ژنتیک نوین
دوره نوزدهم، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۳
صفحه ۸۹ - ۷۵

تجزیه و تحلیلی جامع بر خانواده ژنی Snakin/GASA: بینشی بر منشاء، گسترش، تنوع و بیان آن‌ها

A comprehensive analysis of the Snakin/GASA gene family: insights into their origin, expansion, diversity and expression

آناهیتا پنجی[۱]، احمد اسماعیلی*[۲]، سید محسن سهرابی[۳]

۱- دانش‌آموخته دکتری، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران
۲- استاد، 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

Panji A[1], Ismaili A[*2], Sohrabi SM[3]

1- PhD Graduate, 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

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: Ismaili.a@lu.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۶/۱۲- تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۶/۰۳)

چکیده

خانواده Snakin/GASA پپتیدهای کوچک غنی از سیستئینی هستند که به‌طور گسترده در ژنوم گیاه توزیع شده و در رشد و توسعه و پاسخ گیاهان به تنش‌های زیستی و غیرزیستی نقش دارند. در مطالعه حاضر، وجود خانواده ژنی GASA در موجودات مختلف بررسی شد همچنین ساختار و تغییرات بیان این خانواده ژنی درگیاهان مختلف مقایسه شد. علاوه بر این، تغییرات پس از ترجمه و خاصیت ضد میکروبی پروتئین‌های GASA برای درک بیشتر مکانیسم‌های تنظیمی پیش‌بینی شد. حضور دمین GASA، پپتید سیگنال، تجمع خارج سلولی، شش پل دی‌سولفیدی، فسفوریلاسیون پس از ترجمه و فعالیت ضدمیکروبی برای همه ژن‌های GASA مشاهده شد. الگوی بیان متفاوت در بافت‌های مختلف (logFPKM= 0- 2.5) و القا تحت تنش‌های زیستی، غیرزیستی و هورمونی (در بازه 5+ - 10- =logFold Change در شرایط خشکی و گرما) از دیگر ویژگی‌های این ژن‌ها بود و همچنین عناصر سیس تنظیم کننده کلیدی در نواحی پیشبر این ژن‌ها شناسایی شد که بیانگر این است که ژن‌های Snakin/GASA به‌عنوان یک خانواده ژنی مهم، نقش و عملکردهای متنوعی دارند. همچنین نتایج نشان داد که اغلب پروتئین‌های GASA مورد مطالعه بر اساس خصوصیات فیزیکوشیمیایی، ناپایدار و آبگریز بودند. همچنین، برهمکنش قوی بین ژن‌های خانواده GASA و عوامل رونویسی از خانواده‌های Dof، ERF و MYB در آرابیدوپسیس و برنج پیش‌بینی شد. به‌طور کلی، این نتایج می‌تواند دانش ما را در مورد عملکرد ژن‌های GASA بهبود بخشد و داده‌هایی را برای تحقیقات آینده فراهم کند.

واژه‌های کلیدی

بیان اختصاصی بافت
تجزیه و تحلیل ژنومی
تنش‌های زیستی و غیر زیستی
خانواده ژنی Snakin/GASA
گیاهان تک‌لپه و دولپه

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

مقدمه

گیاهان در طول چرخه زندگی خود در زیست‌بوم‌های طبیعی، در محیطی با طیف گسترده‌ای از میکروارگانیسم‌ها و آفات همزیستی می‌کنند و در طول تکامل، برای محافظت خود در برابر عوامل آسیب‌زای محیطی اقدامات دفاعی پیچیده‌ای را توسعه داده‌اند که آن‌ها را قادر می‌سازد به‌طور مؤثری در برابر موجودات مضر مانند باکتری‌ها، قارچ‌ها، نماتدها و حشرات دفاع کنند (Tyagi et al. 2020). یکی از مهم‌ترین ترکیبات محافظت‌کننده از گیاه در برابر این چالش‌ها، پپتیدهای ضدمیکروبی (Antimicrobial Peptides یا به اختصار AMPs) هستند. نقش AMPها در مقابله با باکتری‌ها، ویروس‌ها، قارچ‌ها و سایر بیمارگرها و همچنین تاثیرات آن‌ها در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی مانند شوری، خشکی، دمای بالا یا پایین و فلزات سنگین به اثبات رسیده است. این پپتیدها وزن مولکولی پایینی داشته (حدودا ٦–١٢ KDa) و پتانسیل فعالیت‌های زیستی بی‌شماری دارند (Olga et al. 2020).

امروزه شناسایی این پپتیدها و بررسی خواص آن‌ها مورد توجه محققین است که با توجه به پیشرفت‌های اخیر در حوزه علوم دارویی معرفی پپتیدهای ضد میکروبی با قابلیت درمانی – بالینی می‌تواند چشم‌انداز امیدوارکننده‌ای برای مقابله با مشکلات مقاومت دارویی باشد (Bahar and Ren 2013).

در گیاهان، اکثر AMPها غنی از سیستئین هستند و تعداد اسیدهای آمینه سیستئین زوج است (Iqbal et al. 2019). این ویژگی باعث تشکیل پیوندهای دی‌سولفیدی متعدد می‌شود و به AMPهای گیاهی پایداری حرارتی، شیمیایی و پروتئولیتیک بالایی می‌بخشد که برای عمل به‌عنوان یک سپر شیمیایی در برابر آفات و بیمارگرهای متعدد ضروری است (Colgrave and Craik 2004; Tam et al. 2015). پیکربندی توپولوژیکی متمایز، به AMPها کمک می‌کند تا ساختار و فعالیت خود را حتی در محیط‌های سخت، مانند شرایط pH پایین (به‌عنوان مثال، واکوئل گیاهی) یا پروتئولیتیک (به‌عنوان مثال، سیستم گوارشی گیاهخواران) حفظ کنند (Tam et al. 2015). بر اساس تشابه توالی، ساختار و همچنین تعداد و آرایش اسیدهای آمینه سیستئین در توالی اولیه، پپتیدهای دفاعی گیاهی را می‌توان به حداقل هشت خانواده اصلی، از جمله α–هیرپینین‌ها، سیکلوتیدها (Cyclotides)، دیفنسین‌ها (Defensins)، تیونین‌ها (Thionins)، پروتئین‌های انتقال دهنده چربی (Lipid Transfer Proteins)، اسنیکین‌ها (Snakins)، هوئین‌ها (Heveins) و نوتین‌ها (Knottins) طبقه‌بندی کرد (Epand 2016).

اسنیکین‌ها، پپتیدهایی با وزن مولکولی پایین، غنی از سیستئین از خانواده ژنی GASA (Gibberellic Acid-Stimulated Arabidopsis) هستند. وجه تسمیه آن‌ها به‌دلیل شباهت موتیف‌های ساختاری این پپتیدها و پپتیدهای موجود در زهر مارها است. در انتهای آمینی این پپتیدها، یک پپتید راهنما با طول ١٨–٢٩ اسید آمینه وجود دارد. پس از آن، یک ناحیه بسیار متغیر با ٧–٣١ اسید آمینه در وسط قرار دارد که تفاوت‌های اصلی بین اعضای این خانواده را ایجاد می‌کند. در انتهای کربوکسیلی، یک دومین با ٦٦ اسید آمینه وجود دارد که حاوی ١٢ سیستئین حفاظت شده است و این سیستئین‌ها ٦ پیوند دی‌سولفیدی را تشکیل می‌دهند که برای پایداری مولکول ضروری هستند. (Porto and Franco 2013). پیوند دی‌سولفیدی موجب کاهش اکسیداسیون و تنظیم احیاء، در نتیجه کاهش تأثیر تنش‌های غیر زیستی می‌شود (Nahirñak et al. 2012a). از نقش تکاملی این ژن‌ها می‌توان به تشکیل ریشه‌های جانبی، توسعه برگ، القای گلدهی، تنظیم اندازه‌ی سلول‌ها، توسعه بذر و جوانه‌زنی آن در گیاهان اشاره کرد. ژن‌های خانواده GASA، در مسیرهای پیام‌دهی هورمون‌های جیبرلیک اسید، آبسیزیک اسید، براسینواستروئیدها، سالیسیلیک اسید و نفتالین استیک اسید، تنظیم احیاء، تغییر در بیان برخی ژن‌ها و همچنین بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه، در دفاع علیه تنش‌های زیستی و غیر زیستی، عمل می‌کنند (Rezaee, Ahmadizadeh, and Heidari 2020). اسنیکین‌ها عموماً کوچک، دارای بار مثبت و غنی از سیستئین هستند (Oliveira-Lima et al. 2017) که در پاسخ‌های دفاعی گیاه، مانند فعالیت ضد میکروبی در برابر طیف وسیعی از پاتوژن‌های گیاهی (Almasia et al. 2008) و همچنین در انواع فرآیندهای توسعه گیاه (Sun et al. 2013; Zimmermann, Sakai, and Hochholdinger 2009) نقش دارند.

ژن‌های GASA در بافت‌های مختلف گیاهی الگوهای بیانی متفاوتی دارند (Panji, Ismaili, and Sohrabi 2022). برای مثال

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

ژن‌های AtGASA1 و AtGASA2 بیشتر در جوانه‌های گل و میوه و ژن AtGASA4 بیشتر در نواحی مریستمی Arabidopsis بیان شود (Bouteraa et al. 2023). ژن OsGASA9 در خوشه‌های برنج (*Oryza sativa*) بیان بسیار بالایی دارد (Li et al. 2020). علاوه بر این، بیان ژن‌های GASA در بافت‌های جوان بیشتر از بافت‌های مسن‌تر است (Bouteraa et al. 2023).

ژن‌های GASA همچنین در واکنش به تنش‌های غیرزیستی و زیستی و هورمون‌ها نقش دارند. به‌طوری‌که با افزایش بیوسنتز سالیسیلیک‌اسید (SA)، بیان نابه‌جای FsGASA4 (ژن GASA در *Fagus sylvatica*) مقاومت به تنش شوری، رادیکال‌های اکسیژن‌های واکنش‌پذیر و تنش گرمایی را در طول جوانه‌زنی بذر در گیاه *Arabidopsis thaliana* تراریخته بهبود می‌بخشد (Alonso-Ramírez et al. 2009).

با افزایش بیان ژن‌های خانواده GASA در سویا (*Glycine max*)، مقاومت نسبت به ویروس موزاییک سویا افزایش یافت (He et al. 2017). بیمارگر ویروس تریستزای مرکبات، ژن CcGASA4 را در مرکبات (*Citrus clementina*) فعال می‌کند (Wu et al. 2020). در نتیجه، خانواده ژنی GASA در چندین فعالیت فیزیولوژیکی و بیولوژیکی درگیر هستند.

طبق تحقیقات قبلی، پروتئین‌های GASA توسط جیبرلین (GA) و سایر هورمون‌های گیاهی مانند اکسین (IAA)، آبسیزیک‌اسید (ABA)، براسینوستروئیدها (BRs) و سالیسیلیک‌اسید (SA) تحریک می‌شوند (Li et al. 2011). AtGASA4 و AtGASA6 در *Arabidopsis* نیز توسط هورمون‌های رشد از جمله GA، اکسین، سیتوکینین و BR تحریک و توسط هورمون‌های تنش مانند ABA، SA، و اسید جاسمونیک (JA) سرکوب می‌شوند (Qu et al. 2016). علاوه بر این، ژن‌های GASA نقش مهمی در تولید و سیگنال‌دهی GA، و در تعاملات مختلف بین ژن‌های GASA و DELLA ایفا می‌کنند (Li et al. 2020; Sun et al. 2013; Zhang et al. 2009). تاکنون مطالعات گوناگونی با تمرکز بر خصوصیات عملکردی این پپتیدها در گونه‌های گیاهی مختلف شامل گندم نان (Cheng et al. 2019)، سیب (Fan et al. 2017)، برنج (Muhammad et al. 2019)، آرابیدوپسیس (Zhang and Wang 2008)، انگور (Ahmad et al. 2020)، سویا (Ahmad et al. 2019)، پنبه (Qiao et al. 2021)، ذرت (Zimmermann, Sakai, and Hochholdinger 2009)، گوجه‌فرنگی (Shi et al. 1992)، ژربرا (Kotilainen et al. 1999)، فلفل (Mao et al. 2011)، توت‌فرنگی (de la Fuente et al. 2006)، لوبیا فرانسوی (Bindschedler et al. 2006)، کاکائو (Faraji et al. 2021)، سیب‌زمینی (Nahirñak et al. 2016)، صنوبر (Han et al. 2021)، زردآلو (Han et al. 2021) و جو (Panji, Ismaili, and Sohrabi 2023) انجام گرفته است.

هدف از این مطالعه شناسایی این خانواده ژنی در موجودات گوناگون (شامل پروکاریوت‌ها، خزه‌ها، سرخس‌ها، جانوران، گیاهان نهان‌دانه و بازدانه) و تجزیه تحلیل فیزیکوشیمیایی، دمین‌های عملکردی، ساختار ژن، عناصر پیشبری، هستی‌شناسی، خاصیت ضد میکروبی، پیوندهای دی‌سولفیدی، مکان تجمع سلولی، تغییرات پس از ترجمه و ساختارهای ثانویه، بررسی‌های فیلوژنتیک و تجزیه و تحلیل بیان ژن به‌صورت *In silico* در گیاهان آرابیدوپسیس و برنج به‌عنوان دو گیاه مدل اصلی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

شناسایی ژن‌ها

برای شناسایی اعضای خانواده ژنی GASA، تمام توالی‌های پروتئین GASA موجود از بانک پروتئین پایگاه داده NCBI دریافت شد. توالی‌های دانلود شده با استفاده از نرم‌افزارهای CLC Genomics Workbench 9.0 و Vector NTI 10.3 هم‌تراز شدند و یک توالی مورد توافق از توالی‌های مختلف به‌دست آمد. توالی مورد توافق در سرور tBLASTn درج شد و در مقابل ژنوم موجودات مختلف شامل باکتری‌ها، جلبک‌ها و خزه‌ها، جانوران و سلسله‌ی گیاهی که شامل گیاهان آوندی و گیاهان بدون آوند مختلف است، هم‌ردیف شدند. نتایج حاصل از این هم‌ردیفی به‌عنوان ژن‌های اسنیکین فرضی وارد مراحل بعدی آنالیز شدند. چارچوب‌های خوانش باز (ORF) موجود در توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار Vector NTI 10.3 به پروتئین ترجمه شدند. توالی‌های پروتئینی حاصل با به کارگیری سه نرم‌افزار Interproscan، Pfam و CDD سایت NCBI برای وجود یا عدم وجود دمین‌های عملکردی محافظت شده مورد بررسی قرار گرفتند. تنها دمین‌های

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

عملکردی محافظت شده‌ای که توسط هر سه نرم‌افزار مذکور تأیید شده بودند، به‌عنوان دمین‌های اصلی پروتئین‌های اسنیکین انتخاب شدند.

بررسی ویژگی‌های پروتئینی

خصوصیات فیزیکوشیمیایی پپتیدهای خانواده GASA با استفاده از سرور بر خط ProtParam - Expasy تعیین شد (Gasteiger et al. 2005). اطلاعات کروموزومی همه اعضای خانواده ژنی GASA، از پایگاه‌های اطلاعاتی Phytozome و Ensembl به‌دست آمد. مرزهای اگزون-اینترون در همه ژن‌های GASA به‌وسیله هم‌ردیفی توالی ژنومیک و CDS با استفاده از سرور نمایش ساختار ژن (Gene Structure Display Server) شناسایی و تعیین شد (Guo et al. 2007).

ناحیه ۱۵۰۰ جفت‌باز پیشبر با استفاده از پایگاه بر خط PlantCare جهت تشخیص عناصر تنظیم‌کننده Cis مورد بررسی قرار گرفتند (Lescot et al. 2002). بررسی عوامل رونویسی به‌کمک پایگاه PlantRegMap صورت گرفت (Tian et al. 2020). عوامل رونویسی به‌طور اختصاصی به نواحی پیشبری متصل شده و بسته به نوع آن ها به کاهش یا افزایش بیان ژن‌ها منجر می‌شوند (Babu et al. 2004). از پایگاه‌های بر خط BLAST2GO (Conesa et al. 2005) برای تجزیه و تحلیل هستی شناسی ژن[1] (GO) استفاده شد. این تجزیه و تحلیل جهت پیش‌بینی عملکرد، نقش و خصوصیات ژن‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. بر اساس آنالیزهای هستی‌شناسی، ژن‌هایGASA از سه جنبه‌ی عملکرد مولکولی، فرایندهای زیستی و اجزا سلولی مورد بررسی قرار می‌گیرند.

برای پیش‌بینی این‌که هر کدام از پروتئین‌های GASA در کدام‌یک از بخش‌های سلول تجمع یافته و فعالیت دارند از سرور بر خط CELLO2GO استفاده شد (Yu et al. 2014).

جهت مشخص کردن خاصیت ضد میکروبی توالی‌های پروتئینی GASA از پایگاه بر خط CAMP[2] استفاده شد. توالی‌های پروتئینی به‌کمک الگوریتم‌های ماشین بردار پشتیبان[3] (SVM)، افتراقی خطی[4] (DA)، شبکه عصبی مصنوعی[5] (ANN) و جنگل تصادفی[6] (RF) مورد بررسی قرار گرفته و خاصیت ضد میکروبی بالقوه آن‌ها پیش‌بینی شد (Waghu et al. 2014).

جهت تعیین پپتید راهنما و مکان برش آن بر روی پروتئین‌ها از سرورهای SignalP (Almagro Armenteros et al. 2019) و TargetP (Emanuelsson et al. 2007) استفاده شد. همچنین برای تعیین مارپیچ‌های گذرنده از غشاء از پایگاه بر خط TMHMM (Krogh et al. 2001) استفاده شد.

موتیف‌ها، توالی‌های حفاظت‌شده کوتاه با عملکرد مجزا می‌باشند. توزیع موتیف‌های حفاظت‌شده پروتئین‌های GASA با استفاده از پایگاه اطلاعاتی MEME 5.3.0، تعیین و مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت (Bailey et al. 2009). پیوندهای دی‌سولفیدی موجود در پروتئین‌ها با استفاده از سرور DiANNA 1.1 پیش‌بینی شد (Ferrè and Clote 2005). مکان‌های فسفوریلاسیون و گلیکوزیلاسیون پروتئین‌های GASA با استفاده از سرورهای NetPhos 3. (Blom et al. 2004) و NetNGlyc 1.0 پیش‌بینی شدند (Gupta and Brunak 2002). همچنین با استفاده از نرم‌افزار Phyre2 ساختارهای ثانویه موجود در توالی‌های اسنیکین، مورد بررسی قرار گرفتند (Kelley et al. 2015).

روابط فیلوژنتیکی خانواده ژنی Snakin/GASA

روابط فیلوژنتیکی بین ژن‌های GASA مورد ارزیابی قرار گرفت. هم‌ترازی توالی چندگانه پروتئین‌های GASA با استفاده از Clustal Omega انجام شد (Sievers et al. 2011) و سپس با استفاده از نرم‌افزار MEGA X، درخت با روش Maximum-likelihood ایجاد و درخت فیلوژنتیک حاصل به روش بوت استرپ (bootstrap) با ۱۰۰۰ تکرار مورد ارزیابی قرار گرفت (Kumar et al. 2018).

تجزیه و تحلیل In solico بیان ژن‌ها در شرایط تنش‌های زیستی و غیر زیستی

تجزیه و تحلیل بیان ژن‌های خانواده GASA تحت شرایط تنش در گیاه برنج و آرابیدوپسیس به‌عنوان دو گیاه مدل اصلی به‌صورت *In silico* با استفاده از مجموعه داده‌های بیان ژنی حاصل از چندین آزمایش ریزآرایه، انجام شد. مجموعه‌های داده

[1] GENE Ontology
[2] Collection of Antimicrobial Peptide
[3] Support Vector Machine
[4] Discriminant Analysis
[5] Artificial Neural Network
[6] Random Forest

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

میکروآرایه مربوط به تأثیر تنش‌های مختلف زیستی و غیر زیستی در گیاهان برنج و آرابیدوپسیس از پایگاه داده GEO سایت NCBI به‌دست آمدند. از ابزار GEO2R برای تحلیل نمونه‌های نرمال‌سازی شده در مجموعه داده استفاده شد و ژن‌های با بیان متفاوت (DEGs) شناسایی شد. در این تحلیل‌ها، نمونه‌های تحت تنش با نمونه‌های کنترل برای شناسایی DEGs مقایسه شدند. DEGs با FDR < 0.05 و $|\text{Log 2 (fold change)}| \geq 1$ فیلتر شدند و ژن‌های خانواده GASA از این بین جدا شدند مطالعات صورت گرفته در گیاه برنج شامل تنش‌های غرقابی: GSE23574، خشکی:GSE63718، سرمایی: GSE37940، گرمایی: GSE83572، شوری: GSE4438 و GSE58603، فلزات سنگین: GSE25206 و GSE37161، حشره آفت: GSE110068، باکتریایی: GSE16793، قارچی: GSE7256، ویروسی: GSE11025، گیاه انگل: GSE7256 و در گیاه آرابیدوپسیس شامل تنش خشکی: GSE34188 و GSE40998، سرمایی: GSE31837 و GSE69923، گرمایی: GSE34188، شوری: GSE39956، GSE71001 و GSE121225، تنش آلومینیوم: GSE7334، کمبود آهن: GSE10576، کمبود سولفور: GSE30166، کمبود فسفات: GSE34004، pH پایین: GSE30095، باکتریایی: GSE62751 و GSE90852، قارچی: GSE76071، GSE50526، GSE58771، GSE67554 و GSE95609، حشرات آفت: GSE5525، GSE38281 و GSE6516، ویروسی: GSE37921 و GSE46760، تیمارهای هورمونی: GSE537، GSE7432 و GSE8456 می‌باشند. نقشه‌های حرارتی با استفاده از Heatmapper ایجاد شدند (Babicki et al., 2016).

تجزیه و تحلیل In solico بیان اختصاصی بافت ژن‌ها

الگوی بیان ژن‌های GASA در بافت‌های مختلف، از داده‌های RNA Seq به‌دست آمد تا درک اولیه از اهمیت عملکرد ژن‌های GASA در فرآیند رشد گیاه ارائه شود (Rapazote-Flores et al. 2019; Davidson et al. 2012; Mergner, Frejno, List, Papacek, Chen, Chaudhary, Samaras, Richter, Shikata, Messerer, et al. 2020; Mayer et al. 2012; Sakai et al. 2011; Bian et al. 2019).

تجزیه و تحلیل بیان اختصاصی ژن‌های GASA در گیاه برنج، در بافت‌های کالوس، بساک، برچه و مادگی، گل‌آذین زودرس، گل‌آذین در حال ظهور، اندوسپرم، بافت جنین، دانه ۵ روز پس از گرده‌افشانی، دانه ۱۰ روز پس از گرده‌افشانی، دانه کامل، خوشه قبل و بعد از گلدهی، برگ و ریشه (Davidson et al. 2012; Sakai et al. 2011) و در گیاه آرابیدوپسیس، در بافت‌های گرده، ریشه، ساقه گل، برچه، کاسبرگ، گلبرگ، برگ، گل، میوه و کوتیلدون مورد ارزیابی قرار گرفت (Mergner, Frejno, List, Papacek, Chen, Chaudhary, Samaras, Richter, Shikata, and Messerer 2020).

نتایج و بحث

شناسایی خانواده ژنی GASA

بررسی‌های هم‌ترازی نشان داد که پپتیدهای Snakin/GASA شامل یک خانواده چند ژنی هستند و در جانوران، خزه‌ها و جلبک‌های سبز وجود ندارند. اگرچه توالی‌های ژنی همولوگ را می‌توان در چند باکتری از جمله *Escherichia coli*، *Klebsiella pneumoniae*، *Nitriliruptoraceae bacterium*، *Acinetobacter baumannii*، *Soehngenia saccharolytica*، *Glycocaulis profundi* و *Staphylococcus warneri* نیز یافت. این خانواده در تمام گونه‌های گیاهان ژیمنوسپرم، شبه آنژیوسپرم و آنژیوسپرم در تعداد متفاوت توزیع شده‌اند، به این معنی که ظهور Snakin/GASA می‌تواند سازگاری گیاهان اجدادی با زمین باشد. در این مطالعه، با تجزیه و تحلیل توالی‌های ژنوم، تقریباً ۵۵۰ ژن کد کننده پروتئین Snakin/GASA در ۲۸ گونه گیاهی مورد بررسی قرار گرفت. که در گیاهان مختلف، با تعداد متفاوت از ۹ پپتید در خیار (*Cucumis sativus*) تا ٤٤ پپتید در کینوا (*Chenopodium quinoa*) متغیر بود (جدول ۱). این اختلاف قابل‌توجه نشان‌دهنده ضرورت بررسی دقیق‌تر ساختاری و عملکردی ژن‌های Snakin/GASA است تا با وجود تشابهات بالای توالی، ارتباط بیولوژیکی آن‌ها بهتر روشن شود.

ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی

از ابزار Protparam-ExPASy برای بررسی خصوصیات پروتئین‌ها مانند وزن مولکولی، نقطه ایزوالکتریک، شاخص ناپایداری، میانگین کل هیدروپاتیک (GRAVY)، محتوای اسید آمینه اصلی و شاخص آلیفاتیک استفاده شد. Ala، Cys، Lys و

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

Leu رایج‌ترین اسیدهای آمینه در پروتئین‌های GASA بودند، اگرچه Ser و Thr نیز یافت شدند. در مجموع، طول پپتید از ٦٥ در پنبه تا ٨٤٠ اسید آمینه در سیب متغیر بود در حالی‌که بیشتر پپتیدها ٨٥ تا ٢٠٠ اسیدآمینه طول داشتند. کمترین وزن مولکولی در زیتون با ٦/٥ کیلو دالتون و بیشترین ٩٥/٧ در سیب مشاهده شد، در صورتی‌که تعداد زیادی از پپتیدهای بررسی شده، کمتر از ١٥ کیلودالتون وزن داشتند. وزن مولکولی پایین می‌تواند موجب سرعت تولید، انتقال و عملکرد پروتئین‌های ضد میکروبی شود (Porto and Franco 2013). نقطه ایزوالکتریک بین ٥,٠٧ تا ١١,٧٧ متغیر بود و همچنین اغلب پپتیدها ناپایدار (بیشتر از ٤٠) و آبگریز بودند. میزان pH ایزوالکتریکی که برای اسینکین‌های شناسایی شده محاسبه شده، نشان‌دهنده‌ی خاصیت بازی این پپتیدها بوده که این امر به دلیل فراوانی بالای اسیدهای آمینه‌ای مانند سیستئین در ساختار آن‌ها است (Nahirñak et al. 2012b; Porto and Franco 2013).

میزان شاخص ناپایداری توالی‌های شناسایی شده، نشان‌دهنده پایداری متفاوت این پپتیدها در محیط است. ناپایداری یکی از عوامل تأثیرگذار بر فعالیت ضد میکروبی آن‌ها می‌باشد (Gamage et al. 2019). ناپایداری، نیمه عمر پروتئین‌ها را در فعالیت‌های آنزیمی سلولی آن‌ها نشان می‌دهد (Abdullah et al. 2021). شاخص آلیفاتیک اسینکین‌های شناسایی شده گیاهی در مطالعه حاضر (از ٢٢,٩ در سویا تا ٩٥,٥ در سیب) نشان‌دهنده‌ی مقاومت نسبتاً خوب این پروتئین‌ها در مقابل حرارت بوده که به دلایلی مانند وجود ساختارهای ثانویه و پل‌های دی سولفیدی و همچنین درصد بالای اسیدهای آمینه‌ی خاص است (Ikai 1980; Porto and Franco 2013). به حجم نسبی که توسط زنجیره‌های آلیفاتیک اشغال می‌شود شاخص آلیفاتیک گویند که نشان‌دهنده‌ی آبگریزی و همچنین پایداری پروتئین است. عمومی‌ترین مکانیسم ضدمیکروبی اسینکین‌های گیاهی و سایر پپتیدهای ضدمیکروبی، برهمکنش و از بین بردن غشاهای سلولی بیمارگرها است. برای انجام این برهمکنش، پپتیدها باید ساختارهای ویژه و همچنین خاصیت آبگریزی در خود ایجاد کنند. اسینکین‌های گیاهی به‌وسیله‌ی افزایش میزان اسیدهای آمینه آبگریز مانند سیستئین در ساختار خود خاصیت هیدروفوبیک خود را افزایش داده و می‌توانند با غشاهای سلولی که عمدتاً از اسیدهای چرب دو لایه با خاصیت آبگریزی بالایی هستند، برهمکنش مناسبی داشته باشند (Gasteiger et al. 2005; Porto and Franco 2013).

جدول ١- طول توالی، وزن مولکولی، نقطه ایزوالکتریک، شاخص آلیفاتیک، شاخص ناپایداری، میانگین کل شاخص هیدروپاتیک و مکان تجمع سلولی ژن‌های خانواده Snakin/GASA در چندین گیاه مدل

Plant Model گیاه مدل	Length (aa) طول توالی	MW (KDa) وزن مولکولی	pI نقطه ایزوالکتریک	Aliphatic Index شاخص آلیفاتیک	Instability Index شاخص ناپایداری	GRAVY میانگین کل شاخص هیدروپاتیک	Cell Localization مکان تجمع سلولی
Amborella trichopoda آمبورلا	98-129	9.8-13.8	8.1-9.8	45.9-82.8	44.4-63.9	-0.3 / 0.2	خارج سلولی
Ananas comosus آناناس	67-116	10.09-13.9	8.8-9.94	31.6-79.17	33.8-69.8	-0.8 / 0.13	خارج سلولی
Arabidopsis thaliana آرابیدوپسیس	87-275	9.7-29.13	8.16-10.23	51.9-79.7	33.7-64.07	-0.5 / 0.15	خارج سلولی93% هسته‌ای/غشای 7% پلاسمایی
Brachypodium distachyon براکی‌پودیوم	93-110	9.8- 13.5	8.8-10	51.4-72.7	29.17-55.77	-0.27 / 0.12	خارج سلولی
Brassica oleracea کلم	88-294	9.5-31.3	6.33-10.64	51.18-80.09	28.156-66.48	-0.58 / 0.02	96% خارج سلولی 8% هسته‌ای/غشای پلاسمایی

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

Brassica rapa کلزا	88-280	9.5-29.9	7.33-10.38	51.18-80.7	26.47-67.85	-0.5 / 0.04	خارج سلولی96% هسته‌ای/غشای8% پلاسمایی
Chenopodium quinoa کینوا	87-274	9.3-28.13	8.1-10	40.16-80/8	11.7-70.7	-0.5 / 0.13	خارج سلولی 2%هسته‌ای/غشای پلاسمایی
Cicer arietinum نخود	86-182	9.4-17.27	8.6-9.85	41.8-91.55	28.1-85.13	-0.56 / 0.09	94%خارج سلولی 2% هسته‌ای/غشای پلاسمایی 5% میتوکندریایی
Citrus sinensis پرتقال	88-236	9.7.25.8	5.07-9.9	50.01-86.46	29.33-64.5	-0.37 / 0.67	94% خارج سلولی 12% هسته‌ای/غشای پلاسمایی
Cucumis sativus خیار	68-231	7.3-24.2	8.19-10	40.3-76.6	35-84	-0.3 / 0.2	66% خارج سلولی 22% هسته‌ای 11% غشای پلاسمایی
Glycine max سویا	88-191	9.5-20.27	5.9-9.66	22.9-87.9	30/2-107.5	-0.8 / 0.1	خارج سلولی 12% هسته‌ای 6% غشای پلاسمایی
Gossypium hirsutum پنبه	65-281	7.3-29.6	6.16-10.23	30-82.6	32.3-90.15	-0.66 / 0.25	92% خارج سلولی 5.5% سیتوپلاسمیک 17% هسته‌ای/غشای پلاسمایی
Helianthus annuus آفتابگردان	78-431	8.2-43.9	8.17-10	36.5-93.8	30-84.8	-0.66 / 0.75	92% خارج سلولی 17% غشای پلاسمایی 25% هسته‌ای
Lactuca sativa کاهو	89-662	9.73-67.7	8.24-9.8	40.17-80.75	31.9-109.6	-0.5 / 0.2	90% خارج سلولی 5.2% غشای پلاسمایی 15.8% هسته‌ای
Malus domestica سیب	88-840	9.7-95.7	8.8-10.35	41.6-95.5	36-77.5	-0.46 / 0.18	91% خارج سلولی 13% هسته‌ای/غشای پلاسمایی
Manihot esculenta کاساوا	88-112	9.7-12.34	7.39-9.66	45.6-86.15	25.7-68.2	-0.43 / 0.23	خارج سلولی
Medicago truncatula یونجه	85-406	9.2-45.7	7.31-10	41.8-89.5	22.3-76.3	-0.44 / 0.16	96% خارج سلولی 11.5% هسته‌ای 3.8% غشای پلاسمایی
Musa acuminate موز	83-136	9.13-14.33	8.-9.7	48.2-75.6	30.7-63.2	-0.55 / 0.13	خارج سلولی
Olea europaea زیتون	88-145	6.3-15.7	9.2-9.8	28.13-88.4	25.7-69.6	-0.68 / 0.13	خارج سلولی هسته‌ای6%
Oryza sativa برنج	92-162	9.6-17.11	6.-9.56	46.44-70.5	32.22-61.54	-0.55 / 0.04	خارج سلولی 10% هسته‌ای
Phaseolus vulgaris لوبیا	88-179	9.4-19.16	8.5-9.86	53.04-89.7	23.17-78.7	-0.54 / 0.03	خارج سلولی 3% هسته‌ای/غشای پلاسمایی
Populus trichocarpa صنوبر سیاه	88-206	9.65-22.37	9.22-9.95	54.6-83.1	27.19-69.3	-0.44 / 0.3	خارج سلولی 6% هسته‌ای/غشای پلاسمایی
Prunus persica هلو	88-210	9.5-22.43	8.43-9.9	44.35-87.6	31.3-85.16	-0.38 / 0.22	94% خارج سلولی

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

12% هسته‌ای 6% غشای پلاسمایی							
خارج سلولی	-0.55 / -0.01	20.11-62.76	53/03-87.46	8.51-9.7	9.67-16.05	88-146	*Solanum lycopersicum* گوجه‌فرنگی
خارج سلولی 3% هسته‌ای/غشای پلاسمایی	-0.52 / 0.09	17.3-78.44	53-87.44	6.28-10	9.7-16.3	88-155	*Solanum tuberosum* سیب زمینی
92% خارج سلولی 8.3% هسته‌ای	-0.68 / 0.27	32.77-79.27	53.8-92.7	8.72-11.77	9.82-15.05	93-141	*Sorghum bicolor* سورگوم
خارج سلولی 13% هسته‌ای 6.6% غشای پلاسمایی	-0.32 / 0.14	35.1-72.47	53.07-84.17	8.8-10.13	9.6-24.12	88-231	*Vitis vinifera* انگور
خارج سلولی 7.7% هسته‌ای	-0.56 / 0.36	32.32-75.16	50-81.07	6.8-9.57	9.74-22.2	93-198	*Zea mays* ذرت

تعیین دمین عملکردی

در همه پروتئین‌های GASA شناسایی شده، یک پپتید راهنما در انتهای آمینی شامل ۲۰ تا ۳۰ اسید آمینه، یک توالی پپتیدی متغیر و یک دومین بسیار حفاظت‌شده در انتهای کربوکسیلی، حاوی تقریباً ۶۰ اسید آمینه و ۱۲ سیستئین در تمام پروتئین‌های GASA یافت شد (شکل ۱). همچنین مارپیچ‌های گذرنده از غشاء در تمام پروتئین‌های GASA بررسی شد که حداقل یک بخش گذرنده در ٤٥ درصد از آن‌ها مشاهده شد.

تعیین وضعیت ساختار ژن‌ها

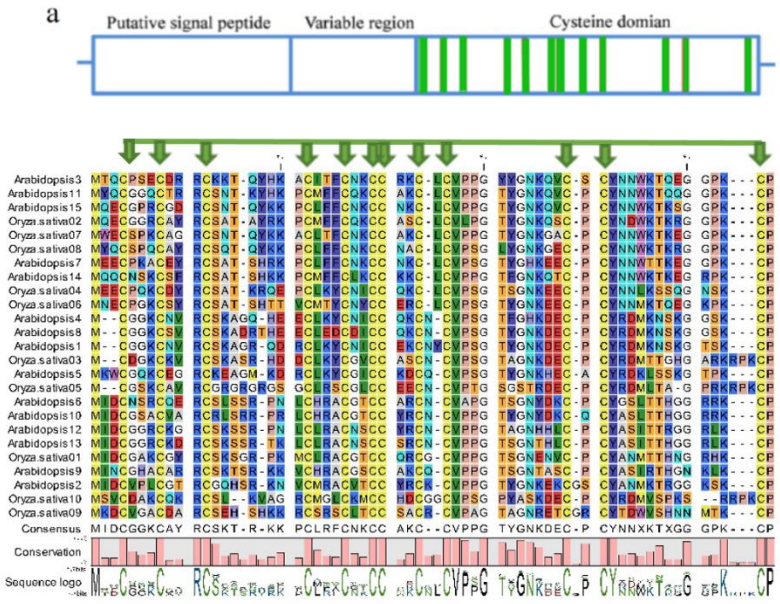
با استفاده از ابزار Gene Structure Display Server ساختارهای اگزون–اینترون بر اساس هم‌ترازی CDS و توالی ژنی ایجاد شد. ژن‌های GASA ساختارهای ژنتیکی مشترک و حفاظت‌شده داشتند، به‌طوری که دارای دو، سه و یا چهار اگزون بودند (شکل ۲). وجود بیش از یک اینترون در ساختار اسنیکین‌ها امکان انجام پیرایش متناوب را در آن‌ها ایجاد کرده و بنابراین امکان تولید چندین ایزوفروم از آن‌ها وجود دارد (Matlin, Clark, and Smith 2005). اینترون‌های مختلف در ساختار خود دارای عناصری هستند که منجر به افزایش بیان ژن و پاسخ به تنش‌ها و محرک‌های محیطی می‌شوند. وجود این عناصر در اینترون‌ها، نقش تکاملی مهمی را که اینترون‌ها و دیگر عناصر غیر کدکننده در ژنوم موجودات زنده بازی می‌کنند را مشخص می‌کند (Ast 2004).

تجزیه و تحلیل عناصر سیس و فاکتورهای رونویسی

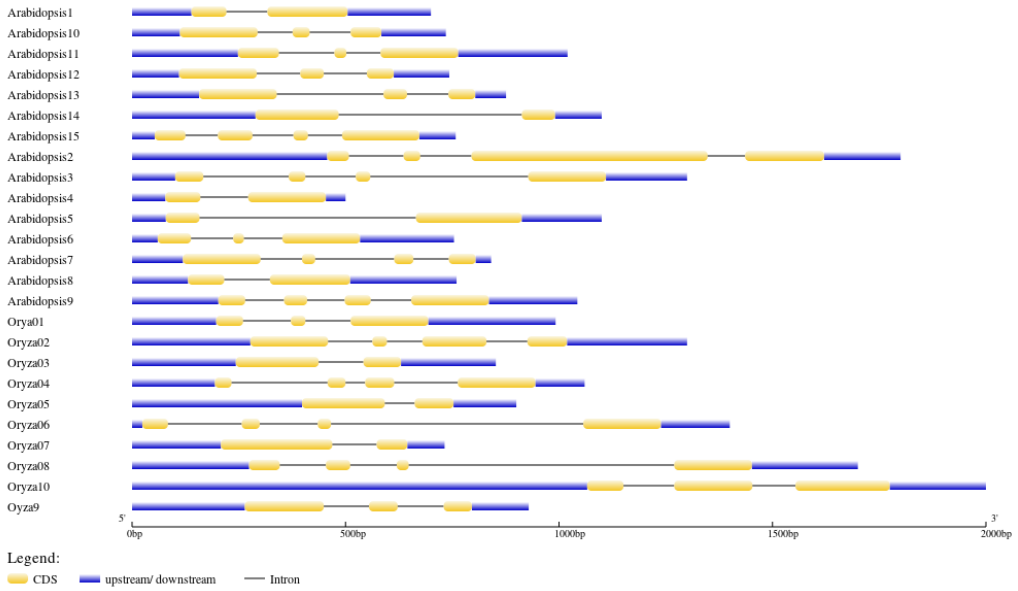
توالی‌های تنظیم‌کننده cis که در فعالیت ژن‌ها نقش دارند، قطعات نوکلئوتیدی خطی در مناطق غیر کدکننده DNA هستند (Venter and Botha 2010). عوامل رونویسی (Transcription Factors - TFs) تنظیم‌کننده‌های مرکزی بیان ژن هستند و در پاسخ به تنش‌زا و هورمون‌ها و در تمایز سلولی و رشد اندام‌ها نقش دارند (Sukumari Nath et al. 2019). جهت بررسی مکانیسم‌های تنظیمی ژن‌های GASA، ۱۵۰۰ جفت‌باز بالادست کدون شروع مورد ارزیابی گرفت. عناصر تنظیمی سیس مرتبط با هورمون‌های گیاهی در پیشبرهای گیاهان مدل بررسی شده، از جمله موتیف TGACG، جعبه TATC، جعبه P، ABRE، عنصر TGA، هسته AuxRR و عناصر ERE و TCA شناسایی شدند. مشخص شد که اکثر این عناصر سیس به ABA، GA و اسید سالیسیلیک مرتبط هستند. عناصر سیس مرتبط با انواع مختلف پاسخ استرس (LTR و STRE) و مقاومت به بیماری (تکرارهای غنی از TC، W-box و WUN-motif) در اکثر ژن‌ها شناسایی شدند. عناصر تنظیم سیس متابولیسم (O2-Site) zein و تنظیم‌کننده اختصاصی بذر (RY-element) نیز در این مناطق از پیشبر شناسایی شد. علاوه بر این، پیشبرهای اکثر ژن‌های GASA شامل عناصر سیس مربوط به تنفس بی‌هوازی (ARE) و پاسخ نوری (GT1-motif، TCT-motif، Box 4، GATA، G-BOX و AE-box) بودند. یافته‌ها نشان داد که چندین هورمون گیاهی ممکن است ژن‌های GASA را برای واکنش به تنش‌های مختلف کنترل کنند (شکل a۳). همچنین از Cytoscape v3.8.2 (Smoot et al. 2011) برای ایجاد

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

یک شبکه تعامل عوامل رونویسی – ژن‌های برنج (شکل b۳) و آرابیدوپسیس (شکل c۳) استفاده شد. برهمکنش‌های قوی بین عوامل رونویسی Dof، WRKY، ERF و MYB و ژن‌های GASA در شبکه برهمکنشی ساخته شده مشاهده شد (شکل ۳).

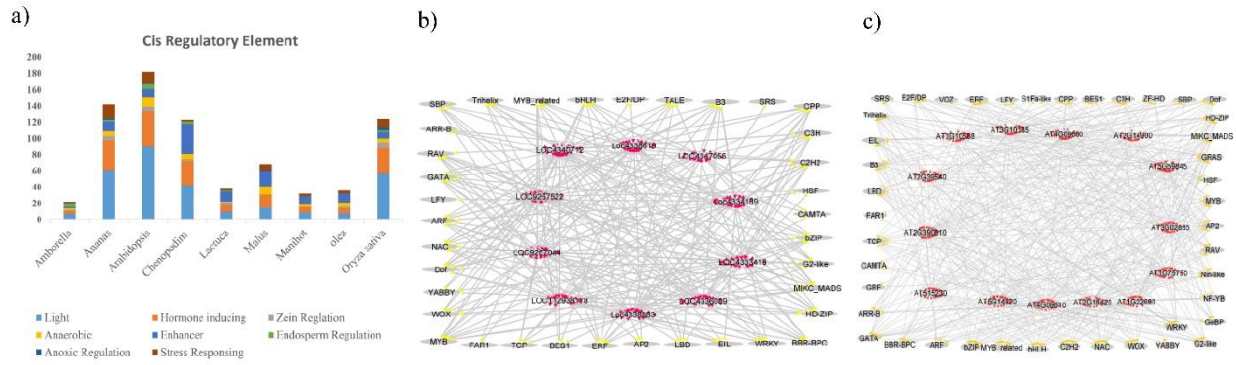


شکل ۱- همترازی دومین GASA از پروتئین‌های اسنیکین برنج و آرابیدوپسیس. a) تجزیه و تحلیل ساختار دومین‌های پروتئین‌های اسنیکین، ستون‌های سبز نشان‌دهنده ۱۲ سیستئین حفظ شده آن‌ها است. b) هم‌ترازی چندگانه توالی پروتئین‌های اسنیکین، که دمین‌های حفاظت شده آن‌ها نشان داده شده است.

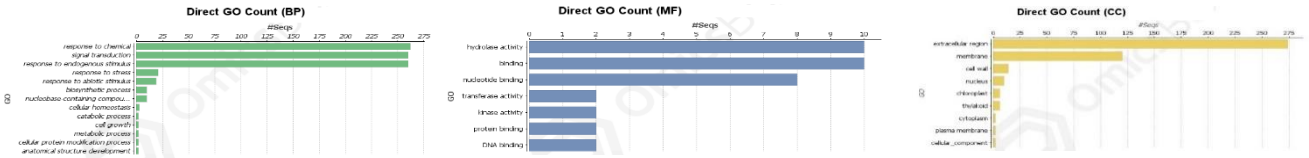


شکل۲- تجزیه و تحلیل ترکیب اگزون-اینترون گیاهان آرابیدوپسیس و برنج، جعبه‌های زرد، خط سیاه و آبی به‌ترتیب موقعیت اگزون، اینترون و توالی UTR می‌باشند.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]



شکل ۳- a – عناصر سیس و فاکتورهای رونویسی پیش‌بینی شده در ناحیه ۱,۵ کیلوباز بالا دست کدون آغاز ژن‌های GASA، b. برنج و c. آرابیدوپسیس



شکل ٤– هستی‌شناسی ژن‌ها. فعالیت‌های مرتبط با فرآیندهای زیستی (BP)، فعالیت‌های مولکولی (MF) و اجزای سلولی (CC) را نشان می‌دهد. بیشترین تعداد توالی‌ها در BP به پاسخ به مواد شیمیایی و انتقال سیگنال، در MF به فعالیت‌های هیدرولازی و اتصال و در CC به منطقه خارج سلولی و غشا مربوط می‌باشد.

تعیین هستی‌شناسی ژن‌ها

تجزیه و تحلیل هستی‌شناسی یک محصول ژنی را با در نظر گرفتن سه جنبه اصلی عملکرد مولکولی، فرایند زیستی که در آن شرکت می‌کند و جایگاه سلولی آن توصیف می‌کند (Du Plessis, Škunca, and Dessimoz 2011). نتایج مشخص کرد که ۵۵ درصد از پروتئین‌های GASA در فرایندهای زیستی دخیل می‌باشند. از مهم‌ترین فرایندهای زیستی که تعداد چشمگیری از پروتئین‌های GASA در آن نقش دارند، می‌توان به پاسخ به تنش‌های زیستی، محرک‌های درون‌زا و غیر زیستی و همچنین انتقال سیگنال اشاره کرد. همین‌طور اینکه این پروتئین‌ها در پاسخ به فرایندهای سنتتیک و هموستازی سلولی نیز دخیل می‌باشند. نتایج حاصل از بررسی جنبه عملکرد مولکولی ژن‌های شناسایی شده نشان داد که پروتئین‌های GASA در فعالیت‌های هیدولازی، اتصال، کیناز و ترانسفراز دخیل می‌باشند (شکل ٤). محلی که اسنیکین‌ها پس از تولید در آن تجمع پیدا می‌کنند، همواره با نقشی که این پپتیدها در سیستم دفاعی و مقابله با عوامل بیماری‌زا بازی می‌کنند، رابطه‌ی مستقیم دارد. اسنیکین‌ها و تقریباً تمامی پپتیدهای ضد میکروبی برای برهمکنش بهتر با غشاهای میکروبی و همچنین انجام بهتر فعالیت ضد میکروبی خود باید از درون سلول به محیط خارج سلولی و فضای بین سلول‌ها یعنی جایی که اغلب بیمارگرها حضور دارند، انتقال یابند. به‌همین دلیل، اسنیکین‌ها پس از ترجمه و تشکیل ساختارهای ثانویه، با استفاده از پپتید راهنمای خارج سلولی خود به خارج از سلول ترشح شده تا در اولین خط دفاعی سلول به مبارزه با بیمارگرها بپردازند. بنابراین، چنین پپتید راهنمای ترشحی خارج سلولی باید در ساختار اسنیکین‌ها و سایر پپتیدهای ضدمیکروبی که مکانیسم اصلی عمل آن‌ها برهمکنش با غشاهای میکروبی است، وجود داشته باشد (Oliveira-Lima et al. 2017). براساس نتایج حاصل از پیش‌بینی اجزای سلولی برای پروتئین‌های GASA، حدود۹۸ درصد از پپتیدهای شناسایی شده، خارج از غشای سلولی ، ۱۰درصد در هسته، ٦ درصد در غشای پلاسمایی و ۰/٦درصد از پپتیدها در اندامک‌های درون سلولی فعالند (شکل٤). در مطالعات پیشین نیز، تجمع خارج سلولی پروتئین‌های GASA در گیاهان مختلف گزارش شده است

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

Rezaee, Ahmadizadeh, and Heidari 2020; Zhang et al.) (2009).

خاصیت ضد میکروبی پروتئین‌های GASA

بر اساس برخی ویژگی‌های پپتیدهای ضد میکروبی، پایگاه اطلاعاتی CAMP ابزاری را توسعه داده است که با استفاده از الگوریتم‌های محاسباتی مختلف، قادر به پیش‌بینی ویژگی ضد میکروبی در پپتیدها و پروتئین‌های دیگر است. این الگوریتم‌ها تنها در صورت وجود یک یا چند ویژگی مشترک ضد میکروبی پپتیدها و پروتئین‌های مورد بررسی، آن‌ها را به‌عنوان پپتید یا پروتئین‌های با خاصیت ضد میکروبی در نظر می‌گیرد (Waghu et al. 2014). بررسی اسنیکین‌های شناسایی شده در گیاهان مورد مطالعه پس از حذف پپتید راهنما، در پایگاه CAMP، خاصیت ضد میکروبی را با احتمال بالایی در تمامی این پپتیدها نشان داد. درالگوریتم Support Vector Machine (SVM) با میزان احتمال بیشتر از ۹۹ درصد، الگوریتم Random Forest (RF) با میزان احتمال بیشتر از ۷۰ درصد، الگوریتم Discriminant Analysis (DA) با میزان احتمال بیشتر از ۹٤ درصد و الگوریتم Artificial Neural Network (ANN) با تأیید کامل وجود خاصیت ضد میکروبی را در تمامی اسنیکین‌های شناسایی شده پیش‌بینی کرد.

بررسی موتیف‌های حفاظت شده و پیوندهای دی‌سولفیدی

موتیف‌ها به‌طور کلی به‌عنوان توالی‌های حفظ شده تکاملی در ساختارهای اولیه پروتئین‌ها شناسایی می‌شوند. از آن‌جایی که موتیف‌ها در طول سیر تکامل پایدار و با ثبات باقی مانده‌اند، باید عملکردهای بیولوژیکی خاصی داشته باشند (Seo and Kim 2018). با استفاده از سرور اطلاعاتی بر خط MEME موتیف‌های حفاظت شده در پروتئین‌های GASA، تشخیص داده شدند. مشابهت در موتیف یا دمین در پروتئین‌های مختلف نشان‌دهنده عملکردی مشابه در پروتئین‌ها می‌باشد. ده موتیف پروتئینی حفاظت‌شده در پروتئین‌های GASA شناسایی شد. بررسی وجود پیوندهای دی‌سولفیدی در ساختار پپتیدهای GASA ، ۱۲ اسید آمینه سیستئین حفظ شده را نشان داد که شش پیوند دی‌سولفیدی درون مولکولی را تشکیل می‌دهند. الگوی اتصال اسیدهای آمینه سیستئین و تشکیل پیوندهای دی‌سولفیدی در Arabidopsis1-Arabidopsis3 و Arabidopsis4-Arabidopsis10 یکسان بود و سایر GASAها الگوهای اختصاصی را نشان دادند.

تغییرات پس از ترجمه و ساختارهای ثانویه

اسنیکین‌های گیاهی برای ایجاد ساختارهای پایدار و همچنین عملکرد مناسب در شرایط مختلف، باید در ساختار خود پیچ و تاب‌های ویژه‌ای همانند مارپیچ‌های آلفا، صفحات بتا و همچنین پل‌های دی‌سولفیدی ایجاد کنند تا بتوانند با بیشترین قابلیت با بیمارگرهای هدف برهمکنش داشته باشند (Porto and Franco 2013). مارپیچ‌های آلفا و صفحات بتا در ساختارهای پروتئینی پیش‌بینی‌شده برای همه پروتئین‌های GASA یافت شدند. وجود ۰ تا ٦ مارپیچ آلفا و ۱ تا ۱۱ رشته بتا در ساختار این پپتیدها مشخص شده است. پپتیدهای Arabidopsis1,2,3,6,11,12,13,15 و Oryza1,6 تنها دارای رشته های بتا هستند، اما سایر پپتیدهای اسنیکین دارای مارپیچ آلفا و رشته‌های بتا با هم هستند. تغییرات پس از ترجمه، تغییراتی شیمیایی در پروتئین‌ها هستند که منجر به تفاوت در ساختار و عملکرد، مانند مکان سلولی و تنظیم آلوستریک فعالیت آنزیم می‌شوند (Ahmad et al. 2019). فسفوریلاسیون پروتئین‌ها همچنین برای سیگنال‌دهی سلولی و تنظیم پروتئین بسیار مهم است و به‌عنوان بستری برای کینازهای مختلف عمل می‌کند (Silva-Sanchez, Li, and Chen 2015). به‌طور مشابه، گلیکوزیلاسیون یک تغییر رایج و متنوع است که برای فرآیندهای بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی یک ارگانیسم حیاتی است (Abdullah et al. 2021). این GASAهای گلیکوزیله ممکن است نقش مهمی در فرآیندهای گیاهی داشته باشند. در این تحقیق، تغییرات پس از ترجمه ژن‌های GASA، از نظر فسفوریلاسیون و گلیکوزیلاسیون پیش‌بینی شده است. در گیاهان آرابیدوپسیس و برنج نیز به‌ترتیب ۱۹۵ و ۱۲۰ جایگاه فسفوریلاسیون مشاهده شد و همچنین در ژن‌های Arabidopsis9,16 و Oryza2,3 جایگاه های مربوط به گلیکوزیلاسیون دیده شد. پیش‌تر نتایج مشابه در گیاهان برنج، آرابیدوپسیس، گوجه‌فرنگی و کاکائو مشاهده شده است (Abdullah et al. 2021; Rezaee, Ahmadizadeh, and Heidari 2020).

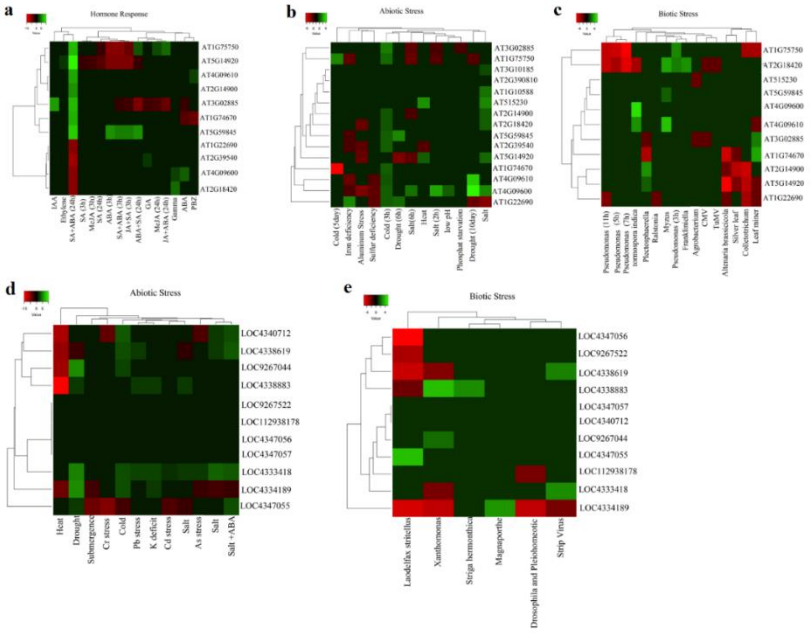
آنالیز فیلوژنتیکی

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

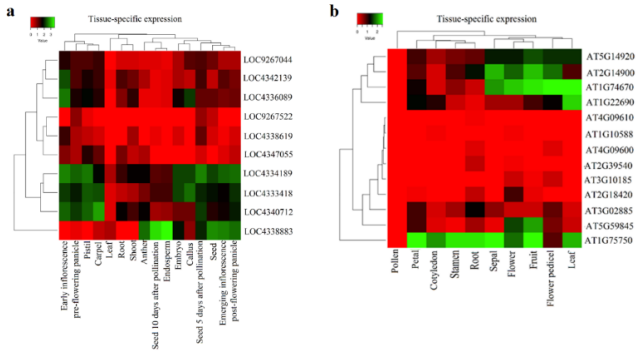
درخت فیلوژنتیک با استفاده از توالی‌های پروتئین GASA برای درک بهتر ارتباطات تکاملی ایجاد شد. بر اساس درخت فیلوژنتیک، ژن‌های GASA در سه گروه اصلی طبقه‌بندی شدند.

تجزیه و تحلیل In-Silico بیان ژن‌ها

داده‌های آزمایش‌های ریزآرایه برای بررسی پروفایل‌های بیان ژن‌های GASA در پاسخ به تنش‌های زیستی، غیرزیستی و هورمونی در گیاه برنج و آرابیدوپسیس استفاده شد. نتایج نشان داد که تنش‌های مختلف مانند غرقابی، خشکی، سرما، شوری، سمیت فلزات سنگین و تنش‌های زیستی از جمله پاتوژن‌ها و آفات، بر بیان ژن‌های GASA تأثیرگذار بوده و این تأثیرات به‌صورت کاهش یا افزایش بیان ژن‌ها مشاهده شد. همچنین، تیمارهای هورمونی مانند ABA، SA و IAA نیز تغییراتی در بیان ژن‌ها ایجاد کردند. این تغییرات در بافت‌های مختلف گیاه مانند کالوس، بساک، برچه، مادگی، گل‌آذین، اندوسپرم، جنین و دانه نیز مورد بررسی قرار گرفت و الگوهای بیانی متفاوتی بسته به نوع بافت و شرایط تنش مشاهده شد. یافته‌ها نشان داد که ژن‌های GASA نقش‌های متنوعی در پاسخ به تنش‌های مختلف دارند (شکل ۵ و ٦).



شکل ۵- الگوی بیان ژن‌های GASA در گیاه آرابیدوپسیس (a. در پاسخ به تیمار هورمونی، b. پاسخ به تنش‌های غیر زیستی و c- پاسخ به تنش‌های زیستی) و در گیاه برنج (d. تنش‌های غیر زیستی و e. تنش‌های زیستی). مقادیر Foldchange از مقیاس ۱۰- برای کاهش بیان (رنگ قرمز) و ٦ (رنگ سبز) برای افزایش بیان استفاده شده است.



شکل ٦- بیان اختصاصی بافت ژن‌های Snakin/GASA در a . گیاه برنج و b. گیاه آرابیدوپسیس

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

نتیجه‌گیری کلی

در این مطالعه، تجزیه و تحلیلی جامع بر خانواده ژنی Snakin/GASA با هدف ارائه بینشی کامل‌تر بر منشاء، گسترش، تنوع و الگوهای بیان آن‌ها تحت شرایط مختلف انجام شد. نتایج نشان داد که توالی پپیدهای اسنیکین در برخی باکتری‌ها و گیاهان نهاندانه وجود دارند و در بازدانگان و جانوران دارای همولوگ نیستند. حضور دمین GASA، پپتید سیگنال، تجمع خارج سلولی، شش پل دی‌سولفیدی، فسفوریلاسیون پس از ترجمه و فعالیت ضد میکروبی برای همه ژن‌های GASA مشاهده شد. الگوی بیان متفاوت در بافت‌های مختلف و القاء تحت تنش‌های زیستی و غیرزیستی از دیگر ویژگی‌های این ژن‌ها بود. همان‌طور که قبلاً ذکر شد، پیش‌بینی شده است که ژن‌های GASA به تنش‌های مختلف حساس هستند. ژن‌های GASA در فرآیندهای مختلف رشد و نمو گیاهان از طریق الگوی مرتبط با هورمون درگیر می‌شوند، که نشان می‌دهد این ژن‌ها در فرآیندهای تنظیمی و ارتباط متقابل هورمونی نقش دارند. به‌طور کلی، اطلاعات یافته شده در این مطالعه می‌تواند اطلاعات ما را در مورد نقش بالقوه ژن‌های GASA در فرآیندهای بیولوژیکی و فیزیولوژیکی گیاهان گسترش دهد و همچنین می‌تواند به محققان آینده در درک بهتر نقش این ژن‌ها کمک کند.

منابع

Abdullah, Faraji S, Mehmood F, Malik HM, Ahmed I, Heidari P, Poczai P (2021) The GASA Gene Family in Theobroma cacao: Genome wide Identification and Expression Analysis. bioRxiv: 2021.01.27.425041.

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. International Journal of Molecular Sciences 21:1088.

Ahmad MZ, Sana A, Jamil A, Nasir JA, Ahmed S, Hameed MU, Abdullah (2019) A genome-wide approach to the comprehensive analysis of GASA gene family in *Glycine max*. Plant molecular biology 100:607-620.

Almagro Armenteros JJ, Tsirigos KD, Sønderby CK, Petersen TN, Winther O, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H (2019) SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. Nature Biotechnology 37:420-423.

Almasia NI, Bazzini AA, Hopp HE, VAZQUEZ-ROVERE CE (2008) Overexpression of snakin-1 gene enhances resistance to *Rhizoctonia solani* and *Erwinia carotovora* in transgenic potato plants. Molecular Plant Pathology 9:329-338.

Alonso-Ramírez A, Rodríguez D, Reyes D, Jiménez JA, Nicolás G, López-Climent M, Gómez-Cadenas A, Nicolás C (2009) Evidence for a role of gibberellins in salicylic acid-modulated early plant responses to abiotic stress in Arabidopsis seeds. Plant physiology 150:1335-1344.

Ast G (2004). How did alternative splicing evolve? Nature Reviews Genetics 5:773-782.

Babu MM, Luscombe NM, Aravind L, Gerstein M, Teichmann SA (2004) Structure and evolution of transcriptional regulatory networks. Current opinion in structural biology 14:283-291.

Bahar AA, Ren D (2013) Antimicrobial Peptides. Pharmaceuticals 6:1543-1575.

Bailey TL, Boden M, Buske FA, Frith M, Grant CE, Clementi L, Ren J, Li WW, Noble WS (2009) MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. Nucleic Acids Reserches 37:W202-8.

Bian J, Deng P, Zhan H, Wu X, Nishantha MD, Yan Z, Du X, Nie X, Song W (2019) Transcriptional dynamics of grain development in barley (*Hordeum vulgare* L.). International journal of molecular sciences 20:962.

Bindschedler LV, Whitelegge JP, Millar DJ, Bolwell GP (2006) A two component chitin-binding protein from French bean–association of a proline-rich protein with a cysteine-rich polypeptide. FEBS letters 580:1541-1546.

Blom N, Sicheritz-Pontén T, Gupta R, Gammeltoft S, Brunak S (2004) Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. Proteomics 4:1633-49.

Bouteraa MT, Ben Romdhane W, Baazaoui N, Alfaifi MY, Chouaibi Y, Ben Akacha B, Ben Hsouna A, Kačániová M, Ćavar Zeljković S and Garzoli S (2023). GASA proteins: Review of their functions in plant environmental stress tolerance. Plants 12:2045.

Bouteraa MT, Ben Romdhane W, Baazaoui N, Alfaifi MY, Chouaibi Y, Ben Akacha B, Ben Hsouna A, Kačániová M, Ćavar Zeljković S, Garzoli S, Ben Saad R (2019) Identification and Analysis of the GASR Gene Family in Common Wheat (*Triticum aestivum* L.) and Characterization of TaGASR34, a Gene Associated With Seed Dormancy and Germination. Frontiers in genetics 10:980.

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

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

Conesa A, Götz S, García-Gómez JM, Terol J, Talón M, Robles M (2005) Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. Bioinformatics 21:3674-3676.
Davidson RM, Gowda M, Moghe G, Lin H, Vaillancourt B, Shiu SH, Jiang N, Robin Buell C (2012) Comparative transcriptomics of three Poaceae species reveals patterns of gene expression evolution. The Plant Journal 71:492-502.
de la Fuente JI, Amaya I, Castillejo C, Sánchez-Sevilla JF, Quesada MA, Botella MA, Valpuesta V (2006). The strawberry gene FaGAST affects plant growth through inhibition of cell elongation. Journal of experimental botany 57:2401-2411.
Du Plessis L, Škunca N, Dessimoz C (2011) The what, where, how and why of gene ontology—a primer for bioinformaticians. Briefings in bioinformatics 12:723-735.
Emanuelsson O, Brunak S, Von Heijne G, Nielsen H (2007). Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. Nature Protocols 2:953-971.
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 MM, 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 18:827.
Faraji S, Mehmood F, Malik HM, Ahmed I, Heidari P, Poczai P (2021) The GASA Gene Family in *Theobroma cacao*: Genome Wide Identification and Expression Analyses. bioRxiv.
Ferrè F. and Clote, P. (2005). DiANNA: a web server for disulfide connectivity prediction. Nucleic Acids Research 33:W230-W232.
Gamage DG, Gunaratne A, Periyannan GR, Russell TG (2019) Applicability of instability index for in vitro protein stability prediction. Protein and Peptide Letters 26:339-347.
Bairoch A, Gattiker A, Wilkins MR, Gasteiger E, Duvaud S, Appel RD (2005) Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. The proteomics protocols handbook:571-607.
Guo AY, Zhu QH, Chen X, Luo JC (2007) [GSDS: a gene structure display server]. Yi Chuan 29:1023-6.
Gupta R, Brunak S (2002). Prediction of glycosylation across the human proteome and the correlation to protein function. Pac Symp Biocomput: 310-22.
Han S, Jiao Z, Niu MX, Yu X, Huang M, Liu C, Wang HL, Zhou Y, Mao W, Wang X, Yin W (2021) Genome-Wide Comprehensive Analysis of the GASA Gene Family in Populus. International journal of molecular sciences 22:12336.
He H, Yang X, Xun H, Lou X, Li S, Zhang Z, Jiang L, Dong Y, Wang S, Pang J, Liu B (2017) Over-expression of GmSN1 enhances virus resistance in Arabidopsis and soybean. Plant Cell Rep 36:1441-1455.
Ikai A (1980) Thermostability and aliphatic index of globular proteins. The journal of Biochemistry 88:1895-8.
Iqbal A, Khan RS, Shehryar K, Imran A, Ali F, Attia S, Shah S, Mii M (2019) Antimicrobial peptides as effective tools for enhanced disease resistance in plants. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC) 139:1-15.
Kelley LA, Mezulis S, Yates CM, Wass MN, Sternberg MJ (2015) The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. Nature Protocols, 10: 845-858.
Kotilainen M, Helariutta Y, Mehto M, Pöllänen E, Albert VA, Elomaa P, Teeri TH (1999) GEG participates in the regulation of cell and organ shape during corolla and carpel development in Gerbera hybrida. The Plant Cell 11:1093-1104.
Krogh A, Larsson B, Von Heijne G, Sonnhammer EL (2001) Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. Journal of molecular biology 305:567-80.
Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K (2018) MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. Molecular biology and evolution 35:1547-1549.
Lescot M, Déhais P, Thijs G, Marchal K, Moreau Y, Van de Peer Y, Rouzé P, 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 Reserches 30:325-7.
Li KL, Bai X, Li Y, Cai H, Ji W, Tang LL, Wen YD, Zhu YM (2011) GsGASA1 mediated root growth inhibition in response to chronic cold stress is marked by the accumulation of DELLAs. Journal of Plant Physiology 168:2153-2160.
Li Z, Gao Z, Li R, Xu Y, Kong Y, Zhou G, Meng C, Hu R (2020) Genome-wide identification and expression profiling of HD-ZIP gene family in Medicago truncatula. Genomics 112:3624-3635.
Mao Z, Zheng J, Wang Y, Chen G, Yang Y, Feng D, Xie B (2011) The new CaSn gene belonging to the snakin family induces resistance against root-knot nematode infection in pepper. Phytoparasitica 39:151-164.
Matlin A.J, Clark F, Smith C.W (2005) Understanding alternative splicing: towards a cellular code. Nature reviews Molecular cell biology 6:386-398.
Mayer K, Waugh R., Langridge P, Close T, Wise R, Graner A, Matsumoto T, Sato K, Schulman A, Muehlbauer G (2012) A physical, genetic and functional sequence assembly of the barley genome.
Mergner J, Frejno M, List M, Papacek M, Chen X, Chaudhary A, Samaras P, Richter S, Shikata H, Messerer M, Lang D (2020a) Mass-spectrometry-based draft of the Arabidopsis proteome. Nature 579:409-414.
Muhammad I, Li WQ, Jing XQ, Zhou MR, Shalmani A, Ali M, Wei XY, Sharif R, Liu WT, Chen KM (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. Journal of plant physiology 234-235:117-132.
Nahirñak V, Almasia NI, Hopp HE, Vazquez-Rovere C (2012) Involvement in hormone crosstalk and redox homeostasis Snakin/GASA proteins. Plant Signal Behav 7:1004-1008.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

Nahirñak V, Almasia NI, Hopp HE, Vazquez-Rovere C (2012) Snakin/GASA proteins: involvement in hormone crosstalk and redox homeostasis. Plant Signal Behav 7:1004-8.

Nahirñak V, Rivarola M, Gonzalez de Urreta M, Paniego N, Hopp HE, Almasia NI, Vazquez-Rovere C (2016) Genome-wide Analysis of the Snakin/GASA Gene Family in *Solanum tuberosum* cv. Kennebec. American Journal of Potato Research 93:172-188.

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.

Oliveira-Lima M, Maria Benko-Iseppon A, Ribamar Costa Ferreira Neto J, Rodriguez-Decuadro S, Akio Kido E, Crovella S, Pandolfi V (2017) Snakin: structure, roles and applications of a plant antimicrobial peptide. Current Protein and Peptide Science 18:368-374.

Panji A, Ismaili A, Sohrabi S.M (2022) Investigation of the characteristics and expression changes of snakin gene family members in different stages of seed development in barley (*Hordeum vulgare* L.). Crop Biotechnology 12:1-13 (In Farsi).

Panji A, Ismaili A, Sohrabi SM (2023). Genome-wide identification and expression profiling of snakin/GASA genes under drought stress in barley (*Hordeum vulgare* L.). 3 Biotech 13:126.

Porto WF, Franco OL (2013) Theoretical structural insights into the snakin/GASA family. Peptides 44:163-167.

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 4:7.

Qu J, Kang SG, Hah C, Jang JC (2016) Molecular and cellular characterization of GA-Stimulated Transcripts GASA4 and GASA6 in *Arabidopsis thaliana*. Plant Science 246:1-10.

Rapazote-Flores P, Bayer M, Milne L, Mayer CD, Fuller J, Guo W, Hedley PE, Morris J, Halpin C, Kam J, McKim SM (2019) BaRTv1. 0: an improved barley reference transcript dataset to determine accurate changes in the barley transcriptome using RNA-seq. BMC genomics 20:1-17.

Rezaee S, Ahmadizadeh M, Heidari P (2020) Genome-wide characterization, expression profiling, and post-transcriptional study of GASA gene family. Gene Reports 20:100795.

Sakai H, Mizuno H, Kawahara Y, Wakimoto H, Ikawa H, Kawahigashi H, Kanamori H, Matsumoto T, Itoh T, Gaut BS (2011) Retrogenes in rice (*Oryza sativa* L. ssp. japonica) exhibit correlated expression with their source genes. Genome biology and evolution 3:1357-1368.

Seo MH, Kim PM (2018) The present and the future of motif-mediated protein–protein interactions. Current opinion in structural biology 50:162-170.

Shi L, Gast RT, Gopalraj M, Olszewski NE (1992) Characterization of a shoot-specific, GA3-and ABA-regulated gene from tomato. The Plant Journal 2:153-159.

Sievers F, Wilm A, Dineen D, Gibson TJ, Karplus K, Li W, Lopez R, McWilliam H, Remmert M, Söding J, Thompson JD (2011) Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. Molecular systems biology 7:539.

Silva-Sanchez C, Li H, Chen S (2015) Recent advances and challenges in plant phosphoproteomics. Proteomics 15:1127-41.

Smoot ME, Ono K, Ruscheinski J, Wang PL, Ideker T (2011) Cytoscape 2.8: new features for data integration and network visualization. Bioinformatics 27:431-432.

Sukumari Nath V, Kumar Mishra A, Kumar A, Matoušek J, Jakše J (2019) Revisiting the role of transcription factors in coordinating the defense response against citrus bark cracking viroid infection in commercial hop (*Humulus Lupulus* L.). Viruses 11:419.

Sun S, Wang H, Yu H, Zhong C, Zhang X, Peng J, Wang X (2013) GASA14 regulates leaf expansion and abiotic stress resistance by modulating reactive oxygen species accumulation. Journal of experimental botany 64:1637-47.

Tam JP, Wang S, Wong KH, Tan WL (2015) Antimicrobial peptides from plants. Pharmaceuticals 8:711-757.

Tian F, Yang DC, Meng YQ, Jin J, Gao G (2020) PlantRegMap: charting functional regulatory maps in plants. Nucleic Acids Research 48:D1104-D1113.

Tyagi V, Jacob SR, Gupta K, Brahmi P (2020) Status of introduction and conservation in barley (*Hordeum vulgare* L.). Journal of Cereal Research 12:13-18.

Venter M, Botha F (2010) Synthetic promoter engineering in Plant Developmental Biology-Biotechnological Perspectives. Springer 393-414.

Waghu FH, Gopi L, Barai RS, Ramteke P, Nizami B, Idicula-Thomas S (2014). CAMP: Collection of sequences and structures of antimicrobial peptides. Nucleic acids research 42:D1154-D1158.

Wu T, Cheng C, Zhong Y, Lv Y, Ma Y, Zhong G (2020) Molecular characterization of the gibberellin-stimulated transcript of GASA4 in Citrus. Plant Growth Regulation 91:89-99.

Yu CS, Cheng CW, Su WC, Chang KC, Huang SW, Hwang JK, Lu CH (2014) CELLO2GO: a web server for protein subCELlular LOcalization prediction with functional gene ontology annotation. PLoS One 9:e99368.

Zhang S, Wang X (2008) Expression pattern of GASA, downstream genes of DELLA, in Arabidopsis. Chinese Science Bulletin 53:3839-3846.

Zhang S, Yang C, Peng J, Sun S, Wang X (2009) GASA5, a regulator of flowering time and stem growth in *Arabidopsis thaliana*. Plant molecular biology 69:745-759.

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 152:356-365.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]