

همسانه‌سازی و بررسی ژن‌های شبه سایکلوتاید در گندم نان (*Triticum aestivum*)

Cloning and characterization of cyclotide-like genes in wheat

سمیرا ترکمن^۱، بهمن بهرام‌نژاد^{۱*}، جلال رستم‌زاده^۱، نازنین کودری^۱

۱- به‌ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشیار، استادیار دانشگاه کردستان

Torkaman S¹, Bahramnejad B^{*1}, Rostamzadeh J¹, Kodari N¹

1- MSc Student, Associate Professor, Assistant Professor, University of Kurdistan,
Sanandaj, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: b.bahramnejad@uok.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۳/۷/۱۰ - تاریخ پذیرش: ۹۵/۳/۱۱)

چکیده

ژن‌های شبه‌سایکلوتاید در گیاهان خانواده گرامینه با روش‌های بیوانفورماتیکی شناسایی شده‌اند. در این پژوهش بر اساس توالی نواحی حفاظت‌شده شبه‌سایکلوتایدهای احتمالی برای گرامینه‌ها، آغازگر طراحی شد و با استفاده از تکنیک RACE-PCR ۳' ژن‌های کدکننده پروتئین‌های شبه-سایکلوتاید در گندم در وکتور pTZ57R/T همسانه‌سازی و تعیین توالی شدند. مقایسه توالی‌های به‌دست آمده با توالی موجود در پایگاه داده PGI نشان داد تعداد ۱۱ توالی نوکلئوتیدی شبه‌سایکلوتاید از گندم به‌دست آمده است. ترجمه توالی‌های نوکلئوتیدی نشان داد که ۱۱ توالی مربوط به دو ژن هستند که *Tacyc11* و *Tacyc12* نام‌گذاری شدند. این توالی‌ها شباهت زیادی (۸۶ تا ۹۲ درصد) با توالی‌های شبه‌سایکلوتاید در خانواده گرامینه داشتند. تعداد نوکلئوتیدهای این توالی‌ها بین ۴۰۲ تا ۴۷۹ متغیر بود. بیان نیمه کمی *Tacyc12* در اندام‌های ریشه، کلتوتیل، ساقه، برگ و گل‌آذین با استفاده از RT-PCR نیمه کمی مطالعه شد. کلتوتیل بیش‌ترین میزان بیان نسبی و ساقه کم‌ترین میزان بیان نسبی را نشان داد. هم‌چنین تغییرات بیان ژن شبه‌سایکلوتاید در اندام برگ با تیمار اسید سالیسیلیک مطالعه شد و بعد از ۲۴ ساعت افزایش معنی‌داری در بیان دیده شد.

واژه‌های کلیدی

بیان نسبی
ژن شبه‌سایکلوتاید
گندم
۳'RACE-PCR

مقدمه

سایکلوتایدها پروتئین‌هایی غیر عادی هستند که اولین بار در سال ۱۹۷۰ در مطالعه خواص دارویی گیاهی آفریقایی به نام کالاتا کالاتا^۱ شناسایی شدند (Gran 1973). ساختار پروتئینی در سایکلوتایدها خاص و منحصر به فرد است و باعث پایداری پروتئین در برابر تجزیه شیمیایی، دمایی و آنزیمی می‌شود (Colgrave and Craik 2004). انتهای کربوکسیلی و آمینی این پروتئین‌ها توسط پیوند پپتیدی به هم متصل شده و در نتیجه ساختاری حلقوی پدید آورده‌اند (فاقد انتها هستند). این پروتئین-های حلقوی به طور تقریبی دارای ۳۰ اسید آمینه هستند که در بین آن‌ها ۶ اسید آمینه سیستمین وجود دارد که دو به دو توسط پیوند دی‌سولفیدی به هم متصل شده‌اند و در نتیجه پروتئین سایکلوتاید دارای سه پیوند دی‌سولفید است که ساختاری به نام گره‌های سیستمینی حلقوی^۲ به وجود می‌آورند که تعداد آن‌ها ۶ حلقه است (Craik et al. 1999). ساختار حلقوی نقش مهمی در فعالیت و پایداری پروتئین بازی می‌کند و وجود گره‌های سیستمینی حلقوی برای ثبات دمایی مهم است (Colgrave and Craik 2004). تولید سایکلوتایدها در سطح کلان در آزمایشگاه به وسیله کشت سلولی و هم‌چنین بیان در گیاهان تراریخت برای استفاده‌های دارویی، حشره‌کشی و مبارزه با آفات و بیماری‌ها انجام شده و به تولید انبوه رسیده است (Oguis et al. 2015).

سایکلوتایدها به دو زیر خانواده مهم موبیوس^۳ و بریسلت^۴ تقسیم می‌شوند. این تقسیم‌بندی بر اساس کنفورماسیون اسید آمینه پرولین در حلقه پنجم است. حضور پیوند پپتیدی به حالت سیس باعث چرخش در ساختمان پروتئین می‌شود. زیر خانواده موبیوس دارای پیوند پپتیدی به حالت سیس و زیر خانواده بریسلت فاقد این ساختار هستند (Craik et al. 1999; Jennings et al. 2008). به طور تقریبی دو سوم سایکلوتایدهای شناسایی شده متعلق به زیر خانواده بریسلت هستند (Zhang et al. 2006). بریسلت‌ها دارای تعداد زیادی اسیدهای آمینه کاتیونی در حلقه ۵، ۶ و هم‌چنین دارای یک مارپیچ α در حلقه ۳ هستند. حلقه ۱ و ۴ در هر دو زیر

خانواده حفظ شده‌است. ژن‌های کدکننده سایکلوتایدها شامل قسمت‌هایی به نام ناحیه کدکننده سیگنال پپتید، ناحیه ابتدایی، انتهای آمینی، ناحیه سایکلوتایدی و دم می‌باشند. این ژن‌ها ابتدا به صورت پیش‌پروتئین سایکلوتاید با سایز متغیر ۲۰۷-۹۸ آمینواسید بیان شده و پروتئین اولیه حاصل در نتیجه برش آنزیمی و تشکیل باندهای دی‌سولفید، سپس اتصال ابتدا و انتهای آن به هم، به صورت حلقوی و بالغ در می‌آیند (Zhang et al. 2009). انتهای آمینی دارای ساختار مارپیچ آلفا است و در تبدیل پیش-پروتئین سایکلوتاید به سایکلوتاید بالغ نقش دارد.

سایکلوتایدها از پروتئین‌های دفاعی گیاهان محسوب می‌شوند و دارای فعالیت ضد میکروبی می‌باشند. علاوه بر تنش‌های زیستی، بیان این ژن‌ها در تنش‌های غیر زیستی نیز گزارش شده است. برای مثال بیان ژن‌های سایکلوتاید در گیاه *Oldenlandia affinis* هنگام حمله عامل بیماری‌زا افزایش یافت. در گیاه *baoshanensis* Zhang et al. (2006). علاوه بر این‌ها نقش‌های بیولوژیک زیادی برای سایکلوتایدها گزارش شده‌است که از جمله آن‌ها می‌توان به فعالیت‌های ضد آیدز (Gruber et al. 2007)، جلوگیری از اتصال ناقل عصبی نوروتنسنین^۵ به غشا سلولی (Chen et al. 2005)، تسهیل زایمان (Gran 1973)، نابودی گلبول‌های قرمز (Schopke et al. 1993)، فعالیت علیه سلول‌های سرطانی (Lindholm et al. 2002) و فعالیت‌های حشره‌کشی (Jennings et al. 2008) اشاره کرد.

سایکلوتایدها تاکنون در سه خانواده بنفشیان^۶، روناس^۷ و کدوئیان^۸ گزارش شده‌اند (Herrmann and Burman 2008). مطالعات بعدی وجود توالی‌های شبه سایکلوتایدی در گرامینه‌هایی نظیر گندم، ذرت و برنج را نشان داد (Mulvenna et al. 2012). مهم‌ترین شباهت شبه سایکلوتایدها با سایکلوتایدها در حلقه شماره یک ساختار سه بعدی می‌باشد که شامل چهار اسید آمینه حفظ شده از جمله اسید گلوتامیک است که در همه سایکلوتایدها کاملاً حفظ شده‌است و در توالی‌های شبه

³ Neurotensin inhibitory⁶ Violaceae⁷ Robiaceae⁸ Cucurbitaceae¹ *Oldenlandia affinis*² Cyclic Cystine Knot (CCK)³ Mobius⁴ Bracelet

تاریکی کشت شد و سه روز پس از جوانه‌زنی، از کلئوپتیل‌ها نمونه‌برداری صورت گرفت و بلافاصله داخل ازت مایع قرار داده شد.

استخراج RNA و سنتز cDNA

استخراج RNA از نمونه‌های برداشت شده با استفاده از کیت AccuZol™ (شرکت BIONEER) انجام شد و با کمک ژل آگارز یک درصد کیفیت RNA استخراج شده مورد بررسی قرار گرفت و کمیت RNA با دستگاه نانودراپ (WPA Biowave II، انگلستان) تعیین شد.

به‌منظور سنتز cDNA از کیت Revert Aid first strand cDNA synthesis (شرکت Fermentase) و آغازگر واجد یک لنگر oligo dT-anchor (این آغازگر با توجه به این‌که انتهای RNA پلی A می‌باشد پلی T است و یک توالی خاص غیر ژنومی نیز به آن متصل شده تا در مرحله بعدی امکان تکثیر توالی‌های موردنظر وجود داشته باشد. لازم به ذکر است این توالی با توالی آغازگر لنگر anchor یکسان می‌باشد) که توالی آن در جدول ۱ ارائه شده، استفاده شد.

سایکلو تاید نیز وجود دارد. این اسید آمینه در پایداری ساختار سایکلو تاید‌ها بسیار مهم است (Mulvenna et al. 2012). هر یک از شبه سایکلو تاید‌های شناسایی شده در گرامینه‌ها حاوی توالی رمزکننده پپتید، علامت و پیش‌پروتئین می‌باشند. این پیش‌پروتئین شامل ۳۶-۲۶ اسید آمینه است که حاوی شش اسید آمینه سیستئین بسیار شبیه با سایکلو تاید‌های شناخته شده می‌باشند. در ذرت، گندم و ارزن به ترتیب ده، پنج و یک توالی شبه سایکلو تاید احتمالی بر اساس کارهای بیوانفورماتیکی در پایگاه داده^۱ PGI گزارش شده است (Mulvenna et al. 2012). تا پایان این مطالعه هیچ گزارشی در مورد همسازسازی و مطالعه ژن‌های شبه سایکلو تایدی در غلات منتشر نشده و موارد فوق بر اساس کارهای بیوانفورماتیکی در پایگاه داده EST این گیاهان بوده است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

بذر رقم سرداری گندم در شرایط اتاقک رشد با دمای کمتر از ۱۳ درجه سانتی‌گراد و شرایط نوری ۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت

^۱ Plant gene index: Dana Farber Cancer Institute (DFCI) Gene Index

جدول ۱- توالی آغازگرهای مورد استفاده برای همسازسازی و بیان نیمه کمی شبه سایکلو تاید‌های گندم

نام آغازگر	توالی آغازگر	دمای اتصال °C
WF (Specific)	GAAAGCTAGCTAGCTAGCATGG	۵۴
WR (Reverse)	CAATAAGTTGAACACCACCG	۵۰
Oligo dT anchor primer	GACCACGCGTATCGATGTCGACTTTTTTTTTTTTTTTTTT	۵۴
PCR anchor primer	GACCACGCGTATCGATGTCGAC	۵۴
M13 (Forward)	GTAAAACGACGGCCAGT	۵۰
M13 (Reverse)	CAGGAAACAGCTATGAC	۵۰
RT-WF (Forward)	TTGGCGCTGCTGCTTCTC	۵۳
RT-WR (Reverse)	CAATAAGTTGAACACCACCG	۵۳
WF-Ref (Forward)	GTATGGTCAAGGCTGGTTTT	۵۳
WR-Ref (reverse)	GAGGATACCCCTTTGGATTG	۵۳

طراحی آغازگر

توالی‌های نوکلئوتیدی شبه سایکلو تایدی گندم (TC431678)، سورگوم (TC122732) و ذرت (TC509834, TC510947)، PGI (TC503118، TC510820) موجود در سایت (<http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/>) با جستجوی کلمه کلیدی سایکلو تاید به دست آمدند. توالی‌ها با برنامه Clustal W هم‌ردیف شدند و بر اساس یک ناحیه مشابه و حفظ‌شده در تمامی توالی‌ها طراحی آغازگر صورت گرفت.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز 3'RACE بر اساس دستورالعمل Bahramnejad et al. (2010) انجام گرفت. واکنش در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل دو میکرولیتر از cDNA سنتز شده، ۱۲ میکرولیتر Mastermix (Fermentase)، هشت میکرولیتر آب فاقد نوکلئاز، ۱/۵ میکرولیتر از آغازگرهای اختصاصی و معکوس هر دو با غلظت ۱۰۰ میکرومولار انجام شد. شرایط زمانی و دمایی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز به صورت ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه برای شروع و سپس ۳۵ چرخه شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه، ۵۳ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه و در نهایت ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه بود. تفکیک محصول PCR بر روی ژل آگارز یک درصد با رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید (۱mg/lit) صورت گرفت و سپس باند مورد نظر از ژل جدا شد. خالص‌سازی باند مورد نظر از ژل آگارز توسط کیت Nucleic Acid Extraction (شرکت Vivantis) صورت گرفت. برای تایید وجود قطعه مورد نظر از ژل آگارز استفاده شد و هم‌چنین غلظت آن توسط نانودراپ اندازه‌گیری شد. DNA جدا شده از ژل، با استفاده از کیت (Fermentase, K1214 cloningInsTAclone™ PCR) همسازسازی شد.

به منظور تهیه سلول‌های مستعد باکتری *E. coli* از سویه DH5α و روش کلرید کلسیم استفاده شد (Sambrook and Russell 2001). تراریختی به روش فیزیکی ذوب و انجماد انجام گرفت، در این روش ۱۰۰ میکرولیتر از سلول مستعد با یک میکرولیتر از پلاسمید حاوی ژن مورد نظر مخلوط شد و به مدت ۹۰ ثانیه در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد و سپس بلافاصله به مدت ۳ دقیقه روی یخ قرار داده شد. سپس ۵۰۰ میکرولیتر، LB مایع به آن اضافه شد و در

انکوباتور (۳۷°C، ۱۸۰rpm، به مدت ۱-۲h) قرار داده شد. پس از مدت زمان مورد نظر باکتری‌ها روی محیط کشت LB جامد حاوی آمپی سیلین (غلظت ۱۰۰ ml/mg)، X-gal و IPTG کشت و پس از گذشت ۱۲h کلونی‌های آبی و سفید مشاهده شدند. برای تایید تراریختی مقداری از یک کلونی سفید در ۵۰ میکرولیتر آب مقطر حل و در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه حرارت داده شد. سپس دو میکرولیتر از مایع رویی به عنوان الگو در واکنش PCR استفاده شد و محصول PCR پس از انجام واکنش و برای مشاهده اندازه قطعه DNA مورد نظر و تایید حضور ژن در کلونی مربوطه بر روی ژل آگارز یک درصد بارگذاری شد. کلونی‌های سفیدی که حضور ژن مورد نظر در آن‌ها تایید شد، بر روی LB جامد حاوی آمپی سیلین (غلظت ۱۰۰ml/mg) واکنش شدند و پس از یک شبانه روز رشد برای استخراج پلاسمید به کار رفتند. استخراج پلاسمید به روش لیز قلیایی صورت گرفت. یک کلونی از باکتری‌های واکنش شده را به ۱/۵ml LB مایع منتقل و داخل انکوباتور به مدت یک شبانه روز قرار داده سپس باکتری رشد یافته را سانتریفیوژ (۱ min، ۴°C و ۱۲۰۰۰ rpm) نموده و رسوب به دست آمده در ۱۰۰μl محلول سرد شامل ۵۰mM گلوکز، ۵۰mM Tris-Hcl (pH=۸)، ۱۰ EDTAmM (pH=۸) حل و به مدت پنج دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. سپس ۲۰۰μl از محلول حاوی NaOH ۰/۲ مولار و SDS یک درصد به آن اضافه و به آرامی مخلوط و پنج دقیقه روی یخ گذاشته شد. سپس ۱۵۰μl استات پتاسیم ۳M (pH ۴/۸) اضافه کرده و ۱۵ دقیقه روی یخ قرار داده شد. پس از سپری شدن زمان لازم به مدت پنج دقیقه در دمای ۴°C و ۱۲۰۰۰rpm سانتریفیوژ شد. مایع رویی به تیوب جدید منتقل و هم‌حجم آن ایزوپروپانول اضافه شد. پس از مخلوط کردن به مدت ۳۰ دقیقه در فریزر -۲۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و بعد سانتریفیوژ (۲۰min، دمای ۴°C و ۱۲۰۰۰rpm) انجام و رسوب به دست آمده با اتانول ۷۰ درصد شستشو داده شد. بعد از خشک شدن رسوب، ۵۰μl آب استریل به آن اضافه و رسوب حاصل حل شد. برای تایید حضور پلاسمید از ژل آگارز یک درصد استفاده و کمیت پلاسمیدها با نانودراپ سنجیده شد. ۰/۵μl از پلاسمید استخراج شده با آب استریل رقیق شد. ۰/۵μl از آن به عنوان الگو در

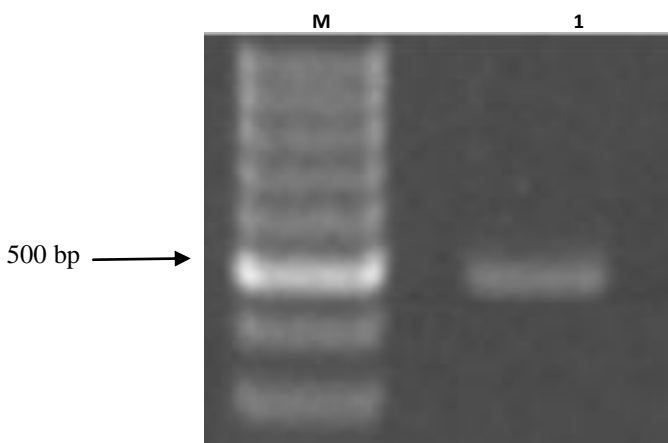
محصول PCR بر روی ژل آگارز یک درصد با رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید صورت گرفت.

تیمار گیاه با اسید سالیسیلیک

یک هفته پس از جوانه‌زنی، اسید سالیسیلیک با غلظت ۰/۳ میلی-مولار بر روی برگ‌های تعدادی از گیاهان اسپری شد و سپس گیاهان مذکور در محفظه بسته و شفاف نگهداری شدند. نمونه-برداری از برگ‌ها در مراحل پیش از اعمال تیمار، ۲۴ ساعت بعد از تیمار و ۴۸ ساعت بعد از تیمار صورت گرفت و نمونه‌ها داخل ازت مایع نگهداری شدند سپس استخراج RNA از نمونه‌های مذکور انجام شد و پس از تعیین کمیت و کیفیت RNA استخراج شده، تمامی نمونه‌ها هم غلظت شدند.

نتیجه

به‌منظور انجام روش RACE-PCR^۳ ابتدا cDNA توسط آغازگر dT anchorOligo توسط آنزیم ترانسکریپتاز معکوس ساخته شد. سپس واکنش PCR با استفاده از آغازگر اختصاصی WF و PCR anchor انجام شد. نتیجه تکثیر به‌صورت یک تک باند با اندازه تقریبی ۵۰۰ bp بود که با اندازه تقریبی شبه سایکلوتایدها در سایر گیاهان مطابقت داشت (شکل ۱).



شکل ۱- محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (۱) پس از انجام روش RACE-PCR^۳ و خط‌کش ژنی (M) روی ژل آگارز یک درصد.

واکنش PCR (۸ μl master mix، ۱۰ μl آب، ۱/۵ μl آغازگر مستقیم و ۱/۵ μl آغازگر معکوس اختصاصی (با غلظت ۱۰۰) استفاده و محصول PCR بر روی ژل آگارز یک درصد بارگذاری و با مشاهده باند مورد نظر صحت پلاسمیدهای نو ترکیب تایید شد.

تعیین توالی و آنالیز بیوانفورماتیکی

تعداد ۱۲ پلاسمید نو ترکیب تایید شده، برای تعیین توالی به شرکت Bioneer (کره جنوبی) فرستاده شد. توالی‌های به‌دست آمده ابتدا در پایگاه اطلاعاتی NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)، بلاست^۱ شدند و پس از تایید این‌که توالی‌های به‌دست آمده شبه‌سایکلوتاید هستند، اقدام به ترجمه توالی‌ها (<http://web.expasy.org/translate/>) شد و توالی‌های نوکلئوتیدی و اسید آمینه‌ای آن‌ها توسط پایگاه اطلاعاتی (http://www.ebi.ac.uk) هم‌ردیف و درخت تکاملی توسط نرم-افزار MEGA4 رسم شد.

طراحی آغازگر برای بررسی بیان نیمه کمی و واکنش RT-PCR در این مطالعه از ژن آلفا توبولین به‌عنوان مرجع استفاده شد (جدول ۱). برای طراحی آغازگر مستقیم و معکوس اختصاصی توالی‌های نوکلئوتیدی حاصل از پلاسمیدهای نو ترکیب که حضور ژن مورد نظر در آن‌ها به‌وسیله توالی‌یابی تایید شده بود در سایت Clustal W (<http://www.ebi.ac.uk>) هم‌ردیف شدند و بر اساس نواحی حفظ‌شده در ابتدا و انتها، آغازگرهای مستقیم و معکوس طراحی شدند.

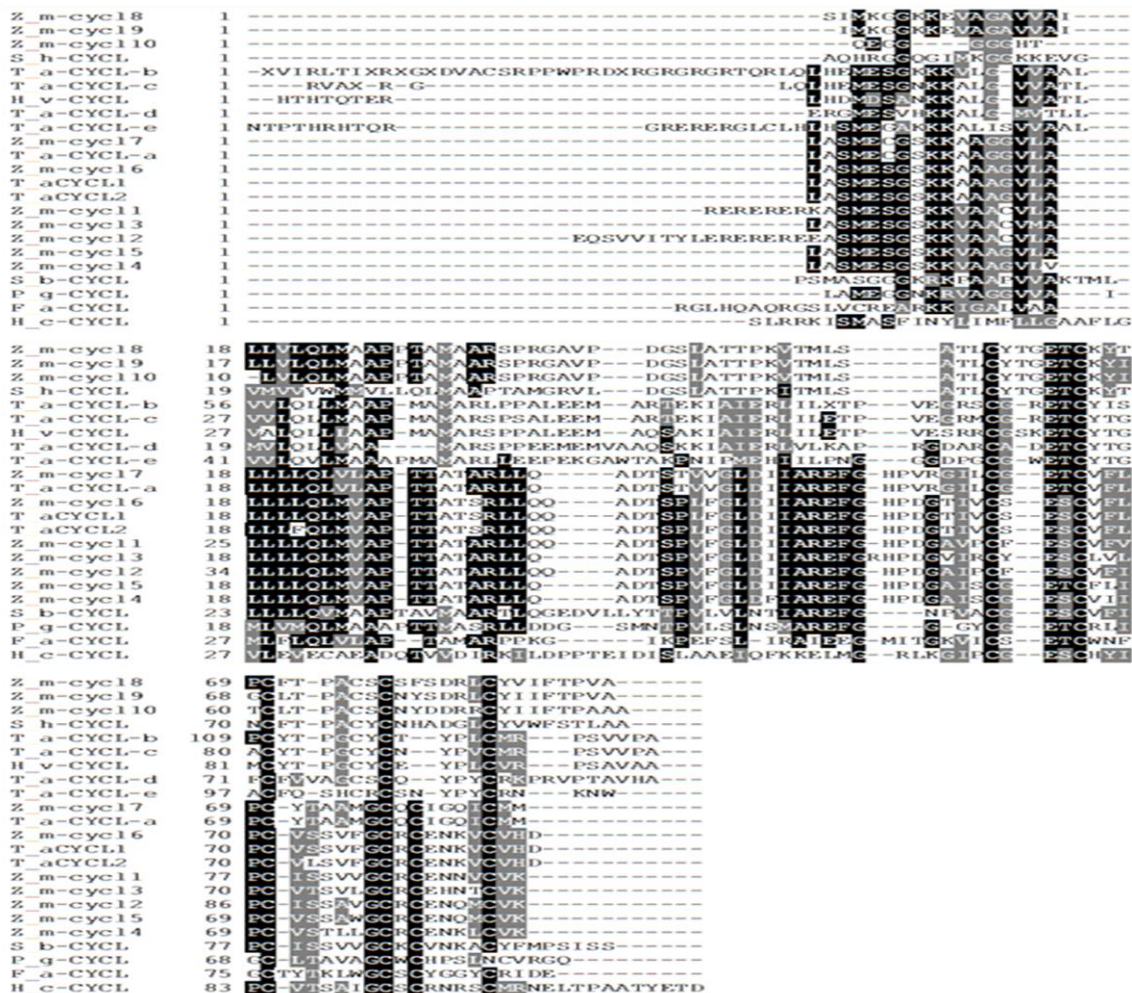
واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتری شامل دو میکرولیتر از cDNA سنتز شده، ۱۲ میکرولیتر Mastermix (Fermentase)، ۸ میکرولیتر آب فاقد نوکلئاز، یک میکرولیتر آغازگر مستقیم اختصاصی، یک میکرولیتر آغازگر معکوس اختصاصی، ۰/۵ میکرولیتر آغازگر مستقیم کنترل و ۰/۵ میکرولیتر آغازگر معکوس کنترل انجام شد. شرایط زمانی و دمایی PCR به‌صورت ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه برای شروع و سپس ۲۶ چرخه شامل ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه، ۵۳ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه و در نهایت یک مرحله ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه بود. بررسی

¹ Basic Local Alignment Search Tool

جدول ۲- مشخصات شبه‌سایکلو تاید های حاضر میزان مشابهت و یکسانی و توالی که با آن بیشترین میزان مشابهت را دارد.

نام سایکلو تاید	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Identity	مشابهت با کد دسترسی
Tacycl1	446	561	96%	8e ⁻¹²²	96%	92%	NM 00115121
Tacycl2	492	492	100%	1e ⁻¹³⁵	86%	86%	BT009169.1
Tacycl3	503	503	100%	5e ⁻¹³⁹	87%	87%	BT009169.1
Tacycl4	542	542	98%	1e ⁻¹⁵⁰	88%	88%	BT009169.1
Tacycl5	516	516	100%	7e ⁻¹⁴³	87%	87%	BT009169.1
Tacycl6	525	525	100%	1e ⁻¹⁴⁵	87%	87%	BT009169.1
Tacycl7	525	525	100%	1e ⁻¹⁴⁵	87%	87%	BT009169.1
Tacycl8	520	520	100%	5e ⁻¹⁴⁴	87%	87%	BT009169.1
Tacycl9	520	520	100%	5e ⁻¹⁴⁴	87%	87%	BT009169.1
Tacycl10	510	510	98%	3e ⁻¹⁴¹	87%	87%	BT009169.1
Tacycl11	449	449	87%	5e ⁻¹²³	92%	92%	NM 001151219

مشخصات	دسترسی شماره
Zea mays uncharacterized LOC100277726 (LOC100277726) , mRNA	NM 001151219.1
Triticum aestivum clone w11n.pk0099.g7: fis, full insert mRNA	BT009169.1



شکل ۲- هم‌ردیفی توالی‌های پروتئینی شبه‌سایکلو تایدی احتمالی موجود در پایگاه‌های داده با توالی‌های پروتئینی شبه‌سایکلو تایدی گندم در مطالعه حاضر. نواحی حفظ شده با کمک نرم‌افزار آنالین ۳,۲۱ boxshad موجود در سایت (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html) رنگی شده‌اند. نواحی سیاه کاملاً حفظ شده، نواحی خاکستری تا حدی حفظ شده و نواحی سفید حفظ نشده نیستند.

کوتاه به طول سه اسید آمینه. اولین سیستئین در جایگاه ۶۲، دومین سیستئین در جایگاه ۶۶، سومین سیستئین در جایگاه ۷۱، چهارمین سیستئین در جایگاه ۷۸، پنجمین سیستئین در جایگاه ۸۰ و ششمین سیستئین در جایگاه ۸۵ ترتیب آمینواسیدی پروتئین قرار گرفته است.

در هم‌ردیفی توالی‌های آمینواسیدی سایکلو تاید های مطالعه حاضر با کل توالی‌های پروتئینی سایکلو تایدی مربوط به گرامینه‌های موجود در پایگاه‌های داده که در شکل ۲ نشان داده شده است، نواحی سیاه مربوط به نواحی کاملاً حفظ شده، نواحی خاکستری نواحی تا حدی حفظ شده و نواحی سفید مربوط به نواحی کمتر حفظ شده می‌باشد.

جدول ۳ خصوصیات شبه‌سایکلو تاید های این مطالعه و کل شبه‌سایکلو تاید های موجود در پایگاه داده را نشان می‌دهد. در بین توالی‌های به دست آمده توالی *Tacycl11* با ۴۰۲ bp کم‌ترین تعداد نوکلئوتید و توالی *Tacycl10* با ۴۷۹ bp بیش‌ترین تعداد نوکلئوتید را در مطالعه حاضر دارا بودند. البته کم‌ترین توالی نوکلئوتیدی گزارش شده بر اساس کارهای بیوانفورماتیکی در بین گرامینه‌ها مربوط به توالی *Sbcycl* با ۳۸۳ bp بود و بیش‌ترین تعداد نوکلئوتید (۹۰۷ bp) مربوط به توالی *Tacyclb* بود. طول توالی‌های پروتئینی احتمالی به دست آمده از این مطالعه ۸۸ اسید آمینه بود. بیش‌ترین تعداد اسید آمینه در بین گرامینه‌ها مربوط به *Zmcycl19* با ۱۷۱ اسید آمینه است و کم‌ترین تعداد اسید آمینه نیز مربوط به توالی *Zmcycl10* با ۸۴ اسید آمینه بود. لازم به ذکر است توالی‌هایی که تعداد اسید آمینه مشابه داشتند نقطه ایزوالکتریک و وزن مولکولی مشابهی نیز دارند. همه توالی‌های این مطالعه دارای ۸۸ آمینواسید می‌باشند و وزن مولکولی آن‌ها نیز تقریباً یکسان است (۹/۲۴ کیلودالتون) در ضمن نقطه ایزوالکتریک یکسانی (۵/۴۸) نیز دارند.

در دندروگرام توالی‌های آمینواسیدی مطالعه حاضر با توالی‌های آمینواسیدی خانواده گرامینه موجود در پایگاه داده، هر دو توالی مطالعه حاضر با توالی‌های *Zmcycl15*، *Zmcycl16* و *Zmcycl6* در یک شاخه قرار گرفتند (شکل ۳). ساختار ۳ بعدی پروتئین *Tacycl1* رسم شد.

محصول PCR از ژل جدا سازی و در ناقل کلون شد. پس از تایید به وسیله آغازگرها، ۱۱ پلاسمید نو ترکیب برای توالی‌یابی ارسال شد. بلاست توالی‌های به دست آمده با توالی‌های موجود در پایگاه داده NCBI نشان داد که این توالی‌ها شبه‌سایکلو تاید هستند (جدول ۲). درصد تشابه شبه‌سایکلو تاید های به دست آمده با شبه‌سایکلو تاید های موجود در پایگاه داده از ۸۷ تا ۹۶ درصد و میزان e-value از $1e^{-150}$ تا $8e^{-122}$ متغیر بود. این توالی‌ها پس از تایید شبه‌سایکلو تاید بودن به صورت *Tacycl11* نام گذاری شدند. *Ta* ابتدای نام علمی گندم^۱ و *cycl* نشان‌دهنده شبه‌سایکلو تاید بودن^۲ و شماره‌ها ترتیب توالی‌ها می‌باشد. با توجه به دندروگرامی که بر اساس توالی‌های نوکلئوتیدی ترسیم شد، ۱۱ توالی نوکلئوتیدی حاصل از مطالعه حاضر در دو گروه قرار گرفتند. *Tacycl2* در یک شاخه و بقیه توالی‌ها در گروه دیگر قرار گرفتند. با توجه به دندروگرامی که بر اساس توالی‌های اسید آمینه‌ای ترسیم شد، توالی‌های پروتئینی نیز به دو دسته تقسیم شدند. *Tacycl2* در یک شاخه و بقیه در شاخه دیگر قرار گرفتند. در دندروگرام‌های بعدی به جای دسته دوم فقط *Tacycl1* ذکر گردید زیرا توالی‌های پروتئینی بقیه اعضای این گروه نیز ۱۰۰ درصد شبیه *Tacycl1* بود. توالی پروتئینی *Tacycl1* و *Tacycl2* در دو اسید آمینه متفاوت بودند. جایگاه شماره ۲۱ در *Tacycl1*، با اسید آمینه L اشغال شده است. در صورتی که در همین جایگاه در توالی *Tacycl2* اسید آمینه F قرار گرفته است. در جایگاه شماره ۷۳ در *Tacycl1* اسید آمینه S قرار دارد در صورتی که همین جایگاه در توالی *Tacycl2* با اسید آمینه L اشغال شده است.

مشابه سایر شبه‌سایکلو تاید ها هر یک از توالی‌های پروتئینی از چهار قسمت تشکیل شده است: توالی سیگنال مختص شبکه اندوپلاسمی^۳ شامل ۳۴ اسید آمینه، توالی پیش‌پروتئین^۴ شامل ۲۶ اسید آمینه، توالی سایکلو تایدی^۵ شامل ۲۵ اسید آمینه و شش سیستئین حفظ شده شبیه توالی‌های سایکلو تایدی و توالی دم^۶

¹*Triticum aestivum*

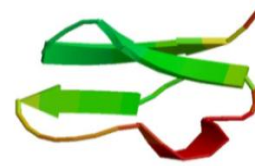
²Cyclotide-like

³ Signal sequence

⁴ Putative precursor

⁵ Cyclotide domain

⁶Tail



شکل ۴- ساختار ۳ بعدی پروتئین Tacycl2 با استفاده از نرم‌افزار swiss model در سایت <http://swissmodel.expasy.org>

این پروتئین دارای سه صفحه بتا و یک آلفا هلیکس بوده که مشابه سایر شبه‌سایکلوتایدها می‌باشد (شکل ۴).

بررسی بیان نیمه کمی ژن شبه‌سایکلوتاید Tacycl2 در اندام‌های مختلف گندم

میزان بیان ژن شبه‌سایکلوتاید در اندام‌های ریشه، گل آذین، ساقه، برگ و کلئوپتیل با استفاده از آغازگرهای اختصاصی RT-WF و RT-WR و آغازگرهای Ref-WF و Ref-WR برای ژن آلفا

توبولین به‌عنوان کنترل مطالعه شد. با توجه به شکل ۵ کلئوپتیل بیش‌ترین میزان بیان نسبی و ساقه کم‌ترین میزان بیان نسبی را نشان داد. برگ و گل آذین حد متوسطی از این دو را نشان دادند. لازم به ذکر است در هر ستون اندازه باند پایین ۱۵۰bp و مربوط به ژن کنترل و باند بالا حدود ۳۵۰bp مربوط به بیان ژن مورد نظر در اندام‌های مختلف بوده است.

بررسی بیان نیمه کمی ژن شبه‌سایکلوتاید Tacycl2 در اثر تیمار با اسید سالیسیلیک

با توجه به شکل ۶ مشاهده می‌شود که بیان نسبی ژن شبه‌سایکلوتاید در برگ بعد از ۲۴ ساعت تیمار با اسید سالیسیلیک افزایش معنی‌داری نسبت به شاهد (عدم اعمال تیمار اسید سالیسیلیک) داشت در حالی که در زمان ۴۸ ساعت بعد از تیمار میزان بیان با کاهش همراه بود.

جدول ۳- مشخصات شبه‌سایکلوتایدهای به‌دست آمده در این مطالعه و شبه‌سایکلوتایدهای احتمالی موجود در پایگاه داده

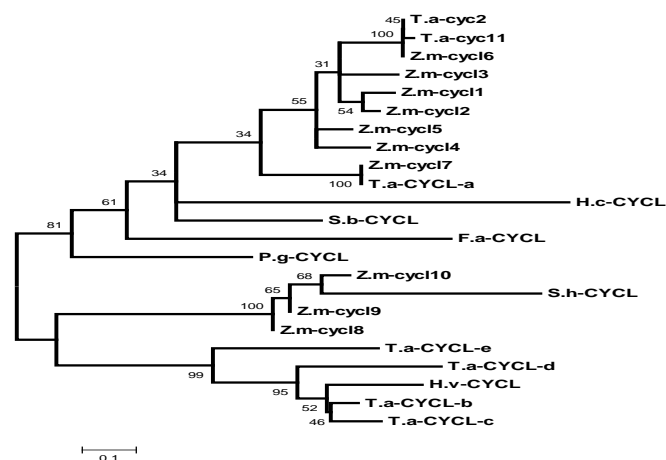
شماره دسترسی	وزن ملکولی (کیلودالتون) ^۱	نقطه ایزوالکتریک ^۱	تعداد اسید آمینه	تعداد نوکلئوتید bp	گیاه مرجع	نام سایکلوتاید
Current study	24.9	5.48	88	404	<i>Triticum aestivum</i>	Tacycl1
Current study	3.9	5.48	88	466	<i>aestivum.T</i>	Tacycl2
Current study	24.9	5.48	88	470	<i>aestivum.T</i>	Tacycl3
Current study	۴2.9	5.48	88	476	<i>aestivum.T</i>	Tacycl4
Current study	24.9	5.48	88	464	<i>aestivum.T</i>	Tacycl5
Current study	24.9	5.48	88	466	<i>aestivum.T</i>	Tacycl6
Current study	24.9	5.48	88	459	<i>aestivum.T</i>	Tacycl7
Current study	24.9	5.48	88	466	<i>aestivum.T</i>	Tacycl8
Current study	24.9	5.48	88	466	<i>aestivum.T</i>	Tacycl9
Current study	24.9	5.48	88	479	<i>aestivum.T</i>	Tacycl10
Current study	24.9	5.48	88	402	<i>aestivum.T</i>	Tacycl11
CF060985	139.10	7.74	94	474	<i>zea mays</i>	**Zmcycl 1
CF014141	193.11	4.89	103	502	<i>maysz</i>	**Zmcycl 2
CK369406	295.9	7.75	87	505	<i>maysz</i>	**Zmcycl 3
BM379838	95.8	6.73	86	526	<i>maysz</i>	**Zmcycl 4
CF630454	985.8	5.64	86	518	<i>maysz</i>	**Zmcycl 5

CF013901	24.9	5.48	88	538	<i>mays.z</i>	**Zmcycl 6
CN070702	901.8	6.71	86	392	<i>mays.z</i>	**Zmcycl 7
BI674581	52.9	8.85	92	496	<i>mays.z</i>	**Zmcycl 8
BM080572	428.9	8.84	91	571	<i>mays.z</i>	**Zmcycl 9
CK368015	701.8	7.77	84	671	<i>mays.z</i>	**Zmcycl 10
CA617438	901.8	6.71	86	429	<i>aestivum.T</i>	#Tacycla
CK154330	419.14	9.61	130	907	<i>aestivum.T</i>	#Tacyclb
CK154890	987.10	8.30	101	889	<i>aestivum.T</i>	#Tacyclc
CA595705	53.10	8.85	96	596	<i>aestivum.T</i>	#Tacycl d
BE591233	884.12	8.95	116	466	<i>aestivum.T</i>	#Tacycl e
TC431678	901.8	6.71	86	560	<i>aestivum.T</i>	#Tacycl f
CA484712	598.9	8.34	83	792	<i>aestivum.T</i>	#Tacycl g
CA622812	638.10	6.29	103	471	<i>aestivum.T</i>	#Tacycl h
BE125990	377.10	8.91	100	383	<i>Sorghum bicolor</i>	**Sbcycl
TC122732	335.10	8.91	100	705	<i>bicolor.S</i>	#Sbcycl1
CD725989	107.9	7.79	88	503	<i>Pennisetum glaucum</i>	**Pgcycl
AL450615	052.11	6.98	102	562	<i>Hordeum vulgare</i>	**Hvcycl
CK803164	484.10	9.12	95	323	<i>Festuca arundinacea</i>	**Facycl
CA274667	085.10	8.61	94	842	<i>Saccharum hybrid cultivar</i>	**Shcycl
CB084585	377.12	5.36	102	660	<i>Hedyotis centranthoides</i>	**Hccycl

*توالی‌های شبه‌سایکلو تاید احتمالی موجود در سایت PGI

**توالی‌های گزارش شده توسط Mulvenna et al. (2006)

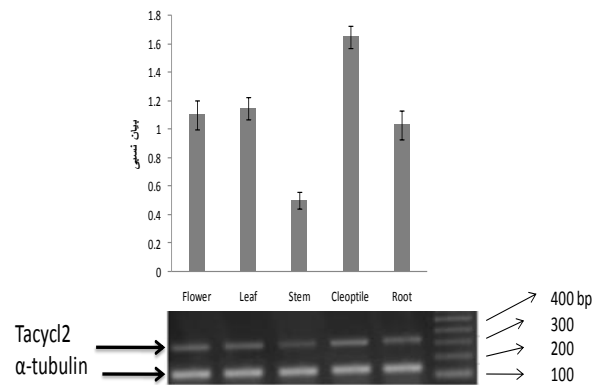
و ۲ توالی‌های پروتئینی در <http://www.expasy.org> قرار می‌گیرند و نقطه ایزوالکتریک و وزن ملکولی به دست می‌آید.



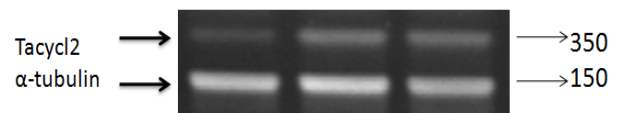
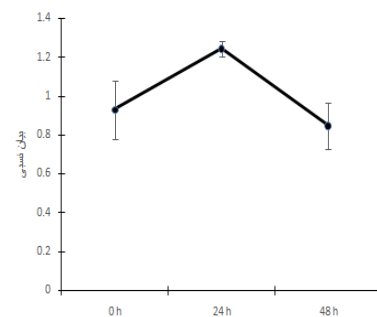
شکل ۳- دندروگرام توالی‌های پروتئینی شبه‌سایکلو تاید‌های مطالعه حاضر با توالی‌های احتمالی شبه‌سایکلو تایدی موجود در پایگاه‌های داده. توالی‌ها به وسیله برنامه ClustalW هم‌ردیف شدند و دندروگرام آن‌ها بر مبنای نزدیک‌ترین همسازگی با برنامه MEGA4 ایجاد شده است.

هم‌چنین نشان داد که شبه‌سایکلوتاییدها در اکثر اندام‌های گیاهی بیان شده‌اند. اما با توجه به دسترسی اندام‌ها و احتمال حضور بیش‌تر پروتئین‌های شبه‌سایکلوتایید در اندام‌های جوانی نظیر گیاهچه و جوانه، در این مطالعه برای همسانه‌سازی و بررسی ژن‌های شبه‌سایکلوتایید ابتدا از کلئوپتیل گندم جداسازی شدند. بانندی که از روش RACE-PCR^۳ به دست آمد حدود ۵۰۰ bp طول داشت. دامنه طول توالی نوکلئوتیدی شبه‌سایکلوتاییدهای احتمالی ۹۰۷-۳۸۳ بود. اما اکثر توالی‌ها در حدود ۵۰۰ bp طول داشتند لذا اندازه باند به‌دست‌آمده قابل قبول بود. البته طول توالی سایکلوتاییدی خانواده‌های دیگر که حاوی این پروتئین می‌باشند نیز در این دامنه قرار دارد. اندازه باند به‌دست‌آمده اولین نشانه از صحیح بودن روند مطالعه بود اما دلیل کافی برای صحت روند نمی‌باشد.

در این مطالعه ۱۱ توالی شبه‌سایکلوتایید با روش RACE-PCR^۳ به‌دست‌آمد. همه توالی‌های نوکلئوتیدی به دنباله پلی A ختم شدند که نشان از موفقیت تکنیک مورد استفاده دارد و طول کاملی از توالی ژن‌های شبه‌سایکلوتایید به‌دست‌آمد. با توجه به نوع آغازگری که طراحی شده بود دو دسته توالی نوکلئوتیدی به‌دست‌آمد. توالی *Tacycl1* و *Tacycl9* کاملاً مشابه بودند. توالی‌های *Tacycl3* و *Tacycl5* نیز در یک گروه قرار گرفتند اما باهم در حد چند نوکلئوتید اختلافات جزئی داشتند. در جایگاه ۴۵ توالی *Tacycl5* نوکلئوتید A قرار گرفت اما همین جایگاه در توالی *Tacycl3* نوکلئوتید C قرار گرفت. در جایگاه ۲۸۸ توالی *Tacycl5* نوکلئوتید T قرار گرفت اما همین جایگاه در توالی *Tacycl3* نوکلئوتید C قرار گرفت. در جایگاه ۴۵۳ توالی *Tacycl5* نوکلئوتید T قرار گرفت اما همین جایگاه در توالی *Tacycl3* نوکلئوتید G قرار گرفت. با توجه به اینکه در همه اختلافات یک باز پورین با یک پیریمیدین جایگزین شده اما این تفاوت‌ها در حدی نیست که دو توالی را از هم متمایز نماید. توالی‌های *Tacycl1* و *Tacycl11* و *Tacycl4* نیز در یک گروه قرار گرفته‌اند اما باهم اختلافات جزئی در حد تک نوکلئوتید دارند. توالی *Tacycl11* برخلاف تمام توالی‌های مطالعه حاضر با GA شروع نمی‌شود. توالی‌های *Tacycl1* و *Tacycl11* طول کوتاه‌تری (۴۰۴ و ۴۰۲) نسبت به توالی *Tacycl4* (۴۷۶) دارند. این تفاوت در



شکل ۵- نمایش بیان شبه‌سایکلوتایید *Tacycl2* در اندام‌های ریشه، گل‌آذین، ساقه، برگ و کلئوپتیل. در هر ستون باند پایین ژن کنترل آلفا توبولین و باند بالا میزان بیان در اندام خاص می‌باشد که در سه تکرار اندازه‌گیری شده‌است.



شکل ۶- نمایش بیان نسبی شبه‌سایکلوتایید *Tacycl2* در برگ گندم بعد از تیمار با اسیدسالیسیلیک. برای هر زمان سه تکرار مستقل در نظر گرفته شده‌است.

بحث

برنامه‌های غربالگری ژنومی نشان داد که در خانواده گرامینه نیز پروتئین‌های شبه‌سایکلوتایید موجود می‌باشد. این برنامه‌ها حضور ژن‌های شبه‌سایکلوتایید را در ذرت، سورگوم، گندم، جو و برنج نشان دادند (Mulvenna et al. 2012) اما تا انجام این مطالعه هیچ گزارشی از همسانه‌سازی ژن‌های شبه‌سایکلوتایید در خانواده گرامینه منتشر نشده‌است. مطالعات داده‌های EST خانواده گرامینه

مشاهده شد که مقدار بیان سایکلو تاید ها در اندام‌های مختلف متفاوت است و یک‌سری از ژن‌های سایکلو تاید فقط در برگ بیان شدند (Zhang et al. 2009). البته در مطالعات بیوانفورماتیکی صورت گرفته در مورد بیان شبه‌سایکلو تاید های احتمالی در خانواده گرامینه نیز بیان این پروتئین‌ها در اندام‌های مختلف متفاوت گزارش شده است (Mulvenna et al. 2012). اطلاعات RT-PCR نیمه کمی در این مطالعه نشان داد که توالی‌های شبه-سایکلو تاید مطالعه حاضر نیز در اندام‌های مختلف به میزان متفاوت بیان می‌شوند.

در مطالعه‌ای بر روی ذرت ژنی به نام umi11 یافت شد که در تنظیم مثبت اندام‌های پایه ساقه و تشکیل تومور تیغه برگ بعد از آلودگی با قارچ *Ustilago maydis* نقش دارد (Jennings et al. 2001; Basse 2005). ژن umi11 از لحاظ ساختاری شبیه شبه-سایکلو تاید های مطالعه حاضر می‌باشد و احتمالاً شبه-سایکلو تاید های مطالعه حاضر نیز خاصیت ضد قارچی دارند. با توجه به نتایج این مطالعه، بیش‌ترین میزان بیان شبه‌سایکلو تاید ها در کلئوپتیل تعیین شد. با توجه به آسیب‌پذیری گیاه در این مرحله و حساس بودن به محیط اطراف، حضور حداکثری این پروتئین‌ها در این اندام احتمالاً تاییدی بر نقش دفاعی آن‌ها می‌باشد. در این مطالعه حضور ژن‌های شبه‌سایکلو تاید در کلئوپتیل، ریشه، ساقه، برگ و گل‌آذین اثبات شد. اما با توجه به محدودیت‌های موجود نتوانستیم حضور ژن‌های شبه سایکلو تاید را در دانه که مهم‌ترین قسمت گندم است اثبات کنیم.

با توجه به کمبود اطلاعات در مورد بیان اختصاصی شبه-سایکلو تاید ها در اندام‌ها، تفسیر نقش‌های ممکن برای شبه-سایکلو تاید ها مشکل است. اطلاعاتی که نقش دفاعی برای سایکلو تاید ها را منطقی می‌دانند، می‌توانند به شبه‌سایکلو تاید های خانواده گرامینه نیز بسط داده شوند (Mulvenna et al. 2012). بیان سایکلو تاید ها در طول فصل متفاوت است و هم‌چنین بیان این ژن‌ها در هنگام حمله عامل بیماری‌زا بیش‌تر می‌شود (Nourse et al. 2004). در بررسی RNA استخراج شده از گیاه *Viola baoshanensis* در شرایط نرمال و تحت تنش کادمیوم گزارش شد که تعداد انواع سایکلو تاید های بیان شده در شرایط تنش بیش‌تر می‌باشد (Simonsen et al. 2005; Zhang et al. 2009). با

اندازه ممکن است معنی‌دار باشد اما شباهت این توالی‌ها در حدی است که در یک گروه قرار می‌گیرند.

توالی‌های پروتئینی نیز به دو گروه تقسیم می‌شوند. توالی *Tacycl2* در یک گروه و بقیه توالی‌ها در گروه دیگر وجود دارند. این توالی‌ها با وجود اختلافاتی که داشتند اما همه به یک توالی اسید آمینه‌ای تبدیل شدند. جایگاه شماره ۲۱ در *Tacycl1* اسید آمینه L قرار دارد در صورتی که همین جایگاه در توالی *Tacycl2* اسید آمینه F قرار گرفته است. اسید آمینه F یک اسید آمینه آروماتیک می‌باشد در صورتی که اسید آمینه L ساختار آروماتیک ندارد اما با توجه به این که اسید آمینه L و F هر دو آب‌گریز می‌باشند و نحوه قرارگیری آن‌ها در غشا به یک صورت است به نظر نمی‌رسد که این موضوع بر ساختار نهایی پروتئین‌ها اثر بگذارد. با توجه به این که این دو اسید آمینه در توالی سیگنال قرار گرفته‌اند بعید به نظر می‌رسد که روی نقش سایکلو تایدی این پروتئین‌ها اثر گذار باشند.

جایگاه شماره ۷۳ در *Tacycl1* اسید آمینه S قرار دارد در صورتی که همین جایگاه در توالی *Tacycl2* اسید آمینه L قرار گرفته است. این دو اسید آمینه در حلقه سه قسمت سایکلو تایدی قرار گرفته‌اند. اسید آمینه S آب‌دوست می‌باشد اما همان طور که ذکر شد اسید آمینه L آب‌گریز است. این تفاوت می‌تواند نقش و ساختار شبه‌سایکلو تاید را تحت تاثیر قرار دهد. اما با توجه به اینکه در سایکلو تاید ها حلقه سه یکی از نواحی است که تنوع بالایی را نشان می‌دهد پس مورد مشاهده شده طبیعی می‌باشد. همه توالی‌های پروتئینی به دست آمده از این مطالعه با توالی LASMESGSKK شروع می‌شوند. این قسمت در ناحیه سیگنال قرار دارد و در اکثر توالی‌های شبه سایکلو تایدی احتمالی خانواده گرامینه نیز وجود دارد. حفظ شدگی بالای قسمت ابتدای توالی‌ها (LASMESGSKK) در شبه سایکلو تاید های مشابه با توالی حفظ شده (AAFALPA) در قسمت ابتدای سایکلو تاید ها، همسازسازی این ژن‌ها را در سایر گرامینه‌ها امکان‌پذیر می‌سازد.

مطالعات اخیر نشان داده‌اند که بیان سایکلو تاید ها در اندام‌های مختلف و هم‌چنین با توجه به شرایط فصلی و تغییرات محیطی متفاوت است (Trabi and Craik 2002). در مطالعه‌ای با استفاده از RNA استخراج شده از برگ و ریشه *Viola baoshanensis*

شده توالی‌های شبه‌سایکلوتایید احتمالی طراحی شد. توالی‌های به- دست‌آمده به دوگروه تقسیم می‌شوند *Tacycl2* در یک گروه و بقیه توالی‌ها در گروه دیگر قرار می‌گیرند. بیان این پروتئین‌ها در ریشه، کلئوپتیل، ساقه، برگ، گل آذین بررسی شد. کلئوپتیل بیش-ترین میزان بیان نیمه کمی را نسبت به سایر اندام‌ها نشان داد. تا پایان این مطالعه هیچ گزارشی مبنی بر همسانه‌سازی توالی‌های شبه‌سایکلوتایید در خانواده گرامینه منتشر نشده‌است و بنابراین وجود شبه‌سایکلوتایید در گندم مورد تایید قرار گرفت و تمام توالی‌های این مطالعه جدید می‌باشند. با توجه تشابه شبه‌سایکلوتایدهای مطالعه حاضر با ژن *umi11* خاصیت ضد قارچی آن‌ها محتمل می‌باشد. پس از بررسی‌های بیشتر این ژن‌ها خصوصا بررسی اثرات پروتئین تخلیص شده طبیعی یا بیان شده در گیاه تراریخت روی قارچ‌ها و باکتری‌های مختلف، می‌توان از نتایج حاصل جهت تولید گیاهان تراریخت برای ایجاد مقاومت به بیماری استفاده کرد.

توجه به مطالعاتی که تاثیر مواد مختلف را روی سایکلوتایدهای خانواده بنفشیان نشان داده است، در این مطالعه نیز تاثیر اسید سالیسیلیک روی شبه‌سایکلوتایدها بررسی شد. لازم به ذکر می‌باشد این اسید نقش مهمی در ایجاد مقاومت به تنش‌های محیطی بر عهده دارد. با توجه به نقش اصلی سایکلوتایدها در دفاع از گیاه و همچنین نقش اسید سالیسیلیک در ایجاد مقاومت، منطقی به نظر می‌رسد که بیان شبه‌سایکلوتایدهای مطالعه شده افزایش یابد. اما مشاهدات این مطالعه دلیل کافی برای این مطلب نبوده و برای نتیجه‌گیری بهتر انجام مطالعات بیشتری روی بیان کمی آن مورد نیاز می‌باشد.

نتیجه‌گیری نهایی

در این مطالعه ۱۱ توالی پروتئین شبه‌سایکلوتایید از نوع شبه بریسلت از گندم به دست آمد. برای به دست آوردن ژن‌های شبه‌سایکلوتایید از روش 3'RACE-PCR استفاده شد و آغازگر اختصاصی برای ژن‌های شبه‌سایکلوتایید بر اساس نواحی حفظ-

منابع

Bahramnejad B, Goodwin PH, Zhang J, Atnaseo C, Erickson LR (2010) A comparison of two class 10 pathogenesis-related genes from alfalfa and their activation by multiple stresses and stress-related signaling molecules. *Plant Cell Reports* 29: 1235-1250.

Gran L (1973) Effect of a polypeptide isolated from Kalata-Kalata (*Oldenlandia-Affinis* DC) on estrogen dominated uterus. *Acta Pharmacologica et Toxicologica* 33: 400-408.

Colgrave ML, Craik DJ (2004) Thermal, chemical, and enzymatic stability of the cyclotide kalata B1: The importance of the cyclic cystine knot. *Biochemistry* 43: 5965-5975.

Craik DJ, Daly NL, Bond T (1999) Plant cyclotides: A unique family of cyclic and knotted proteins that defines the cyclic cystine knot structural motif. *Molecular Biology* 294: 1327-1336.

Herrmann A, Burman R (2008) The alpine violet, *Viola biflora*, is a rich source of cyclotides with potent cytotoxicity. *Phytochemistry* 69:939-952.

Jennings CV, Rosengren KJ, Daly NL, Plan M, Stevens J, Scanlon MJ (2005) Isolation, solution structure, and insecticidal activity of Kalata B2, a circular protein with a twist: Do mobius strips exist in nature? *Biochemistry* 44: 851-860.

Zhang J, Liao B, Craik DJ (2009) Identification of two suites of cyclotide precursor genes from metallophyte *Viola baoshanensis*: cDNA sequence variation, alternative

RNA splicing and potential cyclotide diversity. *Gene* 431:23-32.

Gruber CW, Cemazar M, Clark RJ, Horibe T, Renda RF, Anderson MA, Craik DJ (2007) A novel plant protein-disulfide isomerase involved in the oxidative folding of cystine knot defense proteins. *Biological Chemistry* 282: 20435-20446.

Chen B, Colgrave ML, Daly NL, Rosengren KJ, Gustafson KR, Craik DJ (2005) Isolation and characterization of novel cyclotides from *Viola hederaceae*: solution structure and anti-HIV activity of vhl-1, a leaf-specific expressed cyclotide. *Biochemistry* 280:22395-22405.

Witherup KM, Bogusky MJ, Anderson PS, Ramjit H, Ransom RW, Wood T, Sardana M (1994) Cyclopsychoptide A, a biologically active, 31-residue cyclic peptide isolated from *Psychotrialongipes*. *Natural Products* 57: 1619-1625.

Schopke TH, Agha MI, Kraft R, Otto A, Hiller K (1993) Hamolytisch aktive Komponenten aus *Viola tricolor* L. and *Viola arvensis* Murray. *Scientia Pharmaceutica* 61:145-153.

Lindholm P, Goransson U, Johansson S, Claesson P, Gullbo J, Larsson R, Bohlin L, Backlund A (2002) Cyclotides - a novel type of cytotoxic agents. *Molecular Cancer Therapeutics* 1:365-369.

Mulvenna JP, Mylne JS, Bharathi R, Burton RA, Shirley NJ, Fincher GB, Anderson MA, Craik DJ (2006) Discovery of cyclotide-like protein sequences in

Graminaceous crop plants: Ancestral precursors of circular proteins? *Plant Cell* 18: 2134-2144.

Trabi M, Craik DJ (2002) Circular proteins-no end in sight. *Trends in Biochemical Sciences* 27: 132-139.

Jennings C, West J, Waine C, Craik DJ, Anderson M (2001) Biosynthesis and insecticidal properties of plant cyclotides: The cyclic knotted proteins from *Oldenlandia affinis*. *Proceeding of the National Academy Sciences of the U. S. A.* 98: 10614-10619.

Simonsen SM, Sando L, Ireland DC, Colgrave ML, Bharathi R, Göransson U, Craik DJ (2005) A continent of plant defense peptide diversity: cyclotides in Australian *Hybanthus* (*Violaceae*). *Plant Cell* 17:3176-3189.

Basse CW (2005) Dissecting defense-related and developmental transcriptional responses of maize during *Ustilago maydis* infection and subsequent tumor

formation. *American Society of Plant Biologists* 138:1774-1784.

Raskin I (1992) Salicylate, a new plant hormone. *Plant Physiology* 99: 799-803.

Nourse A, Trabi M, Daly NL, Craik DJ (2004) A comparison of the self-association behavior of the plant cyclotides kalata B1 and kalata B2 via analytical ultracentrifugation. *Biological Chemistry* 279:562-570.

Sambrook J, Russell DW and Russell DW (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual (3-volume set)* (Vol. 999). Cold Spring Harbor, New York, Cold spring harbor laboratory press.

Oguis GK, Meng-Wei K, Craik DJ (2015). "Chapter Seven-Natural Functions and Structure-Activity Relationships of Cyclotides." *Advances in Botanical Research* 76: 187-226.

Cloning and characterization of cyclotide-like genes in wheat

Torkaman S¹, Bahramnejad B*¹, Rostamzadeh J¹, Kodari N¹

1. MSc Student, Associate Professor, Assistant Professor, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran

* Corresponding Author, Email: b.bahramnejad@uok.ac.ir

ABSTRACT

Cyclotide-like genes have been previously reported from the data mining of the NCBI nucleotide database in the Poaceae family. In the current study, we have cloned new members of the cyclotide-like gene family from wheat cDNA using 3'RACE-PCR and specific primers based on conserved region of putative *cyclotide-like* sequences. PCR positive clones were randomly picked and sequenced. Eleven cyclotide-like sequences were identified. Phylogenetic analysis of nucleotide divided them in two classes and protein analysis showed that all sequences belong to two genes designated *Tacycl1* and *Tacycl2*. Length of these sequences was 402-479nt and showed high similarity with classical *cyclotide-like* genes in databases. Expressions of *cyclotide-like* gene *Tacycl1* were studied in different organs, including leaves, flowers, stems and coleoptiles. Expression was significantly different in the organs; coleoptile had maximum relative expression and stems had minimum expression. In addition, expression of *cyclotide-like* gene *Tacycl2* was studied following salicylic acid treatment. The expression of *Tacycl1* increased 24h after salicylic acid treatment. This is the first report on the cloning of *cyclotide-like* genes in wheat

Key Words

Cyclotide-like gene, Relative expression, Wheat, 3'RACE-PCR