

شناسایی، جداسازی و بررسی بیان خانواده ژنی هوئین در جو (*Hordeum vulgare*)

رضا میردریکوند^{۱*}، سید سجاد سهرابی^۲، سید محسن سهرابی^۳ و کامران سمیعی^۴

۱- دانشیار، گروه ژنتیک و بهنژادی گیاهی، واحد خرم‌آباد، دانشگاه آزاد اسلامی، خرم‌آباد

۲- دکتری تخصصی، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد

۳- استادیار، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز

۴- استادیار، گروه کشاورزی، واحد کنگاور، دانشگاه آزاد اسلامی، کنگاور

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۸/۱۲ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۱/۲۷)

چکیده

امروزه پپتیدهای ضد میکروبی به عنوان نسل جدیدی از آنتی‌بیوتیک‌ها برای درمان بیماری‌های میکروبی در انسان، جانوران و محافظت از گیاهان در مقابل بیمارگرهای مختلف، شناخته می‌شوند. هوئین‌ها گروهی از پپتیدهای ضد میکروبی به شمار می‌روند که به دلیل تنوع بسیار بالا و بیان در اندام‌های مختلف گیاهی و همچنین نقش مؤثر در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی به عنوان یکی از مهم‌ترین گروه از پپتیدهای ضد میکروبی شناخته می‌شوند. هدف مطالعه حاضر شناسایی و جداسازی ژن‌های هوئین در گیاه جو و بررسی خصوصیات و میزان بیان آن‌ها در بافت‌ها و شرایط محیطی مختلف بود. بدین منظور تمام توالی‌های پروتئینی مربوط به ژن‌های هوئین گیاهی از پایگاه NCBI دریافت شدند. پس از به دست آمدن توالی مورد توافق، این توالی با استفاده از ابزار tBLASTn در برابر ژنوم جو مورد هم‌ردیفی قرار گرفت. نتایج حاصل از هم‌ردیفی، سرهم‌بندی شده و توالی‌های حاصل بلاست برای تعیین چارچوب خوانش باز (ORF) کامل، دمین‌های عملکردی، سیگنال پپتید، محل تجمع سلولی، خصوصیات فیزیکوشیمیایی، فراوانی اسیدهای آمینه، فعالیت ضد میکروبی و الگوی بیان مورد بررسی قرار گرفتند. در نهایت با استفاده از واکنش PCR توالی کدکننده کامل هوئین‌ها تکثیر و به صورت آزمایشگاهی تأیید شد. در این پژوهش، سیزده ژن هوئین با ORF‌هایی با طول متوسط ۸۱۳ جفت‌باز در گیاه جو شناسایی، جداسازی و توالی‌یابی شدند. ژن‌های هوئین جداسازی شده از جو با سایر هوئین‌های گیاهی، از نظر توالی ژنی و پروتئینی و همچنین خصوصیات ساختاری و عملکردی مشابهت بالایی نشان دادند. نتایج نشان داد که هوئین‌های گیاه جو مانند سایر هوئین‌های گیاهی، بدون اینترون و یا دارای تنها یک اینترون هستند و وجود سیگنال پپتید ترشحی، تجمع خارج سلولی، وجود دمین‌های عملکردی ChtBD1 در همه آن‌ها و دمین عملکردی Lyz-like در برخی از آن‌ها، تأیید شد. همچنین نتایج نشان داد که فعالیت ضد میکروبی و بیان حداکثری در ریشه و اندام‌های زایشی و همچنین بیان در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی از دیگر ویژگی‌های این پروتئین‌ها است. یافته‌های مطالعه حاضر درک ما را در مورد اثر ژن‌های هوئین در فرآیندهای زیستی گیاه مانند رشد و نمو و همچنین پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی افزایش می‌دهد.

واژگان کلیدی: بیان ژن، تنش‌های زیستی و غیرزیستی، دمین عملکردی ChtBD1، هوئین

* نویسنده مسئول، آدرس پست الکترونیکی: mirderikvand@khoiau.ac.ir

مقدمه

پتیدهای ضد میکروبی گروهی از عوامل ضد میکروبی با جرم مولکولی پایین هستند که علیه طیف گسترده‌ای از عوامل بیماری‌زا مانند ویروس‌ها، باکتری‌ها و قارچ‌ها عمل می‌کنند (Thevissen et al., 2007; Wang et al., 2022). امروزه این پتیدهای کوچک به عنوان نسل جدیدی از آنتی‌بیوتیک‌ها برای درمان بیماری‌های میکروبی در انسان، جانوران و محافظت از گیاهان در مقابل بیمارگرهای مختلف شناخته می‌شوند (Bowdish et al., 2005; Elsbach, 2003; Khademi and Nazarian-Firouzabadi, 2019; Punginelli et al., 2022).

اغلب خانواده‌های پتیدهای ضد میکروبی دارای طول کمتر از ۱۰۰ اسید آمینه، وزن مولکولی بین ۲۰-۳۰ کیلو دالتون، کاتیونی، آب‌گریز و دارای ساختاری شامل مارپیچ‌های آلفا و صفحات بتا هستند (Bulet et al., 2004; Zhang et al., 2021). مکانیسم عمل پیشنهاد شده برای اغلب پتیدهای ضد میکروبی شامل برهمکنش این پتیدها با غشاهای میکروبی و ایجاد منافذی در آن‌هاست که منجر به ایجاد میسل، به هم خوردن قطبیت غشایی، نشت سیتوپلاسمی، ورود پتید به درون سلول و آسیب به ساخت درشت مولکول‌های درون سلولی می‌شود (Zhang et al., 2021). از بخش‌های مختلفی که توسط این پتیدها هدف قرار داده می‌شوند می‌توان به پتیدوگلیکان، دیواره سلولی، غشاء پلاسمایی، ریبوزوم‌ها، دستگاه پروتئین‌سازی، دستگاه همانندسازی DNA، دستگاه نسخه‌برداری، پروتئازهای سلولی، چاپرون‌های سلولی، سیستم دوجزئی، سیستم انتقال ABC (ATP-binding cassette) و آنزیم‌های اتولیزکننده (Autolysis) اشاره کرد (Le et al., 2017). علاوه بر مکانیسم ذکر شده، برخی از پتیدهای ضد میکروبی بدون تخریب غشا نیز قادر به ایجاد محدودیت‌های جدی سلولی می‌باشند (Zhang et al., 2021).

شناسایی هزاران نوع پتید ضد میکروبی از منابع مختلف و طراحی مصنوعی شمار زیادی از این نوع پتیدها در مطالعات مختلف گزارش شده است (Laverty et al., 2011; Loo et al., 2021; Santos-Silva et al., 2021).

(Zhang et al., 2021). تاکنون سه روش مختلف برای سنتز پتیدهای ضد میکروبی در موجودات مختلف پیشنهاد شده است. در روش اول، پتیدهای ضد میکروبی دارای توالی کدکننده ژنی در ژنوم موجودات زنده بوده و به صورت ریبوزومی ساخته می‌شوند (Hetrick and van der Donk, 2017; Singh and Abraham, 2014; Zhang et al., 2021). در روش دوم، پتیدها دارای ژن اختصاصی نبوده و به صورت ساخت غیرریبوزومی ساخته می‌شوند (Agrawal et al., 2017; Vila-Farres et al., 2017; Zhang and Gallo, 2016). و در روش سوم، پتیدها در اثر تجزیه پروتئولایتیکی پروتئین‌های مختلف سلولی حاصل می‌شوند (Nongonierma and FitzGerald, 2016; Singh and Abraham, 2014).

اخیراً، علاقه به بیان پتیدهای ضد میکروب در گیاهان به دو دلیل عمده، از جمله نیاز به روش‌های جدید در محافظت گیاهان و تقاضا برای عوامل ضد میکروبی جدید در پزشکی، به طور معنی‌داری افزایش پیدا کرده است. پتیدهای ضد میکروب طبیعی و مصنوعی به عنوان نامزدهای احتمالی در نظر گرفته شده‌اند که می‌توانند این تقاضا را از طریق روش‌های مختلف مبتنی بر بیوتکنولوژی کشاورزی و پزشکی پاسخ دهند. در کنار پتیدهای ضد میکروبی، پتیدهای دارویی بدون فعالیت ضد میکروبی نیز در گیاهان تولید شده‌اند (Zhang et al., 2021).

پتیدهای ضد میکروبی گیاهی، از گروه پتیدهای کاتیونی (بار مثبت) کوچکی هستند که با دارا بودن فعالیت‌های زیستی بالا، به گیاه توانایی بازدارندگی در برابر طیف وسیعی از موجودات زنده مهاجم را می‌بخشند (Li et al., 2021; Santos-Silva et al., 2021). اگرچه در ابتدا تنها فعالیت ضدقارچی برای این پتیدها گزارش شده بود ولی در مطالعات اخیر عملکردهای ضدباکتری و ضدحشرات نیز برای آن‌ها اثبات شده است (Eleftherianos et al., 2021; Vanzolini et al., 2022).

پتیدهای ضد میکروبی گیاهی تاکنون در خانواده‌ها و گونه‌های گیاهی مختلفی مانند گندم، توتون، سیب زمینی، نخودفرنگی، آفتابگردان، اطلسی و تربچه جداسازی شده‌اند (Epanand, 2016; Shen et al., 2005).

(McGinnis and Madden, 2004). نتایج tBLASTn با استفاده از نرم‌افزار CLC Genomics Workbench (نسخه ۲۲) (QIAGEN, USA) سرهم‌بندی شده و توالی‌های حاصله در پایگاه داده دمن‌های حفاظت‌شده (Conserved Domains Database, CDD) مورد بررسی قرار گرفتند (Marchler-Bauer *et al.*, 2014). تنها توالی‌هایی که شامل دمن کامل هوئین (Chitin Binding Domain 1, ChtBD1) با ارزش e-value کمتر از ۰/۰۰۱ بودند به‌عنوان ژن هوئین در جو انتخاب شدند. ژن‌های شناسایی شده در ژنوم جو توسط پایگاه‌های داده Phytozome و morexGenes تأیید شدند (Goodstein *et al.*, 2012). به‌منظور طراحی آغازگرهای اختصاصی، از توالی‌های هوئین شناسایی شده که توسط تمامی تحلیل‌های پایین‌دستی تأیید شده بودند، استفاده شد. آغازگرهای اختصاصی توسط نرم‌افزار AlleleID (نسخه ۶) (Premier Biosoft, USA) طراحی شدند (جدول ۱).

مواد گیاهی و استخراج DNA: پس از تهیه بذور جو (رقم بهدان) از مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی لرستان، بذرها به‌مدت ۵ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۵ درصد استریل شده و پس از آن سه بار با آب مقطر شستشو شدند. پس از ضدعفونی بذور، ۲۰ بذر جو در پتری‌دیش (۱۰ سانتی‌متر) بر روی کاغذ صافی قرار داده شد و ۵ میلی‌لیتر آب مقطر استریل به آن‌ها اضافه شد. به‌منظور جوانه‌زنی ظروف پتری در انکوباتور با دمای 21 ± 1 درجه سانتی‌گراد در تاریکی نگهداری شدند. پس از پنج روز، پتری‌دیش‌ها به ژرمیناتور متقل و در دمای 21 ± 1 درجه سانتی‌گراد با دوره نوری ۱۶/۸ ساعت و رطوبت نسبی ۷۰ درصد به‌مدت ۵ روز نگهداری شدند. از گیاهچه‌های ۱۰ روزه به‌منظور استخراج DNA نمونه‌برداری شد. بافت‌های نمونه‌برداری شده تا زمان استخراج DNA در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. DNA ژنومی با استفاده از روش CTAB (Doyle, 1991) از نمونه‌های پودر شده با ازت مایع استخراج شد. به‌دلیل اهمیت خلوص DNA مورد بررسی و تعیین کمیت و کیفیت آن با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (نانودراپ) میزان جذب نور در طول‌موج‌های ۲۶۰، ۲۸۰ و ۲۳۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. از ژل آگارز یک درصد نیز به‌عنوان روش ارزیابی مکمل استفاده گردید.

پپتیدهای ضد میکروبی گیاهی بر اساس ساختار خود به گروه‌های مختلفی تقسیم می‌شوند. سیکلوتیدها (Cyclotides)، دیفنسین‌ها (Defensins)، تیونین‌ها (Thionins)، پروتئین‌های انتقال‌دهنده چربی (Lipid Transfer Proteins)، اسنیکین‌ها (Snakins)، هوئین‌ها (Heveins) و نوتین‌ها (Knottins) گروه‌های مختلفی از پپتیدهای ضد میکروبی گیاهی هستند (Epand, 2016; Goyal and Mattoo, 2016). با توجه به اینکه هوئین‌ها دارای تنوع بسیار بالایی بوده و در همه خانواده‌های گیاهی وجود دارند از این‌رو به یکی از شناخته‌شده‌ترین گروه‌های پپتیدهای ضد میکروبی تبدیل شده‌اند (Odintsova *et al.*, 2020). مرور منابع نشان می‌دهد که این گروه از پپتیدها دارای تنوع بسیار بالایی بوده و در اندام‌های مختلف گیاهی و در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی و همچنین در پاسخ به مولکول‌های علامت‌دهنده مانند متیل‌جاسمونات، اسید سالیسیلیک و اتیلن القاء و تولید می‌شوند (Berthelot *et al.*, 2016b; Knyazev *et al.*, 2019; Laukkanen *et al.*, 2003; Loo *et al.*, 2021; Shcherbakova *et al.*, 2020; Slavokhotova *et al.*, 2017).

با توجه به اهمیت خانواده هوئین و نقش مؤثر آن در پاسخ به انواع تنش‌های زیستی و غیرزیستی، هدف از این مطالعه شناسایی و جداسازی ژن‌های هوئین در گیاه جو و تحلیل بیوانفورماتیکی آن‌ها در شرایط محیطی مختلف می‌باشد. یافته‌های این پژوهش می‌تواند گامی در جهت تولید گیاهان مقاوم به انواع مختلف تنش‌های زیستی و غیرزیستی محسوب شده و علاوه بر این با استفاده از سیستم‌های مختلف بیانی می‌توان از محصول این ژن‌ها به‌عنوان نسل جدیدی از عوامل ضد میکروبی استفاده نمود.

مواد و روش‌ها

شناسایی اعضای خانواده ژنی هوئین در ژنوم جو: به‌منظور شناسایی خانواده ژنی هوئین، در ابتدا تمامی توالی‌های مربوط به خانواده هوئین از گیاهان تک‌لپه و دولپه که در پایگاه داده پروتئینی NCBI (Pruitt *et al.*, 2005) ثبت شده بودند، دریافت شدند. سپس برای شناسایی توالی ژن‌های هوئین در ژنوم جو از ابزار tBLASTn استفاده شد به‌طوری که از توالی‌های پروتئینی دریافت شده به‌عنوان ورودی علیه ژنوم جو استفاده شد

برش خورده و با کیت استخراج ژل GeneJET (Thermo Fisher Scientific, USA) خالص سازی شده و در نهایت به صورت دوطرفه توسط شرکت Bioneer آلمان (Metabion, Germany) توالی یابی شدند. نتایج توالی یابی برای هر قطعه به طور جداگانه با استفاده از نرم افزار CLC Genomics Workbench (نسخه ۲۲) سرهم بندی شد. صحت نتایج توالی یابی شده با استفاده از ابزار BLASTn علیه پایگاه نوکلئوتیدی NCBI تأیید شد.

واکنش PCR برای تکثیر و جداسازی: واکنش PCR برای تکثیر قطعات ژنی با استفاده از آنزیم Taq شرکت سیناژن (SinaClon BioScience, Iran) و DNA استخراج شده به عنوان الگو با استفاده از دستگاه چرخه ساز شرکت BioRad (BioRad, USA) انجام شد. برنامه حرارتی واکنش PCR در جدول ۲ ارائه شده است. پس از انجام واکنش، محصولات PCR روی ژل آگارز یک درصد بارگذاری و تأیید اندازه شدند. پس از تأیید اندازه، باندهای ژن هوئین از ژل آگارز

جدول ۱- اسامی و توالی آغازگرهای طراحی شده

Table 1. Name and sequences of designed primers

ردیف	نام ژن	توالی آغازگر	طول قطعه تکثیر	دمای اتصال (سانتی گراد)
Row	Gene name	Primer sequence	Product length	Annealing Tm (°C)
1	HORVU0Hr1G016310-F	5'-GCCTCGGGTCATCAGCAG-3'	1086	60
	HORVU0Hr1G016310-R	5'-GCCACAACCAAGAATAAGTCCAC-3'		
2	HORVU1Hr1G062030-F	5'-CGGCAGCAAACACAACAAACC-3'	1093	61
	HORVU1Hr1G062030-R	5'-ACACACATACACGAATCACAAGC-3'		
3	HORVU1Hr1G078050-F	5'-AACAAGAAGGATGAAGATGATGAG-3'	767	60
	HORVU1Hr1G078050-R	5'-GCAAGGCTGGAGAATTATTAAGG-3'		
4	HORVU2Hr1G085270-F	5'-CGGAAGTCGTCGGCAATG-3'	1076	61
	HORVU2Hr1G085270-R	5'-GCACCTAGCAAGTGAGTCTG-3'		
5	HORVU2Hr1G085280-F	5'-AATGCCGTCCACAAGATGAAC-3'	1092	61
	HORVU2Hr1G085280-R	5'-GAATAGACAGGGCGGTAGAGG-3'		
6	HORVU2Hr1G126720-F	5'-CCACAGATGATGAAGCCACAC-3'	467	61
	HORVU2Hr1G126720-R	5'-GTCCACGATTTCAACTCTTATACG-3'		
7	HORVU2Hr1G126740-F	5'-ATCAACCAGACCGTGCCTAC-3'	1027	60
	HORVU2Hr1G126740-R	5'-GTTACTCCGTTACTCGCTGAATC-3'		
8	HORVU3Hr1G064470-F	5'-GCCGTGATGAGAGGACTTGTG-3'	1001	60
	HORVU3Hr1G064470-R	5'-CTGCTGTCTTGTGCCTTCATATAG-3'		
9	HORVU5Hr1G098470-F	5'-ACGAGCCGACGACCTTCC-3'	1021	60
	HORVU5Hr1G098470-R	5'-GTAGCCGACACCGAGAACG-3'		
10	HORVU7Hr1G106900-F	5'-CACATCCAGTAAAGCACACATC-3'	691	59
	HORVU7Hr1G106900-R	5'-TGACAACAATTCAAGGTAGACAC-3'		
11	HORVU7Hr1G107000-F	5'-CGTAGCGATGAAGCGTCTC-3'	743	58
	HORVU7Hr1G107000-R	5'-CCTATTGCCACTGATTACTTCC-3'		
12	HORVU7Hr1G113270-F	5'-GTGCTCCCGAGTTCAATGC-3'	1293	61
	HORVU7Hr1G113270-R	5'-CGAGGACCCAGCCTTACG-3'		
13	HORVU7Hr1G121850-F	5'-GTGTTGTTCCGCGTGGTTGC-3'	1006	61
	HORVU7Hr1G121850-R	5'-CGCCATGCTCTGATGCTCTTATTG-3'		

جدول ۲- برنامه دمایی واکنش PCR

Table 2. PCR program temperature

مرحله Step	درجه حرارت (سانتی‌گراد) Temperature (°C)	زمان (دقیقه) Time (Min)
واسرشته‌سازی اولیه Initial denaturation	95	10
واسرشته‌سازی Denaturation	95	0.5
اتصال Annealing	برای هر ژن مطابق با دمای اتصال For each gene according to the annealing temperature	0.5
گسترش Extension	72	1.5
گسترش نهایی Final extension	72	10

حفاظت‌شده در ساختار محصولات پروتئینی خانواده ژنی هوئین توسط مجموعه نرم‌افزاری MEME شناسایی شدند (Bailey *et al.*, 2015). ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی محصولات پروتئینی خانواده ژنی هوئین شامل فراوانی اسیدهای آمینه، pH ایزوالکتریک (pI)، وزن مولکولی، شاخص آلفاتیک، شاخص ناپایداری و میانگین کل هیدروپاتیک (Grand Average Of Hydropathicity, GRAVY) با استفاده از ابزار ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam>) پیش‌بینی شد (Gasteiger *et al.*, 2005).

هم‌ترازی چندگانه توالی‌های پروتئینی و بازسازی درخت فیلوژنتیکی خانواده ژنی هوئین: هم‌ترازی چندگانه توالی‌های پروتئینی با استفاده از الگوریتم Clustal W با استفاده از نرم‌افزار Vector NTI (نسخه ۱۰/۳) انجام شد (Larkin *et al.*, 2007). درخت فیلوژنتیکی مبتنی بر روش بیشینه احتمال (Maximum Likelihood, ML) برای توالی پروتئین‌های خانواده ژنی هوئین جو با استفاده از نرم‌افزار MEGA X (با در نظر گرفتن ۱۰۰۰ تکرار بوت‌استرپ) بازسازی شد (Kumar *et al.*, 2018). برای مقایسه رابطه تکاملی خانواده ژنی هوئین، پروتئین‌های همولوگ هوئین‌های جو با استفاده از ابزار BLASTp از پایگاه داده پروتئین NCBI بازیابی شدند و یک درخت فیلوژنتیک ML با استفاده از MEGA X (با در نظر گرفتن ۱۰۰۰ تکرار بوت‌استرپ) ترسیم شد (Kumar *et al.*, 2018; Pruitt *et al.*, 2005).

تجزیه و تحلیل ساختار ژنی اعضای خانواده هوئین: چارچوب‌های خوانش باز (ORFs) و مرزهای ایترون-اگزون در ساختار ژن‌های خانواده هوئین با استفاده از سرویس تحت وب FGENSEH و همچنین با کاربرد هم‌ترازی جفتی cDNA و توالی‌های ژن تعبیه‌شده در نرم‌افزار CLC Genomics Workbench (نسخه ۲۲)، شناسایی شدند (Salamov and Solovyev, 2000). طول ORF، کدون‌های شروع و پایان، تعداد اگزون‌ها و ایترون‌ها و نوع ایترون‌های ژن‌های خانواده هوئین با استفاده از نرم‌افزار CLC Genomics Workbench (نسخه ۲۲) و نرم‌افزارهای CDD (Marchler-*et al.*, 2014) تعیین شد. علاوه بر این تجزیه و تحلیل پروموتور و شناسایی عناصر سیس با استفاده از پایگاه داده PlantCARE و PlantPAN انجام شد (Chang *et al.*, 2008; Lescot *et al.*, 2002).

تجزیه و تحلیل ساختار محصولات پروتئینی خانواده ژنی هوئین: دمین‌های حفاظت‌شده عملکردی در ساختار محصولات پروتئینی خانواده ژنی هوئین با استفاده از پایگاه‌های داده CDD، Pfam و InterProScan شناسایی شدند (Finn *et al.*, 2016; Jones *et al.*, 2014; Marchler-Bauer *et al.*, 2014). سیگنال پپتید و محل فعالیت درون‌سلولی محصولات پروتئینی خانواده ژنی هوئین با استفاده از سرویس‌های برخط SignalP، Phobius، PSORT و CELLO2GO پیش‌بینی شدند (Horton *et al.*, 2007; Käll *et al.*, 2007; Nielsen, 2017; Yu *et al.*, 2014). موتیف‌های

(Support Vector Machine) پیش‌بینی شدند (Waghu *et al.*, 2014).

نتایج و بحث

نتایج tBLASTn در سایت NCBI تعداد ۳۶ ناحیه را در ژنوم گیاه جو مشخص کرد که حاوی توالی احتمالی ژن‌های هوئین بودند. سرهم‌بندی این ۳۶ توالی در مجموع ۱۳ کانتینگ منحصر به فرد را ایجاد کرد که حاوی توالی احتمالی ژن‌های هوئین بودند. نتایج هم‌ردیفی و همچنین جستجوی دمین‌های عملکردی این ۱۳ کانتینگ نشان داد که تمامی آن‌ها حاوی ناحیه کدکننده هوئین هستند. طراحی آغازگرها بر اساس این نواحی کدکننده صورت گرفت و واکنش PCR با استفاده از آغازگرها و شرایط اختصاصی هر کانتینگ انجام شد. الکتروفورز محصولات PCR در ژل آگارز یک درصد، باندهایی را در محدوده مورد نظر آغازگرهای طراحی شده نشان داد (شکل ۱). نتایج توالی‌یابی دوطرفه محصولات PCR، توالی شناسایی شده از طریق روش‌های بیوانفورماتیکی را مورد تأیید قرار داد و صحت شناسایی و جداسازی ژن‌های هوئین را مشخص کرد.

تجزیه و تحلیل نتایج توالی‌یابی همچنین مشخص کرد که ژن‌های هوئین شناسایی شده دارای توالی‌های کدکننده‌ای در محدوده‌ی طولی ۳۴۲ تا ۱۱۵۵ جفت‌باز هستند که پس از حذف نواحی ایترونی چارچوب‌های خوانش بازی (ORF) در محدوده‌ی طولی ۳۴۲ تا ۱۰۰۲ جفت‌باز را تولید می‌کنند. تمامی چارچوب‌های خوانش باز این ژن‌ها با کدون ATG شروع می‌شدند. درحالی‌که، این چارچوب‌ها در سه ژن با کدون TAA، پنج ژن با کدون TGA و پنج ژن با کدون TAG خاتمه پیدا می‌کردند. اغلب ژن‌های هوئین شناسایی شده گیاه جو در این مطالعه بدون ایترون بودند و تعداد محدودی از آن‌ها، تنها دارای یک ایترون GT-AG بودند (جدول ۳).

بررسی چارچوب‌های خوانش باز ژن‌های هوئین گیاه جو مشخص کرد که این ژن‌ها پس از ترجمه پروتئین‌هایی در محدوده طولی ۱۱۳ تا ۳۳۳ اسیدآمینو را تولید می‌کنند (جدول ۳). جستجوی دمین‌های عملکردی محافظت‌شده نشان داد که دمین ChtBD1 (دمین هوئین) در تمامی ژن‌های هوئین گیاه

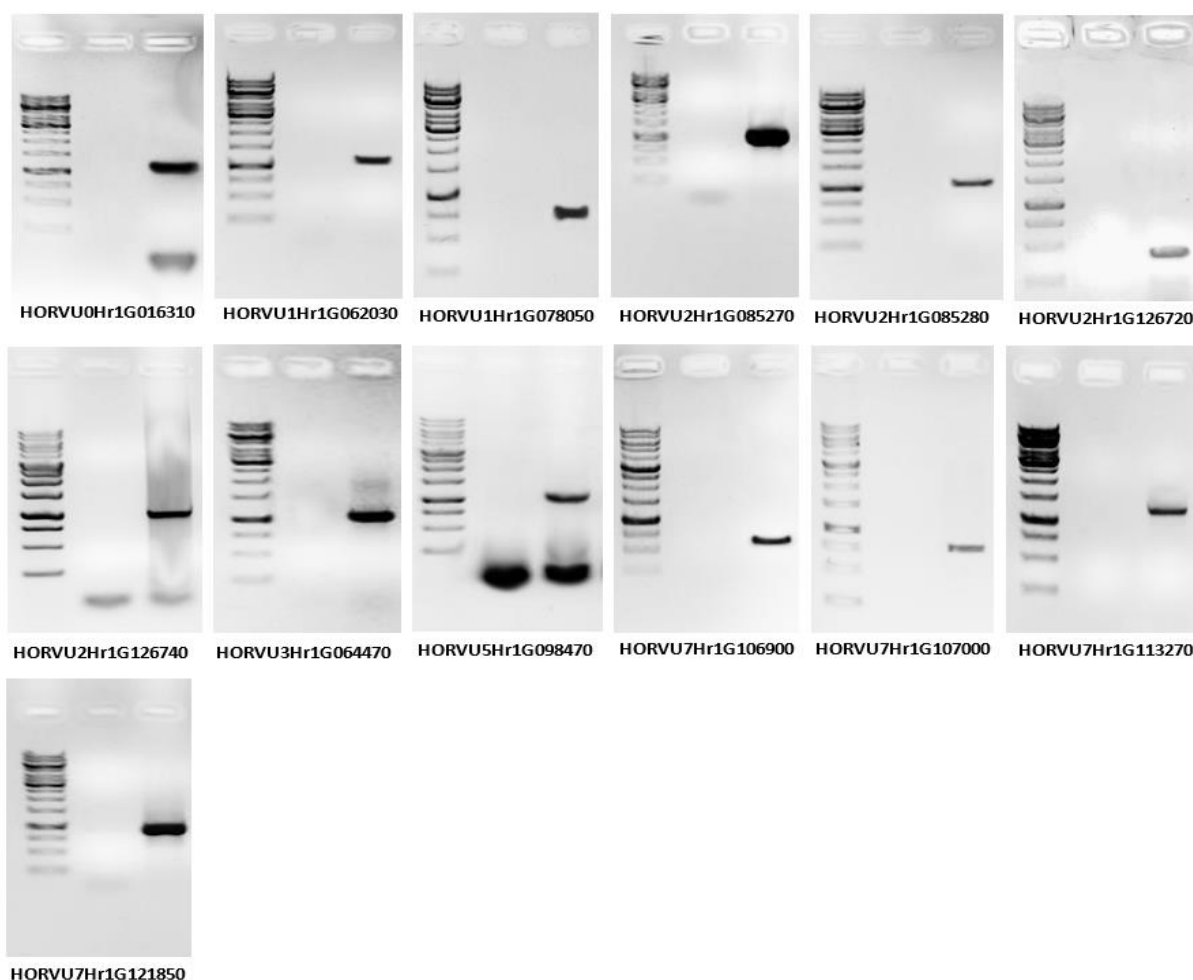
تجزیه و تحلیل بیان ژن اعضای خانواده ژنی هوئین: تجزیه و تحلیل بیان ژن اعضای خانواده ژنی هوئین جو با استفاده از رونوشت‌های مختلف (RNA-seq) در پایگاه داده EoRNA انجام شد. EoRNA یک پایگاه داده بیان جو است که داده‌های فراوانی ژن و رونوشت‌ها را در صورت تقاضا در قالب رونوشت در میلیون (Transcripts Per Million, TPM) برای بافت‌های مختلف و انواع شرایط تنش‌های زیستی و غیرزیستی ارائه می‌دهد. علاوه بر این، EoRNA دسترسی به مجموعه داده رونوشت مرجع جو (Barley Reference Transcripts, BART) را فراهم می‌کند که شامل ۱۷۷۲۴۰ رونوشت منحصر به فرد بیان شده جو است که ۶۰۴۴۴ ژن را پوشش می‌دهد (Milne *et al.*, 2021). تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی بیان اعضای خانواده ژنی هوئین مختص به بافت‌های مختلف جو شامل بساک، مریستم آپیکال، جنین، برگ، ریشه، اندام هوایی و سنبله انجام شد. همچنین بیان ژن اعضای خانواده ژنی هوئین جو تحت تنش‌های غیرزیستی (شامل تنش‌های شوری، خشکی، دمایی و کمبود فسفر) و زیستی (شامل لکه‌قهوه‌ای جو، فوزاریوم و زنگ زرد) ارزیابی شد.

تجزیه و تحلیل فعالیت ضد میکروبی اعضای خانواده ژنی هوئین: از پایگاه داده پپتیدهای ضد میکروبی (Collection of Anti-Microbial Peptides, CAMP) برای ارزیابی فعالیت ضد میکروبی بالقوه اعضای خانواده ژنی هوئین جو استفاده شد. مجموعه پایگاه داده پپتیدهای ضد میکروبی (CAMP) برای گسترش و تسریع مطالعات پپتید ضد میکروبی ایجاد شده است. پایگاه CAMP شامل اطلاعات ۱۳۸۶ توالی حفاظت‌شده پپتیدهای ضد میکروبی متعلق به ۴۵ خانواده مختلف است که در آن اطلاعات مربوط به توالی نوکلئوتیدی، توالی پروتئینی، شماره دسترسی، نوع فعالیت، ارگاناسم منبع، ارگاناسم‌های هدف و خانواده پروتئینی به کاربران ارائه شده است (Waghu *et al.*, 2014). فعالیت ضد میکروبی بالقوه و مناطق با بالاترین فعالیت ضد میکروبی با استفاده از الگوریتم‌های تجزیه و تحلیل افتراقی خطی (Discriminant Analysis)، الگوریتم جنگل تصادفی (Random Forest)، شبکه عصبی مصنوعی (Artificial Neural Network) و ماشین بردار پشتیبان

محیطی زیستی و غیرزیستی نقش دارند. بررسی خصوصیات فیزیکوشیمیایی هوئین‌های جو مشخص کرد که این پروتئین‌ها دارای جرم مولکولی بین ۱۱/۵ تا ۳۵/۳۲۵ کیلودالتون، pH ایزوالکتریک بین ۴/۷۴ تا ۹/۲، شاخص ناپایداری بین ۲۲/۲۸ تا ۴۶/۹، شاخص آلفاتیک بین ۳۷/۹۷ تا ۷۴/۴۲ و GRAVY بین ۰/۳۴۶- تا ۰/۲۰۵ هستند. محاسبه بار خالص هوئین‌های شناسایی شده گیاه جو مشخص کرد که این پروتئین‌ها به دو گروه با بار خالص مثبت و بار خالص منفی تقسیم‌بندی می‌شوند. بررسی فراوانی اسیدهای آمینه نشان داد که گلیسین و آلانین بیشترین فراوانی و متیونین و تریپتوفان کمترین فراوانی را در ساختار هوئین‌های گیاه جو دارند (شکل ۲).

جو وجود دارد. این جستجو همچنین نشان داد که دمین ChtBD1 در برخی ژن‌های هوئین جو چهار مرتبه تکرار شده و در برخی دیگر از این ژن‌ها با دمین عملکردی دیگری به نام Lyz-like همراه است.

نتایج پیش‌بینی توالی سیگنال پپتید مشخص کرد که تمامی هوئین‌های گیاه جو دارای سیگنال پپتید ترشحی در محدوده طولی ۱۹ تا ۳۵ اسیدآمینه هستند. بررسی محل تجمع هوئین‌های شناسایی شده مشخص کرد که تمامی آن‌ها پس از تولید توسط سیگنال پپتیدهای خارج سلولی به محیط خارج از سلول منتقل می‌شوند. بررسی هستی‌شناسی ژن‌های هوئین مشخص کرد که این ژن‌ها به‌طور عمده در پاسخ به تنش‌های



شکل ۱- الگوی بانندی حاصل از PCR ژن‌های هوئین جو بر روی ژل آگارز یک درصد.

Figure 1. The PCR band pattern of isolated Hevein genes in barley on 1% agarose gel.

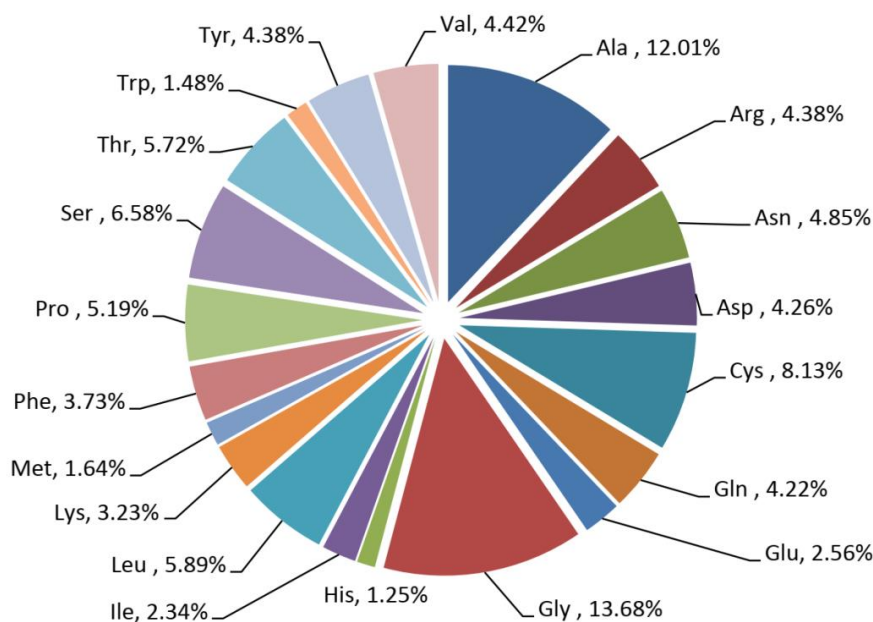
از چپ به راست در همه تصاویر چاهک‌ها به‌ترتیب، نشانگر مولکولی 1 Kbp، کنترل منفی (آب مقطر استریل) و باند تکثیر شده ژن‌های هوئین جو را نشان می‌دهند.

Left-to-right in all gel images show 1 Kb DNA ladder, negative control (sterile distilled water) and amplified bands of barley Hevein genes, respectively.

جدول ۳- ویژگی‌های ساختاری ژن‌های هوئین گیاه جو

Table 3. Structural features of barley Hevein genes.

نام ژن Gene Name	طول توالی ژنی (جفت‌باز) Gene sequence length (bp)	طول چارچوب خوانش باز (جفت‌باز) ORF length (bp)	تعداد اینترون No. of introns	طول پروتئین (اسید آمینه) Protein length (aa)
HORVU0Hr1G016310	1015	810	1	269
HORVUHr1G062030	984	984	-	327
HORVU1Hr1G078050	633	633	-	212
HORVU2Hr1G085270	928	831	1	276
HORVU2Hr1G085280	886	831	1	270
HORVU2Hr1G126720	342	342	-	113
HORVU2Hr1G126740	999	999	-	332
HORVU3Hr1G064470	963	963	-	320
HORVU5Hr1G098470	984	984	-	327
HORVU7Hr1G106900	642	642	-	213
HORVU7Hr1G107000	597	597	-	198
HORVU7Hr1G113270	1155	1002	1	333
HORVU7Hr1G121850	960	960	-	319



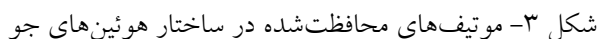
شکل ۲- توزیع فراوانی اسیدهای آمینه موجود در ساختار هوئین‌های جو

Figure 2. Distribution of amino acids in structures of barley Hevein proteins

نتایج هم‌ردیفی چندگانه هوئین‌های گیاه جو مشخص کرد که این پروتئین‌ها در ناحیه‌ی هوئین خود که همان دامین عملکردی ChBD1 است، از محافظت‌شدگی نسبتاً بالایی برخوردار هستند. میزان محافظت‌شدگی در سایر بخش‌های این پروتئین‌ها مانند دامین Lyz-like به نسبت کمتر بود. هم‌ردیفی چندگانه هوئین‌های گیاه جو همچنین نشان داد که ناحیه هوئین این پروتئین‌ها دارای ۸

بررسی موتیف‌های پروتئینی محافظت‌شده، وجود سه موتیف را در ساختار هوئین‌های گیاه جو مشخص نمود (شکل ۳). ژن‌های HORVU2Hr1G126720، HORVU1Hr1G078050، HORVU7Hr1G106900 و HORVU7Hr1G107000 فاقد هر گونه موتیف محافظت‌شده‌ای بودند. موتیف شماره یک در ۹ هوئین و موتیف‌های شماره دو و سه هرکدام در ۶ هوئین وجود داشتند.

اسیدآمینه سیستئین و ۳ اسیدآمینه گلیسین محافظت شده است. نتایج تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی هوئین‌های گیاه جو نشان داد که این پروتئین‌ها به دو گروه کلی تقسیم‌بندی می‌شوند (شکل ۴). درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده، ژن‌های HORVU7Hr1G113270، HORVU1Hr1G062030، HORVU2Hr1G126740، HORVU3Hr1G064470، HORVU5Hr1G098470، HORVU2Hr1G085270، HORVU7Hr1G121850، HORVU0Hr1G016310 و ژن‌های HORVU2Hr1G085280 در یک گروه و HORVU7Hr1G106900، HORVU7Hr1G107000، HORVU1Hr1G078050 و HORVU2Hr1G126720 در گروه دیگر قرار گرفتند (شکل ۴).

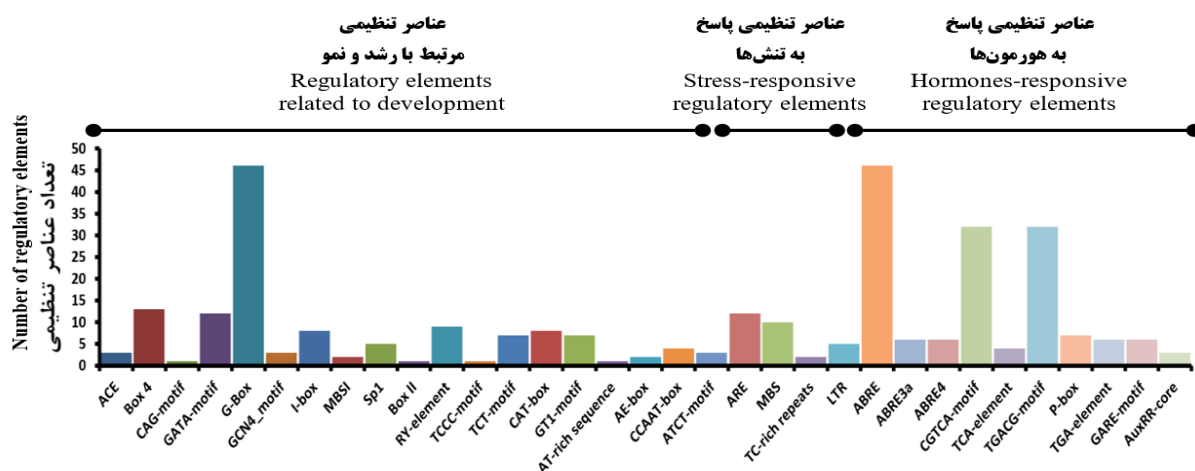


Phylogenetic tree showing the relationships between 100 protein sequences. The sequences are listed on the right, with some highlighted in red. The tree is rooted on the left and branches to the right. The color bar at the bottom indicates different groups or clusters of sequences.

Sequences (from top to bottom):

- W01WL0.1
- KAF2301221.1
- XP 021646346.1
- XP 021646348.1
- XP 021646350.1
- XP 021646349.1
- Q8GUD7.1
- Q8GUD8.1
- AHF8836.1
- Q949H3.2
- XP 021646355.1
- KAF2301240.1
- KAF2301238.1
- KAF2302619.1
- XP 021685895.1
- KAF2302347.1
- XP 021664500.1
- XP 021664338.1
- XP 021665288.1
- KAF2306331.1
- XP 021691072.1
- HORVUJ7H1G113270
- HORVUJ2H1G126740
- HORVUJ2H1G082030
- HORVUJ2H1G098470
- XP 021672589.1
- HORVUJ3H1G064470
- XP 021676009.1
- XP 021676093.1
- XP 021664119.1
- KAF2289107.1
- XP 021637143.1
- KAF2312754.1
- XP 021637128.1
- KAF2308278.1
- KAF2302350.1
- KAF2325773.1
- HORVUJ2H1G085270
- HORVUJ2H1G085280
- HORVUJ0H1G076510
- XP 021668636.1
- XP 021668635.1
- KAF2300327.1
- KAF2314074.1
- KAF2321967.1
- KAF2321970.1
- XP 021686103.1
- XP 021657789.1
- KAF2321972.1
- KAF2321957.1
- XP 021663314.1
- KAF2321973.1
- KAF2321969.1
- KAF2321966.1
- XP 021657784.1
- KAF2321976.1
- XP 021683487.1
- XP 021683486.1
- KAF2321978.1
- KAF2321979.1
- XP 021675881.1
- XP 021661805.1
- KAF2321968.1
- KAF2321974.1
- KAF2321965.1
- XP 021675880.1
- KAF2321971.1
- KAF2321956.1
- KAF2321958.1
- HORVUJ7H1G106900
- HORVUJ7H1G107000
- HORVUJ1H1G078000
- XP 021658607.1
- XP 021658601.1
- KAF2287153.1
- KAF2287144.1
- XP 021659027.1
- AA616225.2

Different groups are shown with blue and green lines. The barley Hevein genes are shown with red circles.



شکل ۵- تجزیه و تحلیل نواحی پروموتری ژن‌های هوئین گیاه جو

Figure 5. Analysis of promoter regions of barley Hevein genes

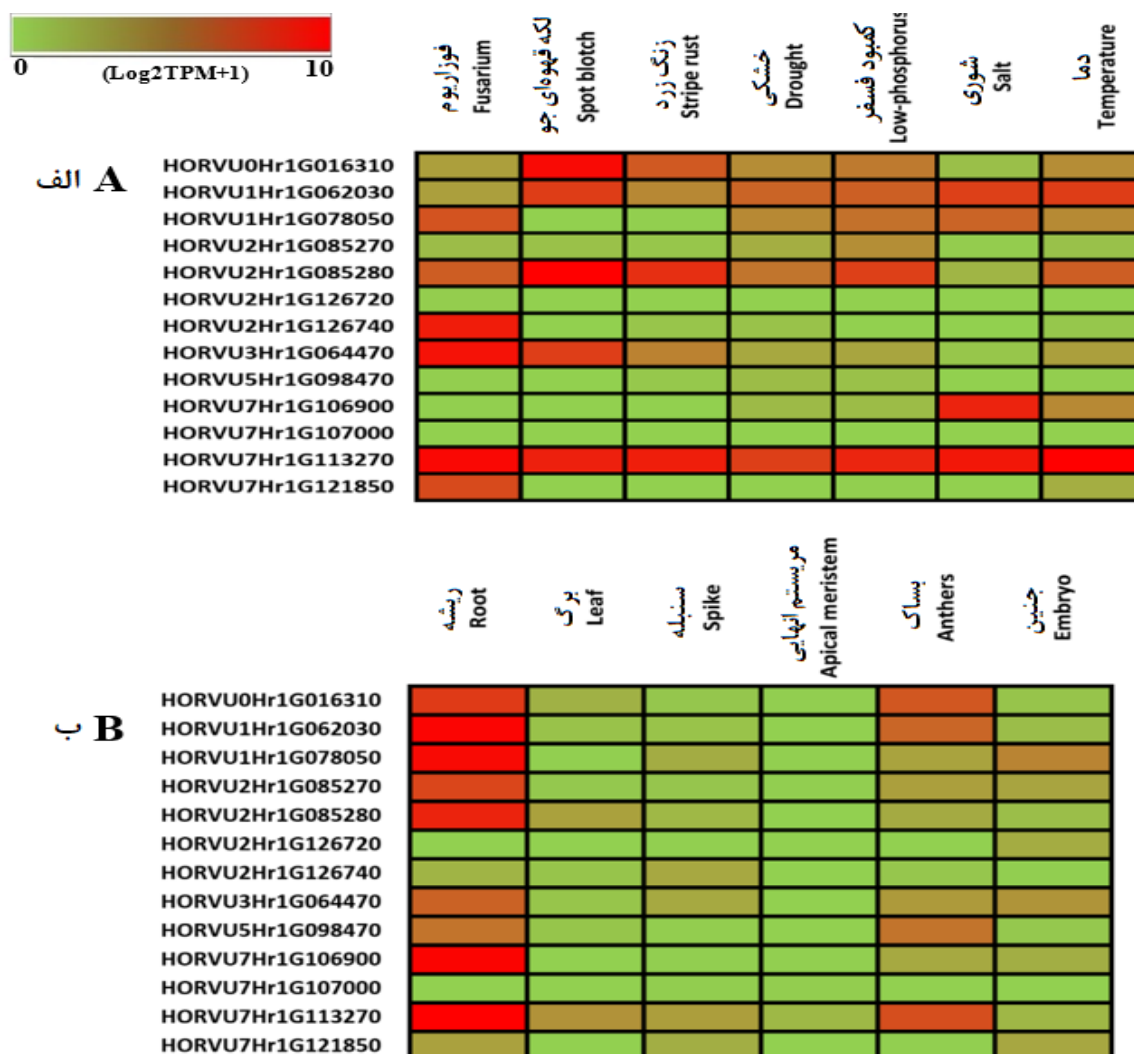
بررسی میزان بیان هوئین‌های گیاه جو تحت تنش‌های مختلف نشان داد که این ژن‌ها دارای بیان و پاسخ متفاوتی نسبت به تنش‌های زیستی و غیرزیستی هستند. ژن HORVU0Hr1G016310 بیشترین میزان تغییر بیان را در بیماری لکه‌قهوه‌ای و کمترین میزان تغییر بیان را در تنش شوری نشان داد. ژن HORVU1Hr1G062030 بیشترین میزان بیان را در تنش‌های دمایی و شوری و بیماری لکه‌قهوه‌ای و کمترین میزان تغییر بیان را در بیماری فوزاریومی نشان داد. بیشترین میزان تغییر بیان ژن HORVU1Hr1G078050 در بیماری فوزاریومی و تنش شوری و کمترین تغییر سطح بیان آن در بیماری‌های زنگ نواری و لکه‌قهوه‌ای مشاهده شد.

ژن HORVU2Hr1G085270 بیشترین میزان تغییر بیان را در تنش کمبود فسفر و کمترین میزان تغییر بیان را در تنش شوری نشان داد. ژن HORVU2Hr1G085280 بیشترین میزان تغییر بیان را در بیماری لکه‌قهوه‌ای و کمترین میزان تغییر بیان را در تنش شوری نشان داد. ژن‌های HORVU2Hr1G126720، HORVU5Hr1G098470 و HORVU7Hr1G107000 تحت تأثیر هیچ‌یک از شرایط تنش قرار نگرفتند و بیان آن‌ها تغییری نداشت. بیشترین میزان تغییر بیان ژن HORVU2Hr1G126740 در بیماری فوزاریومی و میزان تغییر بیان ناچیزی برای این ژن در

بررسی میزان بیان هوئین‌های گیاه جو در بافت‌های مختلف این گیاه نشان داد که این ژن‌ها دارای بیان متفاوتی در بافت‌های مختلف هستند. ژن‌های HORVU0Hr1G016310، HORVU1Hr1G078050، HORVU1Hr1G062030، HORVU2Hr1G085270، HORVU2Hr1G085280، HORVU3Hr1G064470، HORVU2Hr1G126740، HORVU7Hr1G106900 و HORVU5Hr1G098470 بیشترین میزان بیان را در بافت‌های ریشه و پرچم نشان دادند. ژن HORVU7Hr1G113270 در همه بافت‌های مورد بررسی بیان نسبتاً بالایی را نشان داد. ژن HORVU2Hr1G126740 در بافت‌های ریشه و خوشه بیشترین میزان بیان را نشان داد. ژن HORVU7Hr1G121850 در سه بافت ریشه، خوشه و جنین دارای بیشترین میزان بیان بود. ژن HORVU2Hr1G126720 بیشترین میزان بیان را در بافت جنین نشان داد. در نهایت، ژن HORVU7Hr1G107000 بیان پایینی را تنها در بافت‌های خوشه و مریستم انتهایی گیاه جو نشان داد (شکل ۶). به‌طور کلی بررسی بیان بافتی هوئین‌های جو مشخص کرد که این ژن‌ها در بافت ریشه و اندام‌های زایشی، بیان بالاتری را نسبت به سایر بافت‌ها دارند. نتایج همچنین نشان داد که این ژن‌ها در مریستم انتهایی گیاه جو بیان بسیار ناچیزی دارند (شکل ۶).

هوتین‌های گیاه جو با استفاده از ابزار برخط CAMP، وجود این ویژگی را در تمام ژن‌های مورد بررسی، پیش‌بینی کرد. روش‌های محاسباتی مختلف، با میزان اطمینان قابل‌توجهی وجود ویژگی ضد میکروبی را در هوتین‌های گیاه جو پیش‌بینی کردند. روش SVM با میزان احتمال ۱۰۰ درصد، روش RF با میزان احتمال بین ۷۴/۷ تا ۹۹/۴۵ درصد، روش DA با میزان احتمال ۱۰۰ درصد و روش ANN با تأیید کامل، وجود ویژگی ضد میکروبی را در تمامی هوتین‌های گیاه جو پیش‌بینی کرد. نتایج بررسی نواحی مختلف پروتئین‌های هوتین جو مشخص کرد که ویژگی ضد میکروبی این پپتیدها به‌طور عمده در دمن ChtBD1 (دمن هوتین) آن‌ها متمرکز شده است و بقیه نواحی ویژگی ضد میکروبی پایین‌تری نسبت به این ناحیه دارند.

بیماری لکه‌قهوه‌ای و تنش‌های شوری و کمبود فسفر مشاهده شد. ژن HORVU3Hr1G064470 بیشترین و کمترین میزان تغییر بیان را به‌ترتیب در بیماری فوزاریومی و تنش شوری نشان داد. ژن HORVU5Hr1G098470 تغییر بیان ناچیزی را در تنش‌های مختلف نشان داد. ژن HORVU7Hr1G113270 تغییر بیان ناچیزی را در تمامی تنش‌ها نشان داد. بیشترین میزان بیان ژن HORVU7Hr1G121850 در بیماری فوزاریومی و میزان تغییر بیان ناچیزی برای این ژن در بیماری‌های لکه‌قهوه‌ای و زنگ نواری و تنش‌های شوری، خشکی و کمبود فسفر مشاهده شد (شکل ۶).
نتایج تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی ویژگی‌های ضد میکروبی



شکل ۶- تجزیه و تحلیل *in silico* بیان ژن‌های هوتین گیاه جو و در شرایط تنش‌های زیستی و غیرزیستی (الف) و در بافت‌های مختلف (ب).

Figure 6. *In silico* gene expression analysis of barley Hevein genes in biotic and abiotic stresses conditions (A) and

different tissues (B).

ژن‌های هوئین در تمامی گیاهان وجود دارند و متعلق به خانواده بزرگ‌تری از پروتئین‌های متصل شونده به کیتین هستند که در فرایندهای دفاعی گیاه نقش دارند (Beintema, 1994). تاکنون تعداد مختلفی از اعضای خانواده هوئین از درخت کائوچو، درخت توت، سویا، گندم و دیگر گیاهان شناسایی شده است (Andreev et al., 2012; Berthelot et al., 2016a; Berthelot et al., 2016b; Porto et al., 2012; Saeed et al., 2016; Slavokhotova et al., 2017; Van Holle and Van Damme, 2015). در پژوهش حاضر، تعداد سیزده ژن هوئین برای اولین بار از گیاه جو شناسایی شد و ویژگی‌های آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت. اغلب ژن‌های هوئین شناسایی شده گیاه جو بدون اینترون بودند و تعداد محدودی از آن‌ها در ساختار خود تنها دارای یک اینترون بودند. این ساختار ژنی و الگوی اینترونی در سایر گیاهان نیز مشاهده شده است. در درخت کائوچو ژن‌های هوئین یک اینترونی در کنار ژن‌های بدون اینترون شناسایی و گزارش شده‌اند (Berthelot et al., 2016a; Berthelot et al., 2016b). در پژوهشی سه هوئین از گندم شناسایی و جداسازی شدند که فاقد اینترون در ساختار ژنی خود بودند (Andreev et al., 2012). هوئین شناسایی شده در گیاه گوجه‌فرنگی نیز فاقد اینترون بود (Kouzai and Saito, 2013). تمامی هوئین‌های شناسایی شده از درخت توت در ساختار ژنی خود فاقد اینترون بودند (Saeed et al., 2016). فرضیات مختلفی برای وجود ژن‌های بدون اینترون ذکر شده است که از آن جمله می‌توان به انتقال از پروکاریوت‌های باستانی، ایجاد توسط ترانسپوزون‌ها و مکانیسم‌های دیگر اشاره کرد (Yan et al., 2016). عدم وجود اینترون، این ژن‌ها را قادر می‌سازد تا به‌طور مؤثر رونویسی شوند و با نرخ بالاتری به پروتئین ترجمه شوند و همچنین می‌تواند دلیلی بر اهمیت نقش عملکردی این ژن‌ها در حفظ حیات سلول باشد (Gentles and Karlin, 1999; Zou et al., 2011).

جستجوی دمین‌های عملکردی محافظت‌شده نشان داد که دمین ChtBD1 (دمین هوئین) در تمامی ژن‌های هوئین گیاه جو به‌صورت تکی یا تکرار چهارتایی وجود داشته و در برخی از این ژن‌ها با دمین عملکردی دیگری به نام Lyz-like همراه است. این دمین (ChtBD1) دارای حدود ۳۰ تا ۴۰ اسیدآمینو است و در ساختار آن به‌طور معمول هشت اسیدآمینو سیستئین وجود دارد (Damme et al., 1991; Van Parijs et al., 1998). فعالیت ضدقارچی این پروتئین‌ها با از دست دادن دمین هوئین تا حد بسیار زیادی کاهش پیدا می‌کند (Iseli et al., 1993). به‌دلیل وجود ویژگی کاتیونی و آمفی‌پاتیک در این دمین، این پروتئین‌ها قادر هستند با غشاهای دارای بار منفی قارچ‌ها و باکتری‌ها برهم‌کنش داشته باشند (Lipkin et al., 2005; Martins et al., 1996; Xiang et al., 2004). تاکنون، پروتئین‌های هوئین به‌منظور بهبود مقاومت گیاه به بیماری‌های قارچی در گیاهان مختلفی از جمله توتون، گوجه‌فرنگی و آرابیدوپسیس بیان شده‌اند (Khaliluev et al., 2011; Shukurov et al., 2012; Shukurov et al., 2010).

نتایج پیش‌بینی توالی سیگنال پپتید مشخص کرد که تمامی هوئین‌های گیاه جو دارای سیگنال پپتید ترشحی هستند و پس از تولید توسط سیگنال پپتیدهای خارج سلولی به محیط خارج از سلول منتقل می‌شوند. توالی‌های سیگنال پپتید در هوئین‌های شناسایی شده گیاه جو بسیار متغیر بوده و بین هوئین‌ها تفاوت زیادی مشاهده شد. اغلب پروتئین‌های هوئین دارای یک سیگنال پپتید در ناحیه‌ی N خود هستند که توسط آن به مسیر ترشحی هدایت شده و وجود چنین سیگنال پپتیدی در ساختار هوئین‌های گیاه جو همانند سایر هوئین‌ها دور از انتظار نیست (Damme et al., 1998; Lee et al., 1991; Peumans and Van Damme, 1995; Slavokhotova et al., 2017; Van Holle and Van Damme, 2015). اغلب بیماری‌گرها ابتدا از طریق فضای خارج سلولی میزبان را مورد حمله قرار می‌دهند؛ بنابراین، وجود هوئین‌ها و سایر پروتئین‌های

به اینکه هوئین‌ها پروتئین‌های ترشحی هستند، پایداری پروتئینی یکی از پارامترهای حیاتی برای انجام فعالیت آن‌ها است.

میانگین کل آب‌دوستی و آب‌گریزی یا GRAVY معیاری از حلالیت پروتئین است. پروتئین‌های با GRAVY مثبت تمایل به آب‌گریزی داشته و پروتئین‌های با GRAVY منفی، آب‌دوست هستند (Kyte and Doolittle, 1982; Moghadam *et al.*, 2016). میزان GRAVY محاسبه شده برای هوئین‌های گیاه جو (به‌جز HORVU0Hr1G016310 و HORVU2Hr1G126720) نشان‌دهنده‌ی آب‌دوستی این پروتئین‌ها است. میزان GRAVY محاسبه شده برای این پروتئین‌ها همچنین با شاخص‌های آلفاتیک و ناپایداری محاسبه شده تطابق داشته و نشان‌دهنده‌ی پایداری حرارتی هوئین‌های گیاه جو است.

بررسی موتیف‌های پروتئینی محافظت‌شده، وجود سه موتیف را در ساختار هوئین‌های گیاه جو مشخص کرد. ژن‌های HORVU2Hr1G126720، HORVU1Hr1G078050 و HORVU7Hr1G106900 فاقد هر گونه موتیف محافظت‌شده‌ای بودند. نتایج این بررسی نشان داد که موتیف‌های محافظت‌شده تنها در دمین Lyz-like هوئین‌ها قرار داشته و دمین هوئین فاقد این موتیف‌ها بود. این مورد شاید به‌علت طول کوتاه دمین‌های هوئین در ساختار پروتئین‌های هوئین جو باشد. نتایج تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی هوئین‌های گیاه جو نشان داد که این پروتئین‌ها به دو گروه کلی تقسیم‌بندی می‌شوند. در درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده، هوئین‌های دارای دمین هوئین تنها و یا چندتایی با هم در یک گروه و هوئین‌های دارای دمین هوئین به‌همراه دمین Lyz-like با هم در یک گروه قرار گرفتند. چنین روندی در پژوهش‌های قبلی نیز مشاهده شده است و هوئین‌های شناسایی شده از گیاهان مختلف نیز به دو گروه کلی تقسیم‌بندی شده‌اند (Andreev *et al.*, 2012; Berthelot *et al.*, 2016a; Berthelot *et al.*, 2016b; Porto *et al.*, 2012; Saeed *et al.*, 2016; Slavokhotova *et al.*, 2017).

ضدمیکروبی در فضای خارج سلولی، برای مبارزه با این عوامل بیماری‌زا ضروری است (Drikvand *et al.*, 2019). بررسی خصوصیات فیزیکوشیمیایی نشان داد که هوئین‌های شناسایی شده در جو نیز از نظر جرم مولکولی، pH ایزوالکتریک، شاخص ناپایداری، شاخص و GRAVY مشابه با سایر هوئین‌های گیاهی هستند. در مطالعه حاضر، هوئین‌های HORVU2Hr1G085280، HORVU0Hr1G016310 و HORVU7Hr1G113270 و HORVU2Hr1G126740 به‌علت pH ایزوالکتریک پایین‌تر از ۷ دارای خاصیت اسیدی بودند و بقیه‌ی هوئین‌ها با pH ایزوالکتریک بالاتر از ۷ خاصیت بازی نشان می‌دهند. بار مثبت به هوئین‌ها اجازه می‌دهد تا با غشاهای دارای بار منفی بیمارگرها برهم‌کنش کنند. از طرفی، هوئین‌های با بار منفی احتمالاً از طریق مسیرهای دیگری و یا در شرایط pH خاصی که بار خالص آن‌ها را مثبت می‌کند با غشای بیمارگرها برهم‌کنش می‌کنند (Yeaman and Yount, 2003). شاخص آلفاتیک به حجم نسبی زنجیره‌های جانبی اسیدهای آمینه والین، آلانین، ایزولوسین و لوسین گفته می‌شود و همبستگی مستقیمی با پایداری حرارتی یک پروتئین دارد (Ikai, 1980). این شاخص برای پروتئین‌های مقاوم به حرارت حدود ۱۰۰ است (Moghadam *et al.*, 2016). شاخص آلفاتیک محاسبه شده برای هوئین‌های شناسایی شده گیاه جو در محدوده‌ای قرار دارد که نشان‌دهنده‌ی پایداری دمایی نسبتاً مناسبی در این پروتئین‌ها است. این پایداری دمایی به‌طور عمده دلیل فراوانی بالای اسیدآمینه آلانین و تا حدودی لوسین و والین در ساختار این پروتئین‌ها است.

شاخص ناپایداری میزان ثبات یک پروتئین را بر اساس ترکیب اسیدهای آمینه موجود در آن پیش‌بینی می‌کند. اگر این شاخص کمتر از ۴۰ باشد نشان‌دهنده‌ی پایداری پروتئین است (Guruprasad *et al.*, 1990). شاخص ناپایداری محاسبه شده برای هوئین‌های گیاه جو (به‌جز HORVU3Hr1G064470 و HORVU2Hr1G126720) نشان‌دهنده‌ی پایداری مناسب این پروتئین‌ها بود. با توجه

تجزیه و تحلیل نواحی پروموتوری ژنهای هوئین گیاه جو نشان داد که عناصر تنظیمی مرتبط با رشد و نمو، عناصر تنظیمی پاسخ به هورمون‌ها و عناصر تنظیمی پاسخ به تنش‌ها به ترتیب بیشترین فراوانی را در نواحی پروموتوری ژنهای هوئین گیاه جو دارند. عنصر تنظیمی G-Box که بیشترین فراوانی را در بین عناصر تنظیمی مرتبط با رشد و نمو موجود در پروموتور ژنهای هوئین داشت، نقش مهمی را در پاسخ به نور، شرایط بی‌هوازی و هورمون‌های اتیلن، متیل جاسمونات و آبسزیک اسید بازی می‌کند (Menkens *et al.*, 1995). عناصر ABRE، CGTCA-motif و TGACG-motif که بیشترین فراوانی را از بین عناصر پاسخ به هورمون موجود در پروموتور ژنهای هوئین داشتند، به طور معمول در بالادست ژنهای مرتبط با تنش‌های محیطی زیستی و غیرزیستی وجود دارند (Kaur *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2016; Pandey *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2011). در نهایت، عناصر ARE و MBS که بیشترین فراوانی را از بین عناصر تنظیمی پاسخ به تنش‌ها داشتند، نقش مهمی در پاسخ به تنش‌های مختلف زیستی و غیرزیستی بازی می‌کنند (Kaur *et al.*, 2017). بر اساس نتایج مطالعات پیشین، هوئین‌ها به طور عمده در فرآیندهای دفاعی، پاسخ به تنش‌های محیطی، تخریب کیتین، متابولیسم قندها، انتقال پروتون یا فرآیند انتقال سیگنال دخیل هستند (Berthelot *et al.*, 2016b; Wang *et al.*, 2013)؛ بنابراین، وجود چنین عناصر تنظیمی در ساختار این ژن‌ها ضروری به نظر می‌رسد.

نتایج کلی بررسی بیان بافتی هوئین‌های جو مشخص کرد که این ژن‌ها در بافت ریشه و اندام‌های زایشی بیان بالاتری را نسبت به سایر بافت‌ها نشان دادند. نتایج مطالعات دیگر نیز نشان داده است که هوئین‌ها همانند سایر لکترین‌ها در ریشه و اندام‌های زایشی میزان بیان بالایی دارند (Saeed *et al.*, 2016). خاک محل تجمع اغلب بیمارگرهای گیاهی است و ریشه‌های گیاهان اولین اندام‌هایی هستند که با بیمارگرها رو به رو می‌شوند (Graham and Strauss, 2021)؛ بنابراین، گیاهان با تولید پروتئین‌های ضد میکروبی مانند هوئین‌ها، به مقابله با

بیمارگرهای خاک‌زاد می‌پردازند. در پژوهشی میزان و روند بیان دیفنسین‌ها در ریشه‌های هیدروپونیک در مقایسه با ریشه‌های رشد یافته در خاک تفاوت قابل توجهی نشان داد (Drikvand *et al.*, 2019). این نتایج مشخص می‌کند که هوئین‌ها و سایر پپتیدهای ضد میکروبی در اندام‌هایی که بیشتر در معرض حمله بیمارگرها هستند (مانند ریشه‌ها و همچنین اندام‌های حساسی مانند اندام‌های زایشی) میزان بیان بیشتری دارند تا بتوانند به مقابله با بیمارگرها بپردازند (Berthelot *et al.*, 2016b; Drikvand *et al.*, 2019; Saeed *et al.*, 2016).

بررسی میزان بیان هوئین‌های گیاه جو تحت تنش‌های مختلف نشان داد که پاسخ ژنهای هوئین به تنش‌های زیستی بیشتر از تنش‌های غیرزیستی بود. هوئین‌ها به طور گسترده‌ای در تمام سلسله‌ی گیاهی وجود دارند و به خانواده بزرگ پروتئین‌های ضد عوامل بیماری‌زا تعلق دارند (Berthelot *et al.*, 2016b). در پژوهش دیگری، تنش‌های شوری و دمایی باعث القای بیان ژنهای هوئین در گیاه گندم شدند (Andreev *et al.*, 2012). پژوهش سعید و همکاران (Saeed *et al.*, 2016) نشان داد که ژنهای هوئین گیاه توت به علت دارا بودن عناصر تنظیمی خاص در ساختار پروموتور خود به تنش‌های سرما، زخم‌شدگی و همچنین هورمون‌های جاسمونیک اسید و سالیسیلیک اسید که پیام‌رسان‌های مرتبط با تنش‌های زیستی هستند، پاسخ داده و دچار تغییرات بیان می‌شوند. شواهد دیگر نشان می‌دهد که بیان ژن هوئین در برنج تراریخته باعث ایجاد مقاومت گیاهان تراریخت در مقابل بیماری بلاست برنج می‌شود (Lee and Raikhel, 1995; Van Parijs *et al.*, 1991). همچنین در پژوهش ون پارچیجس (Van Parijs *et al.*, 1991) اثرات ضدقارچی وسیع هوئین‌ها مورد تأیید قرار گرفت. نتایج مطالعه کانرار و همکاران (Kanrar *et al.*, 2002) نشان داد که افزایش در بیان ژنهای هوئین در گیاه خردل سیاه باعث افزایش مقاومت گیاهان تراریخت در برابر بیماری بلایت می‌شود. برخی پاسخ‌های گیاهی نسبت به تنش‌های محیطی

زیستی آن‌ها تا حد زیادی ناشناخته باقی مانده است. با توجه به اطلاعات ما، مطالعه حاضر اولین گزارش از جداسازی و شناسایی اعضای خانواده ژنی هوئین در گیاه جو است. در این مطالعه یک تحلیل جامع شامل تجزیه و تحلیل ساختار ژنی، تجزیه و تحلیل ساختار پروتئین، پیش‌بینی دمین‌های عملکردی، موتیف‌های محافظت‌شده، توالی سیگنال پپتید، پیش‌بینی محل تجمع سلولی، تجزیه و تحلیل ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی پروتئینی، تجزیه و تحلیل پروموتور و نواحی تنظیمی، تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک، پیش‌بینی ویژگی ضد میکروبی و تجزیه و تحلیل بیان ژن روی خانواده ژنی هوئین گیاه جو انجام شد. نتایج نشان داد که هوئین‌های گیاه جو مانند سایر هوئین‌های گیاهی، بدون ایترون و یا دارای تنها یک ایترون هستند و وجود سیگنال پپتید ترشحی، تجمع خارج سلولی، وجود دمین‌های عملکردی ChtBD1 در همه آن‌ها و دمین عملکردی Lyz-like در برخی از آن‌ها، وجود اسیدهای آمینه سیستم محافظت‌شده، وجود پیوندهای دی‌سولفیدی، فعالیت ضد میکروبی و بیان حداکثری در ریشه و اندام‌های زایشی و همچنین بیان در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی از دیگر ویژگی‌های این پروتئین‌ها است. اطلاعات جامع موجود در مطالعه حاضر درک ما را در مورد اثر ژن‌های هوئین در فرایندهای زیستی گیاه مانند رشد و نمو و همچنین پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی افزایش می‌دهد.

سپاسگزاری

این پژوهش در قالب طرح پژوهشی شماره ۲۵۱۱/د/۳۹۱۳ با استفاده از اعتبارات پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد خرم‌آباد انجام شده است. مؤلفان از معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد خرم‌آباد بابت حمایت از این مطالعه سپاسگزاری می‌نمایند.

اختصاصی بوده و برخی دیگر بین تنش‌های زیستی و غیرزیستی مشترک هستند. در این بین مولکول‌ها و پروتئین‌های انتقال‌دهنده پیام مانند اجزای آبشار پروتئین کیناز فعال شده با میتوزن (MAPK) ممکن است به عنوان نقاط مشترک در مسیرهای انتقال پیام تنش‌های زیستی و غیرزیستی عمل کرده و باعث پاسخ مشترک ژن‌هایی مانند هوئین‌ها به هر دوی تنش‌های زیستی و غیرزیستی شوند (Andreev et al., 2012; Chinnusamy et al., 2004). در مطالعه حاضر، برخی هوئین‌ها مانند ژن‌های HORVU5Hr1G098470، HORVU2Hr1G126720 و HORVU7Hr1G107000 تحت تأثیر هیچ‌یک از شرایط تنش قرار نگرفتند و بیان آن‌ها تغییری نداشت. این قبیل ژن‌ها ممکن است برای پاسخ به شرایط زیستی متفاوتی غیر از تنش‌های محیطی اختصاصی شده باشند و یا صرفاً در یک بافت و یا اندام خاص بیان نشان دهند. از طرفی، بیان این ژن‌ها ممکن است در شرایط تنش طولانی مدت تغییر پیدا کند.

نتایج تحلیل بیوانفورماتیکی ویژگی‌های ضد میکروبی هوئین‌های گیاه جو، وجود این ویژگی را در تمام ژن‌های مورد بررسی، پیش‌بینی کرد. طبق نتایج به دست آمده می‌توان گفت که هوئین‌های جو دارای خاصیت ضدقارچی و همچنین ضدباکتریایی هستند و این ویژگی به طور عمده به دمین عملکردی هوئین آن‌ها ارتباط دارد. مطالعات مشابه وجود ویژگی‌های ضد میکروبی هوئین در سایر گیاهان را تأیید می‌کند (Damme et al., 1998; Martins et al., 1996; Van Parijs et al., 1991; Xiang et al., 2004).

تاکنون علی‌رغم تحقیقات گسترده بر روی جو (Shuorvazdi et al., 2014; Khodaei et al., 2015; Salami et al., 2016; Ebrahimi et al., 2016)، مطالعات کمی بر روی پپتیدهای ضد میکروبی در این گیاه صورت گرفته است و نقش‌های

References

- Agrawal, S., Acharya, D., Adholeya, A., Barrow, C.J. and Deshmukh, S.K. (2017). Nonribosomal peptides from marine microbes and their antimicrobial and anticancer potential. *Frontiers in Pharmacology*, **8**: 828.
- Andreev, Y.A., Korostyleva, T.V., Slavokhotova, A.A., Rogozhin, E.A., Utkina, L.L., Vassilevski, A.A., Grishin, E.V., Egorov, T.A. and Odintsova, T.I. (2012). Genes encoding Hevein-like defense peptides in wheat: distribution, evolution, and role in stress response. *Biochimie*, **94**: 1009-1016.

- Bailey, T.L., Johnson, J., Grant, C.E. and Noble, W.S. (2015). The MEME suite. *Nucleic Acids Research*, **43**: 39-49.
- Beintema, J.J. (1994). Structural features of plant chitinases and chitin-binding proteins. *FEBS Letters*, **350**: 159-163.
- Berthelot, K., Lecomte, S., Couлары-Salin, B., Bentaleb, A. and Peruch, F. (2016a). Hevea brasiliensis proHevein possesses a conserved C-terminal domain with amyloid-like properties in vitro. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, **1864**: 388-399.
- Berthelot, K., Peruch, F. and Lecomte, S. (2016b). Highlights on Hevea brasiliensis (pro) Hevein proteins. *Biochimie*, **127**: 258-270.
- Bowdish, D.M., Davidson, D.J., Lau, Y.E., Lee, K., Scott, M.G. and Hancock, R.E. (2005). Impact of LL-37 on anti-infective immunity. *Journal of Leukocyte Biology*, **77**: 451-459.
- Bulet, P., Stöcklin, R. and Menin, L. (2004). Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunological Reviews*, **198**: 169-184.
- Chang, W.C., Lee, T.Y., Huang, H. D., Huang, H.Y. and Pan, R.L. (2008). PlantPAN: Plant promoter analysis navigator, for identifying combinatorial cis-regulatory elements with distance constraint in plant gene groups. *BMC Genomics*, **9**: 1-14.
- Chinnusamy, V., Schumaker, K. and Zhu, J.K. (2004). Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signalling in plants. *Journal of Experimental Botany*, **55**: 225-236.
- Choon Koo, J., Jin Chun, H., Cheol Park, H., Chul Kim, M., Duck Koo, Y., Cheol Koo, S., Mi Ok, H., Jeong Park, S., Lee, S.H. and Yun, D.J. (2002). Over-expression of a seed specific Hevein-like antimicrobial peptide from Pharbitis nil enhances resistance to a fungal pathogen in transgenic tobacco plants. *Plant Molecular Biology*, **50**: 441-452.
- Damme, E.J.V., Peumans, W.J., Barre, A. and Rougé, P. (1998). Plant lectins: a composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. *Critical Reviews in Plant Sciences*, **17**: 575-692.
- Doyle, J. (1991). *DNA Protocols for Plants in Molecular Techniques in Taxonomy*. Springer, New York, USA.
- Drikvand, R.M., Sohrabi, S.M. and Samiei, K. (2019). Molecular cloning and characterization of six defensin genes from lentil plant (*Lens culinaris* L.). *3 Biotech*, **9**(3): 104.
- Ebrahimi, M.A., Mohammadian, R. and Khalili, M. (2016). Estimation of genetic correlation, heritability and grouping of barley doubled haploid lines based on indicators related to germination under salt stress. *Plant Genetic Researches*, **3**(1): 29-44 (In Persian).
- Eleftherianos, I., Zhang, W., Heryanto, C., Mohamed, A., Contreras, G., Tettamanti, G., Wink, M. and Bassal, T. (2021). Diversity of insect antimicrobial peptides and proteins-A functional perspective: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, **191**: 277-287.
- Elsbach, P. (2003). What is the real role of antimicrobial polypeptides that can mediate several other inflammatory responses? *Journal of Clinical Investigation*, **111**(11): 1643-1645.
- Epand, R.M. (2016). *Host Defense Peptides and Their Potential as Therapeutic Agents*, Springer, New York, USA.
- Finn, R.D., Coghill, P., Eberhardt, R.Y., Eddy, S.R., Mistry, J., Mitchell, A.L., Potter, S.C., Punta, M., Qureshi, M. and Sangrador-Vegas, A. (2016). The Pfam protein families database: towards a more sustainable future. *Nucleic Acids Research*, **44**: 279-285.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S.e., Wilkins, M.R., Appel, R.D. and Bairoch, A. (2005) *Protein identification and analysis tools on the ExPASy server*. Springer, New York, USA.
- Gentles, A.J. and Karlin, S. (1999). Why are human G-protein-coupled receptors predominantly intronless? *Trends in Genetics*, **15**: 47-49.
- Goodstein, D.M., Shu, S., Howson, R., Neupane, R., Hayes, R.D., Fazo, J., Mitros, T., Dirks, W., Hellsten, U. and Putnam, N. (2012). Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. *Nucleic Acids Research*, **40**: 1178-1186.
- Goyal, R.K. and Mattoo, A.K. (2016) *Plant Antimicrobial Peptides in Host Defense Peptides and Their Potential as Therapeutic Agents*. Springer, New York, USA.
- Graham, J.H. and Strauss, S.L. (2021) *Biological control of soilborne plant pathogens and nematodes in Principles and Applications of Soil Microbiology*. Elsevier, Amsterdam, NL.
- Guruprasad, K., Reddy, B.B. and Pandit, M.W. (1990). Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition: a novel approach for predicting in vivo stability of a protein from its primary sequence. *Protein Engineering, Design and Selection*, **4**: 155-161.
- Hetrick, K.J. and van der Donk, W.A. (2017). Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural product discovery in the genomic era. *Current Opinion in Chemical Biology*, **38**: 36-44.

- Horton, P., Park, K.J., Obayashi, T., Fujita, N., Harada, H., Adams-Collier, C. and Nakai, K. (2007). WoLF PSORT: protein localization predictor. *Nucleic Acids Research*, **35**: 585-587.
- Ikai, A. (1980). Thermostability and aliphatic index of globular proteins. *The Journal of Biochemistry*, **88**: 1895-1898.
- Iseli, B., Boller, T. and Neuhaus, J.M. (1993). The N-terminal cysteine-rich domain of tobacco class I chitinase is essential for chitin binding but not for catalytic or antifungal activity. *Plant Physiology*, **103**: 221-226.
- Jones, P., Binns, D., Chang, H.Y., Fraser, M., Li, W., McAnulla, C., McWilliam, H., Maslen, J., Mitchell, A. and Nuka, G. (2014). InterProScan 5: genome-scale protein function classification. *Bioinformatics*, **30**: 1236-1240.
- Käll, L., Krogh, A. and Sonnhammer, E.L. (2007). Advantages of combined transmembrane topology and signal peptide prediction—the Phobius web server. *Nucleic Acids Research*, **35**: 429-432.
- Kanrar, S., Venkateswari, J.C., Kirti, P.B. and Chopra, V.L. (2002). Transgenic expression of Hevein, the rubber tree lectin, in Indian mustard confers protection against *Alternaria brassicae*. *Plant Science*, **162**: 441-448.
- Kaur, A., Pati, P.K., Pati, A.M. and Nagpal, A.K. (2017). In-silico analysis of cis-acting regulatory elements of pathogenesis-related proteins of *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa*. *PLoS One*, **12**: e0184523.
- Khademi, M. and Nazarian-Firouzabadi, F. (2019). Expression and antimicrobial activity analysis of dermaseptin B1 recombinant peptides in tobacco transgenic plants. *Plant Genetic Researches*, **6**(1): 139-150 (In Persian).
- Khaliluev, M., Mamonov, A., Smirnov, A., Kharchenko, P. and Dolgov, S. (2011). Expression of genes encoding chitin-binding proteins (PR-4) and Hevein-like antimicrobial peptides in transgenic tomato plants enhanced resistance to *Phytophthora infestans*. *Russian Agricultural Sciences*, **37**: 297-302.
- Khodaei, S., Mohammadi, S.A. and Sadeghzadeh, B. (2015). QTL mapping of phosphorus concentration and content on shoot of barley. *Plant Genetic Researches*, **1**(2): 15-24 (In Persian).
- Knyazev, A.V., Ishmayana, S., Soedjanaatmadja, U.M.S., Lelet, M.I., Shipilova, A.S., Knyazeva, S.S., Amosov, A.A. and Shushunov, A.N. (2019). Comprehensive thermodynamic and structural study of Hevein. *Journal of Chemical Thermodynamics*, **131**: 168-174.
- Kouzai, Y. and Saito, A. (2013). Organ-and stage-specific expression of the lectin gene in tomato. *Bulletin of the Shizuoka Institute of Science and Technology*, **21**: 27-33.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. and Tamura, K. (2018). MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, **35**: 1547.
- Kyte, J. and Doolittle, R.F. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of Molecular Biology*, **157**: 105-132.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A. and Lopez, R. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, **23**(3): 2947-2948.
- Laukkanen, M.L., Mäkinen-Kiljunen, S., Isoherranen, K., Haahtela, T., Söderlund, H. and Takkinen, K. (2003). Hevein-specific recombinant IgE antibodies from human single-chain antibody phage display libraries. *Journal of Immunological Methods*, **278**: 271-281.
- Laverty, G., Gorman, S.P. and Gilmore, B.F. (2011). The potential of antimicrobial peptides as biocides. *International Journal of Molecular Sciences*, **12**: 6566-6596.
- Le, C.F., Fang, C.M. and Sekaran, S.D. (2017). Intracellular targeting mechanisms by antimicrobial peptides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **61**: e02340.
- Lee, H. and Raikhel, N. (1995). ProHevein is poorly processed but shows enhanced resistance to a chitin-binding fungus in transgenic tomato plants. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira de Pesquisas Medicas e Biologicas*, **28**: 743-750.
- Lee, H., Broekaert, W., Raikhel, N. and Lee, H. (1991). Co- and post-translational processing of the Hevein preproprotein of latex of the rubber tree (*Hevea brasiliensis*). *Journal of Biological Chemistry*, **266**: 15944-15948.
- Lescot, M., Déhais, P., Thijs, G., Marchal, K., Moreau, Y., Van de Peer, Y., Rouzé, P. and Rombauts, S. (2002). PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. *Nucleic Acids Research*, **30**: 325-327.
- Li, J., Hu, S., Jian, W., Xie, C. and Yang, X. (2021). Plant antimicrobial peptides: structures, functions, and applications. *Botanical Studies*, **62**(1): 5.
- Lipkin, A., Anisimova, V., Nikonorova, A., Babakov, A., Krause, E., Bienert, M., Grishin, E. and Egorov, T. (2005). An antimicrobial peptide Ar-AMP from amaranth (*Amaranthus retroflexus* L.) seeds. *Phytochemistry*, **66**: 2426-2431.

- Liu, S., Li, M., Su, L., Ge, K., Li, L., Li, X., Liu, X. and Li, L. (2016). Negative feedback regulation of ABA biosynthesis in peanut (*Arachis hypogaea*): a transcription factor complex inhibits AhNCED1 expression during water stress. *Scientific Reports*, **6**: 1-11.
- Loo, S., Tay, S.V., Kam, A., Tang, F., Fan, J.S., Yang, D. and Tam, J.P. (2021). Anti-fungal Hevein-like peptides biosynthesized from quinoa cleavable hololactins. *Molecules*, **26**(19): 5909.
- Marchler-Bauer, A., Derbyshire, M.K., Gonzales, N.R., Lu, S., Chitsaz, F., Geer, L.Y., Geer, R.C., He, J., Gwadz, M. and Hurwitz, D.I. (2014). CDD: NCBI's conserved domain database. *Nucleic Acids Research*, **43**: 222-226.
- Martins, J.C., Maes, D., Loris, R., Pepermans, H.A., Wyns, L., Willem, R. and Verheyden, P. (1996). ¹H NMR Study of the Solution Structure of Ac-AMP2, a Sugar Binding Antimicrobial Protein Isolated from *Amaranthus caudatus*. *Journal of Molecular Biology*, **258**: 322-333.
- McGinnis, S. and Madden, T.L. (2004). BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools. *Nucleic Acids Research*, **32**: 20-W25.
- Menkens, A.E., Schindler, U. and Cashmore, A.R. (1995). The G-box: a ubiquitous regulatory DNA element in plants bound by the GBF family of bZIP proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, **20**: 506-510.
- Milne, L., Bayer, M., Rapazote-Flores, P., Mayer, C.D., Waugh, R. and Simpson, C.G. (2021). EoRNA, a barley gene and transcript abundance database. *Scientific Data*, **8**: 1-10.
- Moghadam, A., Niazi, A., Afsharifar, A. and Taghavi, S.M. (2016). Expression of a recombinant anti-HIV and anti-tumor protein, MAP30, in nicotiana tobacum hairy roots: A pH-stable and thermophilic antimicrobial protein. *PLoS One*, **11**: e0159653.
- Nielsen, H. (2017). Predicting Secretory Proteins with SignalP. *Protein Function Prediction: Methods and Protocols*, **1611**: 59-73.
- Nongonierma, A.B. and FitzGerald, R.J. (2016). Strategies for the discovery, identification and validation of milk protein-derived bioactive peptides. *Trends in Food Science & Technology*, **50**: 26-43.
- Odintsova, T., Shcherbakova, L., Slezina, M., Pasechnik, T., Kartabaeva, B., Istomina, E. and Dzhavakhiya, V. (2020). Hevein-like antimicrobial peptides wamps: Structure-function relationship in antifungal activity and sensitization of plant pathogenic fungi to tebuconazole by WAMP-2-derived peptides. *International Journal of Molecular Sciences*, **21**: 1-26.
- Pandey, S., Subramanaym Reddy, C., Yaqoob, U., Negi, Y. and Arora, S. (2015). Insilico analysis of cis acting regulatory elements CAREs in upstream regions of ascorbate glutathione pathway genes from *oryza sativa*. *Biochem Physiol*, **4**: 2.
- Peumans, W.J. and Van Damme, E. (1995). Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiology*, **109**: 347.
- Porto, W.F., Souza, V.A., Nolasco, D.O. and Franco, O.L. (2012). In silico identification of novel Hevein-like peptide precursors. *Peptides*, **38**: 127-136.
- Pruitt, K.D., Tatusova, T. and Maglott, D.R. (2005). NCBI Reference Sequence (RefSeq): a curated non-redundant sequence database of genomes, transcripts and proteins. *Nucleic Acids Research*, **33**: 501-504.
- Punginelli, D., Schillaci, D., Mauro, M., Deidun, A., Barone, G., Arizza, V. and Vazzana, M. (2022). The potential of antimicrobial peptides isolated from freshwater crayfish species in new drug development: A review. *Developmental & Comparative Immunology*, **126**: 104258.
- Saeed, B., Baranwal, V.K. and Khurana, P. (2016). Identification and expression profiling of the lectin gene superfamily in mulberry. *The Plant Genome*, **9**(2): 1-13.
- Salami, R., Mohammadi, S.A., Ghafarian, S. and Moghaddam, M. (2016). Expression analysis of HvTIP2 and HvTIP4 in sensitive and tolerant barley genotypes under salinity stress. *Plant Genetic Researches*, **2**(2): 1-14 (In Persian).
- Salamov, A.A. and Solovyev, V.V. (2000). Ab initio gene finding in *Drosophila* genomic DNA. *Genome Research*, **10**: 516-522.
- Santos-Silva, C.A.d., Tricarico, P.M., Vilela, L.M.B., Roldan-Filho, R.S., Amador, V.C., d'Adamo, A.P., Rêgo, M.d.S., Benko-Iseppon, A.M. and Crovella, S. (2021). Plant antimicrobial peptides as potential tool for topic treatment of hidradenitis suppurativa. *Frontiers in Microbiology*, **12**: 795217.
- Shcherbakova, L., Odintsova, T., Pasechnik, T., Arslanova, L., Smetanina, T., Kartashov, M., Slezina, M. and Dzhavakhiya, V. (2020). Fragments of a wheat Hevein-like antimicrobial peptide augment the inhibitory effect of a triazole fungicide on spore germination of *Fusarium oxysporum* and *Alternaria solani*. *Antibiotics*, **9**: 1-17.
- Shen, G., Pang, Y., Wu, W., Miao, Z., Qian, H., Zhao, L., Sun, X. and Tang, K. (2005). Molecular cloning, characterization and expression of a novel jasmonate-dependent defensin gene from *Ginkgo biloba*. *Journal of Plant Physiology*, **162**: 1160-1168.

- Shukurov, R., D Voblikova, V., Nikonorova, A.K., Komakhin, R.A., V Komakhina, V., A Egorov, T., V Grishin, E. and V Babakov, A. (2012). Transformation of tobacco and Arabidopsis plants with *Stellaria media* genes encoding novel Hevein-like peptides increases their resistance to fungal pathogens. *Transgenic Research*, **21**: 313-325.
- Shukurov, R., Voblikova, V., Nikonorova, A., Egorov, T.A., Grishin, E. and Babakov, A. (2010). Increase of resistance of Arabidopsis thaliana plants to phytopathogenic fungi expressing Hevein-like peptides from weed plant *Stellaria media*. *Russian Agricultural Sciences*, **36**: 265-267.
- Shuorvazdi, A., Mohammadi, S.A., Norozi, M. and Sadeghzadeh, B. (2014). Molecular Analysis of genetic diversity and relationships of barley landraces based on microsatellite markers. *Plant Genetic Researches*, **1(1)**: 51-64 (In Persian).
- Singh, N. and Abraham, J. (2014). Ribosomally synthesized peptides from natural sources. *The Journal of Antibiotics*, **67**: 277-289.
- Slavokhotova, A., Shelenkov, A., Andreev, Y.A. and Odintsova, T. (2017a). Hevein-like antimicrobial peptides of plants. *Biochemistry (Moscow)*, **82(13)**: 1659-1674.
- Thevissen, K., Kristensen, H.-H., Thomma, B.P., Cammue, B.P. and François, I.E. (2007). Therapeutic potential of antifungal plant and insect defensins. *Drug Discovery Today*, **12**: 966-971.
- Van Holle, S. and Van Damme, E.J. (2015). Distribution and evolution of the lectin family in soybean (*Glycine max*). *Molecules*, **20**: 2868-2891.
- Van Parijs, J., Broekaert, W.F., Goldstein, I.J. and Peumans, W.J. (1991). Hevein: an antifungal protein from rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) latex. *Planta*, **183**: 258-264.
- Vanzolini, T., Bruschi, M., Rinaldi, A.C., Magnani, M. and Fraternali, A. Multitalented synthetic antimicrobial peptides and their antibacterial, antifungal and antiviral mechanisms. *International Journal of Molecular Sciences*, **23(1)**: 545.
- Vila-Farres, X., Chu, J., Inoyama, D., Ternei, M.A., Lemetre, C., Cohen, L.J., Cho, W., Reddy, B.V.B., Zebroski, H.A. and Freundlich, J.S. (2017). Antimicrobials inspired by nonribosomal peptide synthetase gene clusters. *Journal of the American Chemical Society*, **139**: 1404-1407.
- Waghu, F.H., Gopi, L., Barai, R.S., Ramteke, P., Nizami, B. and Idicula-Thomas, S. (2014). CAMP: Collection of sequences and structures of antimicrobial peptides. *Nucleic Acids Research*, **42**: 1154-1158.
- Wang, X., Shi, M., Wang, D., Chen, Y., Cai, F., Zhang, S., Wang, L., Tong, Z. and Tian, W.M. (2013). Comparative proteomics of primary and secondary luteoids reveals that chitinase and glucanase play a crucial combined role in rubber particle aggregation in *Hevea brasiliensis*. *Journal of Proteome Research*, **12**: 5146-5159.
- Wang, Y., Chang, R.Y.K., Britton, W.J. and Chan, H.K. (2022). Advances in the development of antimicrobial peptides and proteins for inhaled therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **180**: 114066.
- Wang, Y., Liu, G.J., Yan, X.F., Wei, Z.G. and Xu, Z.R. (2011). MeJA-inducible expression of the heterologous JAZ2 promoter from Arabidopsis in *Populus trichocarpa* protoplasts. *Journal of Plant Diseases and Protection*, **118**: 69-74.
- Xiang, Y., Huang, R.H., Liu, X.Z., Zhang, Y. and Wang, D.C. (2004). Crystal structure of a novel antifungal protein distinct with five disulfide bridges from *Eucommia ulmoides* Oliver at an atomic resolution. *Journal of Structural Biology*, **148**: 86-97.
- Yan, H., Dai, X., Feng, K., Ma, Q. and Yin, T. (2016). IGDD: a database of intronless genes in dicots. *BMC Bioinformatics*, **17**: 1-6.
- Yeaman, M.R. and Yount, N.Y. (2003). Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacological Reviews*, **55**: 27-55.
- Yu, C.S., Cheng, C.W., Su, W.C., Chang, K.C., Huang, S.W., Hwang, J.K. and Lu, C.H. (2014). CELLO2GO: a web server for protein subCELLular LOcalization prediction with functional gene ontology annotation. *PLoS One*, **9**: e99368.
- Zhang, L.J. and Gallo, R.L. (2016). Antimicrobial peptides. *Current Biology*, **26**: R14-R19.
- Zhang, Q.Y., Yan, Z.B., Meng, Y.M., Hong, X.Y., Shao, G., Ma, J.J., Cheng, X.R., Liu, J., Kang, J. and Fu, C.Y. (2021). Antimicrobial peptides: mechanism of action, activity and clinical potential. *Military Medical Research*, **8**: 48.
- Zou, M., Guo, B. and He, S. (2011). The roles and evolutionary patterns of intronless genes in deuterostomes. *Comparative and Functional Genomics*, **2011**: 680673.

