

«مقاله پژوهشی»

شناسایی و بررسی خصوصیات برخی اعضای خانواده ژنی اسنکین در گیاه پیاز (*Allium cepa* L.)حدیث برون^۱، امیر سیاهپوش^۲، سید محسن سهرابی^۳، محمدرضا نیکبخت^۴، جواد قاسمیان یادگاری^۵، محسن محمدی^{۶*}سید سجاد سهرابی^۷

۱. دکتری داروسازی، گروه فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران.

۲. دانشیار، گروه فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی خلیج فارس، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران.

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

۴. استاد، گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یاسوج، ایران.

۵. استادیار، گروه فارماکوگنوزی و بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم‌آباد، ایران.

۶. دانشیار گروه فارماکوگنوزی و بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم‌آباد، ایران.

۷. دکتری تخصصی، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران.

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱/۲۳ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۶/۱۱)

Identification and characterization of some snakin gene family members in onion (*Allium cepa* L.)Hadis Boroun¹, Amir Siahpoosh², Seyyed Mohsen Sohrabi³, Mohammad Reza Nikbakht⁴, Javad Ghasemian Yadegari⁵, Mohsen Mohammadi^{6*}, Seyed Sajad Sohrabi⁷

1. Doctor of Pharmacy, Department of Pharmacognosy, School of Pharmacy Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran.

2. Associate Professor, Department of Pharmacognosy, School of Pharmacy Medicinal Plant Research Center Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran.

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

4. Professor, Department of Physiology and Pharmacology, School of Medicine, Medicinal Plants Research Center, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran.

5. Assistant Professor, Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Biotechnology, Faculty of Pharmacy, Lorestan University of medical sciences Khorramabad, Iran.

6. Assistant Professor, Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Biotechnology, Faculty of Pharmacy, Lorestan University of medical sciences Khorramabad, Iran.

7. Ph.D., Department of Production Engineering and Plant Genetics, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran.

(Received: Apr. 12, 2021 - Accepted: Sep. 2, 2021)

Abstract

Antimicrobial peptides (AMPs) are one of the most important defense barriers of plants against a wide range of pathogens. The snakins attract special attention because they are one of the most important and main cysteine-rich peptides among plant anti-microbial peptides. In the present study, some snakin gene family members were identified and characterized from onion (*Allium cepa* L.) using bioinformatics and experimental methods. All snakin protein sequences were retrieved from NCBI database. The snakin consensus sequence was obtained from alignment of retrieved sequences. Then, the consensus sequence was aligned against the onion transcriptome using tBLASTn tool. The resulting sequences were analyzed to determine the full-ORF, and to prediction of functional domains, signal peptides, subcellular localization, physicochemical properties, amino acid frequency and anti-microbial activity. The complete coding sequence of snakin genes were amplified by PCR. Finally, the presence of seven snakin genes, with an average ORF length of 332 bp, were confirmed in onion. The high similarity of the onion snakin genes with homologous snakin genes belonging to other plant species in terms of nucleotide and protein sequences as well as structural was revealed by bioinformatics analysis. The results also showed that all identified onion snakins had the potential antimicrobial activity. Due to the potential antimicrobial activity of identified peptides, by producing these peptides in different expression systems, they can be used as new antimicrobial agents against human, animal and plant pathogens.

Keywords: Anti-microbial peptides, Bioinformatics, Gene family, Transcriptome.

چکیده

پپتیدهای ضد میکروبی یکی از مهم‌ترین سدهای دفاعی گیاهان در مقابل طیف وسیعی از پاتوژن‌ها به شمار می‌روند. در این بین، اسنکین‌ها توجه ویژه‌ای را به خود جلب می‌کنند، زیرا یکی از مهم‌ترین پپتیدهای غنی از سیستین در میان پپتیدهای ضد میکروبی گیاهی هستند. در مطالعه حاضر، برخی از اعضای خانواده ژنی اسنکین در گیاه پیاز از طریق روش‌های بیوانفورماتیک و آزمایشگاهی شناسایی و تعیین خصوصیت شدند. بدین منظور تمام توالی‌های پروتئینی اسنکین‌های گیاهی از پایگاه NCBI دریافت شدند. توالی مورد توافق اسنکین با هم‌ترازی چندگانه توالی‌های دریافت شده ایجاد شد. سپس توالی مورد توافق اسنکین با استفاده از ابزار tBLASTn در برابر ترنسکرپتوم گیاه پیاز هم‌ترازی موضعی شد. توالی‌های حاصل از tBLASTn، سرهم‌بندی شده و برای تعیین چارچوب خوانش باز کامل و پیش‌بینی دمن‌های عملکردی، سیگنال پپتید، محل تجمع سلولی، خصوصیات فیزیکوشیمیایی، فراوانی اسیدهای آمینه و فعالیت ضد میکروبی مورد بررسی قرار گرفتند. با استفاده از واکنش PCR توالی کد کننده کامل اسنکین‌ها تکثیر شد. در نهایت، وجود هفت ژن اسنکین با چارچوب‌های خوانش باز با طول متوسط ۳۳۲ جفت باز در گیاه پیاز تأیید شد. تجزیه و تحلیل‌های بیوانفورماتیک، شباهت بالای ژن‌های اسنکین پیاز با همولوگ‌های اسنکین در سایر گونه‌های گیاهی، از نظر توالی نوکلئوتیدی و پروتئینی و همچنین خصوصیات ساختاری را نشان داد. نتایج همچنین نشان داد که تمامی اسنکین‌های شناسایی شده در گیاه پیاز دارای خاصیت ضد میکروبی بالقوه بودند. با توجه به اثرات ضد میکروبی بالقوه در پپتیدهای شناسایی شده، می‌توان با تولید این پپتیدها در سیستم‌های بیانی مختلف از آن‌ها به عنوان عوامل ضد میکروبی جدید در مقابله با پاتوژن‌های انسانی، دامی و گیاهی استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: بیوانفورماتیک، پپتیدهای ضد میکروبی، ترنسکرپتوم، خانواده ژنی.

مقدمه

پپتیدهای ضد میکروبی^۱ از جمله مهم‌ترین ترکیبات ضد میکروبی هستند که در اغلب موجودات زنده به منظور بقا در محیط طبیعی و مقابله با انواع مختلف پاتوژن‌ها تولید می‌شوند (Holaskova *et al.*, 2015;) پاتوژن‌ها تولید می‌شوند (Elsbach, 2003; Bulet *et al.*, 2004). این گروه از ترکیبات ضد میکروبی از تنوع بسیار بالایی برخوردار بوده به طوری که تاکنون ۵۰۰۰ نوع پپتید ضد میکروبی در موجودات مختلف شناسایی شده است (Bahar and Ren, 2013; Harris *et al.*, 2009; Kang *et al.*, 2017). در انسان فعالیت پپتیدهای ضد میکروبی اولین بار در دهه های ۱۹۵۰ یافت شد. این ترکیبات به‌وسیله گرانولوسیت‌ها، ماکروفاژها و بسیاری از سلول‌های اپی تلیال تولید شده و دارای فعالیت ضد میکروبی، ضد قارچی، ضد ویروسی و حتی ضد پروتوزوا هستند (Da Costa *et al.*, 2015; Hoskin and Ramamoorthy, 2008). ویژگی مشترک همه پپتیدهای ضد میکروبی، توالی کوتاه آن‌ها (بین ۵ تا ۱۰۰ اسید آمینه) می‌باشد. با این حال از نظر وزن ملکولی، بارالکتریکی ویژه (کاتیونی و آنیونی)، نوع اثر ضد میکروبی، ساختار پروتئینی ثانویه (مارپیچی آلفا، صفحات بتا، مخلوطی از مارپیچی آلفا و صفحات بتا و طویل)، آبگریزی، آبدوستی و یا دوگانه بودن (هیدروفوبی، هیدروفیلی و یا آمفی پاتیک) تفاوت قابل توجهی بین آنها وجود دارد (Bahar and Ren, 2013; Harris *et al.*, 2009; Kang *et al.*, 2017).

به طور کلی، برهمکنش و آسیب به غشاهای میکروبی، آسیب به بخش‌های درون سلولی مانند دستگاه تولید ماکرومولکول‌های DNA، mRNA و پروتئین و برهمکنش با سایر اجزاء حیاتی سلول مهم‌ترین مکانیسم‌های عمل پپتیدهای ضد میکروبی هستند که در مطالعات متعدد پیشنهاد شده‌اند. در چند دهه اخیر، به دلیل خصوصیات بارز

پپتیدهای ضد میکروبی مانند فعالیت زیستی با سرعت و طیف اثر بالا در غلظت بسیار کم، سمیت پایین، نداشتن عوارض جانبی جهت استفاده بالینی و احتمال بسیار پایین ظهور گونه‌های میکروبی مقاوم در برابر آن‌ها، این کلاس از پپتیدها را به عنوان نسل جدیدی از داروهای آنتی‌بیوتیکی مطرح ساخته است. از این رو شناخت مکانیسم عمل، شناسایی و جداسازی از منابع طبیعی و سنتز شیمیایی این آنتی‌بیوتیک‌ها کم خطر از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (Zasloff, 2006; Bahar and Ren, 2013;) (Melo *et al.*, 2009).

گیاهان منبع بالقوه و غنی از پپتیدهای ضد میکروبی محسوب می‌شوند. در گیاهان پپتیدهای ضد میکروبی طی مراحل اولیه پاسخ به پاتوژن‌ها به همراه پپتیدهای مرتبط با تنش و متابولیت‌های ضد میکروبی به عنوان اولین سد دفاعی در مقابل عوامل بیماری‌زا اقدام می‌کنند (Holaskova *et al.*, 2015). با شناسایی و جداسازی ژن‌های کد کننده این گونه پپتیدها در گونه‌های مختلف گیاهی، منابع جدید و پایدار، جهت استحصال و یا سنتز شیمیایی پپتیدهای ضد میکروبی فراهم می‌گردد (Nawrot *et al.*, 2014). اولین پپتید ضد میکروبی گیاهی به نام پورتیونین^۲ در گندم *Triticum aestivum* شناسایی شد که علیه قارچ‌ها و برخی از باکتری‌های پاتوژن مؤثر بود (Tang *et al.*, 2018). در طی مطالعات متعدد، جداسازی و شناسایی پپتیدهای ضد میکروبی در گیاهان مختلف مانند تربچه، یونجه، عدس، شنبلیله، خرما، انگور، آرابیدوپسیس، نخود، لوبیا و گندم گزارش شده است (Janssen *et al.*, 2002; Thomma *et al.*, 2003). در گیاهان پپتیدهای ضد میکروبی بر اساس ساختار خود به گروه‌های مختلفی شامل دیفنسین‌ها، اسنیکین‌ها، تیونین‌ها، پروتئین‌های انتقال‌دهنده چربی، هوثین‌ها،

ضد میکروبی در گیاه پیاز اثبات شده است با این حال به دلیل فقر اطلاعات ژنتیکی و عدم وجود ژنوم مرجع برای گیاه پیاز، تا کنون شناسایی و جداسازی اغلب ژن‌های کدکننده این نوع از پپتیدها از جمله اسنکین در گیاه پیاز صورت نگرفته است. با این حال، امروزه با ظهور فناوری‌های توالی‌یابی نسل جدید^۲ و تجزیه و تحلیل‌های پس از آن شناسایی و بررسی ویژگی‌های ژن‌های مختلف در گیاهان غیر مدل به سادگی و در کوتاه‌ترین زمان ممکن قابل انجام می‌باشد. با استفاده از این اطلاعات و بهره‌گیری از ابزارهای بیوانفورماتیکی می‌توان قبل از اقدام به هر گونه فعالیت آزمایشگاهی به صورت *in silico* ژن یا ژن‌های مورد نظر را شناسایی کرد، ویژگی‌های آن‌ها را بررسی و فعالیت‌هایی را که این ژن‌ها در آن دخیل هستند را شبیه‌سازی کرد (Periwal and Scaria, 2014; Gill and Sanseau, 2000; Bao *et al.*, 2014).

با توجه به عدم وجود ژنوم توالی‌یابی شده برای گیاه پیاز و وجود اطلاعات ترانسکریپتومی مختلف برای آن، هدف تحقیق حاضر، شناسایی اعضای جدید خانواده پپتید ضد میکروبی اسنکین در گیاه پیاز و بررسی خصوصیات آن‌ها برای اولین بار می‌باشد. در این پژوهش، با استفاده از روش‌های مختلف پیش‌بینی بیوانفورماتیکی و روش‌های آزمایشگاهی توالی‌کدکننده اعضای مختلف خانواده اسنکین پیاز شناسایی و تعیین خصوصیت شدند.

مواد و روش‌ها

شناسایی ژن‌ها و طراحی آغازگر

ابتدا توالی پروتئینی مربوط به ژن‌های اسنکین گیاهان مختلف از پایگاه پروتئینی سایت NCBI دریافت شده و سپس به منظور دسترسی به توالی مورد توافق، هم‌ترازی چندگانه در نرم‌افزار Vector NTI 11.0 با

سیکلوتیدها، و نوئین‌ها تقسیم‌بندی می‌شوند (Epanand, 2016; Goyal and Mattoo, 2016; Holaskova *et al.*, 2015; Cools *et al.*, 2017).

در میان گروه‌های متعدد پپتیدهای ضد میکروبی، کلاس اسنکین توجه ویژه‌ای را به خود جلب می‌کند، زیرا یکی مهم‌ترین و اصلی‌ترین پپتیدهای غنی از سیستمین در میان پپتیدهای ضد میکروبی گیاهی است (Goyal and Mattoo, 2016; Nahirñak *et al.*, 2012). اعضای خانواده‌ی اسنکین دارای توالی راهنما^۱ به طول ۱۵ تا ۲۰ اسید آمینه در انتهای آمینی خود و یک ناحیه‌ی متغیر از لحاظ طول و ترکیب اسید آمینه به طول تقریبی ۶۰ اسید آمینه در انتهای کربوکسیلی خود هستند. اسنکین‌ها توسط ۱۲ باقیمانده سیستمین حفاظت شده در انتهای کربوکسیلی پپتید مشخص می‌شوند که تشکیل ۶ پیوند دی‌سولفیدی در پروتئین می‌کنند این باندها نه تنها جهت ساختار ثانویه پپتید بلکه جهت فعالیت زیستی ضروری هستند (Nahirñak *et al.*, 2012; Mansour *et al.*, 2014; Harris *et al.*, 2014; Porto and Franco, 2013). اسنکین‌ها در اندام‌های مختلف گیاهی و در طیف وسیعی از گونه‌های گیاهی تک‌لپه و دو لپه یافت می‌شوند (Epanand, 2016; Goyal and Mattoo, 2016; Oliveira-Lima *et al.*, 2017).

پیاز با نام علمی *Allium cepa* L. گیاهی دوساله، تک‌لپه و علفی از خانواده نرگسیان است که علاوه بر اهمیت تغذیه‌ای، اثرات ضد باکتریایی، ضد قارچی، ضد ویروسی، ضد التهاب، ضد دیابت و ضد لخته‌های خونی نیز می‌باشد (Teshika *et al.*, 2019; Griffiths *et al.*, 2002; Nelson and Regiland, 2007; Sidhu *et al.*, 2019; Liguori *et al.*, 2017). هر چند وجود پپتیدهای

کیت استخراج RNA شرکت یکتا تجهیز آزما و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده صورت گرفت. حذف بقایای DNA ژنومی موجود در RNA با استفاده از آنزیم DNase I شرکت Promega صورت گرفت. ارزیابی کمیت و کیفیت RNA استخراج شده از بافت‌های گیاه پیاز با استفاده از نانودراپ و همچنین ژل-الکتروفورز انجام شد. ساخت رشته‌ی اول cDNA با استفاده از کیت شرکت یکتا تجهیز آزما و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد.

تکثیر، همسانه‌سازی و تعیین توالی ژن‌های اسنیکین گیاه پیاز

تکثیر قطعات ژنی اسنیکین گیاه پیاز با استفاده از واکنش PCR انجام شد. برای تکثیر قطعات مربوط به ژن‌های اسنیکین، از cDNA به عنوان الگو در واکنش PCR استفاده شد. محصولات واکنش PCR پس از الکتروفورز در ژل آگارز یک درصد، با استفاده از کیت شرکت سیناکلون بر اساس دستورالعمل موجود در کیت، از ژل خالص‌سازی شدند. قطعات خالص‌سازی شده در پلاسمید pTZ57R/T همسانه‌سازی شدند و پلاسمیدهای نوترکیب حاوی قطعات ژنی اسنیکین، برای توالی‌یابی به شرکت متابیون آلمان ارسال شدند.

استفاده از الگوریتم ClustalW و پارامترهای پیش فرض صورت گرفت. توالی پروتئینی مورد توافق حاصل از هم‌ترازی چندگانه، که در تمامی اسنیکین‌ها محافظت شده است، با استفاده از ابزار tBLASTn موجود در پایگاه NCBI با ارزش مورد انتظار ۰/۰۰۱ و پارامترهای پیش‌فرض در برابر ترنسکریپتوم گیاه پیاز مورد هم‌ترازی قرار گرفتند (McGinnis and Madden, 2004). نتایج tBLASTn با هم مخلوط و با استفاده از دو نرم‌افزار CLC Genomics Workbench 3.6.5 و Vector NTI 11.0 سرهم‌بندی شدند. قطعات حاصل با استفاده از ابزارهای CDD و ORF finder برای وجود چارچوب خوانش باز کامل مورد ارزیابی قرار گرفتند (Marchler-Bauer *et al.*, 2014). از توالی‌های دارای چارچوب خوانش باز کامل ژن اسنیکین به عنوان الگو برای طراحی آغازگر استفاده شد. آغازگرها با استفاده از نرم‌افزار AlleleID 6.0 طراحی شدند (جدول ۱).

تهیه نمونه و استخراج RNA

اندام‌های هوایی و زمینی گیاه پیاز به صورت تازه از مزارع اطراف خرم‌آباد تهیه و بلافاصله در ازت مایع فریز و به دمای منهای ۸۰ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. استخراج RNA از بافت‌های گیاه پیاز، با استفاده از

جدول ۱. آغازگرهای مورد استفاده برای جداسازی ژن‌های اسنیکین گیاه پیاز

نام آغازگر	توالی آغازگر (5'→3')	دمای اتصال آغازگر (°C)	طول توالی تکمیری (جفت باز)
Ac-S1-F	TCATCCTCCAAGTATTCTTCAACC	۵۵	۳۶۰
Ac-S1-R	AATGGCTGTAAAGACGATCAAGG		
Ac-S2-F	TCCTCCAACCGTCTCCTTCTAC	۵۶	۴۴۵
Ac-S2-R	AAAGAGCAGATGAGATGGACAAAG		
Ac-S3-F	GGTTTCAGTTCCAGTTCTAC	۵۶	۳۹۶
Ac-S3-R	TGAGTAAGCCAGCCAGTG		
Ac-S4-F	ATACATTATGAAACGCTTGGTC	۵۳	۳۵۵
Ac-S4-R	AAATTACAGAAAGATACAACATAGG		
Ac-S5-F	ATGTGGAGGGCGGTGTGATG	۵۶	۴۰۰
Ac-S5-R	GCAGATGAGATGGACAAAGGAAGG		
Ac-S6-F	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAG	۵۶	۳۸۴
Ac-S6-R	AAGACCAGCATAGCAAGGACAAG		
Ac-S7-F	GGTATCAACGCAGAGTACGG	۵۶	۴۳۸
Ac-S7-R	ATTAAGGGCATTGGGTCCAC		

آنالیزهای بیوانفورماتیکی

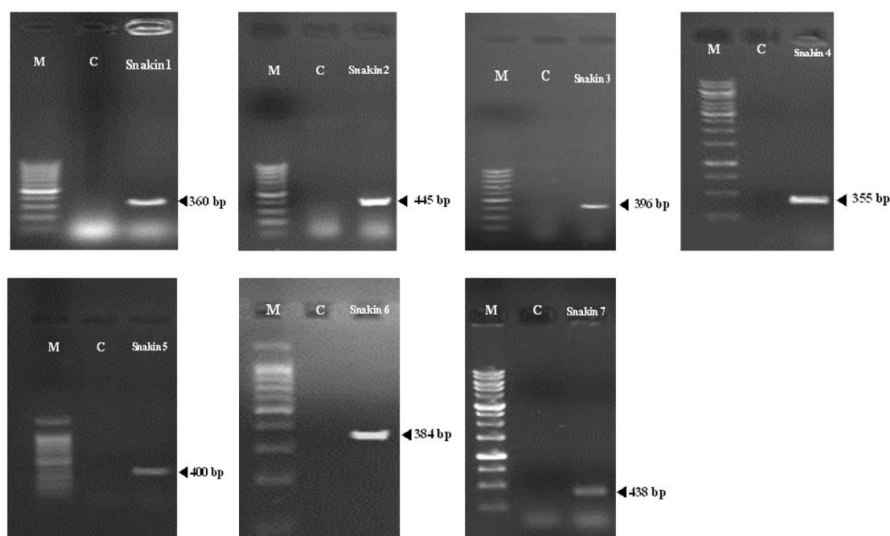
علیه پایگاه EST گیاه پیاز استفاده شد. سرهم‌بندی توالی‌های حاصل از هم‌ترازی، باعث ایجاد ۷ کانتیگ با طول‌های ۵۴۱، ۶۳۹، ۶۴۵، ۵۵۲، ۵۶۸، ۶۵۸ و ۶۶۰ جفت باز شد. نتایج حاصل از تکثیر با آغازگرهای اختصاصی طراحی شده، قطعاتی با طول ۳۶۰، ۴۴۵، ۳۹۶، ۳۵۵، ۴۰۰، ۳۸۴ و ۴۳۸ جفت بازی را به ترتیب برای Snakin1، Snakin2، Snakin3، Snakin4، Snakin5، Snakin6 و Snakin7 نشان داد (شکل ۱).

تجزیه و تحلیل نتایج توالی‌یابی، وجود چارچوب‌های خوانش بازی به طول ۲۷۰ تا ۳۶۰ جفت باز را برای اسنیکین‌های شناسایی شده گیاه پیاز نشان داد (جدول ۲). در اوایل، نتایج پژوهش‌ها بر این مبنا استوار بود که اسنیکین‌های گیاهی متعلق به یک خانواده‌ی چند ژنی کوچک بوده و دارای تعداد ژن محدودی در ژنوم گیاهان هستند (Nahirñak *et al.*, 2012; Porto and Franco, 2013). با این حال، پژوهش‌های جدیدتر مشخص کردند که اسنیکین‌های گیاهی در واقع یک خانواده بزرگ چند ژنی بوده و دارای تعداد ژن بیشتری در ژنوم گیاهان هستند. به طوری که تاکنون تعداد ۱۶ عضو از خانواده اسنیکین‌ها در گیاه سیب‌زمینی شناسایی و تعیین خصوصیت شده‌اند (Nahirñak *et al.*, 2016). همچنین، تاکنون ۱۵ اسنیکین در گیاه آرابیدوپسیس و ۹ اسنیکین در گیاه برنج و ۱۰ اسنیکین در گیاه ذرت شناسایی شده‌اند (Zhang and Wang, 2010; Zimmermann *et al.*, 2008). در پژوهشی در گیاه سورگوم، تعداد ۱۲ عضو از خانواده اسنیکین شناسایی شد و ویژگی‌های آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت (Filiz and Kurt, 2020). در پژوهش دیگری تعداد ۱۷ عضو از خانواده اسنیکین در گیاه کاکائو شناسایی و مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت (Faraji *et al.*, 2021). بررسی پژوهش‌های گذشته تاکنون، این مطلب که اسنیکین‌ها خانواده‌های چندژنی را در گیاهان مختلف تشکیل می‌دهند را مورد تأیید قرار می‌دهد.

نتایج توالی‌یابی ژن‌های اسنیکین با استفاده از نرم‌افزار Vector NTI 11.0 بررسی و ویرایش شدند. توالی‌های اسنیکین حاصل با استفاده از ابزار BLASTn موجود در پایگاه NCBI در برابر بانک ژن هم‌ردیف شده و جداسازی صحیح آن‌ها بررسی شد. دمین‌های عملکردی محافظت شده موجود در توالی‌های اسنیکین با استفاده از ابزار CDD موجود در پایگاه NCBI مشخص شدند (Marchler- *et al.*, 2014). خصوصیات فیزیکیوشیمیایی اسنیکین‌های جداسازی‌شده با استفاده از ابزار ProtParam تعیین شد (ProtParam, 2017). محل تجمع سلولی و وجود یا عدم وجود سیگنال پپتید در ساختار اسنیکین‌های جداسازی شده با استفاده از ابزارهای CELLO و SignalP مشخص شد (Jones *et al.*, 2014; Nielsen, 2017). باندهای دی‌سولفیدی احتمالی موجود در ساختار اسنیکین‌های جداسازی‌شده با استفاده از ابزار DiANNA پیش‌بینی شد (Ferrè and Clote, 2006). ساختارهای ثانویه موجود در اسنیکین‌های جداسازی شده با استفاده از نرم‌افزار CLC Genomics Workbench 3.6.5 مشخص شدند. خاصیت ضد میکروبی اسنیکین‌های جداسازی شده با استفاده از پایگاه CAMP مورد پیش‌بینی قرار گرفت (Waghu *et al.*, 2014). تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی با استفاده از روش Maximum likelihood و آزمون Bootstrap با ۱۰۰۰ تکرار در نرم‌افزار MEGA 7.0 انجام شد (Tamura *et al.*, 2013).

نتایج و بحث

تعداد ۲۷۱۶ توالی پروتئینی اسنیکین از بانک پروتئینی دریافت شد و پس از هم‌ترازی یک توالی مورد توافق به طول ۵۹ اسید آمینه را ایجاد کردند. از توالی مورد توافق حاصل شده برای tBLASTn



شکل ۱. الکتروفورز محصولات PCR ژن‌های اسنیکین گیاه پیاز با الگوی cDNA. چاهک M- برای ژن‌های اسنیکین ۴ و ۷ از نشانگر وزن مولکولی 10 kbp و برای بقیه ژن‌ها از نشانگر وزن مولکولی 100 bp استفاده شده است. چاهک C- واکنش کنترل منفی.

تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی، ژن‌های اسنیکین گیاه پیاز را در گروه‌های مختلفی تقسیم‌بندی کرد. در درخت فیلوژنتیکی ترسیم‌شده، ژن‌های Snakin 2 و Snakin 1 با هم در یک گروه جداگانه، ژن‌های Snakin 3 و Snakin 5 با هم در یک گروه، ژن Snakin 6 با هم در یک گروه، ژن‌های Snakin 7 و Snakin 4 در هیچ گروهی قرار نگرفتند (شکل ۲).

ترجمه چارچوب‌های خوانش باز موجود در اسنیکین‌های شناسایی‌شده گیاه پیاز، پپتیدهایی به طول ۸۹ تا ۱۱۹ اسید آمینه را تولید کرد (جدول ۲). اسنیکین‌های گیاهی عموماً از سه بخش سیگنال پپتید، ناحیه متغیر و پپتید کامل و بالغ تشکیل شده‌اند (Nahirňak *et al.*, 2012; Nahirňak *et al.*, 2013; Porto and Franco, 2016). بررسی توالی پروتئینی این اسنیکین‌ها با استفاده از ابزارهای SignalP و وجود سیگنال پپتیدهایی به طول ۲۱ تا ۲۸ جفت باز را در ساختار آن‌ها نشان داد (شکل ۳ و جدول ۲). بررسی این توالی‌ها در سرور CELLO2GO نشان داد که تمامی این پروتئین‌ها دارای تجمع خارج سلولی بوده و در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیر زیستی القاء می‌شوند (جدول ۲).

در هم‌ترازی توالی ژن Snakin 1 گیاه پیاز در برابر بانک ژن، این توالی دارای ۶۷ تا ۷۹ درصد شباهت به ژن‌های اسنیکین گیاهان لوپن، چمن جاوری، ارزن، کلم و کلزا بود. همچنین، ژن Snakin 2 گیاه پیاز دارای ۷۵ تا ۸۳ درصد شباهت به ژن‌های اسنیکین گیاهان گوجه‌فرنگی، پسته، کتان، لوبیا و ماش بود. در هم‌ترازی توالی ژن Snakin 3 گیاه پیاز در برابر بانک ژن، این توالی دارای ۶۸ تا ۷۰ درصد شباهت به ژن‌های اسنیکین گیاهان کتان و گل میمون بود. ژن Snakin 4 گیاه پیاز دارای ۷۲ تا ۸۲ درصد شباهت ژن‌های اسنیکین گیاهان سیب‌زمینی، کتان و نخود بود. در هم‌ترازی توالی ژن Snakin 5 گیاه پیاز در برابر بانک ژن، این توالی دارای ۷۶ تا ۸۳ درصد شباهت به ژن‌های اسنیکین گیاهان گوجه‌فرنگی، پسته، کتان، کهور، پنبه و سیب زمینی بود. ژن Snakin 6 گیاه پیاز دارای ۶۷ تا ۸۱ درصد شباهت به ژن‌های اسنیکین گیاهان گل میمون، سیب زمینی شیرین، هویج و سیر بود. در هم‌ترازی توالی ژن Snakin 7 گیاه پیاز در برابر بانک ژن، این توالی دارای ۷۶ تا ۸۷ درصد شباهت به ژن‌های اسنیکین گیاهان لوپن، توتون، مارچوبه، کلزا، کلم، پرتقال و هلو بود.

جدول ۲. ویژگی‌های ژن‌های اسنیگین گیاه پیاز

نام اسنیگین	طول چارچوب خوانش باز	طول پپتید	طول سیگنال پپتید	محل تجمع
Snakin 1	۲۹۱ جفت باز	۹۶ اسید آمینه	۲۶ اسید آمینه	خارج سلولی
Snakin 2	۳۶۰ جفت باز	۱۱۹ اسید آمینه	۲۱ اسید آمینه	خارج سلولی
Snakin 3	۳۵۴ جفت باز	۱۱۷ اسید آمینه	۲۸ اسید آمینه	خارج سلولی
Snakin 4	۲۷۰ جفت باز	۸۹ اسید آمینه	۲۶ اسید آمینه	خارج سلولی
Snakin 5	۳۶۰ جفت باز	۱۱۹ اسید آمینه	۲۱ اسید آمینه	خارج سلولی
Snakin 6	۳۳۶ جفت باز	۱۱۱ اسید آمینه	۲۲ اسید آمینه	خارج سلولی
Snakin 7	۳۵۴ جفت باز	۱۱۷ اسید آمینه	۲۲ اسید آمینه	خارج سلولی



شکل ۲. درخت فیلوژنتیکی اسنیگین‌های گیاه پیاز. محل قرارگیری اسنیگین‌های گیاه پیاز در این درخت فیلوژنتیکی با دایره سیاه مشخص شده است.

Snakin 1	1	MARISLLSSA ILILLALSMI IDFSQAGREG SLKPSQCAA CTYRCHLKGH
	51	KKRCLFYCNH CCNKCLCVPS GTVQGHKREC PCYKNWYERD GSPKCP*
Snakin 2	1	MANSTCILLL SLHLLLIAT AIQVKHAHAP TLQPVNSTAP TAQPNYP SHG
	51	FTEGSLQPQE CGGRCDVRCS ATQYRKPCMF FCQKCCATCR CVPSGTYGNK
	101	QTCPCYNNWK TKRGGPKCP*
Snakin 3	1	MSMASKMPAF ILLSFLLLVI DITPKIAGVP ASAPVTEPGH HAPAPAPAPI
	51	MIKDIKEDCP ACKGRCALHS RPKICIRACT TCCQTVRCPV PGTYGHREL
	101	GPRYTGWLTH GNRTKCP*
Snakin 4	1	MKRLVILTFI LFTLFFSSSF LQTTIAGSAF CDSKCKVRCS KAGVQDRCLK
	51	YCGICCAKCN CVPSGTYGNK DECPCYRDMV SSKNKPKCP*
Snakin 5	1	MANSTCILLL SLHLLLIAT AIQVKHAHAP TLQPVNSTAP TAQPNYP SHG
	51	FTEGSLQPQE CGGRCDVRCS ATQYRKPCMF FCQKCCATCR CVPSGTYGNK
	101	QTCPCYNNWK TKRGGPKCP*
Snakin 6	1	MIMKLLWFL VAFLEFFQVFA EASLDHGISN LDDQEVTS LH KHRIIRRRPR
	51	INCHFACARR CSKSSRKNVC HRACGTCCLR CHCVPPGTYG NTHTCPCYAG
	101	LKTHGKCLK P*
Snakin 7	1	MATTKHILLF LLIVALFATA MAQSFKALAK EEELTKGSDF HLDRRHRGHG
	51	QGSLRSYQCP GECSRRCSRT RYRKPCLFFC NKCCAKCFCV PPGFYGHKGV
	101	CPCYNNWKTQ QGGPKCP*

شکل ۳. توالی پپتیدی اسنیکین‌های گیاه پیاز که در آن سیگنال پپتید با رنگ خاکستری و دمین عملکردی GASA با رنگ مشکی مشخص شده است.

اصلی عمل آن‌ها برهمکنش با غشاهای میکروبی است، وجود داشته باشد (Sagaram *et al.*, 2012). بررسی وجود دمین‌های عملکردی محافظت شده، وجود یک دمین عملکردی محافظت شده GASA از خانواده پروتئین‌های تنظیم شونده با جیبرلین را در ساختار تمامی اسنیکین‌های شناسایی شده از گیاه پیاز نشان داد (شکل ۳). این دمین عملکردی محافظت شده نوعی پیچ و تاب خوردگی پروتئینی پایدار و غنی از سیستئین است که در تمامی خانواده‌های ژنی اسنیکین گیاهی وجود دارد. این دمین در ناحیه محافظت شده سوم اسنیکین‌ها قرار گرفته و ۶ پیوند دی سولفیدی درون مولکولی در آن تشکیل می‌شود (Nahirňak *et al.*, 2012; Nahirňak *et al.*, 2016; Porto and Franco, 2013).

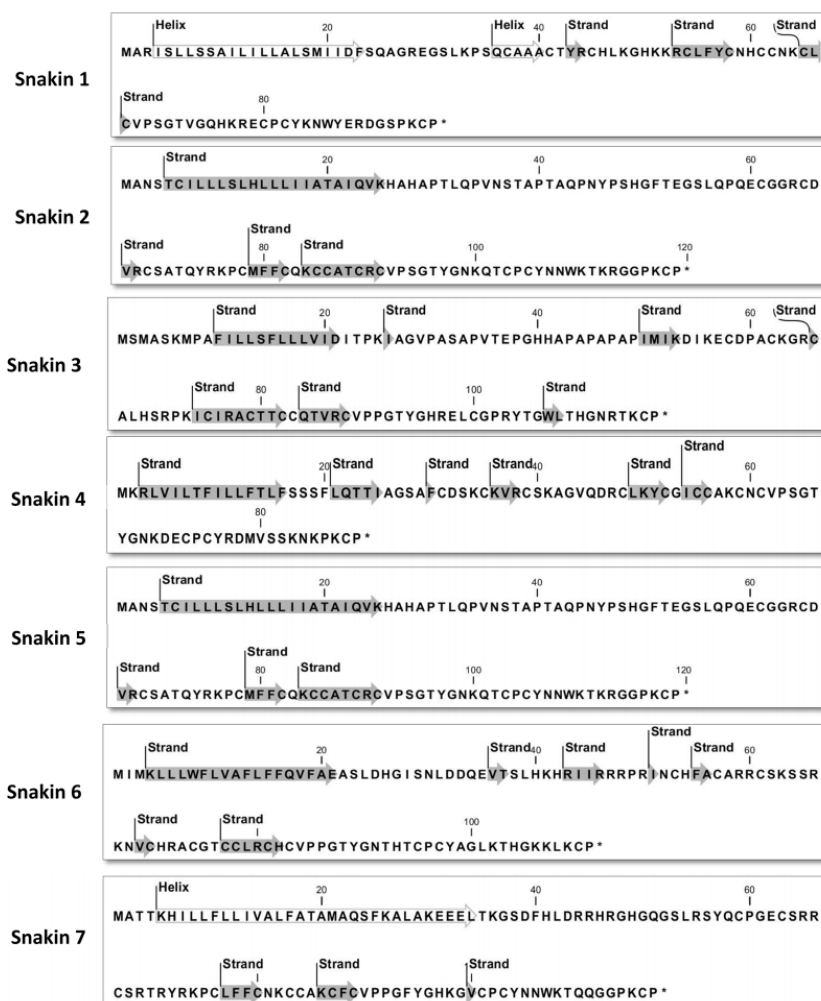
بررسی ساختارهای ثانویه در اسنیکین‌های گیاه پیاز، وجود مارپیچ‌های آلفا و همچنین رشته‌های بتا به صورت تکی یا با هم را در ساختار تمام این

محلی که اسنیکین‌ها و سایر پپتیدهای ضد میکروبی گیاهی پس از تولید در آن‌ها تجمع پیدا می‌کنند، همواره با نقشی که این پپتیدها در سیستم دفاعی و مقابله با عوامل بیماری‌زا بازی می‌کنند، رابطه‌ی مستقیم دارد. اسنیکین‌های گیاهی 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 پاتوژن‌ها حضور دارند، انتقال پیدا کنند. به همین دلیل، این پپتیدها پس از اینکه ترجمه شدند و ساختارهای ثانویه در آن‌ها ایجاد شد، با استفاده از سیگنال پپتید خارج سلولی خود به خارج از سلول ترشح شده تا در اولین خط دفاعی سلول به مبارزه با پاتوژن‌ها بپردازند. بنابراین، چنین سیگنال پپتید ترشحاتی خارج سلولی باید در ساختار اسنیکین‌های گیاهی سایر پپتیدهای ضد میکروبی که مکانیسم

ساختاری هستند که در ساختار اسنیکین‌های گیاهی ایجاد شده تا این پپتیدها بتوانند ضمن حفظ پایداری و یکپارچگی ساختاری خود در محل تجمع، با حداکثر قابلیت علیه با پاتوژن‌های هدف خود عمل کنند (Valente *et al.*, 2013). بررسی‌های ساختاری مختلفی که تاکنون انجام شده نشان داده‌اند که، اسنیکین‌های گیاهی در ساختار خود دارای مارپیچ‌های آلفا و رشته‌های بتا بوده که در پایداری و عملکرد این پپتیدها نقش عمده‌ای بازی می‌کنند (Thomma *et al.*, 2002; Nawrot *et al.*, 2014; Nahirňak *et al.*, 2012; Nahirňak *et al.*, 2016; Porto and Franco, 2013).

اسنیکین‌ها نشان داد. نتایج، وجود ۱ تا ۲ مارپیچ آلفا و همچنین ۳ تا ۷ رشته بتا را در ساختار این پپتیدها مشخص کرد. مارپیچ‌های آلفا تنها در Snakin 1 و Snakin 7 موجود بودند و در سایر اسنیکین‌ها تنها مارپیچ‌های آلفا وجود داشتند (شکل ۴).

اسنیکین‌های گیاهی همانند سایر پروتئین‌ها برای اینکه ساختار پایدار و همچنین عملکرد مناسبی را در شرایط مختلف زیستی نشان دهند، نیازمند ایجاد پیچ و تاب خوردگی پروتئینی پایدار در ساختار خود هستند، که ترکیب این پیچ و تاب خوردگی‌ها برای هر گروه از پروتئین‌ها اختصاصی است. ساختارهای مارپیچ آلفا و رشته بتا انواعی از این پیچ و تاب خوردگی‌های



شکل ۴. ساختارهای ثانویه پیش‌بینی شده در اسنیکین‌های گیاه پیاز. در این تصویر مارپیچ‌های آلفا با فلش سفید و رشته‌های بتا با فلش خاکستری مشخص شده‌اند.

ساختار خود، خاصیت آبریزی خود را افزایش داده و می‌تواند با غشاهای سلولی که عمدتاً از اسیدهای چرب به صورت دو لایه با خاصیت آبریزی بالایی دارند، برهمکنش مناسبی داشته باشند (Sagaram *et al.*, 2012; Gasteiger *et al.*, 2005; Porto and Franco, 2013).

بررسی وجود پیوندهای دی سولفیدی در ساختار اسنیکین‌های گیاه پیاز، وجود پنج تا شش پیوند دی سولفیدی را در آن‌ها نشان داد. الگوی اتصال اسیدهای آمینه سیستئین و همچنین تشکیل پیوندهای دی سولفیدی در Snakin 2 و Snakin 5 گیاه پیاز یکسان بود و سایر اسنیکین‌ها الگوهای اختصاصی را نشان دادند (جدول ۴).

جدول ۳. ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی اسنیکین‌های گیاه پیاز

نام اسنیکین	وزن مولکولی (کیلوالتون)	pH ایزوالکتریک	شاخص ناپایداری	شاخص آلفاتیک	GRAVY*
Snakin 1	۷/۱۰	۹/۱	۶۱/۳۹	۷۴/۲۷	-۰/۱۴۳
Snakin 2	۱۲/۹۶	۹/۰۵	۴۶/۵۵	۵۹/۹۲	-۰/۲۷۲
Snakin 3	۱۲/۵۶	۹/۱۵	۶۲/۲	۷۹/۳۲	۰/۰۶۸
Snakin 4	۹/۸۲	۹/۰۹	۴۵/۶۶	۶۸/۹۹	۰/۰۶۳
Snakin 5	۱۲/۹۶	۹/۰۵	۴۶/۵۵	۵۹/۹۲	-۰/۲۷۲
Snakin 6	۱۲/۶۷	۹/۵۵	۵۰/۲۳	۷۵/۵۹	-۰/۱۳۲
Snakin 7	۱۳/۲۴	۹/۴۵	۵۵/۴۸	۵۴/۲۷	-۰/۳۸۱

* Grand Average of Hydropathy

جدول ۴. پیوندهای دی سولفیدی موجود در ساختار اسنیکین‌های گیاه پیاز

شماره اسنیکین	تعداد پیوندها	پیوند ۱	پیوند ۲	پیوند ۳	پیوند ۴	پیوند ۵	پیوند ۶
Sanki n 1	۶	C1-C6	C2-C10	C3-C8	C4-C11	C5-C12	C7-C9
Sanki n 2	۶	C1-C2	C3-C6	C4-C5	C7-C11	C8-C12	C9-C10
Sanki n 3	۵	C1-C10	C2-C4	C3-C6	C5-C9	C7-C8	-
Sanki n 4	۶	C1-C2	C3-C6	C4-C11	C5-C12	C7-C8	C9-C10
Sanki n 5	۶	C1-C2	C3-C6	C4-C5	C7-C11	C8-C12	C9-C10
Sanki n 6	۶	C1-C11	C2-C4	C3-C6	C5-C12	C7-C9	C8-C10
Sanki n 7	۶	C1-C8	C2-C4	C3-C6	C5-C12	C7-C11	C9-C10

بررسی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی اسنیکین‌های شناسایی شده گیاه پیاز، وزن مولکولی بین ۹/۸۲ تا ۱۲/۹۶ کیلوالتون، pH ایزوالکتریک ۹/۰۵ تا ۹/۵۵، شاخص ناپایداری ۴۵/۶۶ تا ۶۲/۲، شاخص آلفاتیک ۵۴/۲۷ تا ۷۹/۳۲ و GRAVY -۰/۳۸۱ تا ۰/۰۶۸ را برای این پپتیدها مشخص کرد. اسنیکین‌های گیاهی وزن مولکولی پایینی داشته که این وزن مولکولی پایین باعث سرعت تولید و انتقال آن‌ها شده و همچنین سرعت عملکرد آن‌ها را نیز افزایش می‌دهد (Sels *et al.*, 2008; Porto and Franco, 2013). میزان pH ایزوالکتریک اسنیکین‌های گیاهی، نشان دهنده خاصیت بازی در آن‌ها بوده که این امر به دلیل فراوانی بالایی اسیدهای آمینه‌ای مانند سیستئین در ساختار آن‌ها است (Castro and Fontes, 2005; Pelegrini and Franco, 2005; Nahirňak *et al.*, 2012; Nahirňak *et al.*, 2016; Porto and Franco, 2013). میزان شاخص ناپایداری اسنیکین‌های گیاهی، نشان دهنده‌ی میزان پایداری متفاوت این پپتیدها در محیط بوده، که میزان پایداری یکی از عوامل تأثیرگذار بر فعالیت ضد میکروبی آن‌ها است (Guruprasad *et al.*, 1990). به حجم نسبی که توسط زنجیره‌های آلفاتیک اشغال می‌شود شاخص آلفاتیک گویند که نشان دهنده آبریزی و همچنین پایداری پروتئین است. شاخص آلفاتیک اسنیکین‌های گیاهی نشان دهنده‌ی 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). عمومی‌ترین مکانیسم ضد میکروبی اسنیکین‌های گیاهی و سایر پپتیدهای ضد میکروبی، برهمکنش و از بین بردن غشاهای سلولی پاتوژن‌ها است. برای انجام این برهمکنش، پپتیدها باید ساختارهای ویژه و همچنین خاصیت هیدروفوبیک در خود ایجاد کنند. اسنیکین‌های گیاهی به وسیله‌ی افزایش میزان اسیدهای آمینه آبریز مانند سیستئین در

میکروبی را در تمامی اسنیکین‌های شناسایی شده گیاه پیاز پیش‌بینی کرد. اسنیکین‌ها و سایر پپتیدهای ضد میکروبی به دلیل دارا بودن ویژگی‌هایی مانند آب‌گریزی، ساختارهای ثانویه، وجود بار مثبت بالا و دیگر ویژگی‌ها فعالیت ضد میکروبی از خود نشان می‌دهند که توسط ابزارهایی مانند CAMP قابل پیش‌بینی است (Waghu *et al.*, 2014).

جدول ۵. پیش‌بینی خاصیت ضد میکروبی اسنیکین‌های گیاه پیاز

نام اسنیکین	روش SVM	روش RF	روش ANN	روش DA
Snakin 1	۰/۹۹۴	۰/۹۴۵۵	تأیید شد	۰/۹۹۹
Snakin 2	۱	۰/۸۷۳۵	تأیید شد	۰/۹۹۹
Snakin 3	۰/۹۹۹	۰/۹۵۶۵	تأیید شد	۰/۹۹۴
Snakin 4	۰/۹۹۹	۰/۹۶۷	تأیید شد	۱
Snakin 5	۱	۰/۸۷۳۵	تأیید شد	۰/۹۹۹
Snakin 6	۱	۰/۹۸۶۵	تأیید شد	۱
Snakin 7	۱	۰/۹۴۷	تأیید شد	۱

نتیجه‌گیری

پژوهش حاضر، وجود خانواده‌ی چند ژنی پپتیدهای ضد میکروبی اسنیکین را در گیاه پیاز مشخص کرد. در این پژوهش، برای اولین بار توالی‌های کد کننده‌ی ۷ اسنیکین از گیاه پیاز با استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیکی و آزمایشگاهی مختلف شناسایی شد و ویژگی‌های ساختاری و عملکردی آن‌ها مانند طول توالی ژنی، طول توالی پپتیدی، ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی پروتئینی، محل تجمع سلولی و خاصیت ضد میکروبی آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت. به طور کلی نتایج این پژوهش مشخص کرد که، ژن‌های خانواده اسنیکین در گیاه پیاز همانند سایر اسنیکین‌های گیاهی، هم در سطح ژنی و هم پروتئینی خصوصیات ساختاری و عملکردی مشابهی را نشان می‌دهند. این نتایج همچنین مشخص کرد که تمامی اسنیکین‌های شناسایی شده در گیاه پیاز دارای خاصیت ضد میکروبی بالقوه بوده، هر چند که ممکن است فعالیت‌های دیگری

در تمامی اسنیکین‌های گیاه پیاز، تعداد دوازده اسید آمینه‌ی سیستئین محافظت شده وجود داشت که باعث ایجاد شش پیوند دی سولفیدی درون مولکولی در آن‌ها می‌شد. اسنیکین‌های گیاهی همانند سایر پپتیدهای ضد میکروبی غنی از سیستئین، برای ایجاد ساختارهای پایدار و همچنین عملکرد مناسب در شرایط مختلف، باید پیچ و تاب‌های ویژه‌ای همانند مارپیچ‌های آلفا، رشته‌های بتا و همچنین پل‌های دی سولفیدی در ساختار خود ایجاد کنند تا بتوانند با بیشترین قابلیت پاتوژن‌های هدف برهمکنش داشته باشند (Cools *et al.*, 2017; Porto and Franco, 2013; Nahirňak *et al.*, 2012; Nahirňak *et al.*, 2016).

نتایج بررسی بیوانفورماتیکی خاصیت ضد میکروبی اسنیکین‌های گیاه پیاز در سایت CAMP، وجود خاصیت ضد میکروبی را در تمام اسنیکین‌های گیاه پیاز پیش‌بینی کرد. اسنیکین‌های کامل پس از حذف سیگنال پپتید از آن‌ها، با به کارگیری چهار روش Discriminant Analysis (DA)، Random Forest (RF)، Support Vector Machine (SVM)، Artificial Neural Network (ANN) و Machine Network به منظور پیش‌بینی وجود یا عدم وجود خاصیت ضد میکروبی مورد بررسی و تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. نتایج کلی پیش‌بینی خاصیت ضد میکروبی در اسنیکین‌های گیاه پیاز در جدول ۵ نشان داده شده است. روش‌های مختلف، توانستند با میزان اطمینان قابل توجهی وجود خاصیت ضد میکروبی را در اسنیکین‌های گیاه پیاز پیش‌بینی کنند (جدول ۵).

الگوریتم Support Vector Machine با میزان احتمال بین ۰/۹۹۴ تا ۱، الگوریتم Random Forest با میزان احتمال بین ۰/۸۷۳۵ تا ۱، الگوریتم Discriminant Analysis با میزان احتمال بین ۰/۹۹۴ تا ۱ و الگوریتم Artificial Neural Network با تأیید کامل، وجود خاصیت ضد

پزشکی و دامپزشکی به عنوان عوامل ضد میکروبی جدید در مقابله با پاتوژن‌های انسانی، دامی و گیاهی استفاده کرد.

نیز نشان دهند. با توجه به این اثرات ضد میکروبی بالقوه در این پپتیدها، می‌توان با تولید این پپتیدها در سیستم‌های بیانی یوکاریوتی و پروکاریوتی از آن‌ها در

REFERENCES

- Bahar AA, Ren D (2013) Antimicrobial peptides. *Pharmaceuticals*. 6 (12): 1543-1575.
- Bao R, Huang L, Andrade J, Tan W, Kibbe WA, Jiang H, Feng G (2014) Review of current methods, applications, and data management for the bioinformatics analysis of whole exome sequencing. *Cancer informatics*. Sup 2: 67-83.
- Bulet P, Stöcklin R, Menin L (2004) Antimicrobial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunological reviews*. 198 (1): 169-184.
- Castro MS, Fontes W (2005) Plant defense and antimicrobial peptides. *Protein and peptide letters*. 12 (1): 11-16.
- Cools TL, Struyfs C, Cammue BP, Thevissen K (2017) Antifungal plant defensins: increased insight in their mode of action as a basis for their use to combat fungal infections. *Future Microbiology*. 12 (5): 441-454.
- Da Costa JP, Cova M, Ferreira R, Vitorino R (2015) Antimicrobial peptides: an alternative for innovative medicines? *Applied microbiology and biotechnology*. 99 (5): 2023-2040.
- Elsbach P (2003) What is the real role of antimicrobial polypeptides that can mediate several other inflammatory responses? *Journal of Clinical Investigation*. 111 (11): 1643.
- Epand RM (2016) Host Defense Peptides and Their Potential as Therapeutic Agents. Springer ,
- Faraji S, Mehmood F, Malik HMT, Ahmed I, Heidari P, Poczai P (2021) The GASA Gene Family in Cacao (*Theobroma cacao*, Malvaceae): Genome Wide Identification and Expression Analysis. *Agronomy*. 11 (7): 1425.
- Ferrè F, Clote P (2006) DiANNA 1.1: an extension of the DiANNA web server for ternary cysteine classification. *Nucleic acids research*. 34 (suppl_2): W182-W185.
- 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.
- Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud Se, Wilkins MR, Appel RD, Bairoch A (2005) Protein identification and analysis tools on the Expasy server. Springer.
- Gill RW, Sanseau P (2000) Rapid in silico cloning of genes using expressed sequence tags (ESTs). *Biotechnology annual review*. 5: 25-44.
- Goyal RK, Mattoo AK (2016) Plant antimicrobial peptides. In: Host defense peptides and their potential as therapeutic agents. Springer, pp 111-136
- Griffiths G, Trueman L, Crowther T, Thomas B, Smith B (2002) Onions—a global benefit to health. *Phytotherapy research*. 16 (7): 603-615.
- Guruprasad K, Reddy BB, Pandit MW (1990) Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition: a novel approach for predicting in vivo stability of a protein from its primary sequence. *Protein Engineering, Design and Selection*. 4 (2): 155-161.
- Harris F, Dennison SR, Phoenix DA (2009) Anionic antimicrobial peptides from eukaryotic organisms. *Current Protein and Peptide Science*. 10 (6): 585-606.
- Harris PW, Yang SH, Molina A, López G, Middleditch M, Brimble MA (2014) Plant antimicrobial peptides snakin-1 and snakin-2: chemical synthesis and insights into the disulfide connectivity. *Chemistry—A European Journal*. 20 (17): 5102-5110.

- Holaskova E, Galuszka P, Frebort I, Oz MT (2015) Antimicrobial peptide production and plant-based expression systems for medical and agricultural biotechnology. *Biotechnology advances*. 33 (6): 1005-1023.
- Hoskin DW, Ramamoorthy A (2008) Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. 1778 (2): 357-375.
- Ikai A (1980) Thermostability and aliphatic index of globular proteins. *The Journal of Biochemistry*. 88 (6): 1895-1898.
- Janssen BJ, Schirra HJ, Lay FT, Anderson MA, Craik DJ (2003) Structure of *Petunia hybrida* defensin 1, a novel plant defensin with five disulfide bonds. *Biochemistry*. 42 (27): 8214-8222.
- Jones P, Binns D, Chang H-Y, Fraser M, Li W, McAnulla C, McWilliam H, Maslen J, Mitchell A, Nuka G (2014) InterProScan 5: genome-scale protein function classification. *Bioinformatics*. 30 (9): 1236-1240.
- Kang H-K, Kim C, Seo CH, Park Y (2017) The therapeutic applications of antimicrobial peptides (AMPs): a patent review. *Journal of microbiology*. 55 (1): 1-12.
- Liguori L, Califano R, Albanese D, Raimo F, Crescitelli A, Di Matteo M (2017) Chemical composition and antioxidant properties of five white onion (*Allium cepa* L.) landraces. *Journal of Food Quality*. 2017.
- Mansour SC, Pena OM, Hancock RE (2014) Host defense peptides: front-line immunomodulators. *Trends in immunology*. 35 (9): 443-450.
- Marchler-Bauer A, Derbyshire MK, Gonzales NR, Lu S, Chitsaz F, Geer LY, Geer RC, He J, Gwadz M, Hurwitz DI (2014) CDD: NCBI's conserved domain database. *Nucleic acids research*. 43 (D1): D222-D226.
- McGinnis S, Madden TL (2004) BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools. *Nucleic acids research*. 32 (suppl_2): W20-W25.
- Melo MN, Ferre R, Castanho MA (2009) Antimicrobial peptides: linking partition, activity and high membrane-bound concentrations. *Nature Reviews Microbiology*. 7 (3): 245-250.
- Nahirňak V, Almasia NI, Hopp HE, Vazquez-Rovere C (2012) Snakin/GASA proteins: involvement in hormone crosstalk and redox homeostasis. *Plant signaling & behavior*. 7 (8): 1004-1008.
- Nahirňak V, Rivarola M, De Urreta MG, 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 (2): 172-188.
- Nawrot R, Barylski J, Nowicki G, Broniarczyk J, Buchwald W, Goździcka-Józefiak A (2014) Plant antimicrobial peptides. *Folia microbiologica*. 59 (3): 181-196.
- Nelson C, Regiland A (2007) Antimicrobial properties of extracts of *Allium cepa* and *Zingiber officinale* (ginger) on *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* and *Bacillus subtilis*. *Int J Trop Med*. 3 (2): 1540-1470.
- Nielsen H (2017) Predicting Secretory Proteins with SignalP. *Protein Function Prediction: Methods and Protocols*. 59-73.
- 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 (4): 368-374.
- Pelegrini PB, Franco OL (2005) Plant γ -thionins: novel insights on the mechanism of action of a multi-

- functional class of defense proteins. The international journal of biochemistry & cell biology. 37 (11): 2239-2253.
- Periwal V, Scaria V (2014) Bioinformatics Review. Bioinformatics. 45: 1-9.
- Porto WF, Franco OL (2013) Theoretical structural insights into the snakin/GASA family. Peptides. 44: 163-167.
- ProtParam E (2017) ExPASy-ProtParam tool .
- Sagaram US, Kaur J, Shah D (2012) Antifungal plant defensins: structure-activity relationships, modes of action, and biotech applications. In: Small Wonders: Peptides for disease control. ACS Publications, pp 317-336
- Sels J, Mathys J, De Coninck BM, Cammue BP, De Bolle MF (2008) Plant pathogenesis-related (PR) proteins: a focus on PR peptides. Plant Physiology and Biochemistry. 46 (11): 941-950.
- Sidhu JS, Ali M, Al-Rashdan A, Ahmed N (2019) Onion (*Allium cepa* L.) is potentially a good source of important antioxidants. Journal of food science and technology. 56 (4): 1811-1819.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S (2013) (MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Molecular biology and evolution. 30 (12): 2725-2729.
- Tang S-S, Prodhon ZH, Biswas SK, Le C-F, Sekaran SD (2018) Antimicrobial peptides from different plant sources: Isolation, characterisation ,and purification. Phytochemistry. 154: 94-105.
- Teshika JD, Zakariyyah AM, Zaynab T, Zengin G, Rengasamy KR, Pandian SK, Fawzi MM (2019) Traditional and modern uses of onion bulb (*Allium cepa* L.): a systematic review. Critical reviews in food science and nutrition. 59 (sup1): S39-S70.
- Thomma BP, Cammue BP, Thevissen K (2002) Plant defensins. Planta. 216 (2): 193-202.
- Valente AP, de Paula VS, Almeida FC (2013) Revealing the properties of plant defensins through dynamics. Molecules. 18 (9): 11311-11326.
- 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 (D1): D1154-D1158.
- Zasloff M (2006) Defending the epithelium. Nature medicine. 12 (6): 607-608.
- Zhang S, Wang X (2008) Expression pattern of GASA, downstream genes of DELLA, in Arabidopsis. Chinese Science Bulletin. 53 (24): 3839-3846.
- Zimmermann R, Sakai H, Hochholdinger F (2010) The gibberellic acid stimulated-like gene family in maize and its role in lateral root development. Plant physiology. 152 (1): 356-365.