLDLLYK	-	-0.22	91.86	42.10	4.89	25809.38	7	8	226	<i>AtCBL2</i>
****MSQCIDGFKHV IDGFKHVCSSFFRCF VCSFFRCFDIDYK	-	-0.272	86.04	47.79	4.80	26538.06	6	7	230	<i>AtCBL3</i>
****MGCSVSKKKK	MGC VSKKKK	-0.314	88.60	47.49	5.13	25693.48	7	8	222	<i>AtCBLA</i>
****MGCVCSKQLE **MGCVCCKQLEGR	MGCVCCKQL	-0.140	94.14	42.60	4.84	23518.03	7	8	203	<i>AtCBL5</i>
***MMMQCLDGLKHL LALILLTCCDADPPK	-	-0.252	90.97	34.36	5.56	26028.94	6	7	226	<i>AtCBL6</i>
ASSNSTGCFDQKRR NVVEGVTCCYGGEMNK	-	-0.38	77.38	35.48	4.78	24404.40	6	7	214	<i>AtCBL7</i>
MLAFVKCFSLKRAK*	-	-0.207	90.19	38.3	5.01	24649.28	7	8	214	<i>AtCBL8</i>
****MGC FHSSTAAR	MGC FHSSTA	-0.215	85.12	33.08	4.58	24531.84	7	8	213	<i>AtCBL9</i>
-	-	-0.083	92.54	38.51	4.72	29342.45	8	9	256	<i>AtCBL10</i>

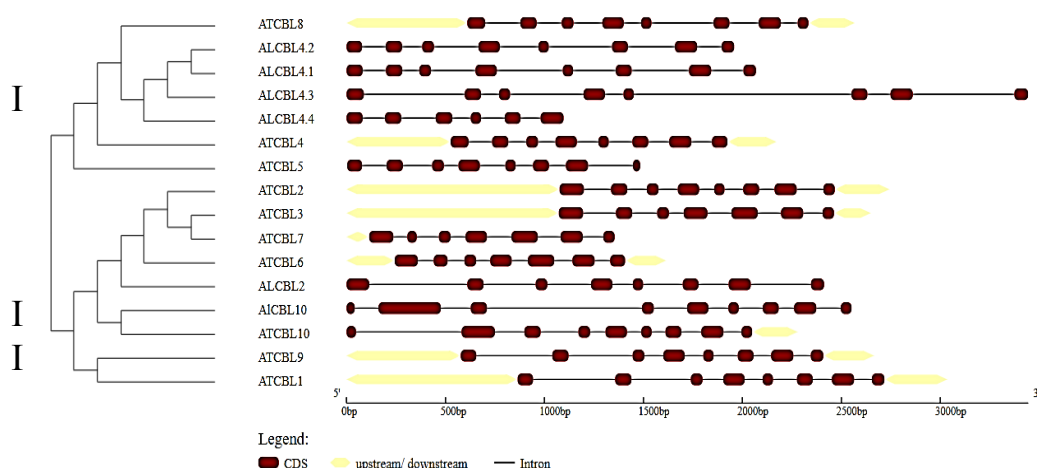
هشت اگزون و هفت اینترون، حدود ۱۶/۶ درصد ژن‌ها دارای نه اگزون و هشت اینترون و حدود ۱۶/۶ درصد ژن‌ها دارای شش اگزون و پنج اینترون هستند. طول‌ترین طول ژن در DNA با ۳۴۴۴ جفت‌باز مربوط به ژن Alg8494 و کوتاه‌ترین طول ژن با ۱۰۹۷ جفت‌باز مربوط به Alg13204 می‌باشد (جدول ۱). در مقایسه ساختار ژنی اینترون/اگزون CBL در برنج و ۱۴ گیاه دیگر از تیره غلات، از ۱۵۲ ژن مورد بررسی، ۵۵٪ ژن‌ها نیز دارای هفت اینترون بوده که خود دلالت بر وجود یک مدل حفاظت‌شده در فرایندهای تکاملی و سازماندهی ساختار ژنی اینترون/اگزون CBL‌ها بوده است. لازم به ذکر است در این بررسی CBL‌هایی نیز با ۲۰ اینترون (*HvCBL6.2*) یا فاقد اینترون (*PeCBL1.4*) شناسایی شدند (Jiang *et al.*, 2020). بر مبنای ترسیم درخت فیلوژنتیکی با استفاده از برنامه 6.0 MEGA به روش اتصال همسایه، همه CBL‌ها به دو خوشه بزرگ تقسیم شده به نحویکه تقریباً همه AICBL‌ها در مجاورت با ژن‌های ارتولوگ‌های AICBL طبقه‌بندی شدند.

از میان پروتئین‌های CBL آلوروپوس و آرآیدوپسیس بررسی‌شده با نرم‌افزار SignalP 5.0 تنها *AtCBL6*، دارای توالی پپتید پیامی^۱ ترشحی MMMQCLDGLKHLALILLTCCD و جایگاه برش آن بود. پپتیدهای پیام در واقع توالی کوتاه پپتیدی در انتهای آمینی بسیاری از پروتئین‌ها خصوصاً پروتئین‌های سنتتیک بوده که وظیفه هدایت پروتئین‌ها به داخل یا سطح غشاها را برعهده دارند (Armenteros *et al.*, 2019).

شناسایی ساختار ژنی و روابط فیلوژنتیکی

بررسی ساختار اگزون- اینترونی خانواده ژنی CBL نشان داد که ۶۰ درصد ژن‌های *AtCBL* دارای هشت اگزون و هفت اینترون، حدود ۳۰ درصد ژن‌ها دارای هفت اگزون و شش اینترون و ۱۰ درصد ژن‌های CBL آرآیدوپسیس دارای نه اگزون و هشت اینترون می‌باشند درحالی‌که ۶۶/۶ درصد ژن‌های CBL آلوروپوس دارای

1. Signal peptide

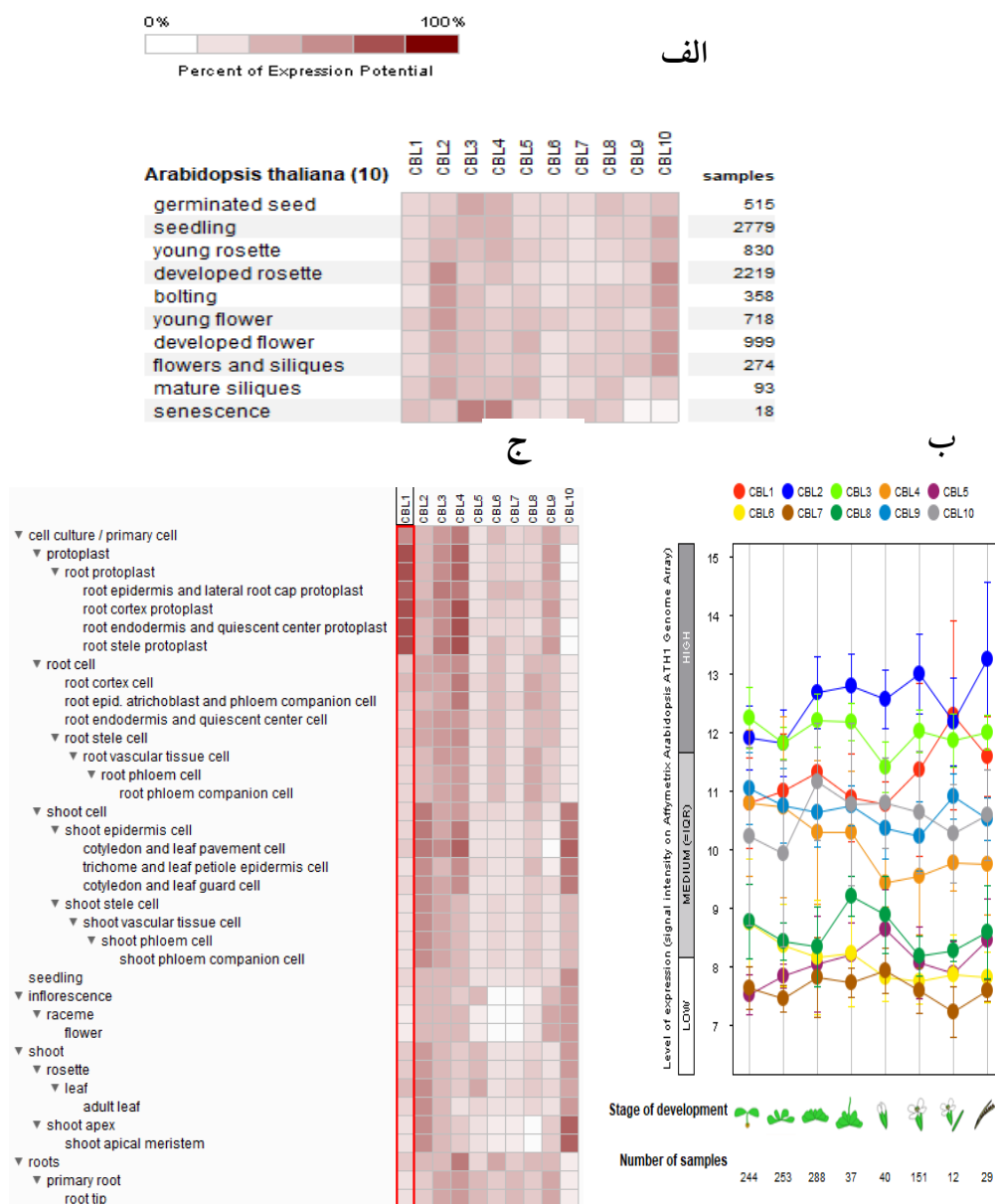


شکل ۲. آنالیز ساختار ژنی و درخت فیلوژنتیکی اعضای خانواده *CBL* در آلورپوس لیتورالیس و آرآبیدوپسیس تالیانا

CBL از داده‌های ریزآرایه چپ افی‌ماتریکس ATH1 آرآبیدوپسیس (ATLAS Niolabs GmbH, Berlin, Germany) استفاده شد. چپ ATH1 یکی از غنی‌ترین آرایه‌های افی‌ماتریکس بوده که جهت بررسی بیان در سطح ترانسکرپتوم مورد استفاده قرار می‌گیرد، به‌طوری‌که این آرایه امکان بررسی همزمان ۲۲/۳۹۲ ژن منحصر بفرد را در تیمارهای مورد بررسی فراهم می‌کند (Aminfar et al., 2019). بررسی بیان مقایسه‌ای ۱۰ عضو خانواده ژنی *AtCBL* در ۱۰ مرحله نموی با استفاده از نرم‌افزار genevestigator نشان داد (شکل ۳) که هر ۱۰ ژن مورد بررسی در هر ۱۰ مرحله نموی در تمام شرایط اعم از کنترل و تنش از بیان قابل ملاحظه‌ای برخوردار بوده هر چند که شدت بیان در میان این ژن‌ها متفاوت بود (شکل ۳-الف). این نتایج بیانگر بیان بافت-اختصاصی اعضای این خانواده در مراحل مختلف نموی می‌باشد. بررسی بیان مقایسه‌ای اعضای این خانواده در ۹ مرحله نموی در شرایط تنش نیز موید همین بیان اختصاصی بود. بررسی مطالعات پیشین نشان می‌دهد برخی از اعضای شبکه ژنی *CBL/CIPK* در پاسخ به تنش‌ها یا مراحل مختلف رشدی و نموی، از الگوهای بیان بافت‌اختصاصی برخوردارند (Li et al., 2009).

همان‌گونه که در شکل (۲) نشان داده شده، این دسته‌بندی با رابطه اورتولوژی آنها همخوانی دارد. همه ژن‌های *CBL* آلورپوس به‌جز *AiCBL2* و *AiCBL2* به همراه سه ژن *AtCBL4*، *AtCBL5* و *AtCBL8* آرآبیدوپسیس در گروه اول قرار گرفتند. درحالی‌که بقیه ژن‌های *AtCBL* و دو ژن *AiCBL2* و *AiCBL10* در گروه دوم قرار گرفتند. در بررسی مقایسه‌ای *CBLAt*ها با *BrrCBL*ها، ژن‌های اورتولوگ دو گونه در مجاورت یکدیگر خوشه بندی شدند (Yin et al., 2017). مطالعات نشان می‌دهد برخی از مسیرهای سیگنالینگ *CBL-CIPK* در گونه‌های مختلف گیاهی حفظ شده است. به‌عنوان مثال، مسیر پیام‌رسانی *SOS* در برنج نیز حفاظت شده بوده و از عملکرد مشابه‌ای برخوردار است (Martínez-Atienza et al., 2007). ژن همسانه‌سازی شده *PeSOS1* از گیاه *Populus euphratica* از عملکرد مشابه‌ای با ژن *AtSOS1* برخوردار بوده (Wu et al., 2007) و یا ژن همولوگ *AtCBL4* در ذرت، در تحمل به تنش شوری نقش دارد (Wang et al., 2007).

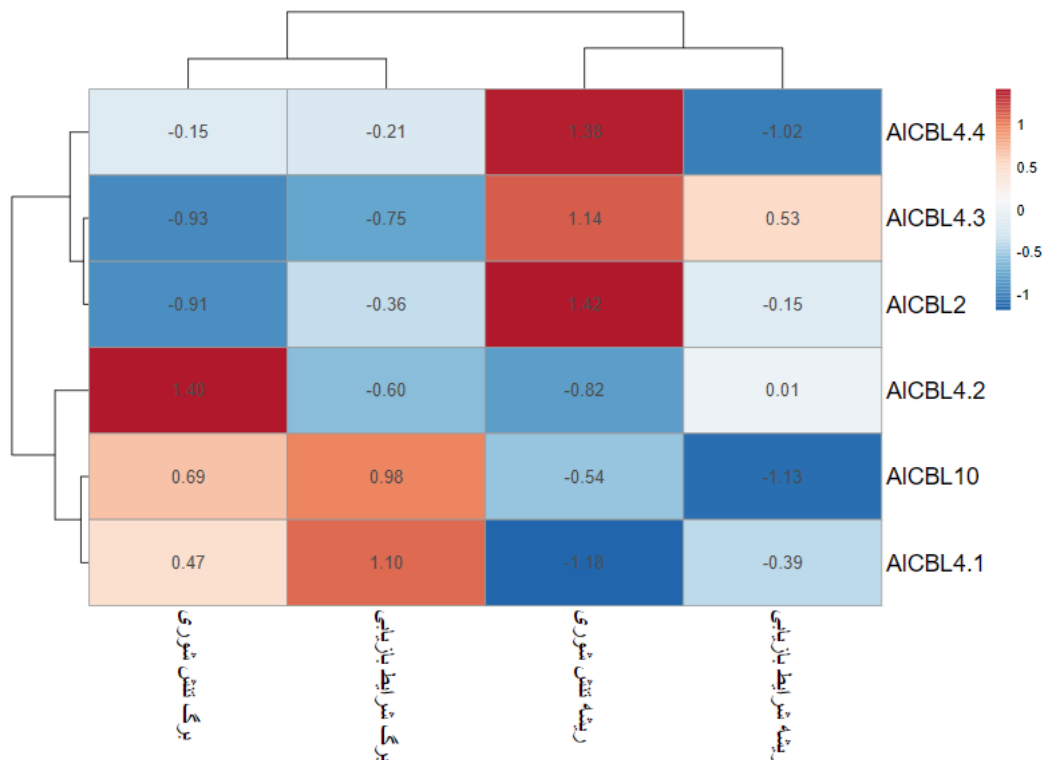
آنالیز بیان مقایسه‌ای اعضای خانواده ژنی *AtCBL* و *AiCBL* در این تحقیق جهت بررسی الگوی بیانی خانواده ژنی



شکل ۳. بررسی این سیلیکو الگوی بیان خانواده ژنی CBL در گیاه مدل آرکیدوپسیس با استفاده از نرم افزار GENEVESTIGATOR. (الف) تجزیه و تحلیل بیان ریزآرایه ژن های CBL1 الی CBL10 در ۱۰ مرحله مختلف نموی در تمام شرایط (الف)، در ۹ مرحله نموی در شرایط تنش (ب) به همراه الگوی بیانی خانواده ژنی CBL در ۳۷ بافت مختلف در شرایط تنش (ج).

متفاوت در تنظیمات بیان این ژن هاست. در بررسی بیان در بافت های مختلف در شرایط تنش نیز رویکرد بیان اختصاصی متنوع اعضای این خانواده ژنی مشهود بود (شکل ۳-ج). بر مبنای داده های ریزآرایه که به صورت درصد شدت بیان ارائه گردیده بیشترین فعالیت به ژن های *AtCBL3*، *AtCBL2*، *AtCBL1* و *AtCBL4* اختصاص داشت.

هر چند اعضای این خانواده به لحاظ همولوژی توالی، از شباهت بالایی برخوردار می باشند ولی همان گونه که در شکل (۳-ب) مشاهده می شود بیشترین سطح بیان به ترتیب به ژن های *AtCBL2* و *AtCBL3* و کمترین بیان هم به ژن های *AtCBL6* و *AtCBL7* تعلق داشت. به نظر می رسد این تنوع بیان احتمالاً به دلیل وجود سازوکارهای تنظیمی



شکل ۴. الگوی Heatmap از داده‌های ترانسکریپتوم (RNA-seq) خانواده ژنی *AICBL* الگوی ارائه شده میزان تغییر بیان ژن‌های *AICBL* را در دو بافت برگ و ریشه تحت شرایط تنش شوری و بازیابی نشان می‌دهد. شدت بیان به صورت نوار رنگی در انتهای شکل ارائه شده است که در آن رنگ آبی نشان‌دهنده کاهش بیان و رنگ قرمز نشان‌دهنده افزایش بیان است.

AICBL در بافت‌های برگ و ریشه آلورپوس در شرایط تنش شوری و بازیابی نیز از داده‌های RNA-seq استفاده شده و نمودار Heatmap در مقیاس \log_2FC ترسیم شد (شکل ۴). الگوی بیانی ژن‌های *AICBL* در دو بافت برگ و ریشه در تنش شوری و شرایط بازیابی متفاوت بود. یک هفته بعد از تنش شوری، بیشترین بیان در برگ گیاه آلورپوس، در ژن *AICBL4.2* و بیشترین بیان در برگ در شرایط ریکاوری نیز به ژن *AICBL4.1* اختصاص داشت. کمترین بیان در تنش شوری و شرایط ریکاوری در ژن *AICBL4.4* مشاهده شد. در بافت ریشه، بیشترین بیان پس از یک هفته تنش شوری برای ژن *AICBL2* مشاهده شد در حالی که در ژن‌های *AICBL4.4* و *AICBL4.3* نیز افزایش بیان معنی‌دار مشاهده شد که حاکی از سازوکار تنظیمی وابسته به بافت برای این ژن‌هاست. کمترین بیان در

در شرایط تنش شوری ژن *AtCBL2* به نسبت در بافت شاخساره از بیان بیشتری برخوردار بود در حالی که برای دو ژن *AtCBL4* و *AtCBL1* در پروتوپلاست بیان بیشتری مشاهده شد. بررسی‌های نشان می‌دهد دو ژن *AtCBL4/SOS3* و *AtCBL10* که همسانی اسید آمینه‌ای آنها در حدود ۶۰ درصد بوده ولی از الگوهای بیان بافت-اختصاصی متفاوتی برخوردارند. ژن *AtCBL4* در حالی که بیان بالایی را در بافت ریشه (به‌طور عمده در نوک ریشه) نشان می‌دهد اما در سایر بافت‌ها، نسبتاً از بیان قابل ملاحظه‌ای برخوردار نیست (Li et al., 2009).

مطالعه الگوی بیانی خانواده ژنی می‌تواند اطلاعات مهمی برای درک کارکرد آنها فراهم آورد (Hashemi et al., 2016; Hashemipetroudi et al., 2016; Hashemi-Petroudi et al., 2020a). در این تحقیق برای بررسی بیان ژن‌های

داده شده است. این یافته‌ها از یک سو مبین اختصاصیت عملکردی بوده و از سوی دیگر وجود تکرار^۴ در ژن‌های *CBL* و *CIPK* را منعکس می‌نماید. به‌عنوان مثال، در گیاه آراییدوپسیس ژن‌های *CBL1* و *CBL9* علی‌رغم این‌که از نظر توالی اسیدهای آمینه از تشابه بالا برخوردارند ولی به لحاظ عملکرد به‌صورت اختصاصی عمل می‌نمایند (Li *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2006; Cheong *et al.*, 2007; Yin *et al.*, 2017). این امر حاکی از این واقعیت بوده که حس‌گرهای کلسیم علی‌رغم شباهت توالی بالا یا رابطه تکاملی نزدیک ممکن است عملکردهای بسیار متفاوتی را بروز دهند. به‌عبارت دیگر می‌توان نتیجه گرفت که ژن‌های مضاعف شده^۵ معمولاً با عملکردهای جدیدی تکامل یافتند (Yin *et al.*, 2017). امروز آنالیز بیش‌بیان و بررسی جهش‌یافته‌های *CBL* و *CIPK* موجب متحول شدن درک ما از عملکرد ژن‌ها شده است. این تجزیه و تحلیل‌ها ثابت نموده که این ژن‌ها قادرند تحمل به تنش‌های مختلف را در گیاهان القا نمایند در نتیجه گیاه حامل این ژن‌ها می‌تواند به شرایط نامساعد محیطی سازگار شود.

این بررسی به‌عنوان اولین مطالعه جامع خانواده *AICBL* با هدف روشن‌سازی تکامل، الگوهای بیان و عملکردهای احتمالی ژن‌های *CBL* در آلوروپوس لیتورالیس در پاسخ به تنش‌های غیر زیستی می‌باشد. این یافته‌ها اطلاعاتی برای پیش‌بینی عملکرد ژن‌های *CBL* در تحمل گیاه به تنش شوری فراهم می‌نماید. مطالعات تکمیلی بیان ژن‌های خانواده ژنی *AICBL* به‌ویژه *AICBL4* تحت تنش‌های غیرزیستی مختلف به روش RT-qPCR می‌تواند در درک سازوکار تنظیمات بیان ژن‌های مرتبط با مسیر

بافت ریشه نیز به‌ترتیب برای ژن‌های *AICBL4.1*، *AICBL10* و *AICBL4.4* بود. تجزیه و تحلیل‌های بیوانفورماتیکی نشان می‌دهد تعاملات متمایز و در عین حال گزینشی در میان این اعضای شبکه ژنی CBL-CIPK حاکم است (Evrard, 2013). شناسایی اولین مورد از تعاملات ژنی در قالب شبکه CBL-CIPK^۱ 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 تعامل دارد و این تعامل باعث فعال‌سازی کینازها در غشای پلاسمایی شده، که به نوبه خود فعال‌سازی آنتی‌پورترهای Na⁺/H⁺ تحت عنوان SOS1 و H⁺-ATPase واکوئلی را جهت افزایش تحمل به تنش در پی دارد (Zhang *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2019; Ma *et al.*, 2020). تحقیقات بعدی در آراییدوپسیس نشان داد که ژن *AtCBL10* نیز با *AtCIPK24* در تعامل می‌باشد. بدین صورت که کمپلکس *CBL10-CIPK24* در تعامل با واکوئول‌ها شاخساره را از آسیب‌های ناشی از تنش شوری محافظت می‌نمایند (Yang *et al.*, 2019). در تحقیق دیگری بر روی گیاه موتانت آراییدوپسیس که از جهش در ژن *cipk3* برخوردار بود پاسخ فوق حساسیت به ABA^۲ در مراحل جوانه‌زنی بذر مشاهده شد که با تغییر در الگوی بیانی تعدادی از ژن‌های نشانگر تنش^۳ در مواجهه با تیمارهای ABA، سرما و نمک زیاد همراه بود (Zhang *et al.*, 2014).

در مطالعات گسترده صورت گرفته در خصوص شبکه CBL-CIPK، تعامل اختصاصی و همپوشانی میان اعضای مختلف خانواده *CBL* و *CIPK* نشان

1. CBL-CIPK network
2. ABA hypersensitivity
3. Stress marker genes

4. Redundancy
5. Duplicated genes

SOS مفید باشد.

کشاورزی و منابع طبیعی ساری انجام شده است و بدینوسیله نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند مراتب تشکر و قدردانی خود را اعلام نمایند.

سپاسگزاری

این پژوهش با حمایت مالی پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم

REFERENCES

- Aminfar Z, Rabiei B, Tohidfar M, Mirjalili MH (2019) Meta-analysis of Transcriptomics related to the genes of the mevalonate (MVA) and the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate (MEP) pathways for isoprenoids biosynthesis in plants. *Crop Biotechnology*. 9(25): 1-17.
- Armenteros JJA, Tsirigos KD, Sønderby CK, Petersen TN, Winther O, Brunak S, Von Heijne G, Nielsen H (2019) SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. *Nature biotechnology*. 37(4): 420-423.
- 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: 202-208.
- Barhoumi Z, Djebali W, Abdelly C, Chaïbi W, Smaoui A (2008) Ultrastructure of *Aeluropus littoralis* leaf salt glands under NaCl stress. *Protoplasma*. 233(3-4): 195-202.
- Barhoumi Z, Djebali W, Chaïbi W, Abdelly C, Smaoui A (2007) Salt impact on photosynthesis and leaf ultrastructure of *Aeluropus littoralis*. *Journal of plant research*. 120(4): 529-537.
- Batistič O, Waadt R, Steinhorst L, Held K, Kudla J (2010) CBL-mediated targeting of CIPKs facilitates the decoding of calcium signals emanating from distinct cellular stores. *The Plant Journal*. 61(2): 211-222.
- Cheong YH, Kim K-N, Pandey GK, Gupta R, Grant JJ, Luan S (2003) CBL1, a calcium sensor that differentially regulates salt, drought, and cold responses in Arabidopsis. *The Plant Cell*. 15(8): 1833-1845.
- Cheong YH, Pandey GK, Grant JJ, Batistic O, Li L, Kim BG, Lee SC, Kudla J, Luan S (2007) Two calcineurin B-like calcium sensors, interacting with protein kinase CIPK23, regulate leaf transpiration and root potassium uptake in Arabidopsis. *The Plant Journal*. 52(2): 223-239.
- Dodd AN, Kudla J, Sanders D (2010) The language of calcium signaling. *Annual review of plant biology*. 61: 593-620.
- El-Gebali S, Mistry J, Bateman A, Eddy 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.
- Evrard A (2013). Cell type-specific transcriptional responses of plants to salinity.
- Fatemi F, Hashemi-Petroudi SH, Nematzadeh G, Askari H, Abdollahi MR (2019) Exploiting differential gene expression to discover ionic and osmotic-associated transcripts in the halophyte grass *Aeluropus littoralis*. *Biological procedures online*. 21(1): 1-16.
- Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*. 39(4): 783-791.
- Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Wilkins MR, Appel RD, Bairoch A (2005) Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In: Walker JM. (ed) *The proteomics protocols handbook*, Humana Press, New York City, New York, United States, pp 571-607.
- Ghorbani HR, Samizadeh Lahiji H,

- Nematzadeh G-A (2017) Expression pattern analysis of transcription factors from *Aeluropus littoralis* in response to salt stress and recovery condition. *Journal of Plant Molecular Breeding*. 5(1): 19-30.
- Hall T, Biosciences I, Carlsbad C (2011) BioEdit: an important software for molecular biology. *GERF Bull Biosci*. 2(1): 60-61.
- Hashemi-Petroudi S, Nematzadeh G, Mohammadi S, Kuhlmann M (2020a) Expression pattern analysis of heat shock transcription factors (HSFs) gene family in *Aeluropus littoralis* under salinity stress. *Environmental Stresses in Crop Sciences*. 13(2).
- Hashemi-Petroudi SH, Mohammadi S (2020b) Identification of the ERF gene family in *Aeluropus littoralis* halophyte plant and analysis of their expression pattern in response to salt stress. *Crop Biotechnology*. 9(29): 53-66.
- Hashemi-Petroudi SH, Nematzadeh G, Kuhlmann M (2019) Identification and analysis of a DEVIL paralog gene cluster in *Aeluropus littoralis* by a comparative genomic approach. *Crop Biotechnology*. 9(25): 75-87.
- 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, Ahmadian G, Yamchi A, Kuhlmann M (2016) Identification and validation of *Aeluropus littoralis* reference genes for Quantitative Real-Time PCR Normalization. *Journal of Biological Research-Thessaloniki*. 23(1): 1-13.
- Hashemipetroudi S, Nematzadeh G, Ahmadian G, Yamchi A, Kuhlmann M (2016) Expression analysis of salt stress related expressed sequence tags (ESTs) from *Aeluropus littoralis* by quantitative real-time PCR. *Biosci. Biotech. Res. Comm*. 9(3): 445-456.
- Horton P, Park K-J, Obayashi T, Fujita N, Harada H, Adams-Collier C, Nakai K (2007) WoLF PSORT: protein localization predictor. *Nucleic Acids Res*. 35: 585-587.
- Hu B, Jin J, Guo A-Y, Zhang H, Luo J, Gao G (2014) GSDS 2.0: an upgraded gene feature visualization server. *Bioinformatics*. 31(8): 1296-1297.
- Hulo N, Bairoch A, Bulliard V, Cerutti L, De Castro E, Langendijk-Genevaux PS, Pagni M, Sigrist CJ (2006) The PROSITE database. *Nucleic acids research*. 34(suppl_1): D227-D230.
- Jalili MM, Haddad MA, Housaindokht MR (2019) Biocomputational Investigations of Structural and Functional Properties of Cry Proteins for Malaria Biocontrol.
- 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.
- Karami Lake B, Sohani M, Abedi A (2020) Bioinformatical study of Calcium/cation (CaCA) antiporters gene family in maize (*Zea mays* L.). *Crop Biotechnology*. 9(29): 21-37.
- Kim K-N, Cheong YH, Gupta R, Luan S (2000) Interaction specificity of *Arabidopsis calcineurin* B-like calcium sensors and their target

- kinases. *Plant physiology*. 124(4): 1844-1853.
- Kolukisaoglu Ü, Weinl S, Blazevic D, Batistic O, Kudla J (2004) Calcium sensors and their interacting protein kinases: genomics of the *Arabidopsis* and rice CBL-CIPK signaling networks. *Plant physiology*. 134(1): 43-58.
- Kudla J, Becker D, Grill E, Hedrich R, Hippler M, Kummer U, Parniske M, Romeis T, Schumacher K (2018) Advances and current challenges in calcium signaling. *New Phytologist*. 218(2): 414-431.
- Kudla J, Xu Q, Harter K, Gruissem W, Luan S (1999) Genes for calcineurin B-like proteins in *Arabidopsis* are differentially regulated by stress signals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 96(8): 4718-4723.
- Letunic I, Bork P (2018) 20 years of the SMART protein domain annotation resource. *Nucleic acids research*. 46(D1): D493-D496.
- Lewit-Bentley A, Réty S (2000) EF-hand calcium-binding proteins. *Current opinion in structural biology*. 10(6): 637-643.
- Li J, Jiang M-M, Ren L, Liu Y, Chen H-Y (2016) Identification and characterization of CBL and CIPK gene families in eggplant (*Solanum melongena* L.). *Molecular Genetics and Genomics*. 291(4): 1769-1781.
- Li L, Kim B-G, Cheong YH, Pandey GK, Luan S (2006) A Ca²⁺ signaling pathway regulates a K⁺ channel for low-K response in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 103(33): 12625-12630.
- Li R, Zhang J, Wei J, Wang H, Wang Y, Ma R (2009) Functions and mechanisms of the CBL-CIPK signaling system in plant response to abiotic stress. *Progress in Natural Science*. 19(6): 667-676.
- 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.
- Luan S (2009) The CBL-CIPK network in plant calcium signaling. *Trends in plant science*. 14(1): 37-42.
- Ma X, Gai W-X, Qiao Y-M, Ali M, Wei A-M, Luo D-X, Li Q-H, Gong Z-H (2019) Identification of CBL and CIPK gene families and functional characterization of CaCIPK1 under *Phytophthora capsici* in pepper (*Capsicum annuum* L.). *BMC genomics*. 20(1): 775.
- Ma X, Li Q-H, Yu Y-N, Qiao Y-M, Gong Z-H (2020) The CBL-CIPK Pathway in Plant Response to Stress Signals. *International Journal of Molecular Sciences*. 21(16): 5668.
- 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.
- 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.
- Nagae M, Nozawa A, Koizumi N, Sano H, Hashimoto H, Sato M, Shimizu T (2003) The crystal structure of the novel calcium-binding protein AtCBL2 from *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*. 278(43): 42240-42246.
- Pandey GK, Cheong YH, Kim K-N, Grant JJ, Li L, Hung W, D'angelo C, Weinl S, Kudla J, Luan S (2004) The calcium sensor calcineurin B-like 9 modulates abscisic acid sensitivity and biosynthesis in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. 16(7): 1912-1924.
- Pandey GK, Kanwar P, Pandey A, 2014. Global comparative analysis of CBL-CIPK gene families in plants. Springer.
- Podell S, Gribskov M (2004) Predicting N-terminal myristoylation sites in plant proteins. *BMC genomics*. 5(1): 37.

- Sánchez-Barrena MJ, Martínez-Ripoll M, Zhu J-K, Albert A (2005) The structure of the *Arabidopsis thaliana* SOS3: molecular mechanism of sensing calcium for salt stress response. *Journal of molecular biology*. 345(5): 1253-1264.
- Sanyal S, Rao S, Mishra L, Sharma M, Pandey G (2016) Plant Stress Responses Mediated by CBL–CIPK Phosphorylation Network. (ed) *The Enzymes*, Elsevier, pp 31-64.
- 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. *Nat. Genet.* 24(3): 236.
- Shi J, Kim K-N, Ritz O, Albrecht V, Gupta R, Harter K, Luan S, Kudla J (1999) Novel protein kinases associated with calcineurin B-like calcium sensors in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. 11(12): 2393-2405.
- Sigrist CJ, De Castro E, Cerutti L, Cucho BA, Hulo N, Bridge A, Bougueleret L, Xenarios I (2012) New and continuing developments at PROSITE. *Nucleic Acids Res.* 41(D1): D344-D347.
- Sun Z, Qi X, Li P, Wu C, Zhao Y, Zhang H, Wang Z (2008) Overexpression of a *Thellungiella halophila* CBI9 homolog, ThCBL9, confers salt and osmotic tolerances in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Biology*. 51(1): 25-34.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, FilipSKI 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.
- 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.
- Xu J, Li H-D, Chen L-Q, Wang Y, Liu L-L, He L, Wu W-H (2006) A protein kinase, interacting with two calcineurin B-like proteins, regulates K⁺ transporter AKT1 in *Arabidopsis*. *Cell*. 125(7): 1347-1360.
- 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.