

## «مقاله پژوهشی»

## بررسی ویژگی‌ها و تغییرات بیانی اعضای خانواده ژنی اسنیکین در مراحل مختلف نمو بذر در گیاه جو (*Hordeum vulgare* L.)

آناهیتا پنجمی<sup>۱</sup>، احمد اسماعیلی<sup>۲\*</sup>، سید محسن سهرابی<sup>۳</sup>

۱. دانشجوی دکتری، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران.

۲. استادیار، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران.

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

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۶/۰۱ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۹/۳۰)

### Investigation of the characteristics and expression changes of snakin gene family members in different stages of seed development in barley (*Hordeum vulgare* L.)

Anahita Panji<sup>1</sup>, Ahmad Ismaili<sup>2\*</sup>, Seyed Mohsen Sohrabi<sup>3</sup>

1. Ph.D. Student, Department of Plant Production and Genetic Engineering, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran.

2. Professor, Department of Plant Production and Genetic Engineering, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran.

3. Assistant Professor, Department of Production Engineering and Plant Genetics, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.

(Received: Aug. 23, 2022 - Accepted: Dec. 21, 2022)

#### Abstract

Antimicrobial peptides are a part of the innate immune system in plants. They are present in all tissues and a wide range of plant species, and their antimicrobial effect against plant and animal pathogens and cancer cells has been proven. Snakins are a group of low molecular weight cysteine-rich plant antimicrobial peptides involved in the defense against biotic and abiotic stresses, hormone pathways, and plant growth and development. In the present study, laboratory and bioinformatic methods were used to investigate the characteristics of the snakin gene family members and to evaluate their expression changes in four seed development stages (3, 8, 13, and 18 days after pollination) in barley plants. The results showed the presence of 11 snakin genes in the genome of barley. The protein sequences of the identified snakins contained the GASA functional domain. These snakins had a signal peptide and had extracellular accumulation. Due to their high abundance of hydrophobic amino acids, they were hydrophobic and produced complex secondary structures. Phylogenetic analysis was performed between barley, rice, and arabidopsis snakins as two monocot and dicot models, leading to three classes. Also, six disulfide bonds and antimicrobial properties were computationally confirmed in all identified proteins. Expression analysis showed different expression patterns for snakin gene family members in different stages of seed development and also exhibited different trends in each stage. The snakin genes can use to produce transgenic plants and to produce a new generation of natural antibiotic agents to protect humans, plants, and animals.

**Keywords:** Antimicrobial activity, Barley, Bioinformatics analysis, Gene expression trend, Seed development stages.

#### چکیده

پپتیدهای ضد میکروبی جزئی از سیستم دفاعی در گیاهان هستند. آنها در تمامی بافت‌ها و در گونه‌های گیاهی مختلفی وجود دارند و دارای اثر ضد میکروبی در برابر پاتوژن‌های گیاهی و جانوری و خواص ضد سرطانی هستند. اسنیکین‌ها گروهی از این پپتیدهای ضد میکروبی غنی از سیستمین با وزن مولکولی پایین هستند که در تنش‌های محیطی، مسیرهای پیام‌دهی هورمون‌ها و رشد و تکامل نقش دارند. در مطالعه حاضر، با استفاده از روش‌های آزمایشگاهی و بیوانفورماتیکی ویژگی‌های اعضای خانواده ژنی اسنیکین و تغییرات بیانی آنها در مراحل نمو بذر (۳، ۸، ۱۳ و ۱۸ روز پس از گرده‌افشانی) در گیاه جو مورد بررسی قرار گرفت. نتایج وجود تعداد یازده ژن اسنیکین در ژنوم گیاه جو را نشان داد. اسنیکین‌های شناسایی شده حاوی دمین عملکردی تحریک شونده با جیبرلین بودند. این اسنیکین‌ها دارای سیگنال پپتید و تجمع خارج سلولی بودند و به دلیل فراوانی بالای اسیدهای آمینه هیدروفوب، آبگریز بوده و ساختارهای ثانویه پیچیده‌ای تولید می‌کردند. در همه پروتئین‌های شناسایی شده، وجود تعداد شش پیوند دی‌سولفیدی و خاصیت ضد میکروبی به صورت محاسباتی مشخص گردید. بررسی تغییرات بیانی اعضای خانواده ژنی اسنیکین در مراحل مختلف نمو بذر نشان داد که ژن‌های مذکور دارای الگوهای بیانی کاملاً متفاوتی هستند و در هر مرحله‌ی نمو میزان بیان آنها روند متفاوتی را نشان می‌دهد. با شناسایی ژن‌های اسنیکین، علاوه بر استفاده از آن در تولید گیاهان تراریخت، می‌توان آن را در سیستم‌های مختلف بیانی تولید کرد و به عنوان نسل جدیدی از عوامل آنتی‌بیوتیک طبیعی در محافظت از انسان، گیاهان و جانوران به کار برد.

**واژه‌های کلیدی:** آنالیز بیوانفورماتیکی، پپتیدهای اسنیکین، جو، روند بیان ژن، فعالیت ضد میکروبی، مراحل نمو بذر.

## مقدمه

گیاهان به‌طور مداوم در معرض عوامل مختلف زنده و غیر زنده تهدیدکننده حیات قرار دارند و برای در امان ماندن از اثرات مضر این عوامل، واکنش‌های آبخاری خاصی را با هدف حفظ هموستازی خود آغاز می‌کنند (Olga *et al.*, 2020). یکی از مهم‌ترین ترکیبات محافظت‌کننده از گیاه در برابر این چالش‌ها، پپتیدهای ضد میکروبی (Antimicrobial Peptides) یا به اختصار (AMPs) هستند. پپتیدهای ضد میکروبی، به عنوان بخشی از سیستم ایمنی ذاتی در تعداد زیادی از موجودات زنده شامل میکروارگانیسم‌ها، بندپایان، جانوران و گیاهان مطرح هستند (Elsbach, 2003; Holaskova *et al.*, 2015). این ترکیبات در دفاع علیه باکتری‌ها، ویروس‌ها، قارچ‌ها و سایر عوامل بیماری‌زا نقش دارند. همچنین نقش این پپتیدها در پاسخ گیاهان به تنش‌های غیر زنده مانند شوری، خشکی، دمای بالا یا پایین و فلزات سنگین اثبات شده است. این پپتیدها بر اساس خصوصیات کلی از قبیل بار الکتریکی مثبت، حضور باندهای دی‌سولفیدی، وزن مولکولی، ساختار پروتئینی ثانویه، میزان آبگریزی به گروه‌های مختلفی تقسیم‌بندی می‌شوند و سازوکار عمل آنها هدف‌گیری ساختارهای غشای خارجی و بخش‌های درون سلولی و یا میان‌کنش با سایر اجزای حیاتی سلول است (Haris *et al.*, 2014; Bahar & Ren, 2013; Kang *et al.*, 2017). تا به حال بیش از ۱۷۰۰ نوع پپتید ضد میکروبی طبیعی از منابع مختلف شناسایی شده است و هزاران مورد آنالوگ پپتیدی بر اساس این پپتیدها طراحی و به‌طور مصنوعی ساخته شده است (Laverty *et al.*, 2011). یکی از مهم‌ترین انواع پپتیدهای ضد میکروبی شناخته‌شده، اسنیکین‌ها (Snakins) می‌باشند (Olga *et al.*, 2020).

اسنیکین‌ها، پپتیدهایی با وزن مولکولی پایین (۸۰-۲۷۰ اسیدآمینو)، غنی از سیستمین از خانواده ژنی GASA (Gibberellic Acid-Stimulated Arabidopsis) هستند. همان‌طوری که از نام این

پپتیدها پیداست، بین موتیف‌های ساختاری این پپتیدها و پپتیدهای موجود در زهر مارها تشابه بالایی وجود دارد. در ساختار این پپتیدها سه ناحیه مشهود است: یک سیگنال پپتید به طول ۱۸-۲۹ اسیدآمینو در انتهای آمینی، یک ناحیه بسیار متغیر با ۷-۳۱ اسیدآمینو که موجب تفاوت اصلی در اعضای این خانواده است و دمینی در انتهای کربوکسیلی با ۶۶ اسیدآمینو که دارای ۱۲ سیستمین حفاظت شده است که با ایجاد ۶ پیوند دی‌سولفیدی نقش مهمی در پایداری مولکول ایفا می‌کند (Porto & Franco, 2013). پیوند دی‌سولفیدی موجب کاهش اکسیداسیون و تنظیم احیاء، در نتیجه کاهش تأثیر تنش‌های غیر زیستی می‌شود (Nahirñak *et al.*, 2012). از نقش‌های تکاملی این ژن‌ها می‌توان به ایجاد ریشه‌های جانبی، توسعه برگ، القای گلدهی، تنظیم سایز سلول‌ها، توسعه بذر و جوانه‌زنی آن در گیاهان تک‌لپه و دولپه اشاره کرد. ژن‌های خانواده GASA، در مسیرهای پیام‌دهی هورمون‌های جیبرلیک اسید، آبسزیک اسید، براسینواستروئیدها، سالیسیلیک اسید و اکسین، تنظیم احیاء، تغییر در بیان برخی ژن‌ها (با میان‌کنش قوی با فاکتورهای رونویسی) و همچنین بیوستز متابولیت‌های ثانویه و در دفاع علیه تنش‌های زیستی و غیر زیستی عمل می‌کنند (Rezaee *et al.*, 2020). مطالعات بعدی نشان دادند که، اسنیکین‌ها در اندام‌های مختلف گیاهی و در طیف وسیعی از گونه‌های گیاهی تک‌لپه و دو لپه یافت می‌شوند. همانند سایر پپتیدهای ضد میکروبی گیاهی، اسنیکین‌ها دارای اسید آمینه‌های بازی بوده که باعث ایجاد بار مثبت در آنها می‌شوند (Porto & Franco, 2013; Goyal & Mattoo, 2016; Epan, 2016). اولین اسنیکین به نام Snakin-1 (StSN1) در سال ۱۹۹۹ و پس از آن Snakin-2 (StSN2) در سال ۲۰۰۲ از غده‌های سیب زمینی جداسازی شد (Segura *et al.*, 1999; Berrocal-Lobo *et al.*, 2002).

(2020)، ۱۷ عضو از خانواده اسنیکین در گیاه کاکائو (Fan *et al.*, 2021)، ۲۶ عضو در سیب (Faraji *et al.*, 2021)، ۱۴ عضو در انگور (Ahmad *et al.*, 2021)، ۳۸ عضو در پنبه (Qiao *et al.*, 2021)، ۳۷ عضو در سویا (Ahmad *et al.*, 2019)، ۱۸ عضو در توتون (Li *et al.*, 2022) و ۱۹ و ۲۱ عضو در گونه‌های مختلف صنوبر (Han *et al.*, 2021)، شناسایی و مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. بررسی پژوهش‌های گذشته تاکنون، این مطلب که اسنیکین‌ها خانواده‌های چندژنی را در گیاهان مختلف تشکیل می‌دهند را مورد تأیید قرار می‌دهد. این تحقیق با هدف شناسایی، جداسازی، توالی‌یابی، تعیین خصوصیت توالی‌های کد کننده پپتیدهای ضد میکروبی اسنیکین از گیاه جو و بررسی بیان آنها در در طی مراحل تکامل دانه به منظور معرفی عوامل ضد میکروبی جدید صورت گرفت.

## روش‌شناسی پژوهش

### شناسایی ژن‌ها

برای شناسایی اعضای خانواده ژنی GASA در ژنوم جو، تمام توالی‌های پروتئین GASA موجود از بانک پروتئین پایگاه داده NCBI دریافت شد. توالی‌های دانلودشده با استفاده از نرم‌افزارهای CLC Genomics Workbench 9.0 و Vector NTI 10.3 هم‌تراز شدند و یک توالی مورد توافق از توالی‌های مختلف به دست آمد. توالی مورد توافق در نرم‌افزار tBLASTn درج شد و با ارزش مورد انتظار ۰/۰۰۱ در مقابل ژنوم غیر مستندسازی شده جو قرار گرفت. نتایج tBLASTn با هم مخلوط و با استفاده از نرم‌افزارهای CLC Genomics Workbench 3.6.5 و Vector NTI 11.0 سرهم‌بندی شدند.

### تعیین چارچوب خوانش باز ژن‌های اسنیکین

برای بررسی صحت جداسازی و همچنین وجود

گیاه جو (*Hordeum vulgare* L.) با  $2n=2x=14$ ، مقاوم در برابر تنش‌های غیر زیستی مانند خشکی، سرما و شوری، بعد از گندم، برنج و ذرت چهارمین غله با ارزش دنیاست (Baum *et al.*, 2007). پروتئین‌های جو، سرشار از اسیدهای آمینه گلوتامین (Gln) و پرولین (Pro) و سایر اسیدهای آمینه آب‌گریز هستند. هیدرولیز آنزیمی پروتئین‌های جو، قطعات پپتیدی با فعالیت‌های زیستی امیدوارکننده، مانند خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ظرفیت اتصال فلزی ایجاد کرد که کاربردهای بالقوه پروتئین‌های جو را در محصولات آرایشی و غذایی گسترش می‌دهد. علاوه بر این، محتوای بالای اسیدهای آمینه آب‌گریز می‌تواند عناصر ساختاری مورد نیاز برای تشکیل پپتیدهای آملی‌فیلیک با فعالیت ضد میکروبی بهتر را فراهم کند (Bamdad *et al.*, 2015).

پایگاه‌های داده و منابع اینترنتی مختلف اطلاعات ارزشمندی از پپتیدهای ضد میکروبی طبیعی و مصنوعی را فراهم آورده‌اند. در این پایگاه‌های داده، ابزار جستجو برای پپتیدها با ویژگی‌های دلخواه، ابزارهای مختلف آنالیز و پیش‌بینی فراهم شده است که به فرآیند کشف و طراحی پپتیدهای ضد میکروبی جدید با فعالیت بهبود یافته کمک می‌کنند. به‌طور کلی، پایگاه‌های داده در کنار فراهم کردن اطلاعات پپتیدی، به تحقیق روی پپتیدهای ضد میکروبی کمک کرده و امکان بهره‌برداری بهتر از فعالیت‌های زیستی پپتیدها در زمینه‌های مختلف را ایجاد می‌کنند.

### پیشینه پژوهش

تا کنون تعداد ۱۶ عضو از خانواده اسنیکین‌ها در گیاه سیب زمینی (Nahirñak *et al.*, 2016)، ۱۵ اسنیکین در گیاه آرابیدوپسیس (Rezaee *et al.*, 2020)، ۹ اسنیکین در گیاه برنج (Muhammad *et al.*, 2019)، ۱۰ اسنیکین در گیاه ذرت (Zimmermann *et al.*, 2009)، ۱۲ عضو در گیاه سورگوم (Filiz & Kurt,

واسرشت‌سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در دمای اتصال هر جفت آغازگر (جدول ۱) به مدت ۳۰ ثانیه و گسترش در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، طی ۳۵ چرخه صورت گرفت. همچنین واسرشت‌سازی اولیه ۱۰ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد و گسترش نهایی ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. پس از انجام واکنش، محصولات PCR روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد بارگذاری و تأیید اندازه شدند (شکل ۱). پس از بررسی نتایج، قطعات تکثیری با استفاده از کیت استخراج از ژل شرکت Thermo Fisher Schientific طبق دستورالعمل شرکت سازنده، خالص‌سازی و جهت توالی‌یابی دوطرفه به شرکت متابیون آلمان ارسال شدند. تعیین توالی قطعات به صورت رفت و برگشتی و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی مربوط به هر ژن انجام گرفت. پس از دریافت نتایج توالی‌یابی، به صورت جداگانه برای هر ژن و با استفاده از نرم‌افزار Vector NTI 11.0 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. توالی‌های تجزیه و تحلیل شده مربوط به هر ژن با استفاده از BLASTn سایت NCBI در برابر پایگاه nr هم‌ردیف شده و صحت جداسازی و توالی‌یابی آن‌ها تأیید گردید.

چارچوب خوانش باز کامل، قطعات حاصل از سرهم‌بندی با استفاده از پایگاه داده‌های دومین‌های حفاظت‌شده (CDD) و ابزارهای BLASTn و ORF finder موجود در پایگاه NCBI در برابر بانک ژن مورد هم‌ترازی قرار گرفتند (Marchler-*et al.*, 2014). آغازگرها برای تکثیر قطعات کامل ژن با استفاده از نرم‌افزار Allele ID 7.0 (Apte *et al.*, 2007)، براساس چارچوب‌های خوانش باز کامل (ORFs) ژن‌های GASA شناسایی شده (جدول ۱) طراحی شدند.

### تهیه نمونه و استخراج DNA

بذر جو رقم زهک از مرکز تحقیقات بذر و نهال کرج تهیه شد. بذرها در گلدان‌های استریل پر از خاک به وزن ۲/۵ کیلوگرم (۲۰ سانتی‌متر ارتفاع و ۱۵ سانتی‌متر قطر) کاشته شدند و روزانه تا زمانی که به مرحله سه برگگی برسند، آبیاری شدند. استخراج DNA از بافت برگ به روش CTAB، صورت گرفت (Doyle & Doyle, 1987). و سپس مورد ارزیابی کیفی و کمی به‌وسیله ژل آگاروز ۱٪ و اسپکتروفوتومتر قرار گرفت. واکنش PCR با استفاده از مسترمیکس آمپلیکون با برنامه دمایی،

جدول ۱. اسم، توالی پرایمرهای مورد استفاده برای جداسازی قطعه ژن کامل، دمای اتصال (°C)، طول قطعه تکثیری و شماره دسترسی

اسم ژن	توالی پرایمر	دمای اتصال (°C)	طول قطعه تکثیری (bp)	شماره دسترسی
HvSn2	F: AATCACCAGAAAGCGAAGCAAACC R: GGGATGAGATCACGGGCACTTG	۵۹	۵۵۴	OL677460
HvSn3	F: ATATAGGGTCACACATCAGTAGC R: GAGATTATTGAACATTGGGACAGG	۶۰	۵۷۱	OL677461
HvSn4	F: ACTCACTCGTCGCTCACTCATC R: CCGTAGGGTGGAGGTTGAAGAC	۵۷	۵۶۸	OL631779
HvSn5	F: CCAAGCAACTCTCAAGAACAC R: ATGGGCTGTGGAGGATGG	۶۰	۵۱۳	OL677462
HvSn7	F: GCATCGCCACCCAAGCCTAAG R: GTCAACACCGTTCCTTCCACACC	۶۳	۷۱۹	OL677463
HvSn8	F: GAAGAAGAGAAGACGATGAAGCC R: GAAACACTCCTCACTACTCAAACC	۵۸	۵۹۰	OL631773
HvSn9	F: ACCGACACTATCTACTACTCCTAC R: GATGATTATTGATGGGTGCTTGG	۶۰	۱۱۵۱	OL631774
HvSn10	F: GCGACCACCAGCCAGAAG R: TGAAGGAGAGGAAGAAGAAGATGG	۶۳	۶۱۱	OL631775
HvSn11	F: CACTACACTAGCCAGCGTCTTATC R: CAACGGCGAGGCAGAATCC	۶۳	۱۱۲۲	OL631776
HvSn12	F: TACACCTACCTACGGACCTACC R: CCTGGCAATGAATCTACATCTACG	۶۰	۷۹۸	OL631777
HvSn13	F: TCCTCGTCCCTCGCAGTCG R: AGTAATAACCATCAACCGCAAGC	۶۰	۵۲۶	OL631778

### تجزیه و تحلیل‌های بیوانفورماتیکی

مجموعه‌ای از پپتیدهای ضد میکروبی مختلف که به صورت محاسباتی و یا آزمایشگاهی وجود خاصیت ضد میکروبی در آن‌ها تأیید شده است، گردآوری شده است. در نرم‌افزار CAMP، توالی‌های پروتئینی اسنیکین، با استفاده از چهار روش محاسباتی Support Vector Machine، Artificial Random Forest، Discriminant Analysis و Neural Network مورد بررسی قرار گرفته و وجود یا عدم وجود خاصیت ضد میکروبی در آن‌ها مشخص گردید (Zaslloff *et al.*, 2006).

چارچوب‌های خوانش باز (ORF) موجود در توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار Vector NTI 10.3 به پروتئین ترجمه شدند. توالی‌های پروتئینی حاصل با به‌کارگیری سه نرم‌افزار Interproscan، Pfam و CDD سایت NCBI برای وجود یا عدم وجود دمین‌های عملکردی محافظت‌شده مورد بررسی قرار گرفتند (Carvalho *et al.*, 2001; Finn *et al.*, 2016; Lata *et al.*, 2007). تنها دمین‌های عملکردی محافظت‌شده‌ای که توسط سه نرم‌افزار مذکور تأیید شده بودند، به عنوان دمین‌های اصلی پروتئین‌های اسنیکین انتخاب شدند. با استفاده از نرم‌افزار Phyre2 ساختارهای ثانویه موجود در توالی‌های اسنیکین، مورد بررسی قرار گرفتند (Kelley *et al.*, 2015). مشخصات فیزیوشیمیایی این پروتئین‌ها شامل طول، بار خالص، pH ایزوالکتریک، فراوانی اسیدهای آمینه با استفاده از نرم‌افزار ProtParam بررسی شد (Wilkins *et al.*, 1999). وجود یا عدم وجود پیوندهای دی‌سولفیدی با استفاده از نرم‌افزار DiANNA مورد بررسی قرار گرفت (Ferrè & Clote, 2005). بررسی وجود یا عدم وجود توالی سیگنال، ماریپچ‌های غشایی و همچنین محل تجمع اسنیکین‌ها به ترتیب با استفاده از نرم‌افزارهای SignalP 5.0، TMHMM و CELLO2GO صورت گرفت (Petersen *et al.*, 2011; Reddy *et al.*, 2004). توالی‌های رونوشت ژن‌های GASA با استفاده از سرور psRNATarget (<http://plantgrn.oble.org/psRNATarget/>) در برابر تمام microRNAهای منتشرشده جو غربال‌گری شدند (Dai *et al.*, 2018). با استفاده از ابزار Gene Structure Display Server ساختارهای اگزون-اینترون را براساس هم‌ترازی cDNA و توالی ژنی پروتئین‌های اسنیکین جو ایجاد گردید (Guo *et al.*, 2007). بررسی وجود یا عدم وجود خاصیت ضد میکروبی با استفاده از نرم‌افزار CAMP انجام شد. در این نرم‌افزار

### تجزیه و تحلیل بیان ژن *in silico*

بررسی الگوی بیانی اعضای خانواده ژنی اسنیکین در چهار مرحله تکاملی بذر، شامل پیش‌ذخیره زود هنگام (۳ روز پس از گرده‌افشانی)، پیش‌ذخیره با تأخیر (۸ روز پس از گرده‌افشانی)، ذخیره زود هنگام (۱۳ روز پس از گرده‌افشانی) و پر شدن دانه (۱۸ روز پس از گرده‌افشانی) با استفاده از داده‌های حاصل از توالی‌یابی RNA (Bian *et al.*, 2019) انجام گردید.

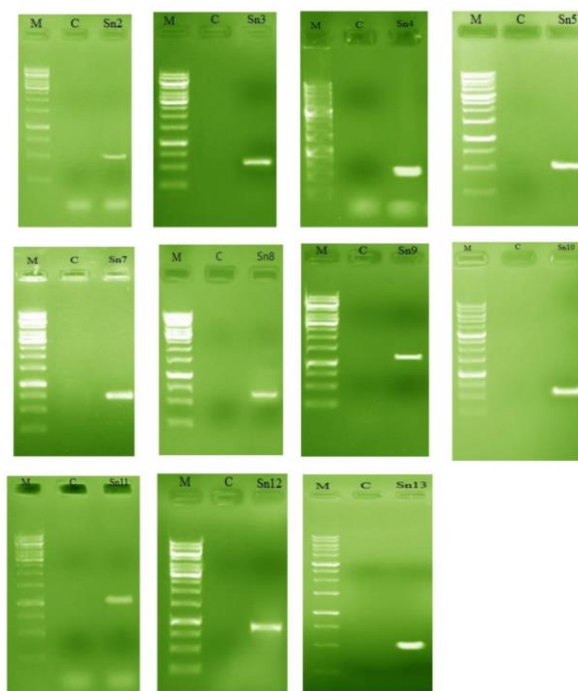
### یافته‌های پژوهش

سرمه‌بندی نتایج حاصل از همردیفی توالی مورد توافق اسنیکین در برابر ژنوم گیاه جو، منجر به ایجاد ۱۱ کانتیگ به طول‌های ۱۶۲۰، ۱۴۵۱، ۱۴۳۶، ۱۲۳۴، ۱۵۲۰، ۱۷۵۰، ۱۶۳۵، ۱۱۵۰، ۱۹۲۵، ۱۸۴۲ و ۱۳۶۲ جفت باز شد. با الگو قراردادن کانتیگ‌های ایجادشده، آغازگرهایی طراحی شد. نتایج حاصل از تکثیر با آغازگرهای اختصاصی، قطعاتی با طول ۵۵۴، ۵۷۱، ۵۶۸، ۵۱۳، ۷۱۹، ۵۹۰، ۱۱۵۱، ۶۱۱، ۱۱۲۲، ۷۹۸ و ۵۲۶ جفت باز را برای اسنیکین‌های HvSn2، HvSn3، HvSn4، HvSn5، HvSn7، HvSn8، HvSn9، HvSn10، HvSn11، HvSn12 و HvSn13 نشان داد (شکل ۱). با استفاده از ابزارهای SignalP و CELLO توالی‌های پروتئینی خانواده

میکروبی است، وجود داشته باشد (Sagaram *et al.*, 2012).

در بررسی وجود زمین‌های عملکردی محافظت‌شده، یک زمین محافظت شده GASA از خانواده پروتئین‌های تنظیم‌شونده با جیرلین در ساختار تمامی اسنیکین‌های شناسایی شده از گیاه جو مشاهده شد. این زمین عملکردی محافظت‌شده، نوعی پیچ و تاب خوردگی پایدار و غنی از سیستمین است که در تمامی خانواده‌های ژنی اسنیکین گیاهی وجود دارد. این زمین در ناحیه محافظت‌شده سوم اسنیکین‌ها (ناحیه کربوکسیلی) قرار گرفته و به دلیل وجود ۱۲ اسیدآمینو سیستمین محافظت‌شده، شش پیوند دی‌سولفیدی درون مولکولی در آن تشکیل می‌شود (Nahirñak *et al.*, 2016; 2012). در بررسی وجود پیوندهای دی‌سولفیدی در ساختار اسنیکین‌های جو، تمام اسنیکین‌های جداسازی شده در این پژوهش، دارای ۱۲ اسیدآمینو سیستمین محافظت شده بودند که توانایی تشکیل شش پیوند دی‌سولفیدی درون مولکولی را در ساختار این پپتیدها داشتند (شکل ۲).

اسنیکین گیاه جو آنالیز شدند و در ساختار این پروتئین‌ها، وجود پپتیدهای نشانه‌ای به طول ۲۹، ۲۴، ۳۳، ۳۳، ۲۳، ۲۵، ۲۸، ۳۶، ۲۹، ۱۹ و ۲۴ اسیدآمینو حداقل یک مارپیچ عرض‌گشایی در پروتئین‌های HvSn4، HvSn5، HvSn11 و HvSn13 تأیید شد. تجمع خارج سلولی و القا در پاسخ به تنش‌های زنده و غیر زنده بخش دیگری از ویژگی‌های پیش‌بینی شده برای پپتیدهای اسنیکین گیاه جو بود. محلی از سلول که اسنیکین‌ها و سایر پپتیدهای ضد میکروبی گیاهی پس از تولید در آن‌ها تجمع پیدا می‌کنند، همواره با عملکرد این پپتیدها در سیستم دفاعی و مقابله با عوامل بیماری‌زا، در ارتباط است. به دلیل وجود اثرات محافظتی در مقابل پاتوژن‌ها، این پپتیدها پس از تولید و تغییرات پس از ترجمه و ایجاد ساختارهای ثانویه، به خارج از سلول ترشح می‌شوند تا در اولین مراحل دفاع، وارد عمل شوند. بنابراین باید چنین سیگنال پپتیدهای ترش‌حی خارج سلولی در ساختار اسنیکین‌ها و سایر پپتیدهای ضد میکروبی که مکانیسم اصلی عمل آن‌ها برهمکنش با غشاهای

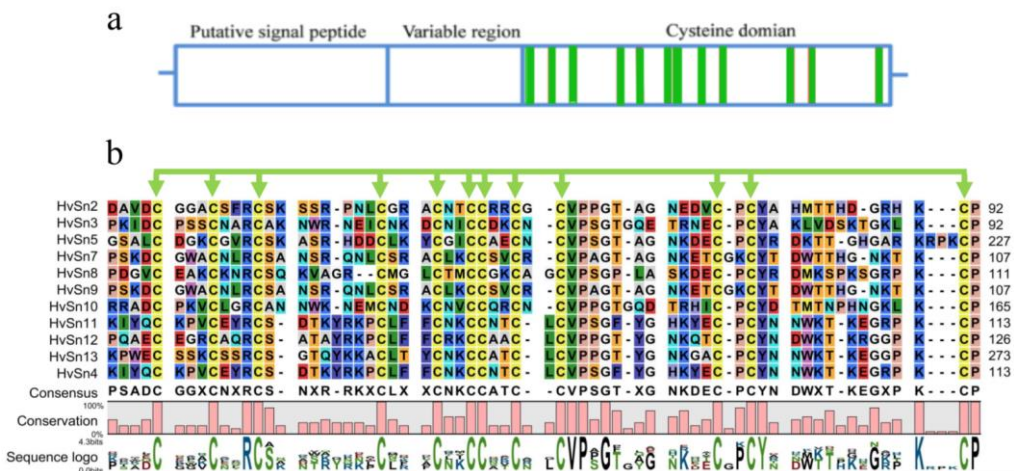


شکل ۱. ژل الکتروفورز محصولات PCR ژن‌های اسنیکین، در تمام تصاویر چاهک ۱، نشانگر 1Kbp؛ چاهک ۲، واکنش کنترل منفی و چاهک ۳، توالی تکثیر شده ژن مورد نظر روی DNA جو رقم زهک

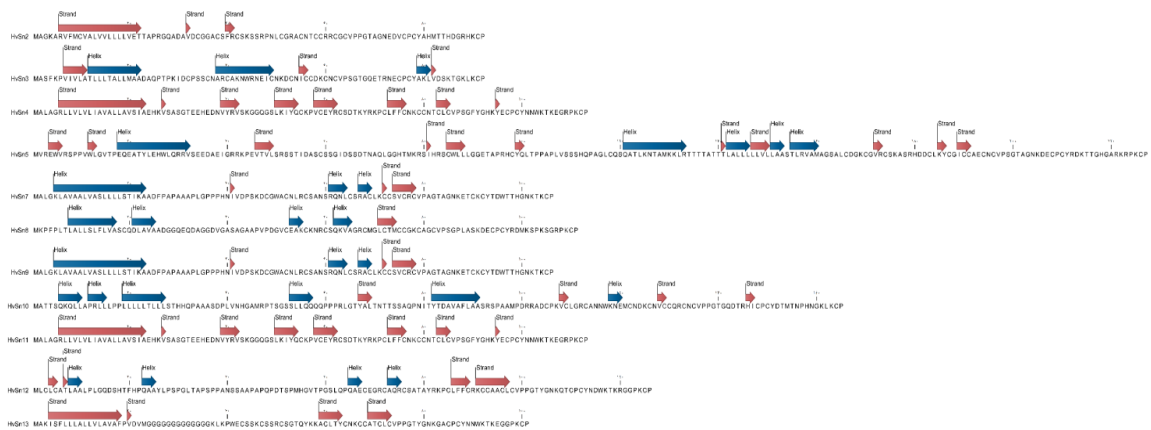
میکروبی می‌شود (Porto & Franco, 2013). دامنه pH ایزوالکتریک پیش‌بینی شده برای پپتیدهای جداسازی شده، بیانگر ویژگی بازی بالای این گروه از پپتیدهاست. اسیدهای آمینه بازی مانند سیستئین، آرژنین و لیزین به فراوانی در ساختار اسنیکین‌ها مشاهده می‌شود و خود دلیلی بر خاصیت بازی این پپتیدهای ضد میکروبی است (Castro & Fontes, 2005; Nahirñak *et al.*, 2012; Nahirñak *et al.*, 2016; Porto & Franco, 2013). نقطه ایزوالکتریک (pI)، pH است که در آن یک اسیدآمینه یا پروتئین بار خود را از دست می‌دهد (فاقد بار الکتریکی خالص بوده یا به عبارت دیگر از لحاظ بار الکتریکی خنثی می‌باشد) و بنابراین در میدان الکتریکی با جریان مستقیم، قادر به حرکت نمی‌باشد. اطلاع از نقطه ایزوالکتریک یک پروتئین می‌تواند برای انتخاب و بهینه‌سازی روش‌های مورد استفاده برای خالص‌سازی پروتئین اعم از کروماتوگرافی تبادل یونی و الکتروفورز ایزوالکتریک مفید باشد (Castro & Fontes, 2005). شاخص آلفاتیک حجم نسبی اشغال شده توسط زنجیره‌های آلفاتیک بوده و معیاری از افزایش ثبات حرارتی و آبگریز بودن پروتئین است (Ikai, 1980).

بررسی ساختارهای ثانویه در اسنیکین‌های گیاه جو، وجود ماریپج‌های آلفا و همچنین رشته‌های بتا به صورت تکی یا با هم را در ساختار تمام این پپتیدها نشان داد. نتایج وجود صفر تا ۶ ماریپج آلفا و ۱ تا ۱۱ رشته بتا را در ساختار این پپتیدها مشخص کرد. در پپتیدهای HvSn2، HvSn4، HvSn11، HvSn13 فقط رشته‌های بتا وجود دارد، اما در سایر پپتیدهای اسنیکین جو، ماریپج آلفا و رشته‌های بتا در کنار هم موجود است. وجود این فولدینگ و خمش‌ها در ساختار پپتیدها باعث حفظ پایداری و یکپارچگی در محل تجمع شده و همچنین موجب تقابل حداکثری با پاتوژن‌های هدف می‌گردد (شکل ۳).

نتایج آنالیز ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی پروتئین‌ها، وزن مولکولی حدود ۹ تا ۲۴ کیلودالتون، وجود ناپایداری در اکثر پپتیدها (با شاخص بالاتر از ۴۰) به جز HvSn4 و HvSn11 با ضریب ناپایداری بین ۲۶ تا ۶۲، pH ایزوالکتریک در محدوده ۸-۹، شاخص آلفاتیک بین ۴۸/۲۵ و ۷/۸۸ و شاخص هیدروپاتی بین ۰/۳- تا ۰/۰۶ را نشان داد. وزن مولکولی پایین اسنیکین‌ها، موجب افزایش سرعت تولید، انتقال و عملکرد این پپتیدهای ضد



شکل ۲. هم ترازوی دومین GASA از پروتئین‌های اسنیکین جو. الف) تجزیه و تحلیل ساختار دومین‌های پروتئین‌های اسنیکین جو، ستون‌های سبز نشان دهنده ۱۲ سیستئین حفظ شده آنها بود. ب) هم‌ترازی چندگانه توالی پروتئین‌های اسنیکین، که سیستئین‌های حفاظت شده آن‌ها نشان داده شده است.



شکل ۳. ساختارهای ثانویه در اسنیکین‌های گیاه جو

Sagaram *et al.*, 2012; Wilkins *et al.*, 1999). miRNAها گروهی از RNAهای کوتاه غیر کدکننده هستند که با فرایندهای زیستی سلولی و پاسخ به تنش‌ها از طریق کنترل بیان ژن پس از رونویسی در ارتباط می‌باشند (Heidari *et al.*, 2020). نتیجه بررسی توالی رونوشت‌های GASA نشان داد که HvSn5 توسط Hvu miR6196a و HvSn11 توسط Hvu miR5803 مورد هدف قرار می‌گیرد.

بررسی ساختار اگزون-اینترون، پروتئین‌های اسنیکین را به سه گروه تقسیم کرد، ژن‌های HvSn9، HvSn8، HvSn5، HvSn4، HvSn3 دارای یک اینترون و دو اگزون هستند. از سوی دیگر، HvSn11 و HvSn12، دارای چهار اگزون و سه اینترون می‌باشند. ژن‌های گروه ۳ (HvSn2، HvSn7، HvSn10 و HvSn13)، که دارای سه اگزون و دو اینترون هستند.

پایگاه اطلاعاتی CAMP ابزاری را توسعه داده است که با استفاده از الگوریتم‌های محاسباتی مختلف و بر اساس ویژگی‌هایی مانند آبگریزی، وجود شارژ مثبت، پیچش و ساختارهای ثانویه، به پیش‌بینی ویژگی ضد میکروبی در پپتیدها و پروتئین‌های دیگر می‌پردازد. این الگوریتم‌ها تنها در صورتی پروتئین‌ها را به عنوان پپتیدهای ضد میکروبی می‌شناسد، که دارای یک یا چند ویژگی مشترک ضد میکروبی

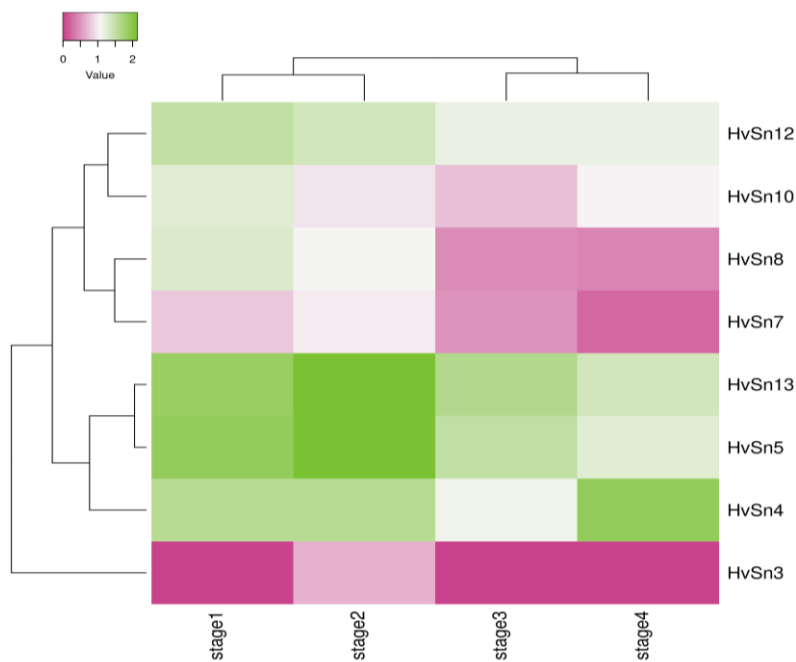
شاخص آلفاتیکی محاسبه شده برای پپتیدهای اسنیکین گیاه جو، نشان‌دهنده مقاومت نسبتاً خوب آنها در مقابل درجه حرارت است که می‌توان آن را به درصد بالای اسیدهای آمینه والین، لوسین، و آلانین و همچنین وجود ساختارهای ثانویه و پل‌های دی‌سولفیدی موجود در این پپتیدها نسبت داد. متوسط هیدروپاتی کل (GRAVY) از تقسیم مجموع هیدروپاتی محاسبه شده برای تمام اسیدهای آمینه در پروتئین بر تعداد کل اسیدهای آمینه آن پروتئین بدست می‌آید. در صورتی که GRAVY محاسبه شده برای یک پروتئین منفی باشد، بدین معنی است که آن پروتئین غیر قطبی است و در صورت مثبت بودن آن قطبی محسوب می‌شود (Kyte & Doolittle, 1982).

مهم‌ترین رویکرد اثر پپتیدهای ضد میکروبی در مقابل پاتوژن‌ها، ارتباط و تعامل با غشاهای سلولی است. ویژگی هیدروفوبی و همچنین ساختارهای ثانویه خاص و پیوندهای دی‌سولفیدی، موجب سهولت درگیری پپتیدهای اسنیکین با غشاهای دولایه فسفولیپیدی پاتوژن‌ها می‌شود. پپتیدهای اسنیکین برای ایجاد تعامل با غشاهای دولایه سلولی که عمدتاً از اسیدهای چرب به شدت آبگریز هستند، باید خاصیت آبگریزی خود را افزایش دهند که این مورد را با افزایش در میزان اسیدهای آمینه غیرقطبی مانند آلانین و لوسین در ساختار خود انجام می‌دهند



پس از گرده‌افشانی)، بیان ژن HvSn10 بسیار پایین، HvSn4 متوسط و سایر ژن‌ها بیان بالایی نشان دادند. در بیان ژن HvSn3 در مراحل اول، سوم و چهارم بررسی (در زمان‌های ۳، ۱۳ و ۱۸ روز پس از گرده‌افشانی) پایین بوده و در مرحله دوم (۸ روز پس از گرده‌افشانی) نسبت به مراحل دیگر، افزایش داشت. در مراحل سوم و چهارم، ژن‌های HvSn4 و HvSn10 بر خلاف سایر ژن‌ها که روند بیان ثابتی را طی می‌کردند، به شدت افزایش بیان داشتند. ژن HvSn4 در مرحله اول دوم، بیان متوسط، در مرحله سوم بیان پایین و در مرحله چهارم بیان بالایی را نشان داد. ژن‌های HvSn5، HvSn7، HvSn13 و HvSn4 در دو مرحله اول بررسی روند افزایشی و در دو مرحله دوم روند کاهش بیانی را در پی داشتند. برای ژن‌های HvSn8 و HvSn12، از مرحله اول تا چهارم روند کاهش بیانی را شاهد بودیم و از ژن HvSn10 در دو مرحله اول بیان کاهش و در دو مرحله دوم بیان افزایشی را شاهد بودیم (شکل ۴).

باشند. بررسی اسنیکین‌های شناسایی شده از گیاه جو، پس از حذف سیگنال پپتید، در پایگاه CAMP، خاصیت ضد میکروبی را با احتمال بالایی در تمامی این پپتیدها نشان داد. الگوریتم Support Vector Machine با میزان احتمال بیشتر از ۰/۹۸، الگوریتم Random Forest با میزان احتمال بیشتر از ۰/۸۳، الگوریتم Discriminant Analysis با میزان احتمال بیشتر از ۰/۹۴ و الگوریتم Artificial Neural Network با تأیید کامل وجود خاصیت ضد میکروبی را در تمامی اسنیکین‌های شناسایی شده پیش‌بینی کرد. الگوی بیان حاصل از داده‌های توالی‌یابی ژن‌های اسنیکین در طول مراحل تکامل دانه (به استثنای ژن HvSn4 که دارای سیر افزایشی بود)، روند کلی کاهش بیانی را نشان داد. در مرحله اول بررسی (۳ روز پس از گرده‌افشانی)، بیان ژن HvSn3 بسیار پایین، ژن‌های HvSn4، HvSn5، HvSn7 و ژن‌های HvSn13 متوسط و HvSn8، HvSn10 و HvSn12 بالا می‌باشد. در مرحله دوم بررسی (۸ روز



شکل ۴. نقشه حرارتی حاصل از بیان ژن‌های خانواده اسنیکین در طی مراحل مختلف تکامل بذر- مرحله اول: پیش‌ذخیره زود هنگام (۳ روز پس از گرده‌افشانی)، مرحله دوم: پیش‌ذخیره با تأخیر (۸ روز پس از گرده‌افشانی)، مرحله سوم: ذخیره زود هنگام (۱۳ روز پس از گرده‌افشانی) و مرحله چهارم پر شدن دانه (۱۸ روز پس از گرده‌افشانی).

## نتیجه‌گیری و پیشنهادها

و می‌توانند به عنوان آنتی‌بیوتیک‌های طبیعی، جایگزینی برای مواد شیمیایی جهت محافظت انسان، گیاهان یا حیوانات شوند. با توجه به نیاز به عوامل ضد میکروبی جدید به دلیل ایجاد مقاومت در ترکیبات موجود، می‌توان از پپتیدهای ضد میکروبی به عنوان بهترین کاندید احتمالی موجود یاد کرد. تاکنون گیاهان تراریخته بسیاری تولید شده که پپتیدهای ضد میکروبی را بیان می‌کنند، بنابراین با استفاده از توسعه روش‌های بیوتکنولوژی در گیاهان و تولید گسترده پپتیدهای ضد میکروبی در محصولات کشاورزی می‌توان به استفاده کمتر از سموم و کاهش قیمت تمام شده دست یافت.

در مجموع، پژوهش حاضر وجود خانواده چند ژنی اسنیکین را در گیاه جو مشخص کرد و نشان داد، ژن‌های خانواده اسنیکین در گیاه جو مانند دیگر اسنیکین‌های گیاهی، در سطح ژنی و پروتئینی، ویژگی‌های ساختاری و عملکردی مشابهی از خود نشان می‌دهند. پپتیدهای ضد میکروبی در گیاهان پپتیدهای متنوعی هستند که در ترکیب آمینواسیدی و ساختار با هم متفاوت هستند و فعالیت ضد میکروبی با طیف وسیع دارند. بنابراین پپتیدهای ضد میکروبی توان بالقوه بالایی برای استفاده در بحث پزشکی و کشاورزی دارند

## REFERENCES

- Ahmad, B., Yao, J., Zhang, S., Li, X., Zhang, X., Yadav, V., & Wang, X. (2020). Genome-Wide Characterization and Expression Profiling of GASA Genes during Different Stages of Seed Development in Grapevine (*Vitis vinifera* L.) Predict Their Involvement in Seed Development. *Int J Mol Sci*, 21(3). <https://doi.org/10.3390/ijms21031088>
- Ahmad, M. Z., Sana, A., Jamil, A., Nasir, J. A., Ahmed, S., Hameed, M. U., & Abdullah. (2019). A genome-wide approach to the comprehensive analysis of GASA gene family in Glycine max. *Plant Molecular Biology*, 100(6), 607-620. <https://doi.org/10.1007/s11103-019-00883-1>
- Apte, A., & Singh, S. (2007). AlleleID: a pathogen detection and identification system. *Methods Mol Biol*, 402, 329-346. [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-528-2\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-528-2_1)
- Bahar, A. A., & Ren, D. (2013). Antimicrobial Peptides. *Pharmaceuticals*, 6(12), 1543-1575. <https://www.mdpi.com/1424-8247/6/12/1543>
- Bamdad, F., Sun, X., & Chen, L. (2015). Preparation and characterization of antimicrobial cationized peptides from barley (*Hordeum vulgare* L.) proteins. *LWT-Food science and Technology*, 63(1), 29-36 .
- Baum, M., Von Korff, M., Guo, P., Lakew, B., Hamwieh, A., Lababidi, S., Udupa, S. M., Sayed, H., Choumane, W., & Grando, S. (2007). Molecular approaches and breeding strategies for drought tolerance in barley. In *Genomics-assisted crop improvement* (pp. 51-79). Springer .
- Berrocal-Lobo, M., Segura, A., Moreno, M., López, G., Garcia-Olmedo, F., & Molina, A. (2002). Snakin-2, an antimicrobial peptide from potato whose gene is locally induced by wounding and responds to pathogen infection. *Plant physiology*, 128(3), 951-961 .
- Bian, J., Deng, P., Zhan, H., Wu, X., Nishantha, M. D., Yan, Z., Du, X., Nie, X., & Song, W. (2019). Transcriptional dynamics of grain development in barley (*Hordeum vulgare* L.). *International Journal of Molecular Sciences*, 20(4), 962 .
- Carvalho, A. O., Machado, O. L. T., Da Cunha, M., Santos, I. S., & Gomes, V. M. (2001). Antimicrobial peptides and immunolocalization of a LTP in *Vigna unguiculata* seeds. *Plant Physiology and Biochemistry*, 39(2), 137-146 .

- Castro, M. S., & Fontes, W. (2005). Plant defense and antimicrobial peptides. *Protein Pept Lett*, 12(1), 13-18 .
- Dai, X., Zhuang, Z., & Zhao, P. X. (2018). psRNATarget: a plant small RNA target analysis server (2017 release). *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W49-W54. <https://doi.org/10.1093/nar/gky316>
- Doyle, J. J., & Doyle, J. L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue .
- Elsbach, P. (2003). What is the real role of antimicrobial polypeptides that can mediate several other inflammatory responses? *The Journal of clinical investigation*, 111(11), 1643-1645. <https://doi.org/10.1172/JCI18761>
- Epand, R. M. (2016). *Host Defense Peptides and Their Potential as Therapeutic Agents*. Springer .
- Fan, S., Zhang, D., Zhang, L., Gao, C., Xin, M., Tahir, M. M., Li, Y., Ma, J., & Han, M. (2017). Comprehensive analysis of GASA family members in the *Malus domestica* genome: identification, characterization, and their expressions in response to apple flower induction. *BMC Genomics*, 18(1), 827. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-4213-5>
- Faraji, S., Mehmood, F., Malik, H. M. T., Ahmed, I., Heidari, P., & Poczai, P. (2021). The GASA Gene Family in *Theobroma cacao*: Genome Wide Identification and Expression Analyses. *bioRxiv* .
- Ferrè, F., & Clote, P. (2005). DiANNA: a web server for disulfide connectivity prediction. *Nucleic Acids Research*, 33(suppl\_2), W230-W232. <https://doi.org/10.1093/nar/gki412>
- Filiz, E., & Kurt, F. (2020). Antimicrobial peptides Snakin/GASA gene family in sorghum (*Sorghum bicolor*): Genome-wide identification and bioinformatics analyses. *Gene Reports*, 20, 100766. <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2020.100766>
- Finn, R. D., Coggill, P., Eberhardt, R. Y., Eddy, S. R., Mistry, J., Mitchell, A. L., Potter, S. C., Punta, M., Qureshi, M., & Sangrador-Vegas, A. (2016). The Pfam protein families database: towards a more sustainable future. *Nucleic acids research*, 44(D1), D279-D285.
- Goyal, R. K., & Mattoo, A. K. (2016). Plant Antimicrobial Peptides. In *Host Defense Peptides and Their Potential as Therapeutic Agents* (pp. 111-136). Springer.
- Guo, A. Y., Zhu, Q. H., Chen, X., & Luo, J. C. (2007). [GSDS: a gene structure display server]. *Yi Chuan*, 29(8), 1023-1026.
- Han, S., Jiao, Z., Niu, M.-X., Yu, X., Huang, M., Liu, C., Wang, H.-L., Zhou, Y., Mao, W., Wang, X., Yin, W., & Xia, X. (2021). Genome-Wide Comprehensive Analysis of the GASA Gene Family in *Populus*. *International journal of molecular sciences*, 22(22), 12336. <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/22/12336>
- Harris, P. W., Yang, S. H., Molina, A., López, G., Middleditch, M., & Brimble, M. A. (2014). Plant antimicrobial peptides snakin-1 and snakin-2: chemical synthesis and insights into the disulfide connectivity. *Chemistry*, 20 (17), 5102-5110. <https://doi.org/10.1002/chem.201303207>
- Heidari, P., Mazloomi, F., Nussbaumer, T., & Barcaccia, G. (2020). Insights into the SAM Synthetase Gene Family and Its Roles in Tomato Seedlings under Abiotic Stresses and Hormone Treatments. *Plants (Basel)*, 9(5). <https://doi.org/10.3390/plants9050586>
- Holaskova, E., Galuszka, P., Frebort, I., & Oz, M. T. (2015). Antimicrobial peptide production and plant-based expression systems for medical and agricultural biotechnology. *Biotechnology Advances*, 33(6,Part 2), 1005-1023. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.03.007>

- Ikai, A. (1980). Thermostability and aliphatic index of globular proteins. *J Biochem*, 88(6), 1895-1898 .
- Kang, H. K., Kim, C., Seo, C. H., & Park, Y. (2017). The therapeutic applications of antimicrobial peptides (AMPs): a patent review. *J Microbiol*, 55(1), 1-12. <https://doi.org/10.1007/s12275-017-6452-1>
- Kelley, L. A., Mezulis, S., Yates, C. M., Wass, M. N., & Sternberg, M. J. E. (2015). The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature Protocols*, 10(6), 845-858. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.053>
- Kyte, J., & Doolittle, R. F. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol*, 157(1), 105-132. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(82\)90515-0](https://doi.org/10.1016/0022-2836(82)90515-0)
- Lata, S., Sharma, B., & Raghava, G. (2007). Analysis and prediction of antibacterial peptides. *BMC bioinformatics*, 8(1), 263 .
- Laverty, G., Gorman, S. P., & Gilmore, B. F. (2011). The potential of antimicrobial peptides as biocides. *International journal of molecular sciences*, 12(10), 6566-6596 .
- Li, Z., Gao, J., Wang, G., Wang, S., Chen, K., Pu, W., Wang, Y., Xia, Q., & Fan, X. (2022). Genome-Wide Identification and Characterization of GASA Gene Family in *Nicotiana tabacum* [Original Research]. *Frontiers in Genetics*, 12. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.768942>
- Marchler-Bauer, A., Derbyshire, M. K., Gonzales, N. R., Lu, S., Chitsaz, F., Geer, L. Y., Geer, R. C., He, J., Gwadz, M., & Hurwitz, D. I. (2014). CDD: NCBI's conserved domain database. *Nucleic acids research*, 43(D1), D222-D226 .
- Muhammad, I., Li, W. Q., Jing, X. Q., Zhou, M. R., Shalmani, A., Ali, M., Wei, X. Y., Sharif, R., Liu, W. T., & Chen, K. M. (2019). A systematic in silico prediction of gibberellic acid stimulated GASA family members: A novel small peptide contributes to floral architecture and transcriptomic changes induced by external stimuli in rice. *J Plant Physiol*, 234-235, 117-132. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2019.02.005>
- Nahirňak, V., Almasia, N. I., Hopp, H. E., & Vazquez-Rovere, C. (2012). Snakin/GASA proteins: involvement in hormone crosstalk and redox homeostasis. *Plant Signal Behav*, 7(8), 1004-1008. <https://doi.org/10.4161/psb.20813>
- Nahirňak, V., Rivarola, M., Gonzalez de Urreta, M., Paniego, N., Hopp, H. E., Almasia, N. I., & Vazquez-Rovere, C. (2016). Genome-wide Analysis of the Snakin/GASA Gene Family in *Solanum tuberosum* cv. Kennebec. *American Journal of Potato Research*, 93(2), 172-188. <https://doi.org/10.1007/s12230-016-9494-8>
- Olga, K., Marina, K., Alexey, A., Anton, S., Vladimir, Z., & Igor, T. (2020). The role of plant antimicrobial peptides (AMPs) in response to biotic and abiotic environmental factors. *Biological Communications*, 65 .(۲)
- Petersen, T. N., Brunak, S., von Heijne, G., & Nielsen, H. (2011). SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature methods*, 8(10), 785-786 .
- Porto, W. F., & Franco, O. L. (2013). Theoretical structural insights into the snakin/GASA family. *Peptides*, 44, 163-166 .<sup>۷</sup>
- Qiao, K., Ma, C., Lv, J., Zhang, C., Ma, Q., & Fan, S. (2021). Identification, characterization, and expression profiles of the GASA genes in cotton. *Journal of Cotton Research*, 4(1), 7. <https://doi.org/10.1186/s42397-021-00081-9>
- Reddy, K., Yedery, R & ,Aranha, C. (2004). Antimicrobial peptides: premises and promises. *International journal of antimicrobial agents*, 24(6), 536-547.

- Rezaee, S., Ahmadzadeh, M., & Heidari, P. (2020). Genome-wide characterization, expression profiling, and post-transcriptional study of GASA gene family. *Gene Reports*, 20, 100795. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.genrep.2020.100795>
- Sagaram, U. S., Kaur, J., & Shah, D. (2012). Antifungal Plant Defensins: Structure-Activity Relationships, Modes of Action, and Biotech Applications. In *Small Wonders: Peptides for Disease Control*, 1095, 317-336. American Chemical Society. <https://doi.org/doi:10.1021/bk-2012-1095.ch015>  
bk-2012-1095.ch015/10,1021
- Segura, A., Moreno, M., Madueño, F., Molina, A., & García-Olmedo, F. (1999). Snakin-1, a peptide from potato that is active against plant pathogens. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 12(1), 16-23 .
- Wilkins, M. R., Gasteiger, E., Bairoch, A., Sanchez, J. C., Williams, K. L., Appel, R. D., & Hochstrasser, D. F. (1999). Protein identification and analysis tools in the ExPASy server. *Methods Mol Biol*, 112, 531-552. <https://doi.org/10.1385/1-59259-584-7:531>
- Zasloff, M. (2006). Defending the epithelium. *Nature medicine*, 12(6), 607-608 .
- Zimmermann, R., Sakai, H., & Hochholdinger, F. (2009). The Gibberellic Acid Stimulated-Like Gene Family in Maize and Its Role in Lateral Root Development *Plant Physiology*, 152(1), 356-365. <https://doi.org/10.1104/pp.109.149054>