Evaluation of the CBL family gene expression under drought stress and virus attack in two susceptible and drought tolerant tomato cultivars using semi-quantitative PCR analysis

Peyman Aghaie[1], Mohammad Ali Ebrahimi [2]*, Sayed Ali Hosseini Tafreshi[3], Maryam Haerinasab[1], Shekoofeh Enteshari[1]

[1]Department of Biology, Faculty of Science, Payame Noor Universtiy, PO BOX 19395-3697 Tehran, Iran
[2] Department of Biotechnology, Payame Noor University, Tehran, Iran
[3] Department of cell and Molecular Biology, Faculty of Chemistry, University of Kashan, PO BOX 8731753153, Kashan, Iran

Abstract

Eleven genes encoding Calcineurin B-Like proteins with a high degree of sequence conservation were identified using bioinformatics approaches in tomato. These proteins classified into five clusters including SlCBL1, SlCBL3, SlCBL4, SlCBL8 and SlCBL10 using orthology-based method of nomenclature. Sequence analysis showed that all five members of SlCBL1 and SlCBL4 contained a myristoylation conserved motif (MGXXXS/T) at their N-terminals. Semi-quantitative RT-PCR showed that among the SlCBL1 members, SlCBL1-3 up-regulated under both drought and virus stresses, as well as the combined treatment. Although, both SlCBL3-1 and SlCBL3-2 up-regulated under both drought and virus stresses in both susceptive and resistant cultivars, the combined stress did not have any additional effect on the expression. Among SlCBL4 members, only SlCBL4-1 up-regulated under drought or virus attack. There was a diverse pattern of expression between the two SlCBL8 members under different stresses in both cultivars. SlCBL10 showed no change in expression pattern under drought or virus stresses in susceptive cultivar and this gene showed to be up-regulated under drought in resistant cultivar. Overall, it was concluded that changes in the expression pattern of CBL genes under biotic and abiotic stresses seemingly induced various CBL/CIPK patways in suseptive or resistant plants.

Key words: Calcineurin B-Like proteins, Calcium, Drought stress, Gene expression, Tomato, Virus attack

* ma_ebrahimi@pnu.ac.ir

Copyright©2017, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

زیست‌شناسی گیاهی ایران، سال نهم، شماره سی و دوم، تابستان ۱۳۹۶، صفحه ۱۰۶-۸۹
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۶/۰۴/۲۷
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۹۶/۰۶/۲۰
تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۶/۰۶/۲۵

بررسی میزان بیان ژن‌های خانوادهٔ CBL، در تنش خشکی و حملهٔ ویروس در دو رقم حساس و مقاوم به خشکی گوجه‌فرنگی با روش PCR نیمه‌کمّی

پیمان آقائی[۱]، محمدعلی ابراهیمی[۲]*، سید علی حسینی تفرشی[۳]، مریم حائری نسب[۱]، شکوفه انتشاری[۱]
[۱] گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران
[۲] گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران
[۳] گروه سلولی و مولکولی، دانشکدهٔ شیمی، دانشگاه کاشان، کاشان، ایران

چکیده
کلسیم، یک جزء حیاتی مهم برای شماری از مسیرهای انتقال پیام در گیاهان است که به واسطه انواعی از گیرنده‌های اختصاصی از جمله پروتئین‌های شبه‌کلسی‌نورین B (CBL) در درک تنش‌های محیطی، عمل می‌کند. در پژوهش حاضر، با رویکردهای بیوانفورماتیک، ۱۱ ژن رمزکنندهٔ پروتئین‌های شبه‌کلسی‌نورین B با درجهٔ حفاظت‌شدگی زیاد در گیاه گوجه‌فرنگی شناسایی و تأیید شد. با بهره‌گیری از یک روش مبتنی بر ارتوژنی، این پروتئین‌ها به ۵ کلاس مجزای SlCBL1، SlCBL3، SlCBL4، SlCBL8 و SlCBL10 تقسیم‌بندی و نام‌گذاری شدند. تحلیل توالی‌های پروتئینی نشان داد که همهٔ اعضای CBLهای ۱ و ۴ که شامل ۵ پروتئین می‌شوند، یک ناحیهٔ حفاظت‌شدهٔ مریستویلاسیون در بخش N-ترمینال دارند. بررسی با روش PCR نیمه‌کمّی نشان داد که میان CBLهای کلاس ۱، بیان ژن SlCBL1-3 در هردو تنش خشکی، حملهٔ ویروس و ترکیب این دو، تنها در رقم حساس افزایش داشته است. دربارهٔ CBLهای کلاس ۳، اگرچه دو ژن SlCBL3-1 و SlCBL3-2 در تنش خشکی در هردو رقم حساس و مقاوم، افزایش بیان نشان دادند، اعمال هم‌زمان دو تنش، اثر افزایشی بر بیان این ژن‌ها نداشت. بین دو همولوگ کلاس ۴ نیز، تنها SlCBL4-1 در هردو تنش خشکی و ویروس افزایش بیان نشان داد. براساس نتایج، رفتار بیانی ژن‌های کلاسSlCBL8 در شرایط مختلف تنش و ارقام مختلف، متنوع بود. بیان تنها ژن موجود در کلاس SlCBL10 نیز در رقم حساس با هیچ‌کدام از تنش‌های یادشده افزایش نیافت و تنها در رقم مقاوم، در تنش خشکی افزایش بیان داشت. به‌طورکلی، استنباط شد که با تغییر الگوی بیان ژن‌های CBL در هردو تنش زیستی و غیرزیستی، احتمالاً مسیرهای پیام‌رسانی CBL/CIPK متفاوتی در گیاهان حساس و مقاوم فعال می‌شوند.

واژه‌های کلیدی: بیان ژن، پروتئین‌های شبه‌کلسی‌نورین B، تنش خشکی، حملهٔ ویروس، کلسیم، گوجه‌فرنگی

* نگارنده مسؤول: نشانی پست الکترونیک: ma_ebrahimi@pnu.ac.ir، شماره تماس: ۰۲۱۲۲۴۵۵۰۰۱

Copyright©2017, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

مقدمه

گیاهان به‌دلیل ناتوانی در جابه‌جایی، به کسب توانایی‌های ویژه دربرابر تنش‌های محیطی مختلف نیاز دارند. این موجودات باید بتوانند پیام‌های مختلف محیطی را دریافت، احساس و درک کنند و متناسب با آن پاسخ دهند. از پرسش‌های اساسی در گرایش‌هایی مانند فیزیولوژی و اکوفیزیولوژی گیاهی این است که گیاهان چگونه پیام‌های مرتبط با شرایط تنش را درک و خود را با آن سازگار می‌کنند (Reddy *et al.*, 2011). به‌طورکلی، تنش‌های مختلف محیطی بروز تغییراتی مهم را در سطح بیان بسیاری از ژن‌ها در گیاهان سبب می‌شوند و چنین تغییراتی به تجمع یا کاهش متابولیت‌های ویژه، تغییراتی در رفتار آنزیم‌ها و میزان سنتز پروتئین‌ها و ایجاد پروتئین‌هایی جدید منجر می‌شود (Zhu, 2016).

نقطهٔ آغاز هرگونه سازگاری گیاه در برابر تنش، درک محرک‌های محیطی با سازوکارهای مختلف است. در این میان، سازوکارهای مرتبط با مسیرهای پیام‌رسانی وابسته به کلسیم، اهمیت ویژه‌ای دارند. نقش غلظت و الگوی توزیع کلسیم داخل سلول در انتقال پیام‌های تنشی در گیاهان به‌خوبی اثبات شده است (Pandey *et al.*, 2015). بررسی‌ها نشان داده‌اند که طیفی از محرک‌ها ازجمله خشکی، شوری، دمای زیاد، نور شدید، هورمون‌ها، پاتوژن‌ها و عوامل گره‌زایی، تغییراتی در سطح کلسیم سیتوزولی القا کرده‌اند (Monihan, 2011). در این میان، کالمودولین‌ها (Calmodulin)، پروتئین کینازهای وابسته به کلسیم (Calcium-dependent protein kinase) و پروتئین‌های شبه‌کلسی‌نورین (Calcineurin B-Like B proteins)، اصلی‌ترین گیرنده‌های کلسیمی در سلول‌های گیاهی هستند که نقش مهمی در انتقال پیام‌های مرتبط با کلسیم دارند (Shao *et al.*, 2008).

پژوهش‌هایی که به‌تازگی بر هردو مجموعهٔ جانوری و گیاهی انجام شده‌اند، نشان دادند که پیام کلسیم، نه‌تنها با غلظت درون‌سلولی یون Ca^{2+}، بلکه با ویژگی‌های مکانی و زمانی آن در سلول نیز بیان می‌شود و اغلب بسته به ماهیت پیام‌های خارجی، متفاوت است (Rudd and Franklin-Tong, 2001)؛ بنابراین هر پیام، مجموعهٔ متمایزی از تغییرات Ca^{2+} ایجاد خواهد کرد که مانند رمز عمل می‌کند. فرایند بازگشایی رمزها، با اتصال متفاوت Ca^{2+} به گیرنده‌های اختصاصی دارای میل ترکیبی زیاد آغاز می‌شود. برهم‌کنش میان گیرنده‌ها و عوامل فرودست آنها اغلب عملکرد دیگر پروتئین‌ها ازجمله، عوامل رونویسی یا پروتئین‌های غشایی را تعدیل و تغییراتی در روند فرایندهای سلولی ازجمله بیان ژن و شارش یون‌ها ایجاد می‌کند.

"پروتئین‌های شبه کلسی‌نورین B" که به اختصار آنها را CBL می‌نامند، خانواده‌ای از حسگرهای کلسیمی هستند که به‌سبب شباهت بخشی از ساختارشان با زیرواحد تنظیمی B در کلسی‌نورین فسفاتازهای جانوری به این نام معروف شده‌اند (Kudla *et al.*,1999؛ Batistič and Kudla, 2009). این پروتئین‌ها هم از نظر فیزیکی و هم از نظر عملکردی با گروه ویژه‌ای از پروتئین‌ها موسوم به پروتئین‌های کینازی برهم‌کنش‌کننده با CBL (CBL-Interacting Protein Kinase یا CIPK) تعامل دارند و فعالیت کینازی آنها را تنظیم می‌کنند (Batistic *et al.*, 2011).

در آرابیدوپسیس و برنج، حدود ۱۰ نوع CBL شناسایی شده‌اند که به‌ترتیب با ۲۵ و ۳۰ نوع CIPK برهم‌کنش نشان داده‌اند (Kolukisaoglu *et al*., 2004). از نظر ساختاری، همهٔ CBLها یک هستهٔ مرکزی و نسبتاً حفاظت‌شدهٔ مشترک با حداقل سه ناحیهٔ متصل‌شونده به کلسیم به‌نام EF hand دارند (Batistic and Kudla, 2004). نقش‌های فیزیولوژیک پروتئین‌های CBL و CIPK، نخستین بار در مسیر SOS (Salt Overly Sensitive) در گیاه آرابیدوپسیس کشف و معرفی شد (Qiu *et al*., 2002). درحال‌حاضر، مشخص شده است که شبکهٔ CBL–CIPK، ارائه‌کنندهٔ سازوکاری متفاوت برای رمزگشایی Ca^{2+} است که در گیاهان به‌گونه‌ای منحصربه‌فرد عمل می‌کند. در این مسیر، هر CBL با زیرمجموعه‌ای از CIPKها برهم‌کنش دارد و به‌صورت متقابل، هر CIPK با یک یا تعداد بیشتری از CBLها برهم‌کنش نشان می‌دهد. این مسئله ممکن است شاهدی بر وجود عملکرد بسیار اختصاصی و گستردگی کنش این پروتئین‌ها باشد (Batistic and Kudla, 2004؛ Luan, 2009).

گزارش‌های متعدد، بر نقش CBLها در پاسخ به تنش‌های مختلف زیستی و غیرزیستی تأکید دارند (Albrecht *et al*., 2003؛ Cheong *et al*., 2003؛ Drerup *et al*., 2013). بررسی‌های بیوشیمیایی نشان داده‌اند که میزان بیان CBL1 گیاه آرابیدوپسیس و پیام‌رسانی متأثر از آن، در شرایط تنش‌های غیرزنده مانند زخم، سرما، خشکی و شوری شدید تغییر می‌کنند (Kudla *et al*., 1999). جالب است که CBL9 این گیاه، باوجود شباهت زیاد از نظر توالی آمینواسیدی با CBL1 می‌تواند در پاره‌ای از جنبه‌های فیزیولوژی گیاهی مانند پاسخ به آبسزیک اسید و بیوسنتز این ماده در جریان جوانه‌زنی دانه‌ها، به‌گونه‌ای متفاوت از CBL1 عمل کند (Pandey *et al*., 2004). همچنین پژوهش‌های Pandey و همکاران (۲۰۱۵) بر نقش هردو CBL2 و CBL3 آرابیدوپسیس در همراهی با CIPK21 در تنش اسمزی و شوری تأکید دارند. در پژوهش دیگری به نقش CBL10 در مسیر مقاومت به نمک اشاره شده است (Quan *et al*., 2007؛ Kim *et al*., 2007). ازسویی مشخص شده است که مسیرهای CBL-CIPK در مجموعه‌های انتقال عناصر غذایی، تنظیم‌کنندهٔ هموستازی یون‌های سدیم، پتاسیم، نیترات و پروتون هستند (Xu *et al*., 2006؛ Ho *et al*., 2009).

درمجموع، به نظر می‌رسد که شیوه و میزان متفاوت بیان ژن‌های مختلف CBL هنگام رویارویی با تنش‌های مختلف، متناسب با نقش فیزیولوژیک و جهت‌گیری عملکردی پروتئین‌های آن، تغییر کند (Pandey *et al*., 2015). ازآن‌جاکه تاکنون بررسی جامعی دربارهٔ نقش پروتئین‌های CBL و بیان متفاوت آنها در شرایط تنش زنده و غیرزنده انجام نشده است، در پژوهش حاضر، بیان ژن‌های خانوادهٔ CBL در شرایط تنش خشکی، حملهٔ ویروسی و اعمال هم‌زمان هردو تنش در دو رقم مقاوم و حساس گوجه‌فرنگی یعنی گیاه الگو بررسی و مقایسه شده است. پژوهشگران، این گیاه را به‌علت ارزش اقتصادی مناسب، شناخته‌شده‌بودن ژنوم، سرعت زیاد رشد و امکان تکثیر راحت، الگویی برای درک و مقایسهٔ پاسخ‌های بیان ژن‌ها در گیاهان می‌دانند.

مواد و روش‌ها

تهیهٔ مادهٔ گیاهی: ارقام Cal j و فلات Y گوجه‌فرنگی، پس از انجام یک بررسی مقدماتی و اعمال تیمارهای خشکی و براساس ارزیابی شاخص‌های رشد، بیوشیمیایی و فیزیولوژیک از میان ۱۴ کولتیوار رایج کشت‌شده در مناطق مختلف ایران، به‌ترتیب، رقم حساس و مقاوم انتخاب شدند (نتایج نشان داده نشده‌اند). بذرها پس از گندزدایی با محلول ۱/۵ درصد سدیم هیپوکلریت (NaOCl) و چند بار آب‌شویی با آب مقطر استریل، برای کشت به سینی‌های نشای حاوی پیت‌ماوس (شرکت Klasmann-Deilmann GmbH، آلمان) منتقل شدند. جوانه‌زنی بذرها و تهیهٔ نشاء در اتاقک رشد با رطوبت نسبی حدود ۶۰ درصد و در دورهٔ نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی، شدت نور ۴۰۰۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه و دمای بین ۲ ± ۲۳ درجهٔ سانتی‌گراد انجام شد. نشاهای ۶ روزه (مرحلهٔ ۲ برگی) با دقت به گلدان‌های ۸ سانتی‌متری حاوی پیت‌ماوس منتقل و به‌مدت ۴ روز به‌مقدار ظرفیت زراعی آبیاری شدند.

اعمال تنش‌های خشکی و ویروسی بر گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی: برای اعمال تیمارهای خشکی، ویروس و تیمار ترکیبی خشکی و ویروس، گیاهچه‌های مرحلهٔ ۱۰ روزه به چهار گروه تقسیم شدند. گروه اول شامل گیاهچه‌های شاهد بودند که در ابتدا با بافر تلقیح بدون ویروس تزریق شده بودند و تا پایان دورهٔ آزمایش به‌مقدار ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی و به‌صورت دو روز در میان با محلول یک‌دهم درصد هوگلند آبیاری شدند. این گروه برای نمونهٔ شاهد هردو تیمار خشکی و ویروس استفاده شدند.

گروه دوم شامل گیاهچه‌هایی بودند که تنها در تنش خشکی قرار گرفتند. ۲۳ روز پس از تلقیح بافر بدون ویروس، اعمال تنش خشکی آغاز شد. به‌این‌ترتیب، این گیاهچه‌ها ابتدا به‌مدت یک هفته با ۷۵ درصد ظرفیت زراعی و در هفته‌های بعدی به‌ترتیب با ۵۰ و ۲۵ درصد ظرفیت زراعی و به‌صورت دو روز در میان با محلول یک‌دهم درصد هوگلند آبیاری شدند.

گروه سوم شامل گیاهچه‌هایی بودند که تنها در تنش زیستی ویروسی قرار گرفتند. بدین‌منظور، بافر تلقیح حاوی ویروس Tobacco Rattle Virus یا TRV که یک ویروس RNA ای دوبخشی است، به گیاهچه‌های ۱۰ روزه تزریق شد؛ سپس آبیاری این گروه از گیاهچه‌ها تا پایان آزمایش به‌صورت دو روز در میان و با ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی با محلول یک‌دهم درصد هوگلند انجام شد.

گروه چهارم شامل گیاهچه‌هایی بودند که در تنش هم‌زمان خشکی و ویروس قرار گرفتند. ۲۳ روز پس از تلقیح بافر تلقیح حاوی ویروس، تنش خشکی مشابه گروه دوم بر آنها اعمال شد.

آماده‌کردن و تزریق بافر تلقیح ویروس: تهیهٔ بافر تلقیح (Infiltration Buffer) با روش Velásquez و همکاران (۲۰۰۹) انجام شد. برای آلوده‌کردن برگ‌ها، بافر تلقیح حاوی باکتری ناقل پلاسمید pTRV1 (Tobacco rattle virus) به نسبت یک به یک، با بافر تلقیح حاوی باکتری ناقل پلاسمید pTRV2 مخلوط شد و با یک سرنگ استریل انسولین، در حجمی برابر، به هریک از برگ‌های لپه‌ای گیاهچه‌های ۱۰ روزه تزریق شدند. از بافر بدون ویروس به همین روش، برای تزریق به گروه‌های گیاهی شاهد و تنش خشکی استفاده شد.

تنظیم کارایی تلقیح ویروس، با تزریق باکتری ناقل پلاسمید pTRV2 دارای ژن فیتوئن دساچوراز (Phytoene desaturase) انجام شد که خاموش‌شدن این ژن در گیاه و بروز فنوتیپ سفیدشدگی نوری را باعث شد و تنظیم مثبتی برای کارایی فرایند آلوده‌کردن با ویروس بود.

بررسی ژن‌ها و طراحی آغازگرها: جستجو برای شناسایی هم‌جورهای (Homologs) ژن‌های CBL در گیاه گوجه‌فرنگی، با ابزارهای BLASTt، BLASTp و BLASTnدر پایگاه‌های داده‌ای پروتئینی و نوکلئوتیدی NCBI، Uniprot، EMBL-EBI، DDBJ وSolGenomics و از میان انواع داده‌های cDNA، توالی‌های پروتئینی، کانتیگ‌ها، کروموزوم‌ها و CDSها انجام شد. در این جستجوها از CBLهای پیش‌تر شناسایی‌شدهٔ آرابیدوپسیس، در دسترس در پایگاه داده‌ای TAIR (www.*Arabidopsis*.org)، برای توالی ورودی (Query) به بلاست استفاده شد (Kleist *et al.*, 2014). حد آستانهٔ E-Value در بلاست برای خارج‌کردن توالی‌های CBL غیرهمولوگ، 10^{-4} در نظر گرفته شد. حضور موتیف‌های EF-hand در توالی‌های یافت‌شده و درنهایت، تأیید پروتئین‌های CBL با ورود و تحلیل توالی‌ها در دو پایگاه PROSITE (prosite.expasy.org) و SMART (smart.embl.de) انجام شد. نام‌گذاری CBLهای شناسایی‌شده با روش اورتوژنی، بر پایهٔ میزان مشابهت با CBLهای آرابیدوپسیس و همولوژی‌های درون خانواده انجام و سپس مقایسه و هم‌ردیفی چندگانهٔ توالی ژن‌های مختلف CBL، با روش Motif-based و با نرم‌افزار آنلاین MAFFT (mafft.cbrc.jp) انجام شد.

طراحی آغازگرهای اختصاصی برای هریک از ژن‌های CBL، از روی توالی‌های شناسایی‌شده و با نرم‌افزار PrimerQuest (https://eu.idtdna.com) انجام شد. به‌دلیل شباهت بسیار زیاد بخش‌های رمزکنندهٔ پروتئین در CBL، آغازگرهای اختصاصی، بیشتر از نواحی غیرترجمه‌ای mRNAی این ژن‌ها طراحی شدند. آغازگرهای طراحی‌شده، با نرم‌افزار OligoAnalyzer نسخهٔ ۳/۱ به‌طور کیفی ارزیابی شدند (جدول ۱).

جدول ۱- مشخصات آغازگرهای استفاده‌شده برای ژن‌های **CBL** گوجه‌فرنگی

نام CBL	توالی آغازگر رفت (Forward)	دمای اتصال	درصد GC	توالی آغازگر برگشت (Reverse)	دمای اتصال	درصد GC
SlCBL1-1	GCAACGGAGTGATTGGATTTG	۶۲	۴۷/۶	AGATAGATGAAGAAGAATGGAAGG	۶۲	۳۸/۵
SlCBL1-2	GTCTTCTCTTCTTTCTGCTCTC	۶۰/۸	۴۵/۵	AGATGAAATTGCTCGTCCTTTA	۵۷/۱	۳۶/۴
SlCBL1-3	TTTCAGTCTCCCTCAGC	۵۷/۲	۵۲/۹	AGATGCAAACTTTCAAAGGG	۵۶/۳	۴۰
SlCBL3-1	AGCTGCATATAGATAGGTTTCAG	۵۹/۲	۳۹/۱	ATCAAGATCGCAACACCTC	۵۸	۴۷/۴
SlCBL3-2	CTCCTCTCTTCAGACAAATAGC	۶۰/۸	۴۵/۵	AGACAGAGAGGCACCTAAA	۵۸	۴۷/۴
SlCBL4-1	GCTATATCTATGGCTTCTATAGTTTGAC	۶۱/۷	۳۵/۷	CATCTAACAACCTGCCACAATTA	۵۹/۲	۳۹/۱
SlCBL4-2	GAATGGTATAGTGCTGCTGAAGA	۶۱	۴۳/۵	GGGAAAGCAGCCCATCAA	۵۹/۹	۵۵/۶
SlCBL8-1	TCCATCCCTACAAACAAT	۵۳/۱	۳۸/۹	TAAGACTCTAACGCCAAA	۵۳/۱	۳۸/۹
SlCBL8-2	CTGATATACCATAAACTGTAGTTCG	۵۹/۷	۳۶	CAGTTTGTTGGCTCCGT	۵۷/۲	۵۲/۹
SlCBL10	CTAGCCATAGCGAGGAAATATG	۶۰/۸	۴۵/۵	TTTAGTAGAAGAAGAGCTGTTGG	۵۹/۲	۳۹/۱
EF1α	CCAAGAGGCCATCAGACAAA	۵۵/۱	۵۰	GTAGAGACTGGCGTAATCAAGC	۵۵/۳	۵۰

استخراج RNA و سنتز cDNA: برای استخراج RNA کل، برگ‌های گیاهان دوماهه برداشت و پس از تثبیت سریع در ازت مایع، در فریزر نگهداری شدند. استخراج RNA کل از ۵۰ میلی‌گرم بافت فریزشده و با کیت استخراج (مدل HiYield™ Total RNA Mini Kit-Pant، شرکت RBC Bioscience، مالزی) HiYield™ Total RNA Mini Kit (Plant) شرکت RBC Bioscience انجام و کیفیت و کمیت RNA استخراجی با الکتروفورز ژل آگارز و اسپکتروفتومتر ارزیابی شد. قبل از سنتز cDNA و برای حذف DNA ژنومی، RNA استخراج‌شده با آنزیم DNase تیمار شد. سنتز cDNA با ۱ میکروگرم از RNA کل، آغازگر Random hexamer و آنزیم ترانس‌کریپتاز معکوس (Thermo Scientific Revert Aid Reverse) انجام شد. در ادامه، مقادیر مساوی cDNA برای انجام واکنش PCR نیمه‌کمّی استفاده شدند.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز نیمه‌کمّی: در پژوهش حاضر، برای بررسی میزان بیان ژن‌های CBL از روش PCR نیمه‌کمّی استفاده شد. از یک جفت آغازگر اختصاصی ژن خانه‌دار EF1α گوجه‌فرنگی برای تنظیم داخلی و نرمال‌کردن نتایج حاصل از PCR استفاده شد. توالی این جفت آغازگر با توالی سایر جفت پرایمرهای طراحی‌شده برای ژن‌های CBL در جدول (۱) نشان داده شده است. تعیین چرخهٔ بهینهٔ مرحلهٔ تصاعدی، شرایط PCR و مقدار cDNA لازم، با نمونهٔ cDNA حاصل از گیاه شاهد انجام شد. در ادامه، واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز برای هریک از CBLها با مقادیر هم‌غلظت cDNA حاصل از گیاهان هر تیمار در دو رقم گیاه حساس و مقاوم گوجه و در سه تکرار با شرایط اختصاصی انجام شد. مقادیر مساوی از محصولات PCR حاصل روی ژل آگارز ۱ درصد، الکتروفورز و با دستگاه ژل‌داک (مدل XR^+، شرکت Bio-Rad، آمریکا) عکس‌برداری شدند. شدت باندهای حاصل با نرم‌افزار ImageJ، نسخهٔ 1.42q (http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html) تعیین و با درنظرگرفتن شدت باندهای حاصل از ژن خانه‌دار EF1α، نرمال شد. در پایان، رسم همهٔ نمودارها با نرم‌افزار GraphPad Prism Software نسخهٔ ۶ انجام شد.

نتایج

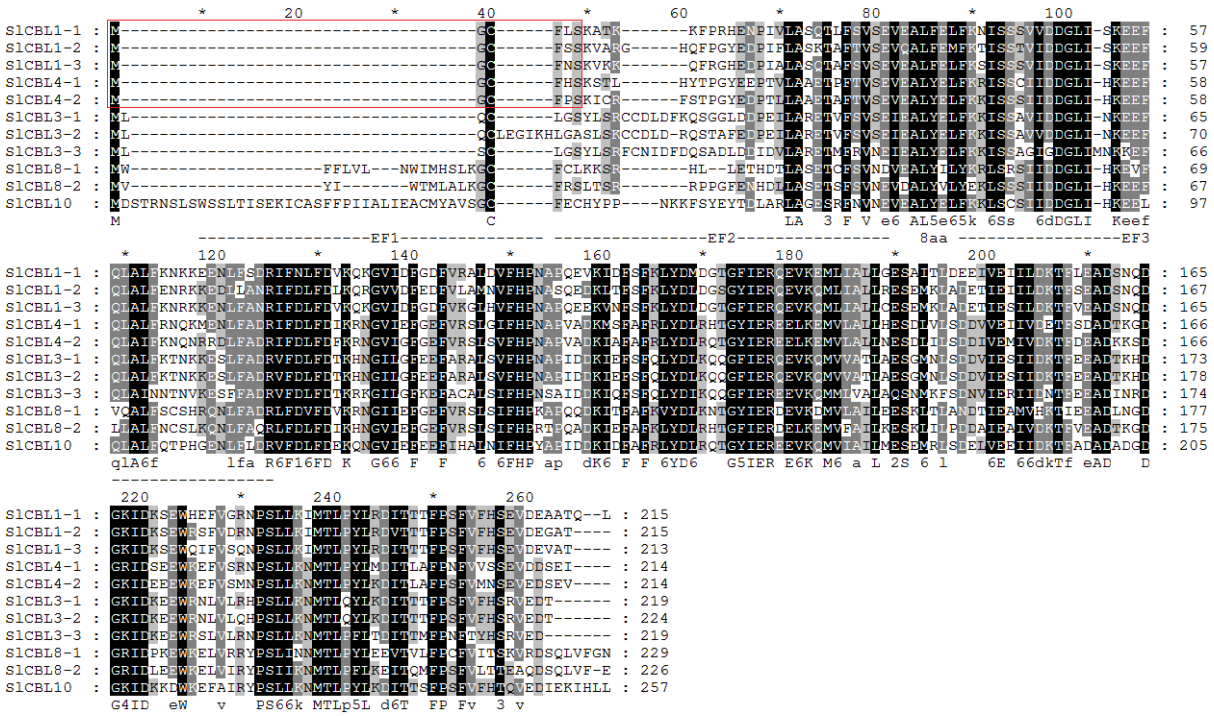
شناسایی بیوانفورماتیک و نام‌گذاری اعضای خانوادهٔ CBL در گوجه‌فرنگی: شناسایی اعضای خانوادهٔ CBL گوجه‌فرنگی با روش‌های متداول بیوانفورماتیک انجام شد. در بررسی حاضر، نخست کوشش شد تا با تکیه بر اطلاعات موجود در چهار پایگاه اصلی بیوانفورماتیک جهانی (NCBI، Uniprot، EMBL-EBI و DDBJ) و نیز یک پایگاه اختصاصی خانوادهٔ Solanaceae موسوم به SolGenomics، در مدت انجام عملیات بلاست و با انتخاب ژن‌های دهگانهٔ CBLهای شناسایی‌شدهٔ آرابیدوپسیس برای توالی ورودی (Kolukisaoglu *et al.*, 2004)، نسبت به شناسایی همهٔ توالی‌های مرتبط اقدام شود. در جستجوی مقدماتی، ۵۱ توالی بررسی‌شدنی و مرتبط، شناسایی شدند. توالی‌های پروتئینی با نرم‌افزار MAFFT (Algorithm G-INS-i) هم‌ردیف و به‌صورت چشمی برای حذف توالی‌های کوتاه و مشکوک ویرایش شدند تا شمار توالی‌های منحصربه‌فرد به ۱۷ گزینه کاهش یابد. در ادامه با

جستجوی توالی‌ها روی کروموزوم‌های متناظر، نسبت به حذف توالی‌های ژنی تکراری اقدام شد و بدین‌ترتیب، تعداد توالی‌های مرتبط با CBL که جایگاه انحصاری روی کروموزوم‌های گوجه داشتند به ۱۲ گزینه کاهش یافت. بین این توالی‌ها، توالی با شناسهٔ Solyc08g054570 مندرج در پایگاه دادهٔ SolGenomics، پس از بررسی تعداد موتیف‌های حفاظت‌شدهٔ EF-hand در توالی، حذف شد و تنها توالی‌ها با حداقل سه ساختار EF-hand پذیرفته شدند. درنهایت، ۱۱ توالی منحصربه‌فرد شناسایی شدند (جدول ۲) که طول آنها حدود ۲۱۳ تا ۲۵۷ آمینواسید بود. این طول تقریباً با طول سایر پروتئین‌های CBL شناسایی‌شده در دیگر گروه‌های گیاهی، منطبق بود (Zhang *et al.*, 2008). برای نام‌گذاری پروتئین‌های CBL شناخته‌شده در گوجه‌فرنگی، از یک روش نام‌گذاری مبتنی بر ارتوژنی استفاده شد. در این روش، توالی‌های نوکلئوتیدی و پروتئینی CBL گیاه آرابیدوپسیس، ژن‌های ورودی ارتولوگ در نظر گرفته شدند. CBLهای پارالوگ، با اختصاص شماره‌های متفاوت از هم جدا شدند و توالی‌های CBL ارتولوگ نیز با قید شماره‌ای پس از خط فاصله، از هم متمایز شدند (Mohanta *et al.*, 2015). در جدول (۲)، شناسه‌های متفاوتی که با روش‌های مختلف نام‌گذاری در پایگاه‌های داده برای CBLها تعیین شده‌اند، با هم مقایسه شده‌اند. مقایسهٔ طول توالی‌های پروتئینی CBLهای گوجه‌فرنگی با جایگاه استقرار موتیف EF-hand آنها در شکل (۱) نشان داده شده است.

جدول ۲- نام‌گذاری متفاوت توالی‌های CBL شناسایی‌شده در ژنوم گوجه‌فرنگی در پایگاه‌های دادهٔ مختلف – برای معرفی بهتر، رمز شناسهٔ توالی‌ها در SolGenomics و Uniprot آورده شده است. حروف a، b، c، d و e در بالای هر نام به‌معنی به‌کارگیری آن به‌ترتیب در پایگاه‌های SolGenomics، NCBI، EBI، Uniprot و DDBJ هستند.

شماره	نام CBL	نام توالی در پایگاه‌های داده‌ای مختلف	تعداد EF-hand	شناسه توالی در SolGene	شناسه توالی در PROSITE
۱	SlCBL1-1	CBL 1 [a, d]	۳	Solyc06g060980	K4C6S8
۲	SlCBL1-2	CBL 1 [a]	۳	Solyc08g007160	K4CIK3
۳	SlCBL1-3	CBL 1 [a]	۳	Solyc08g077770	G5EM33
۴	SlCBL3-1	CBL 2 [a, b, c, d]	۳	Solyc07g065820	G5EM34
۵	SlCBL3-2	CBL 1 [a]	۳	Solyc12g015870	M1CX58
۶	SlCBL3-3	CBL 3 [a]	۳	Solyc02g032310	K4B5H7
۷	SlCBL4-1	CBL 4 [a]	۳	Solyc06g051970	K4C5Y3
۸	SlCBL4-2	SlSOS3 [b], CBL 4 [c], SlCBL4-2 [e]	۳	Solyc03g083320	Q4W3B4
۹	SlCBL8-1	CBL 7 [a]	۳	Solyc08g036590	K4CK19
۱۰	SlCBL8-2	CBL 4 [a, e]	۳	Solyc12g055920	K4DFS3
۱۱	SlCBL10	--	۳	Solyc08g065330	G4XMX1

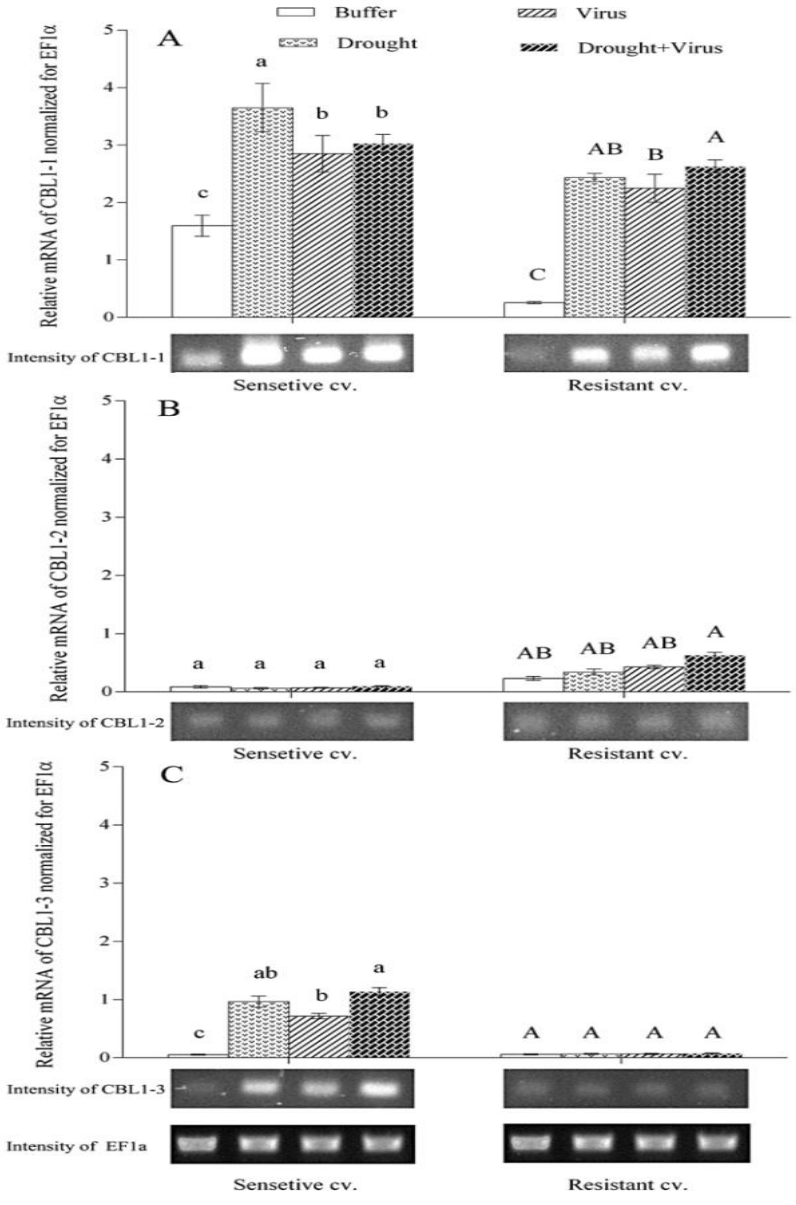
بررسی‌های دقیق‌تر این توالی‌ها مشخص کرد که در بخش N–ترمینال همهٔ اعضای CBLهای ۱ و ۴ که شامل ۵ پروتئین می‌شوند، یک ناحیهٔ حفاظت‌شده (MGXXXS/T) وجود دارد که جایگاه مریستویلاسیون (Myristoylation) شناخته می‌شود. بررسی‌ها نشان دادند که این بخش، محلی برای برهم‌کنش‌های پروتئین با پروتئین یا جایگاهی برای اتصال پروتئین به غشاء است (Luan *et al*., 2002).



شکل ۱- مقایسه و هم‌ردیفی چندگانهٔ توالی آمینواسیدی CBLهای گوجه‌فرنگی - بخش‌های با همولوژی یا شباهت زیاد بین اعضای مختلف CBL با رنگ زمینهٔ تیره‌تر و بخش‌های با شباهت کمتر با زمینهٔ روشن‌تر نشان داده شده‌اند. حدود نواحی حفاظت‌شدهٔ EF-handهای سه‌گانه (EF1-EF3)، به‌صورت نقطه‌چین بالای هر ناحیه و جایگاه حفاظت‌شدهٔ مریستویلاسیون CBLهای گروه ۱ و ۴، در کادر قرمزرنگ مشخص شده است.

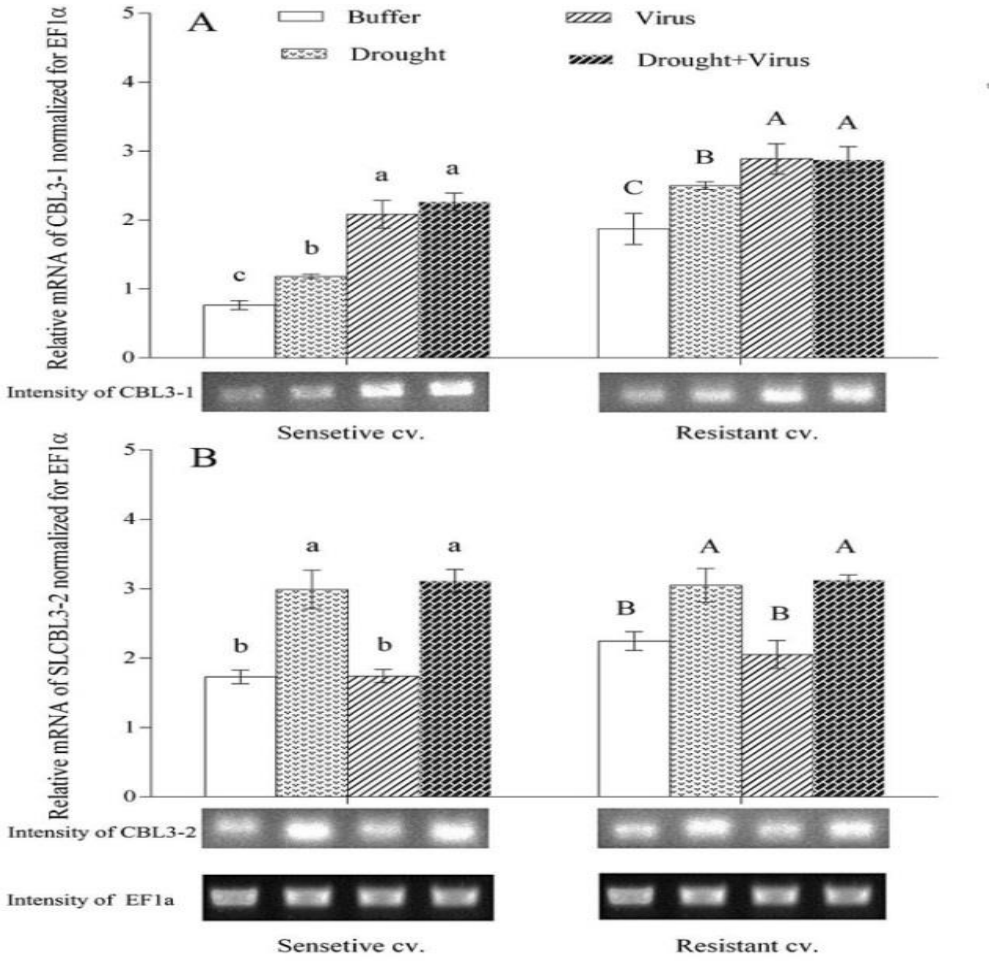
بررسی بیان نیمه‌کمّی ژن‌های کلاس‌های مختلف CBL در گیاه گوجه‌فرنگی: نخستین کلاس شناسایی‌شدهٔ CBL در گوجه‌فرنگی، SlCBL1 بود که شامل سه عضو SlCBL1-1، SlCBL1-2 و SlCBL1-3 است. این ژن‌ها، بیان‌های نیمه‌کمّی متفاوتی در تیمارهای تنش خشکی، ویروسی و در جریان تنش هم‌زمان خشکی و ویروس از خود نشان دادند. همچنین نتایج بیان‌کنندهٔ وجود تفاوت معنی‌دار در کمیت بیان این ژن‌ها در ارقام حساس و مقاوم به خشکی گوجه‌فرنگی بود (شکل ۲). دربارهٔ SlCBL1-1، نشان داده شد که افزایش معنی‌داری در بیان این ژن در هردو تنش خشکی و حملهٔ ویروس و نیز هنگام القای هم‌زمان این دو تنش، در هردو رقم حساس و مقاوم نسبت به گیاهان شاهد به وجود آمده است؛ البته در رقم حساس، نسبت به رقم مقاوم، تنش خشکی اثر القایی بیشتری بر افزایش بیان این ژن داشته است (شکل ۲-A). بررسی‌ها

نشان داد که تفاوت معنی‌داری در بیان ژن SlCBL1-2 در هنگام تنش‌های خشکی، ویروس و تنش هم‌زمان آنها در هردو رقم حساس و مقاوم به خشکی نسبت به تیمارهای شاهد وجود نداشته است (شکل۲-B). نتایج همچنین نشان داد که بیان ژن SlCBL1-3 در هر دو تنش خشکی و حملهٔ ویروس و بالطبع در ترکیب این دو تنش، تنها در رقم حساس نسبت به شاهد افزایش داشته است (شکل۲-C).



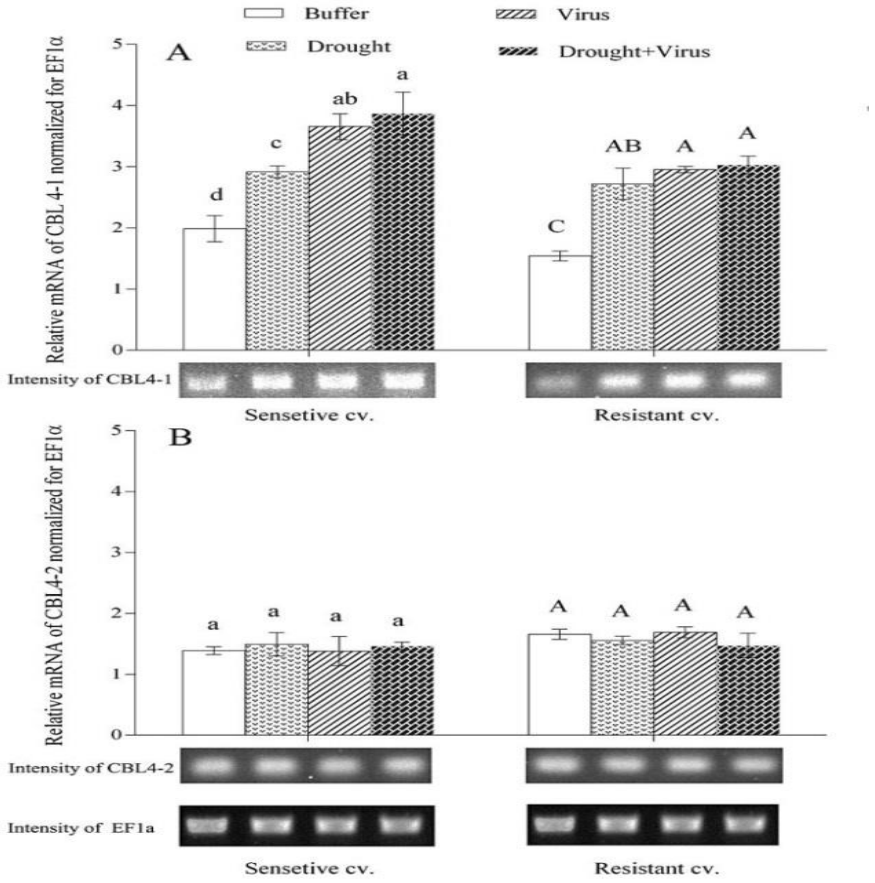
شکل ۲- نمودار بیان نسبی ژن‌های کلاس SlCBL1 در گوجه‌فرنگی در تنش‌های خشکی، حملهٔ ویروسی و ترکیب تنش خشکی و ویروس و مقایسهٔ آن با شاهد (بافر): A (بیان نسبی ژن SlCBL1-1)، B (بیان نسبی ژن SlCBL1-2) و C (بیان نسبی ژن SlCBL1-3)- شدت باند متناسب با هر نمونه در زیر آن نمایش داده شده است. شدت باند ژن EF1α (ژن خانه‌دار) و تنظیم درونی برای نرمال‌کردن بیان ژن‌های CBL نشان داده شده‌اند. مقادیر، میانگین سه تکرار ± SD است. حروف غیرمشترک، نشان‌دهندهٔ وجود تفاوت معنی‌دار با آزمون دانکن است.

در پژوهش حاضر، به‌دلیل شباهت بسیار زیاد توالی رمزکنندهٔ SlCBL3-3 با نواحی مشابه آن در سایر CBLها و نبود نواحی غیرترجمه‌ای در این ژن، به ساخت آغازگر اختصاصی برای آن موفق نشدیم؛ بنابراین تنها دو عضو از کلاس SlCBL3، شامل SlCBL3-1 و SlCBL3-2 جدا شدند و بیان نیمه‌کمّی آنها بررسی شد. براساس نتایج، شدت باند هردو ژن SlCBL3-1 و SlCBL3-2 در تنش خشکی در هر دو رقم حساس و مقاوم، به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (شکل‌های ۳-A و B). همچنین، اعمال تنش ویروسی به‌تنهایی بیان ژن SlCBL3-1 را در هر دو رقم افزایش داد؛ ولی تغییری در بیان ژن SlCBL3-2 در هیچ‌یک از ارقام حساس و مقاوم گوجه‌فرنگی ایجاد نکرد. در مجموع اعمال هم‌زمان دو تنش (خشکی + ویروس)، تأثیر اضافه‌ای روی بیان ژن‌های این کلاس از CBLها نداشته است.



شکل ۳- نمودار بیان نسبی ژن‌های کلاس SlCBL3 در گوجه‌فرنگی در تنش‌های خشکی، حملهٔ ویروسی و ترکیب خشکی و ویروس و مقایسهٔ آن با شاهد (بافر): A (بیان نسبی ژن SlCBL3-1) و B (بیان نسبی ژن SlCBL3-2)- شدت باند متناسب با هر نمونه در زیر آن نمایش داده شده است. شدت باند ژن EF1α (ژن خانه‌دار) و تنظیم درونی برای نرمال‌کردن بیان ژن‌های CBL نشان داده شده‌اند. مقادیر، میانگین سه تکرار ± SD است. حروف غیرمشترک، نشان‌دهندهٔ وجود تفاوت معنی‌دار با آزمون دانکن است.

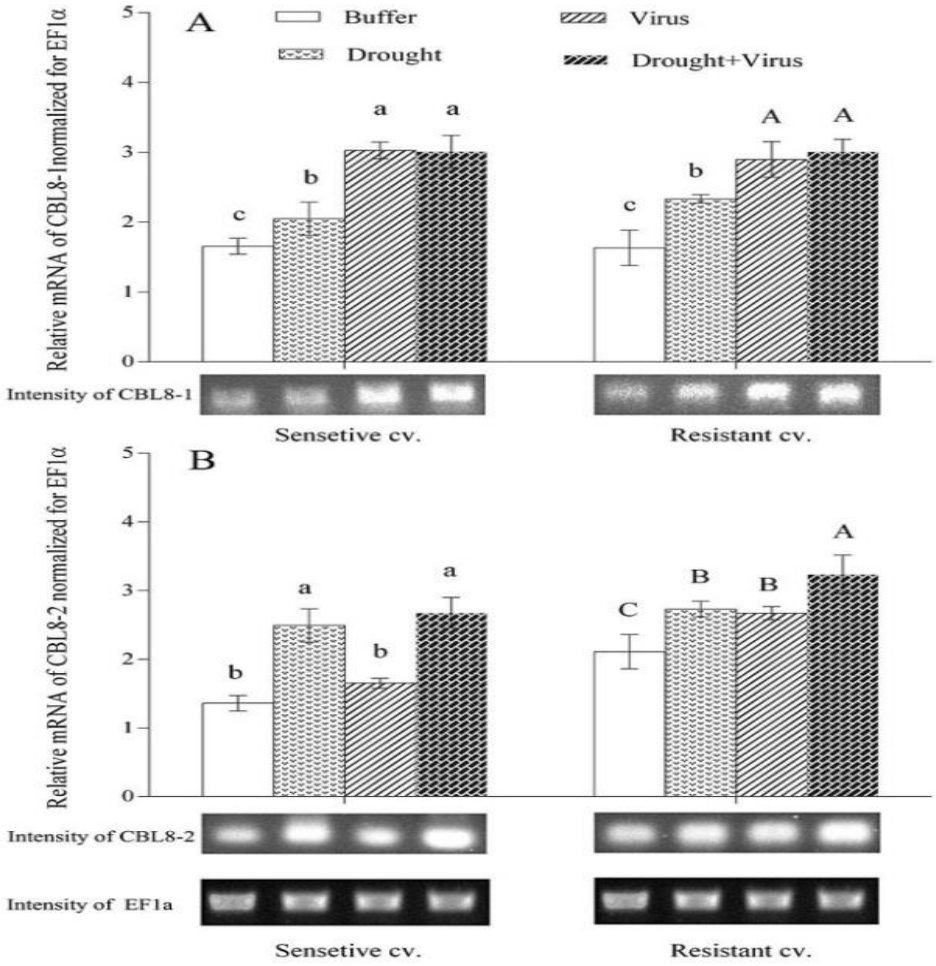
براساس نتایج پژوهش حاضر، رفتار بیانی ژن‌های کلاس SlCBL4 به‌گونه‌ای از یکدیگر متفاوت بوده است؛ درحالی که هیچ‌یک از تنش‌های خشکی، حملهٔ ویروسی و ترکیب این دو تنش، بر بیان ژن SlCBL4-2 در رقم حساس یا مقاوم گوجه تأثیر نداشته است (شکل ۴-B). شدت باندهای مربوط به ژن SlCBL4-1 در هردو تنش افزایش یافته است (شکل ۴-A)؛ البته در حالت ترکیب این دو تنش، اثر اضافی بر بیان این ژن ملاحظه نشد. مقایسهٔ میانگین داده‌های حاصل از شدت باندها نشان می‌دهد که در رقم حساس، حملهٔ ویروس بیش از تنش خشکی در افزایش بیان ژن SlCBL4-1 مؤثر بوده است. این رفتار در رقم مقاوم گیاه گوجه‌فرنگی مشاهده نشد.



شکل ۴- نمودار بیان نسبی ژن‌های کلاس SICBL4 در گوجه‌فرنگی در تنش‌های خشکی، حملهٔ ویروسی و ترکیب خشکی و ویروس و مقایسهٔ آن با شاهد (بافر): A (بیان نسبی ژن SICBL4-1) و B (بیان نسبی ژن SICBL4-2)- شدت باند متناسب با هر نمونه در زیر آن نمایش داده شده است. شدت باند ژن EF1α (ژن خانه‌دار) و تنظیم درونی برای نرمال‌کردن بیان ژن‌های CBL نشان داده شده‌اند. مقادیر، میانگین سه تکرار ± SD است. حروف غیرمشترک، نشان‌دهندهٔ وجود تفاوت معنی‌دار با آزمون دانکن است.

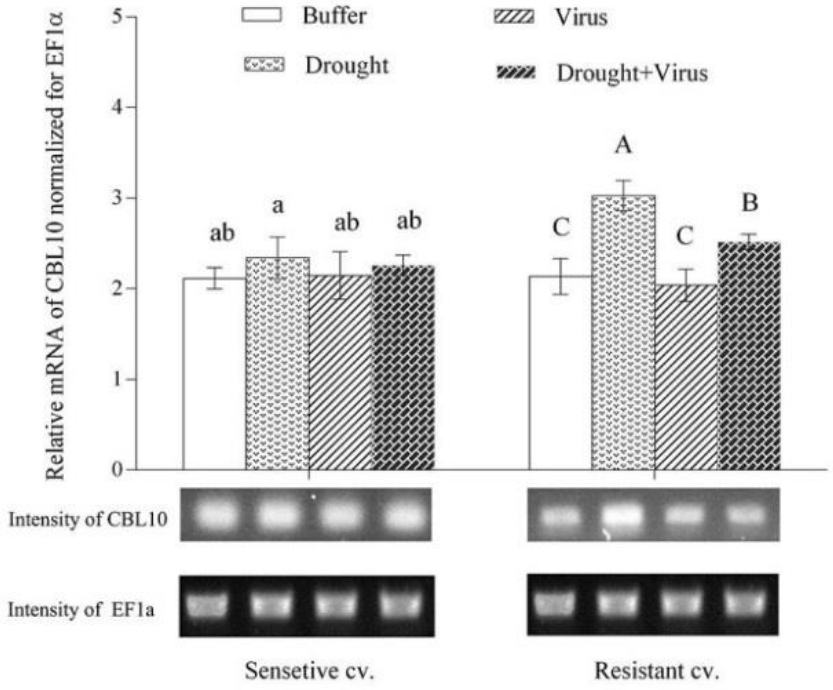
نتایج نشان دادند که ژن‌های مربوط به کلاس SlCBL8 نیز رفتار بیانی متمایز و متنوعی در شرایط تنش مختلف و ارقام متفاوت از خود نشان دادند (شکل‌های ۵-A و B). در هر دو رقم حساس و مقاوم، تنش خشکی القای بیان بیشتر هر دو ژن SlCBL8-1 و SlCBL8-2 را باعث شد. همچنین در رقم مقاوم، بیان

ژن‌های SlCBL8-1 و SlCBL8-2 هنگام آلوده‌شدن گیاه با ویروس، به‌طور معنی‌داری نسبت به شاهد افزایش یافت؛ ولی در رقم حساس، تنها بیان SlCBL8-1 و نه SlCBL8-2 نسبت به شاهد، بیشتر و چشمگیر بود.



شکل ۵- نمودار بیان نسبی ژن‌های کلاس SlCBL8 در گوجه‌فرنگی در تنش‌های خشکی، حملهٔ ویروسی و ترکیب خشکی و ویروس و مقایسهٔ آن با شاهد (بافر): A (بیان نسبی ژن SlCBL8-1) و B (بیان نسبی ژن SlCBL8-2)- شدت باند متناسب با هر نمونه در زیر آن نمایش داده شده است. شدت باند ژن EF1α (ژن خانه‌دار) و تنظیم درونی برای نرمال‌کردن بیان ژن‌های CBL نشان داده شده‌اند. مقادیر میانگین سه تکرار ± SD است. حروف غیرمشترک، نشان‌دهندهٔ وجود تفاوت معنی‌دار با آزمون دانکن است.

نتایج همچنین نشان دادند که هیچ‌کدام از تنش‌های خشکی، حملهٔ ویروسی و ترکیب این دو، بر بیان تنها ژن CBL موجود در کلاس SlCBL10 در رقم حساس موثر نبوده است و تقریبا با بیان ژن شاهد برابر است (شکل۶). همچنین دربارهٔ رقم مقاوم دیده شد که تنها تنش خشکی و نه حملهٔ ویروس (و حتی اثر ترکیبی این دو) افزایش بیان این ژن را نسبت به شاهد باعث شده است.



شکل ۶- نمودار بیان نسبی ژن‌های کلاس SlCBL10 در گوجه‌فرنگی در تنش‌های خشکی، حملهٔ ویروسی و ترکیب خشکی و ویروس و مقایسهٔ آن با شاهد (بافر)- شدت باند متناسب با هر نمونه در زیر آن نمایش داده شده است. شدت باند ژن EF1α (ژن خانه‌دار) و تنظیم درونی برای نرمال‌کردن بیان ژن‌های CBL نشان داده شده‌اند. مقادیر، میانگین سه تکرار ± SD است. حروف غیرمشترک، نشان‌دهندهٔ وجود تفاوت معنی‌دار با آزمون دانکن است.

بحث

درج نام و شناسه‌های متفاوت اختصاصی برای توالی‌ها، به‌ویژه توالی‌های CBL در هر پایگاه داده و نبود روشی واحد برای نام‌گذاری با امکان طبقه‌بندی اعضای خانوادهٔ ژنی، موجب شده است، نام‌های متعدد و گیج‌کننده‌ای برای هر توالی انحصاری CBL وجود داشته باشد. این مسئله به بررسی مقدماتی در پژوهش حاضر، و دستیابی به حدود ۵۱ توالی هم‌پوشان منجر شد که در منابع مختلف با نام‌های متفاوتی برای CBLها تعیین شده بودند؛ بنابراین برای دسته‌بندی و یکسان‌کردن بسیاری از این توالی‌های تکراری، از رویکرد بیوانفورماتیک استفاده شد. گزارش‌های قبلی به حضور حداقل ۱۰ یا ۱۱ عضو در خانوادهٔ CBL در گوجه‌فرنگی اشاره کردند (Kleist *et al*., 2014؛ Mohanta *et al*., 2015). در بررسی حاضر، کوشش بر این بود تا با پایگاه‌های داده‌ای به‌روزشدهٔ ژنومی، در صورت امکان، اعضای جدید CBL در این خانواده شناسایی شوند و پس از حذف توالی‌های غیرمطمئن و تکراری، حضور ۱۱ عضو نهایی برای این خانواده در گوجه‌فرنگی تأیید شد؛ بنابراین براساس داده‌های به‌روزشدهٔ ژنومی از سال ۲۰۱۵ تاکنون، امکان افزایش تعداد اعضای این خانوادهٔ پروتئینی وجود نداشت. در پژوهش حاضر، بر وجود ۳ ناحیهٔ EF-hand که معیاری برای گزینش پروتئین‌های CBL هستند بسیار تأکید شد و دلیل آن، اهمیت عملکرد

هم‌زمان این موتیف‌ها برای انجام درست برهم‌کنش CBLها با CIPKهای شناخته‌شده در گوجه‌فرنگی بود (Kim *et al.*, 2000)؛ همان‌طورکه اشاره شد، در نام‌گذاری اعضای خانوادهٔ CBL گوجه‌فرنگی، یک روش نام‌گذاری مبتنی بر ارتوژنی به کار گرفته شد که پیش‌تر تعدادی از پژوهشگران برای نام‌گذاری برخی خانواده‌های ژنی استفاده کرده بودند (Hamel *et al.*, 2006؛ Mohanta and Mohanta, 2013؛ Mohanta *et al.*, 2014).در روش مبتنی بر اورتوژنی به کاررفته در پژوهش حاضر، اساس کار بر این اصل استوار بود که شباهت توالی به شباهت ساختاری و متعاقب آن به شباهت عملکردی ژن‌ها منجر می‌شود (Aravind *et al.*, 2002؛ Schlicker *et al.*, 2006). در این روش، اطلاعات عملکردی یک پروتئین را که به‌صورت تجربی حاصل شده‌اند، به یک پروتئین ناشناختهٔ مشابه تعمیم می‌دهند. چنین روشی پیش‌تر نیز توسط Mohanta و همکاران در سال ۲۰۱۵ برای نام‌گذاری CBLهای گوجه‌فرنگی و ۳۷ گونه گیاهی دیگر به کار گرفته شد. آنها درنهایت، ۵ نوع یا کلاس CBL (۱، ۳، ۴، ۸ و ۱۰) که درمجموع، ۱۱ پروتئین را شامل می‌شدند، در این خانواده شناسایی و معرفی کردند. نتیجه‌ای که با پژوهش حاضر، دوباره تأیید شد و بدون تغییر باقی ماند.

الگوی بیان یک ژن در بافتی ویژه و در پاسخ به محرک‌های محیطی موجود، به‌صورت بالقوه، منعکس‌کنندهٔ نقش آن ژن در فرایندهای تکوینی، فیزیولوژیک و شاید پیام‌رسانی‌های مرتبط با آن بافت است. بررسی‌ها نشان داده‌اند که اعضای یک خانوادهٔ ژنی می‌توانند به‌طور متفاوت از یکدیگر بیان شوند و ازاین‌رو عملکردها و نقش‌های متمایزی نسبت به هم ایفا کنند. در این راستا، بررسی بیان برخی از اعضای خانوادهٔ CBL در آرابیدوپسیس نشان داده است که بیان این ژن‌ها در بافت‌های مختلف یک گیاه، حتی در شرایط مساعد رشدی، متفاوت است (Kudla *et al.*, 1999).

در بررسی حاضر، اعضای مختلف SlCBL1 رفتارهای کاملاً متمایزی در تنش‌های خشکی و ویروس و در ارقام مختلف حساس و مقاوم گوجه‌فرنگی از خود نشان دادند. رفتاری که بیش از هر چیز بر اختصاصی‌بودن و بی‌مانندی شیوه‌های عملکردی این ژن‌ها تأکید دارند. پیش‌تر Kudla و همکاران در سال ۱۹۹۹، با بررسی الگوی بیان ایزوفرم‌های ۱، ۲ و ۳ ژن‌های CBL آرابیدوپسیس در تنش‌های خشکی، زخم، سرما، شوک گرمایی و لمس مکانیکی، نشان دادن که تیمارهای زخم، خشکی و سرما تا حد زیادی سطح mRNA ژن AtCBL1 را افزایش می‌دهند. درمقابل، تنش‌های شوک گرمایی و لمس مکانیکی اثری بر بیان این ژن نداشته است. همچنین Albrecht و همکاران (۲۰۰۳)، با ایجاد جهش‌یافته‌های *cbl1* و اعمال تنش روی آن‌ها، بر نقش CBL1 در تنش‌های خشکی، شوری و سرما تأکید کردند. در برنج، تیمار با پلی‌اتیلن گلایکول (PEG) که عامل ایجادکنندهٔ تنش خشکی است، بیان CBL1 را القا کرده است (Gu *et al.*, 2008). Cheong و همکاران (۲۰۰۳) با مشاهدهٔ افزایش مقاومت به یخ‌زدگی در جهش‌یافته‌های *cbl1* به این نتیجه رسیدند که شاید CBL1 یک تنظیم‌کنندهٔ مثبت در تنش‌های شوری و خشکی و یک تنظیم‌کنندهٔ منفی برای سرما در گیاهان است. همچنین پیشنهاد شده است که CBL1 از مسیرهای غیروابسته به ABA و

CBL9 که شبیه‌ترین عضو به آن است، از مسیرهای وابسته به ABA و به‌صورت جایگزین، به تنش‌ها پاسخ می‌دهد (D'angelo *et al*., 2006). هردوی این CBLها در همراهی با CIPK23 در جذب پتاسیم و باز و بسته‌شدن روزنه‌ها هم نقش داشته‌اند (Mao *et al*., 2016). در کل، نتایج به دست‌آمده نشان از اهمیت بیشتر دو ژن SlCBL1-1 و SlCBL1-3 در هردو تیمار خشکی و حملهٔ ویروسی در گوجه‌فرنگی دارند.

براساس نتایج حاصل از پژوهش حاضر، بیان هردو عضو بررسی‌شدهٔ SlCBL3، در ارقام حساس و مقاوم، در تنش خشکی القا شد. نتیجه‌ای که با برخی گزارش‌های قبلی نیز تأیید شده است (Mahajan *et al*., 2006). همچنین افزایش بیان این ژن هنگام اعمال تنش زخم، به‌مدت ۳ ساعت و تیمار با سالسیلیک اسید که یک حدواسط پاسخ به تنش‌های زیستی است، پس از ۸ ساعت گزارش شده است (Mahajan *et al*., 2006)؛ بنابراین، به نظر می‌رسد که خانوادهٔ پروتئینی CBL3 در پاسخ گیاه به هردو تنش زنده و غیرزنده حائز اهمیت باشد. در تأیید این مطلب، CBL3 یک تنظیم‌کنندهٔ هموستازی درون‌سلولی یون‌ها در تونوپلاست، با برهم‌کنش با H^+- ATPase واکوئلی یاد شده است (Tang *et al*., 2012). همچنین گزارش شده است که CBL3 در جداکردن و حجره‌بندی Mg^{2+} در واکوئل و سم‌زدایی از این عنصر نقش دارد (Tang *et al*., 2015).

در این تحقیق از دو همولوگ SlCBL4 ، تنها بیان SlCBL4-1در هر دو تنش خشکی و ویروس افزایش یافت. این CBL که با نام SOS3 نیز شناخته می‌شود، نخستین عضو از خانواده CBLها در گیاهان است که در مسیر برون شارش Na^+، هموستازی و ایجاد مقاومت به تنش نمک از قبل مطرح بوده است (Zhu, 2002). تغییر بیان CBL4 هنگام اعمال تنش‌های خشکی، سرما و شوری در گیاهچه‌های صنوبر، در پژوهش‌های Zhang و همکاران (۲۰۰۸) به اثبات رسیده است. D'angelo و همکاران (۲۰۰۶) نیز معتقدند که این CBL به‌صورت جایگزین با CBL1 در برهم‌کنش با CIPK24 در مسیر پیام‌رسانی تنش شوری عمل می‌کند. یافته‌ها در ذرت نشان داده است که شوری در برگ‌ها به‌صورت کاهشی و در ریشه به‌صورت افزایشی بر بیان SlCBL4 اثرگذار بوده است؛ چنان‌که تیمار با ABA، افزایش و پلی‌اتیلن‌گلایکول، کاهش بیان این ژن را در ذرت باعث شده است (Wang *et al*., 2007).

بررسی کیفیت بیان CBL8 در دانه‌رست‌های برنج در تیمار با پلی‌اتیلن‌گلایکول، کاهش میزان بیان این ژن را نشان می‌دهد؛ درحالی‌که سرما و تیمار ABA، فزونی بیان این ژن را باعث شده‌اند (Gu *et al*., 2008). این الگو به‌هیچ‌وجه با داده‌های حاصل از پژوهش حاضر مبنی بر افزایش بیان ژن‌های SlCBL8-1 و SlCBL8-2 در هردو رقم حساس و مقاوم در تنش خشکی منطبق نیست.

در بررسی حاضر، تنش خشکی افزایش بیان CBL10 را در رقم مقاوم باعث شد. این تغییر الگوی بیان CBL10 در تنش‌های غیرزندهٔ دیگر مانند اسمز، شوری و سرما در گیاه صنوبر نیز مشاهده شده است (Zhang *et al*., 2008). همچنین جهش‌یافته‌های *cbl10*، فنوتیپ‌های کلروزشدهٔ بدون رشد را هنگام مواجه‌شدن با تنش نمکی از خود نشان داده‌اند (Zhang *et al*., 2008). در برنج نیز تیمار با پلی‌اتیلن‌گلایکول، افزایش بیان ژن CBL10 را در دانه‌رست‌های در شرایط

تنش باعث شده است (Gu *et al*., 2008). این مدارک، دلیل مستقیمی بر نقش احتمالی این ژن در پاسخ به تنش خشکی است. بیان‌نشدن ژن CBL10 در مواجهه با حملهٔ ویروس، شاید نشان‌دهندهٔ دخالت‌نداشتن این ژن در مسیر پاسخ به تنش‌های ویروسی است.

مشاهدهٔ رفتارهای پیچیده و متناقض و وجود ایزوفرم‌های چندگانهٔ CBL در گیاهان و ازجمله گوجه‌فرنگی، تا حد زیادی بر پیچیدگی‌های درک چگونگی عملکرد این ژن‌ها افزوده است (Kudla *et al*., 1999). نتایج حاصل از تحقیق حاضر، به وضوح نشان دادند که مسیرهای سیگنالی CBL/CIPK در گوجه‌فرنگی در پاسخ به هر دو نوع تنش زیستی و غیرزیستی، رخ می‌دهد. بجز آرابیدوپسیس، برنج و چند گیاه محدود دیگر، مسیرها و پاسخ‌های شبکهٔ CBL/CIPK به تنش در گیاهان عالی چندان بررسی نشده‌اند. شناسایی اعضای این خانوادهٔ ژنی در سایر گیاهان مدل و بررسی مقایسه‌ای ویژگی‌ها، رفتارها و پاسخ‌های صادره در شرایط مختلف زیستی، برای درک بیشتر چگونگی عملکرد شبکه پیام‌رسانی کلسیم اهمیت زیادی دارد (Zhang *et al*., 2008). درمجموع، به نظر می‌رسد که الگوهای متنوع بیان ژن‌های CBL به‌نوعی در هماهنگی با نیاز گیاه عمل می‌کنند (Batistic and Kudla, 2004). در پژوهش حاضر، با بررسی کلی بیان ژن‌های مختلف CBL گوجه‌فرنگی در تنش‌های زیستی (ویروس) و غیرزیستی (خشکی) که با ارائهٔ الگوهای بیانی اختصاصی و هم‌پوشان همراه است، وجود شبکه‌ای پویا و توانمند در پاسخ به نیازهای ناشی از تغییرات محیطی در گیاه استنباط می‌شود. پژوهش‌های بیشتری درزمینهٔ پاسخ CBLهای گیاهی در کنار سایر عوامل مولکولی ازجمله CIPK، عوامل رونویسی و همچنین ژن‌های متأثر از این مسیر در تنش‌های مختلف باید انجام شوند تا درک بهتری از نقش این ژن‌ها در فرایندهای پیام‌رسانی، متابولیک و فیزیولوژی گیاهان حاصل شود.

سپاسگزاری

از دانشگاه پیام نور و مرکز تحصیلات تکمیلی دانشگاه کاشان بابت حمایت از اجرای این پژوهش سپاسگزاری می‌شود.

منابع

Albrecht, V., Weinl, S., Blazevic, D., D'Angelo, C., Batistic, O., Kolukisaoglu, Ü. and Kudla, J. (2003) The calcium sensor CBL1 integrates plant responses to abiotic stresses. The Plant Journal 36(4): 457-470.

Aravind, L., Mazumder, R., Vasudevan, S. and Koonin, E. V. (2002) Trends in protein evolution inferred from sequence and structure analysis. Current Opinion in Structural Biology 12(3): 392-399.

Batistic, O., Kim, K. N., Kleist, T., Kudla, J. and Luan, S. (2011) The CBL–CIPK network for decoding calcium signals in plants. In: Coding and decoding of calcium signals in plants (Ed. Luan, S.) 235-258. Springer Verlag, Berlin.

Batistic, O. and Kudla, J. (2004) Integration and channeling of calcium signaling through the CBL calcium sensor/CIPK protein kinase network. Planta 219(6): 915-924.

Batistic, O. and Kudla, J. (2009) Plant calcineurin B-like proteins and their interacting protein kinases. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research 1793(6): 985-992.

Cheong, Y. H., Kim, K. N., Pandey, G. K., Gupta, R., Grant, J. J. and Luan, S. (2003) CBL1, a calcium sensor that differentially regulates salt, drought, and cold responses in *Arabidopsis*. The Plant Cell 15(8): 1833-1845.

D'angelo, C., Weinl, S., Batistic, O., Pandey, G. K., Cheong, Y. H., Schültke, S. and Harter, K. (2006) Alternative complex formation of the Ca^{2+} regulated protein kinase CIPK1 controls abscisic acid dependent and independent stress responses in *Arabidopsis*. The Plant Journal 48(6): 857-872.

Drerup, M. M., Schlücking, K., Hashimoto, K., Manishankar, P., Steinhorst, L., Kuchitsu, K. and Kudla, J. (2013) The calcineurin B-like calcium sensors CBL1 and CBL9 together with their interacting protein kinase CIPK26 regulate the *Arabidopsis* NADPH oxidase RBOHF. Molecular Plant 6(2): 559-569.

Gu, Z., Ma, B., Jiang, Y., Chen, Z., Su, X. and Zhang, H. (2008) Expression analysis of the calcineurin B-like gene family in rice (*Oryza sativa* L.) under environmental stresses. Gene 415(1): 1-12.

Hamel, L. P., Nicole, M. C., Sritubtim, S., Morency, M. J., Ellis, M., Ehlting, J. and Lee, J. (2006) Ancient signals: comparative genomics of plant MAPK and MAPKK gene families. Trends in Plant Science 11(4): 192-198.

Ho, C. H., Lin, S. H., Hu, H. C. and Tsay, Y. F. (2009) CHL1 functions as a nitrate sensor in plants. Cell 138(6): 1184-1194.

Kim, B. G., Waadt, R., Cheong, Y. H., Pandey, G. K., Dominguez-Solis, J. R., Schültke, S. and Luan, S. (2007) The calcium sensor CBL10 mediates salt tolerance by regulating ion homeostasis in *Arabidopsis*. The Plant Journal 52(3): 473-484.

Kim, K. N., Cheong, Y. H., Gupta, R. and Luan, S. (2000) Interaction specificity of *Arabidopsis* calcineurin B-like calcium sensors and their target kinases. Plant physiology 124(4): 1844-1853.

Kleist, T. J., Spencley, A. L. and Luan, S. (2014) Comparative phylogenomics of the CBL-CIPK calcium-decoding network in the moss *Physcomitrella*, *Arabidopsis*, and other green lineages. Frontiers in Plant Science 5: 187.

Kolukisaoglu, Ü., Weinl, S., Blazevic, D., Batistic, O. and 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., Xu, Q., Harter, K., Gruissem, W. and 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.

Luan, S. (2009) The CBL–CIPK network in plant calcium signaling. Trends in Plant Science 14(1): 37-42.

Luan, S., Kudla, J., Rodriguez-Concepcion, M., Yalovsky, S. and Gruissem, W. (2002) Calmodulins and calcineurin B–like proteins calcium sensors for specific signal response coupling in plants. The Plant Cell Online 14(suppl 1): S389-S400.

Mahajan, S., Sopory, S. K. and Tuteja, N. (2006) Cloning and characterization of CBL-CIPK signalling components from a legume (*Pisum sativum*). The Federation of European Biochemical Societies Journal 273(5): 907-925.

Mao, J., Manik, S., Shi, S., Chao, J., Jin, Y., Wang, Q. and Liu, H. (2016) Mechanisms and physiological roles of the CBL-CIPK networking system in *Arabidopsis thaliana*. Genes 7(9): 62.

Mohanta, T. K., Malnoy, M., Mohanta, N. and Kanchiswamy, C. N. (2014) In-silico identification and phylogenetic analysis of auxin efflux carrier gene family in *Setaria italica* L. African Journal of Biotechnology 13(2): 211-225.

Mohanta, T. K. and Mohanta, N. (2013) Genome wide identification of auxin efflux carrier gene family in physcomitrella patens. Journal of Biotechnological Sciences 1: 54-64.

Mohanta, T. K., Mohanta, N., Mohanta, Y. K., Parida, P. and Bae, H. (2015) Genome-wide identification of Calcineurin B-Like (CBL) gene family of plants reveals novel conserved motifs and evolutionary aspects in calcium signaling events. BioMed Central Plant Biology 15(1): 9-18.

Monihan, S. (2011) The *Arabidopsis* Calcineurin B-Like10 calcium sensor couples environmental signals to developmental responses. PhD thesis, The University of Arizona, Tucson, United States of America.

Pandey, G. K., Cheong, Y. H., Kim, K. N., Grant, J. J., Li, L., Hung, W. and 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, G. K., Kanwar, P., Singh, A., Steinhorst, L., Pandey, A., Yadav, A. K. and Lee, S. C. (2015) CBL-interacting protein kinase, CIPK21, regulates osmotic and salt stress responses in *Arabidopsis*. Plant Physiology pp- 00623.

Qiu, Q. S., Guo, Y., Dietrich, M. A., Schumaker, K. S. and Zhu, J. K. (2002) Regulation of SOS1, a plasma membrane Na^+/H^+ exchanger in *Arabidopsis thaliana*, by SOS2 and SOS3. Proceedings of the National Academy of Sciences 99(12): 8436-8441.

Quan, R., Lin, H., Mendoza, I., Zhang, Y., Cao, W., Yang, Y. and Guo, Y. (2007) SCABP8/CBL10, a putative calcium sensor, interacts with the protein kinase SOS2 to protect *Arabidopsis* shoots from salt stress. The Plant Cell 19(4): 1415-1431.

Reddy, A. S., Ali, G. S., Celesnik, H. and Day, I. S. (2011) Coping with stresses: roles of calcium-and calcium/calmodulin-regulated gene expression. The Plant Cell 3(6): 2010-2032.

Rudd, J. J. and Franklin-Tong, V. E. (2001) Unravelling response-specificity in Ca^{2+} signalling pathways in plant cells. New Phytologist 151(1): 7-33.

Schlicker, A., Domingues, F. S., Rahnenführer, J. and Lengauer, T. (2006) A new measure for functional similarity of gene products based on gene ontology. BioMed Central Bioinformatics 7(1): 302.

Shao, H., Chu, L., Jaleel, C. A. and Zhao, C. (2008) Water-deficit stress-induced anatomical changes in higher plants. Comptes Rendus Biologies 331(3): 215-225.

Tang, R. J., Liu, H., Yang, Y., Yang, L., Gao, X. S., Garcia, V. J. and Zhang, H. X. (2012) Tonoplast calcium sensors CBL2 and CBL3 control plant growth and ion homeostasis through regulating V-ATPase activity in *Arabidopsis*. Cell Research 22(12): 1650–1665.

Tang, R. J., Zhao, F. G., Garcia, V. J., Kleist, T. J., Yang, L., Zhang, H. X. and Luan, S. (2015) Tonoplast CBL–CIPK calcium signaling network regulates magnesium homeostasis in *Arabidopsis*. Proceedings of the National Academy of Sciences 112(10): 3134-3139.

Velásquez, A. C., Chakravarthy, S. and Martin, G. B. (2009) Virus-induced gene silencing (VIGS) in *Nicotiana benthamiana* and tomato. Journal of Visualized Experiments 28: 1292.

Wang, M., Gu, D., Liu, T., Wang, Z., Guo, X., Hou, W. and Wang, G. (2007) Overexpression of a putative maize calcineurin B-like protein in *Arabidopsis* confers salt tolerance. Plant Molecular Biology 65(6): 733-746.

Xu, J., Li, H. D., Chen, L. Q., Wang, Y., Liu, L. L., He, L. and 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.

Zhang, H., Yin, W. and Xia, X. (2008) Calcineurin B-Like family in *Populus*: comparative genome analysis and expression pattern under cold, drought and salt stress treatment. Plant Growth Regulation 56(2): 129-140.

Zhu, J. K. (2002) Salt and drought stress signal transduction in plants. Annual Review of Plant Biology 53: 247-273.

Zhu, J. K. (2016) Abiotic stress signaling and responses in plants. Cell 167(2): 313-324.