

Identification and Sequencing of Defensin Genes in Barley (*Hordeum vulgare* L.): Bioinformatics Analysis and Expression Changes in Response to Biotic and Abiotic Stresses

Zeinab Saffar¹ , Seyed Mohsen Sohrabi^{2,*} , Mohammad Motamedi³  and Anahita Panji⁴ 

1. M.Sc. Student, Department of Plant Biotechnology, Shoushtar Branch, Islamic Azad University, Shoushtar, Iran
- 2- Assistant professor, Department of Production Engineering and Plant Genetics, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
- 3- Assistant Professor, Department of Plant Biotechnology, Shoushtar Branch, Islamic Azad University, Shoushtar, Iran
4. Ph.D., Department of Plant Production and Genetic Engineering, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran

*Corresponding author ✉: sm.sohrabi@scu.ac.ir

Citation: Saffar, Z., Sohrabi, S.M., Motamedi, M. and Panji, A. (2025). Identification and sequencing of defensin genes in barley (*Hordeum vulgare* L.): bioinformatics analysis and expression changes in response to biotic and abiotic stresses. *Plant Genetic Researches*, 11(2): 47-64. <http://dx.doi.org/10.22034/PGR.11.2.4>

(Received: November 28, 2024; Final Revised: February 08, 2025; Accepted: Revised: February 13, 2025; Published online: March 17, 2025)

Extended abstract

Introduction

During evolution, plants have developed diverse mechanisms to cope with biotic and abiotic stresses, one of which is the production and secretion of antimicrobial peptides such as defensins. Plant defensins are short, cysteine-rich and highly stable peptides that have four disulfide bonds in their structures. Defensins, are important group of plant antimicrobial peptides and play vital role in the plant defense system. Barley (*Hordeum vulgare* L.) due to its importance in agriculture and relative resistance to adverse conditions is a suitable candidate for identifying defensin genes. In the present study, members of the barley defensin gene family were identified and sequenced using bioinformatics and laboratory methods.

Materials and methods

To identify the defensin gene family, the protein sequences of plant defensins were obtained from the protein repository of NCBI database and aligned against the barley genome using the tBLASTn tool. Specific primers were designed based on the identified defensin sequences using Allele ID 6.0 software. Oligonucleotide primers were synthesized by Metabion (Metabion GmbH, Germany) using solid-phase phosphamidate chemistry and purified by high-pressure liquid chromatography (HPLC). Genomic DNA was extracted from powdered leaf samples using CTAB method. PCR reaction was performed to amplify gene fragments using the extracted DNA as a template. PCR results were purified from agarose gel and sequenced by Bioneer (Bioneer, South Korea). Sequencing results were analyzed using bioinformatics tools. Conserved functional domains were identified using three different tools (CDD, Pfam and InterproScan). The signal peptide and subcellular localization of defensins were predicted using online tools (SignalP 6.0 and Cello2GO). Physicochemical properties of defensin proteins were predicted using the ProtParam tool. Protein structures were determined using Phyre2 software. Exon-intron boundaries were identified using Gene Structure Display Server. Analysis of cis-elements was performed using



©2025 The author(s). This is an open access article distributed under [Creative Commons Attribution 4.0 International License \(CC BY 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source.

PlantCare database. Phylogenetic analysis was performed using MEGA X software. Evaluation of potential antimicrobial activity was performed using CAMP (Collection of Anti-Microbial Peptides) antimicrobial peptide database. Analysis of defensin gene expression in different tissues and in biotic and abiotic stresses was performed using transcriptomic data.

Results and discussion

In the present study, we identified 13 defensin genes in barley genome. The results showed that all identified defensin genes contain one intron and two exons in their genomic structure. Protein sequences analysis of defensins revealed the presence of signal peptides ranging from 21 to 35 amino acids, indicating their extracellular localization. Functional domain analysis showed that all identified barley defensins contained the conserved functional Knot1 domain. Furthermore, all identified defensins contained 4 disulfide bonds, contributing to alpha helices and beta strands. The study of post-translational modifications in defensin proteins showed the presence of possible phosphorylation and glycosylation residues. Physicochemical analysis of defensin peptides revealed that identified defensins molecular weight ranged from 7 to 9 KDa, isoelectric point ranged from 7.28 to 10, instability index above 40, GRAVY value ranged from -0.073 to 0.43, and aliphatic index ranged from 58.09 to 33.82. The prediction of antimicrobial properties of the identified defensins predicted the presence of potential antimicrobial properties in all these peptides. Phylogenetic analysis classified the identified barley defensins into distinct groups. Analysis of cis-regulatory elements in defensin promoter regions revealed the presence of hormone-responsive elements, as well as elements associated with responses to biotic and abiotic stresses, and light. The expression analysis of identified defensin genes showed that these genes have different expression pattern in the barley tissues and in response to biotic and abiotic stresses.

Conclusion

The present study identified and analyzed defensin genes in barley genome and showed that these genes, with similar structure and function to other plant antimicrobial peptides, play an important role in plant defense against biotic and abiotic stresses. The findings of this study indicate that defensin genes, are secreted peptides, enhancing plant defense mechanisms by interacting with microbial membranes. Defensins are particularly activated under severe stress conditions, such as pathogen attack, and contribute to enhancing plant resistance to adverse environmental stresses. The findings of present study provide a foundation for future research aimed at improving barley and other crop plants resilience. Plus, these results may contribute to the development of genetic engineering strategies to enhance plant resistance to both biotic and abiotic stresses.

Keywords: Antimicrobial peptides, Cysteine-rich peptides, Plant innate immunity, Regulatory gene analysis, Sequencing, Stress-responsive genes



شناسایی و توالی‌یابی ژن‌های دیفنسین در گیاه جو (*Hordeum vulgare L.*): بررسی بیوانفورماتیکی و

تغییرات بیان در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی

زینب صفار^۱، سید محسن سهرابی^{۲*}، محمد معتمدی^۳ و آناهیتا پنجی^۴

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه بیوتکنولوژی گیاهی، واحد شوشتر، دانشگاه آزاد اسلامی، شوشتر، ایران

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

۳- استادیار، گروه بیوتکنولوژی گیاهی، واحد شوشتر، دانشگاه آزاد اسلامی، شوشتر، ایران

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

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۹/۰۸؛ تاریخ آخرین ویرایش: ۱۴۰۳/۱۱/۲۰؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۱/۲۵؛ تاریخ انتشار برخط: ۱۴۰۳/۱۲/۲۷)

چکیده

در طول تکامل، گیاهان مکانیسم‌های متنوعی را برای مقابله با تنش‌های محیطی توسعه داده‌اند که یکی از آن‌ها تولید پپتیدهای ضد میکروبی مانند دیفنسین‌ها است. دیفنسین‌های گیاهی یکی از گروه‌های مهم پپتیدهای ضد میکروبی گیاهی به‌شمار می‌روند و نقش حیاتی در سامانه دفاعی گیاه ایفا می‌کنند. جو (*Hordeum vulgare L.*) به دلیل اهمیت کشاورزی و مقاومت نسبی در برابر شرایط نامساعد، گزینه‌ای مناسب برای شناسایی ژن‌های دیفنسین محسوب می‌شود. مطالعه حاضر با هدف شناسایی و بررسی ویژگی‌های اعضای خانواده ژنی دیفنسین در گیاه جو انجام شد. در این مطالعه، ۱۳ ژن دیفنسین در ژنوم جو شناسایی شدند. نتایج نشان داد که تمامی ژن‌های شناسایی شده دارای یک ایترون و دو اگزون در ساختار ژنومی خود هستند. تحلیل توالی‌های پروتئینی دیفنسین‌ها نشان‌دهنده وجود پپتید سیگنال با طول ۲۱ تا ۳۵ اسیدآمینو بود که به تجمع خارج سلولی آن‌ها اشاره دارد. بررسی نواحی عملکردی نشان داد که تمامی دیفنسین‌های شناسایی شده در جو، دارای دمن عملکردی محافظت‌شده Knot1 هستند. همچنین، وجود ۴ پیوند دی‌سولفیدی در تمامی دیفنسین‌ها مشاهده شد که در تشکیل ساختارهای آلفا-هلیکسی و رشته‌های بتا نقش دارند. بررسی تغییرات پساترجمه‌ای نشان‌دهنده حضور جایگاه‌های احتمالی فسفریلاسیون و گلیکوزیلاسیون بود. تحلیل ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی نشان داد که وزن مولکولی دیفنسین‌ها بین ۷ تا ۹ کیلو دالتون، نقطه ایزوالکتریک بین ۷/۲۸ تا ۱۰، شاخص ناپایداری بیش از ۴۰، شاخص GRAVY بین ۰/۴۳ تا ۰/۷۳- و شاخص آلفاتیک بین ۳۳/۸۲ تا ۵۸/۰۹ متغیر است. پیش‌بینی ویژگی‌های ضد میکروبی نشان داد که تمامی دیفنسین‌های شناسایی شده دارای توان بالقوه ضد میکروبی هستند. تحلیل فیلوژنتیکی دیفنسین‌های شناسایی شده را در گروه‌های مجزا طبقه‌بندی نمود. تحلیل عناصر تنظیمی cis در نواحی پروموتری دیفنسین‌ها، حضور عناصر پاسخ‌دهنده به هورمون‌ها، تنش‌های زیستی و غیرزیستی و همچنین نور را نشان داد. تحلیل بیان ژن‌های شناسایی شده نیز نشان داد که این ژن‌ها دارای الگوهای بیانی متفاوتی در بافت‌های مختلف و در پاسخ به تنش‌های مختلف هستند. مطالعه حاضر منجر به شناسایی و تحلیل ژن‌های دیفنسین در ژنوم گیاه جو شد. نتایج این پژوهش می‌تواند پایه‌ای برای تحقیقات آینده با هدف بهبود مقاومت جو و سایر گیاهان زراعی فراهم آورد و همچنین در توسعه راهکارهای مهندسی ژنتیک برای افزایش مقاومت گیاه به تنش‌های زیستی و غیرزیستی مؤثر واقع شود.

واژگان کلیدی: ایمنی ذاتی گیاهان، پپتیدهای ضد میکروبی، تحلیل تنظیمی ژن‌ها، توالی‌یابی، ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش

مقدمه

گیاهان همواره در معرض عوامل تنش‌زای مختلف محیطی قرار دارند که از جمله آن‌ها می‌توان به تنش‌های زیستی مانند حمله بیماری‌گرها و تنش‌های غیرزیستی مانند خشکی، شوری و دمای بالا اشاره کرد. در طی میلیون‌ها سال تکامل، گیاهان مکانیسم‌های متنوعی برای مقابله با این تنش‌ها توسعه داده‌اند (Li et al., 2021). یکی از مؤثرترین مکانیسم‌ها، تولید و ترشح پپتیدها و پروتئین‌های ضد میکروبی مانند دیفنسین‌هاست. دیفنسین‌ها گروهی از پپتیدهای کوچک، غنی از سیستئین و مقاوم به تجزیه آنزیمی هستند که در دفاع از گیاهان نقش حیاتی دارند. آن‌ها به دلیل ساختار پایدار و اتصال دی‌سولفیدی، توانایی مقابله با طیف وسیعی از بیماری‌گرها شامل باکتری‌ها، قارچ‌ها و ویروس‌ها را دارا هستند (Sher Khan et al., 2019).

در کنار نقش کلیدی دیفنسین‌ها در دفاع زیستی، شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد این پپتیدها در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی نیز مؤثر هستند. به‌عنوان مثال، در شرایط خشکی یا شوری، تولید و بیان دیفنسین‌ها در بسیاری از گیاهان افزایش می‌یابد. این موضوع نشان می‌دهد که دیفنسین‌ها ممکن است علاوه بر نقش مستقیم خود در مقابله با بیماری‌گرها، به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های عمومی سیستم دفاعی گیاهان عمل کنند و نقش مهمی در تقویت مقاومت گیاه در برابر محیط‌های نامطلوب ایفا کنند (Sher Khan et al., 2019).

گیاه جو (*Hordeum vulgare L.*) به‌عنوان یکی از مهم‌ترین غلات دنیا، در تأمین غذا و خوراک دام نقش عمده‌ای دارد. این گیاه به دلیل قابلیت رشد در مناطق نیمه‌خشک و تحمل نسبی به شرایط تنش‌زا، به‌ویژه خشکی، به یکی از گزینه‌های اصلی برای کشت در مناطق کم‌آب تبدیل شده است. با این حال، مانند سایر گیاهان، جو نیز تحت تأثیر شدید تنش‌های محیطی قرار دارد که می‌تواند تأثیرات منفی بر رشد و تولید محصول داشته باشد. از این‌رو، شناسایی و درک دقیق مکانیسم‌های دفاعی جو به‌ویژه در مقابله با تنش‌های غیرزیستی و زیستی، می‌تواند در بهبود مقاومت

این گیاه و افزایش عملکرد آن در شرایط چالش برانگیز محیطی کمک‌کننده باشد (Wiegmann et al., 2019). یکی از جنبه‌های مهم مطالعه بر روی مقاومت گیاهان به تنش‌های زیستی و غیرزیستی، شناسایی و جداسازی ژن‌های مرتبط با پاسخ دفاعی است. دیفنسین‌های گیاهی شناخته‌شده‌ترین و یکی از بزرگ‌ترین خانواده‌های پپتیدهای ضد میکروبی (AMPs) محلول در غشاء گیاهان هستند (Dong et al., 2023). اولین دیفنسین‌های گیاهی شناسایی شده، از گندم، جو و هویج جدا شدند و مشخص گردید که رشد قارچ‌ها را مهار می‌کنند. پس از آن، ژن‌های دیفنسین متعددی از گیاهان مختلف تک‌لپه و دولپه مانند آرابیدوپسیس (Sels et al., 2007; Silverstein et al., 2005)، توتون (Bleackley et al., 2016; Kvanakul et al., 2003; Lay et al., 2016; Melo et al., 2002)، نخود (Do et al., 2004)، عدس (Finkina et al., 2008)، ماش (Chen et al., 2004)، ذرت (Balandín et al., 2005; Cordts et al., 2001; Souza Castro et al., 1996)، برنج (Sakai et al., 2013) شناسایی و جداسازی شد و مشخص گردید که در پاسخ دفاعی گیاه به بیماری‌گرهای مختلف قارچی و باکتریایی فعالیت دارند. اکثر دیفنسین‌های شناسایی شده به‌عنوان بازدارنده‌های قوی رشد بیماری‌گرهای قارچی مانند *Botrytis cinerea*، *Fusarium culmorum*، *Colletotrichum lindemuthianum* و *C. sphaerospermum* عمل می‌کنند (Sharma et al., 2018). سایر دیفنسین‌ها رشد باکتری‌ها را مهار می‌کنند، اما میزان اثر بازدارندگی آن‌ها بر قارچ‌ها معمولاً قوی‌تر است (Sathoff et al., 2019). برای مثال، ژن‌های *So-D2* و *So-D7* در اسفناج (*Spinacia oleracea*) فعالیت‌های ضد میکروبی با طیف گسترده‌ای را در برابر بیماری‌گرهای باکتریایی مانند *Ralstonia solanacearum* نشان می‌دهند (Segura et al., 1998). دیفنسین‌ها همچنین می‌توانند با مهار فعالیت آلفا‌آمیلاز و تریپسین در روده حشرات مانند *Spodoptera liturata* مقاومت گیاه را در برابر حشرات افزایش دهند (Dowd and Johnson, 2018; Vi et al., 2019; Vijayan et al., 2013). از دیگر فعالیت‌های دیفنسین‌های گیاهی می‌توان به

در مجموع، پپتیدهای ضد میکروبی گیاهی در مسیرهای دفاعی گیاه جو نقش دارند، اما عملکردهای آن‌ها می‌تواند بسته به نوع تنش و شرایط فیزیولوژیکی گیاه متفاوت باشد. مقایسه ویژگی‌های این خانواده‌های ژنی، نه تنها به درک بهتر مکانیسم‌های دفاعی گیاه جو کمک می‌کند، بلکه می‌تواند در توسعه برنامه‌های به‌نژادی برای تولید گیاهان مقاوم‌تر به تنش‌های محیطی مفید باشد.

هدف اصلی این مطالعه، شناسایی و جداسازی ژن‌های خانواده دیفنسین در گیاه جو و بررسی ویژگی‌های فیزیوشیمیایی و تکاملی آن‌ها با استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیکی است. در این راستا، آنالیزهایی از قبیل تعیین خصوصیات فیزیوشیمیایی ژن‌های دیفنسین، پیش‌بینی پپتید سیگنالی، فاکتورهای رونویسی و عناصر تنظیم‌کننده سیس و آنالیز فیلوژنتیکی این ژن‌ها انجام شد. همچنین، تحلیل‌های بیوانفورماتیکی (*in silico*) برای بررسی بیان این ژن‌ها در شرایط مختلف تنش‌زا مانند خشکی، شوری و در بافت‌های مختلف گیاه انجام شد. نتایج این تحقیق می‌تواند به روشن‌تر شدن نقش دیفنسین‌ها در تقویت مقاومت گیاه جو به تنش‌های زیستی و غیرزیستی کمک کند. به‌علاوه، این نتایج می‌تواند مبنایی برای تحقیقات آینده در زمینه بهبود ژنتیکی گیاهان زراعی از طریق مهندسی ژنتیک یا برنامه‌های به‌نژادی برای افزایش مقاومت به تنش‌های محیطی فراهم آورد.

مواد و روش‌ها

شناسایی اعضای خانواده ژنی دیفنسین در ژنوم جو: جهت شناسایی خانواده ژنی دیفنسین در ابتدا تمامی توالی‌های مربوط به خانواده دیفنسین گیاهی که در پایگاه داده پروتئینی NCBI (Pruitt *et al.*, 2005) ثبت شده بودند، دریافت شدند. سپس برای شناسایی توالی ژن‌های دیفنسین در ژنوم جو از ابزار tBLASTn استفاده شد (McGinnis and Madden, 2004). نتایج tBLASTn با استفاده از نرم‌افزار CLC Genomics Workbench (نسخه ۲۲) (QIAGEN, USA) سرهم‌بندی شده و توالی‌های حاصله در پایگاه داده دمن‌های حفاظت‌شده (Conserved Domains Database, CDD) مورد بررسی قرار گرفتند

مسدود کردن کانال‌های یونی، در سازگاری گیاه با تنش‌های نامطلوب غیر زیستی، مانند خشکی (Kumar *et al.*, 2019)، روی (Shahzad *et al.*, 2013) و فلزات سنگینی مانند کادمیوم (Luo *et al.*, 2019) اشاره کرد. این پپتیدها با وجود ساختار بسیار حفاظت‌شده، به جز اسیدهای آمینه سیستمین که پیوندهای دی‌سولفیدی پایدار را تشکیل می‌دهند و برخی اسیدهای آمینه حفاظت‌شده دیگر، توالی بسیار متغیری دارند. به‌طور کلی، ساختار سه‌بعدی آن‌ها از سه صفحه β موازی و یک مارپیچ α به موازات صفحات β تشکیل شده است (Graham *et al.*, 2008).

با این حال، اطلاعات مربوط به ژن‌های دیفنسین در گیاه جو هنوز محدود است و به‌طور جامع بررسی نشده‌اند. در سال‌های اخیر، مطالعات متعددی بر روی خانواده‌های ژنی مرتبط با پاسخ به تنش در گیاه جو انجام شده است. به‌عنوان نمونه، خانواده‌های ژنی دهیدرین (Abedini *et al.*, 2012) و هوئین (Mir Derikvand *et al.*, 2022) مورد بررسی قرار گرفته‌اند و نقش آن‌ها در پاسخ به تنش‌های محیطی، به‌ویژه تنش‌های غیرزیستی مانند خشکی و سرما، مشخص شده است. پژوهش‌های انجام‌شده بر روی این ژن‌ها نشان داده‌اند که آن‌ها با تنظیم اسمزی، محافظت از پروتئین‌های سلولی و تثبیت ساختارهای غشایی، در افزایش تحمل گیاه به شرایط نامطلوب محیطی مؤثر هستند. اهمیت ژن‌های دفاعی در پاسخ گیاه به تنش‌های زیستی و غیرزیستی بارها مورد تأکید قرار گرفته است. به‌عنوان مثال، بررسی بیان ژن‌های دفاعی در جو در واکنش به عامل بیماری‌زای *Blumeria graminis* نشان داد که ژن‌های مرتبط با پاسخ اکسیداتیو در این مسیر فعال می‌شوند (Ramezanpour *et al.*, 2024). علاوه بر این، خانواده ژنی اسنیکین نیز در گیاه جو مطالعه شده است. این ژن‌ها، مشابه با دیفنسین‌ها، به‌عنوان پپتیدهای ضد میکروبی غنی از سیستمین شناخته می‌شوند و در سیستم دفاعی گیاهان نقش مهمی دارند. تحقیقات نشان داده‌اند که ژن‌های اسنیکین در مراحل مختلف رشد گیاه و تحت تأثیر تنش‌های محیطی بیان می‌شوند (Panji *et al.*, 2023).

از دستگاه اسپکتروفتومتر (نانودراپ) و ژل آگارز یک درصد بررسی گردید.

واکنش PCR برای تکثیر و جداسازی: واکنش PCR برای تکثیر قطعات ژنی با استفاده از مستر میکس شرکت سیناژن (SinaClon BioScience, Iran) و DNA استخراج شده به‌عنوان الگو با استفاده از دستگاه ترموسایکلر شرکت BioRad (BioRad, USA) انجام شد. شرایط واکنش PCR در جدول ۲ ارائه شده است. پس از انجام واکنش، محصولات PCR روی ژل آگارز یک درصد بارگذاری و تأیید اندازه شدند (شکل ۱). پس از تعیین اندازه، باندهای حاصل از ژن‌های دیفنسین از ژل آگارز با استفاده از کیت استخراج ژل GeneJET (Thermo Fisher Scientific, USA) خالص‌سازی شده و در نهایت به‌صورت رفت و برگشتی توسط شرکت متابیون آلمان توالی‌یابی شدند. نتایج توالی‌یابی برای هر قطعه به‌طور جداگانه با استفاده از نرم‌افزار CLC Genomics Workbench (نسخه ۲۲) مونتاژ شدند.

(Marchler-Bauer *et al.*, 2014). تنها توالی‌هایی که شامل دمین کامل Knot1 (Gamma-Thionin) با e-value کمتر از ۰/۰۰۱ بودند به‌عنوان ژن دیفنسین انتخاب شدند. به‌منظور طراحی آغازگرهای اختصاصی، از توالی‌های دیفنسین شناسایی شده که توسط تمامی تحلیل‌های پایین‌دستی تأیید شده بودند، استفاده شد. آغازگرهای اختصاصی توسط نرم‌افزار AlleleID (نسخه ۶) (Apte and Singh, 2007) طراحی شدند (جدول ۱).

مواد گیاهی و استخراج DNA: پس از تهیه بذور، بذرها با قارچکش بنومیل ضدعفونی و در گلدان‌های پلاستیکی کشت شدند. نمونه‌گیری از برگ گیاهچه‌های ۲۰ روزه صورت گرفت و پس از فریز شدن در ازلت مایع، تا زمان استخراج DNA در یخچال با دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. DNA ژنومی با استفاده از روش CTAB (Doyle, 1991) از نمونه‌های پودر شده با ازلت مایع استخراج شد. کمیت و کیفیت DNA استخراجی با استفاده

جدول ۱- اسامی و توالی آغازگرهای طراحی شده، طول قطعه تکثیری، دمای اتصال

Table 1. Names and sequences of designed primers, amplicon length, annealing temperature

ردیف Row	نام ژن Gene name	شناسه ژن Gene ID	توالی آغازگر Primer sequence	طول قطعه تکثیر Product length	دمای اتصال (سانتی‌گراد) Ta (°C)
1	Def01	HORVU1Hr1G010250-F HORVU1Hr1G010250-R	5'- CCTACCACCACCACCAG-3' 5'- TCTAGCGAACGGCACTGACC-3'	445	60
2	Def02	HORVU1Hr1G010230-F HORVU1Hr1G010230-R	5'- GTGAAGGTGGAGCAGAGCAG-3' 5'- TAAGAAGTGTGACGACGAACG-3'	459	61
3	Def03	HORVU1Hr1G002150-F HORVU1Hr1G002150-R	5'- CAACCAGCCAGCAAGCAGAG-3' 5'- CACGGAACAGACAGACAACGG-3'	409	60
4	Def04	HORVU2Hr1G120390-F HORVU2Hr1G120390-R	5'- TCACGCAAGGAGAGCAAATGG-3' 5'- TAGACGGACACGGGAGGAAC-3'	501	61
5	Def05	HORVU2Hr1G007650-F HORVU2Hr1G007650-R	5'- TAGCACATACCAACAAGGAAG-3' 5'- CATAATTGTGCCATCCATCC-3'	450	61
6	Def06	HORVU2Hr1G007650-F HORVU2Hr1G007650-R	5'- GCTATCAATAATGGCGTCGTC-3' 5'- ACACCGTGAACCTGAAGTCC-3'	562	61
7	Def07	HORVU4Hr1G082400-F HORVU4Hr1G082400-R	5'- ACACACAGACGCAACACACAC-3' 5'- ATGGACGCACGCAGGAAGAG-3'	524	60
8	Def08	HORVU4Hr1G082390-F HORVU4Hr1G082390-R	5'- ACACCCAACCCTGACACACTC-3' 5'- ATGGACATTGACGCAGACACG-3'	378	60
9	Def09	HORVU7Hr1G037690-F HORVU7Hr1G037690-R	5'- CTTGGAAGGTCTTAATCTGTG-3' 5'- GTTACATTATTACCGGAAGC-3'	428	60
10	Def10	HORVU7Hr1G037720-F HORVU7Hr1G037720-R	5'- CCTCCCTCCTACATTCATC-3' 5'- GGTACAGACACAATGCTTCAG-3'	406	59
11	Def11	HORVU6Hr1G0571450-F HORVU6Hr1G0571450-R	5'- GCCAAGGTCACAACAATAGC-3' 5'- GCCATCAACTCAAATCTCAAC-3'	439	58
12	Def12	HORVU5Hr1G084390-F HORVU5Hr1G084390-R	5'- CAGCATGTGGACCAAGAAGG-3' 5'- TAGTGGAGTACATACGATGATACG-3'	504	61
13	Def13	HORVU1Hr1G002100-F HORVU1Hr1G002100-R	5'- ATAAACCCGTGCCTCCTCTT-3' 5'- GGAGGACTGGTCTGCTTGAA-3'	444	61

جدول ۲- برنامه حرارتی واکنش PCR برای تکثیر دیفنسین‌ها

Table 2. PCR thermal cycling used to amplify defensins in barley leaves

مرحله	درجه حرارت (سانتی‌گراد)	زمان (دقیقه)
Step	Temperature (°C)	Time (Min)
واسرشته‌سازی اولیه	95	10
Initial denaturation		
واسرشته‌سازی	95	0.5
Denaturation		
اتصال	دمای اتصال هر آغازگر	0.5
35 Cycle		
Annealing		
گسترش	72	1.5
Extension		
گسترش نهایی	72	10
Final extension		

پروتئین‌های دیفنسین با استفاده از سرورهای NetPhos 3 (نسخه ۳) (Blom *et al.*, 2004) و NetNGlyc (نسخه ۱) پیش‌بینی شدند.

تجزیه و تحلیل عناصر سیس و فاکتورهای رونویسی: ناحیه ۱۵۰۰ جفت‌باز پیش‌باز با استفاده از پایگاه بر خط PlantCare جهت تشخیص عناصر تنظیم‌کننده Cis مورد بررسی قرار گرفتند (Lescot *et al.*, 2002). بررسی عوامل رونویسی به کمک پایگاه PlantRegMap صورت گرفت (Tian *et al.*, 2020).

هم‌ردیفی چندگانه توالی‌های پروتئینی و بازسازی درخت فیلوژنتیکی خانواده ژنی دیفنسین: هم‌ردیفی چندگانه توالی‌های پروتئینی با استفاده از الگوریتم Clustal W انجام شد (Larkin *et al.*, 2007). درخت فیلوژنتیکی مبتنی بر روش بیشینه احتمال (Maximum Likelihood, ML) برای توالی پروتئین‌های خانواده ژنی دیفنسین در گیاه جو و برنج و آرابیدوپسیس (گیاهان مدل اصلی تک و دو لپه‌ای) با استفاده از نرم‌افزار MEGA X (با در نظر گرفتن ۱۰۰۰ تکرار بوت‌استرپ) بازسازی شد (Kumar *et al.*, 2018).

تجزیه و تحلیل فعالیت ضد میکروبی اعضای خانواده ژنی دیفنسین: برای ارزیابی فعالیت بالقوه ضد میکروبی اعضای خانواده ژنی دیفنسین از پایگاه داده پپتیدهای ضد میکروبی (Collection of Anti-Microbial Peptides) CAMP

تجزیه و تحلیل ساختار پروتئین‌های خانواده ژنی دیفنسین: زمین‌های عملکردی محافظت شده در ساختار پروتئین‌های خانواده ژنی دیفنسین با استفاده از پایگاه‌های داده CDD، Pfam و InterProScan مشخص گردیدند (Finn *et al.*, 2016; Jones *et al.*, 2014; Marchler-*et al.*, 2014). پپتید راهنما و محل فعالیت درون‌سلولی پروتئین‌های خانواده ژنی دیفنسین به کمک سرورهای آنالیز SignalP، Phobius، PSORT و CELLO2GO پیش‌بینی شدند (Horton *et al.*, 2007; Käll *et al.*, 2007; Nielsen, 2017; Yu *et al.*, 2014). خصوصیات فیزیکوشیمیایی پروتئین‌های خانواده ژنی دیفنسین شامل pH ایزوالکتریک (pI)، وزن مولکولی، شاخص آلیفاتیک، شاخص ناپایداری و میانگین کل هیدروپاتیک (Grand Average Of Hydropathicity)، GRAVY) با استفاده از ابزار ProtParam پیش‌بینی شد (Gasteiger *et al.*, 2005). علاوه بر این ساختارهای پروتئینی با استفاده از نرم‌افزار Phyre2 تعیین شدند (Kelley *et al.*, 2015). مرزهای آگرون-اینترون در همه ژن‌های دیفنسین به وسیله هم‌ردیفی توالی ژنومیک و CDS با استفاده از سرور نمایش ساختار ژن (Gene Structure Display Server) شناسایی و تعیین شد (Guo *et al.*, 2007). مکان‌های فسفوریلاسیون و گلیکوزیلاسیون

$|\geq 1$ (fold change) فیلتر شده و ژن‌های خانواده دیفنسین از این بین جدا شدند. در نهایت نقشه‌های حرارتی با استفاده از مقادیر بیان ژنی با استفاده از Heatmapper ایجاد شد (Babicki et al., 2016).

نتایج و بحث

سرهم‌بندی نتایج حاصل از هم‌ردیفی توالی مورد توافق دیفنسین‌ها با ژنوم گیاه جو، به تولید ۱۳ کانتیگ انجامید. بر مبنای این کانتیگ‌ها، آغازگرهایی طراحی و با استفاده از آن‌ها قطعاتی با طول‌های ۵۵۴، ۵۷۱، ۵۶۸، ۵۱۳، ۷۱۹، ۵۹۰، ۱۱۵۱، ۶۱۱، ۱۱۲۲، ۷۹۸ و ۵۲۶ جفت‌باز تکثیر شدند (شکل ۱). با بهره‌گیری از ابزارهای SignalP و CELLO، توالی‌های پروتئینی خانواده اسنیکین گیاه جو تجزیه و تحلیل شدند که نشان داد این پروتئین‌ها دارای پپتیدهای نشانه‌ای به طول ۲۵، ۳۱، ۳۵، ۳۳، ۲۸، ۲۸، ۳۳، ۲۴، ۲۲، ۲۲، ۲۱، ۳۰ و ۳۱ اسیدآمینو هستند. در همه پروتئین‌های دیفنسین شناسایی شده، یک دامین بسیار حفاظت شده در انتهای کربوکسیلی، حاوی تقریباً ۶۰ اسید آمینه، که شامل ۸ اسیدآمینو سیستئین که منجر به تشکیل ۴ پیوند دی‌سولفیدی می‌شود، یافت شد (شکل ۲). همچنین مارپیچ‌های گذرنده از غشاء در تمام پروتئین‌های دیفنسین بررسی شد که حداقل یک بخش گذرنده در ۷۰ درصد از آن‌ها مشاهده شد، به طوری که در پپتیدهای Def01، Def02، Def04 و Def05 مشاهده نگردید. این بررسی‌ها نشان می‌دهد که پپتیدهای دیفنسین پس از سنتز، به خارج از سلول ترشح شده و در واکنش به تنش‌های زیستی و غیرزیستی فعال می‌شوند. محل تجمع این پپتیدها در خارج از سلول با نقش کلیدی آن‌ها در دفاع گیاه و مقابله با عوامل بیماری‌زا ارتباط مستقیمی دارد. این پپتیدها به واسطه خاصیت ضدپاتوژنی خود، پس از تکمیل سنتز و انجام تغییرات پساترجمه‌ای که منجر به تشکیل ساختارهای ثانویه می‌شود، به محیط خارج سلولی منتقل می‌شوند تا در خط مقدم دفاع گیاه در برابر مهاجمان میکروبی ایفای نقش کنند. ترشح این پپتیدها به خارج از سلول و وجود سیگنال‌های مربوطه در ساختار دیفنسین‌ها و دیگر پپتیدهای ضد میکروبی ضروری است، زیرا این پپتیدها از طریق تعامل

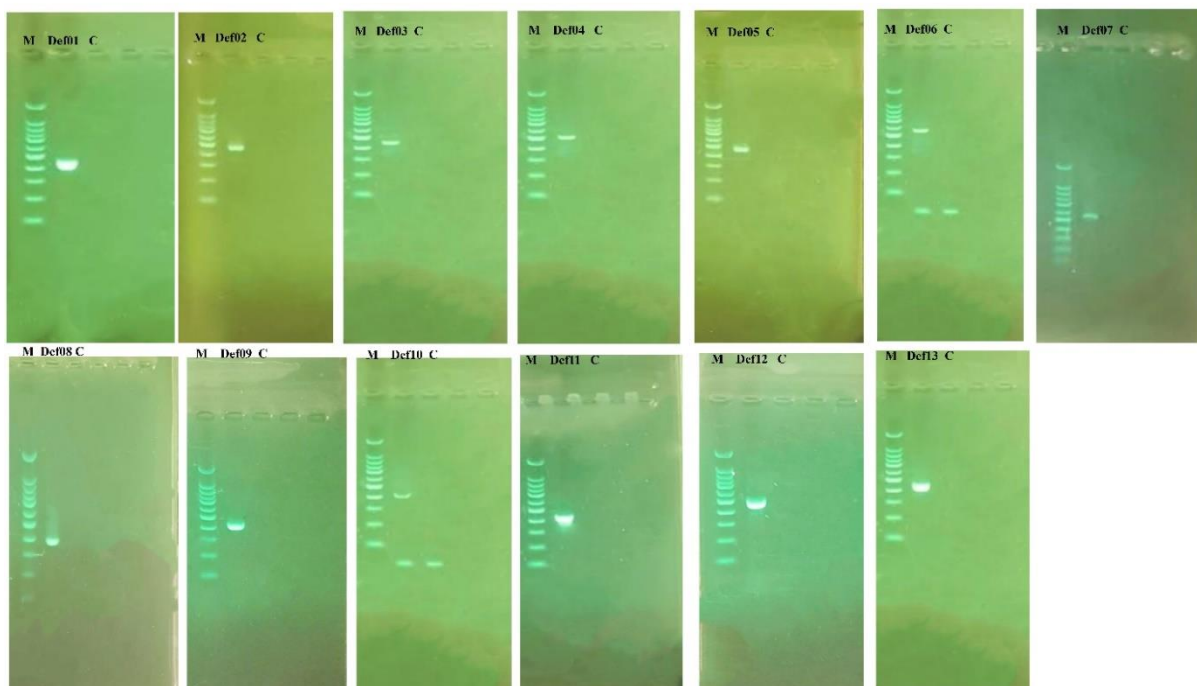
استفاده شد. مجموعه پایگاه داده پپتیدهای ضد میکروبی (CAMP) برای سرعت‌دهی و راحتی در مطالعات پپتیدهای ضد میکروبی ایجاد شده است. پایگاه CAMP اطلاعات توالی‌های حفاظت شده پپتیدهای ضد میکروبی خانواده‌های مختلف را در بر دارد که در آن اطلاعات مربوط به توالی نوکلئوتیدی و پروتئینی، شماره دسترسی، نوع فعالیت، ارگانسیم منبع، ارگانسیم‌های هدف و خانواده پروتئینی به کاربران ارائه می‌گردد (Waghu et al., 2014). در این مطالعه، احتمال وجود فعالیت ضد میکروبی و توالی‌هایی با بیشترین فعالیت ضد میکروبی با استفاده از الگوریتم‌های تجزیه و تحلیل افتراقی خطی (Discriminant Analysis)، الگوریتم جنگل تصادفی (Random Forest)، شبکه عصبی مصنوعی (Artificial Neural Network) و ماشین‌بردار پشتیبان (Support Vector Machine) پیش‌بینی شدند (Waghu et al., 2014).

تجزیه و تحلیل بیان ژن‌های خانواده دیفنسین اختصاصی بافت و تحت شرایط تنش به صورت *In silico*: الگوی بیان ژن‌های دیفنسین در بافت‌های مختلف، با استفاده از تجزیه و تحلی داده‌های RNA Seq به دست آمد تا درک اولیه از اهمیت عملکرد ژن‌های دیفنسین در فرآیند رشد گیاه ارائه شود (Mayer et al., 2012). همچنین با استفاده از مجموعه داده‌های بیان ژنی حاصل از چندین آزمایش ریزآرایه مربوط به تأثیر تنش‌های مختلف زیستی و غیر زیستی موجود در پایگاه داده GEO سایت NCBI ژن‌های با بیان متفاوت (DEGs) شناسایی شدند. در مطالعات مشابه، از رویکردهای بیوانفورماتیکی برای شناسایی و تحلیل بیان ژن‌های دخیل در مسیرهای زیستی استفاده شده است. برای نمونه، در مطالعه‌ای روی گیاه شیرین بیان، بیان ژن‌های کلیدی مسیر سنتز گلیسیریزین در فصول مختلف با استفاده از آنالیز *in silico* بررسی شده است (Khakpour et al., 2019). این روش‌ها امکان مقایسه شرایط بیان ژن را در شرایط مختلف محیطی فراهم می‌کنند. در این تحلیل‌ها، نمونه‌های تحت تنش با نمونه‌های کنترل برای شناسایی DEGs مقایسه شدند. DEGs با $FDR < 0.05$ و $|\log_2$

در سایر پروتئین‌ها از ۲ تا ۸ جایگاه متفاوت بود. پنج پپتید Def04, Def07, Def08, Def09 و Def13 نیز حاوی یک محل گلیکوزیلاسیون بودند. فسفوریلاسیون می‌تواند بر فعالیت، پایداری و تعاملات پروتئین‌های دیفنسین تأثیر بگذارد و با واسطه‌گری کینازها، این پروتئین‌ها را در مسیرهای دفاعی مختلف فعال کند. حضور فراوان فسفوریلاسیون بر روی سرین و ترئونین در دیفنسین‌های جو نشان می‌دهد که این پروتئین‌ها ممکن است تحت تأثیر کینازهایی همچون سرین/ترئونین کینازها باشند، که به‌عنوان اجزای مهمی از آبشار پیام‌رسانی در مکانیسم دفاعی عمل می‌کنند. این کینازها می‌توانند با فسفوریلاسیون پروتئین‌های دفاعی، آن‌ها را در مسیرهای سیگنالینگ تنش زیستی و غیرزیستی فعال کرده و به تقویت پاسخ‌های دفاعی گیاه در برابر عوامل بیماری‌زا و شرایط محیطی تنش‌زا مانند خشکی و شوری کمک کنند (Yang et al., 2022).

با غشاهای میکروبی، عملکرد دفاعی خود را به انجام می‌رسانند. در نتیجه، عملکرد موفقیت‌آمیز دیفنسین‌ها در مراحل اولیه دفاع، به وجود این سیگنال‌های ترشحی وابسته است که امکان فعالیت مؤثر آن‌ها را در مقابل پاتوژن‌ها فراهم می‌سازد (Fu et al., 2023).

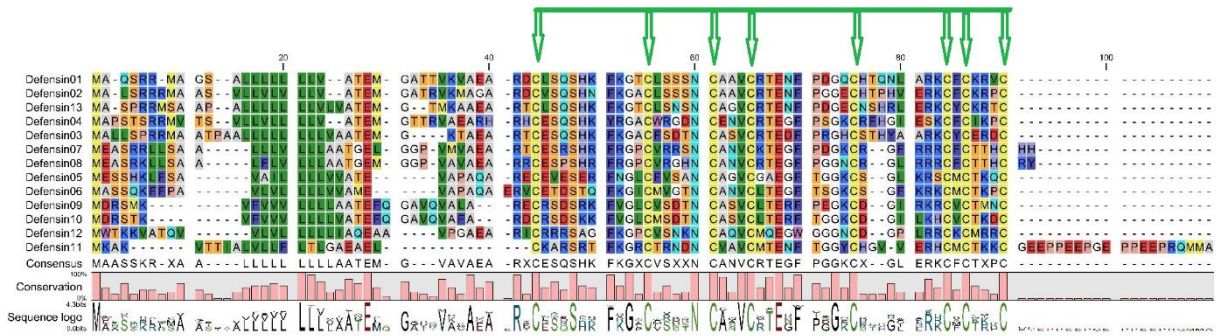
در بررسی ساختارهای ثانویه پروتئین‌های دیفنسین جو، وجود ۰ تا ۵ مارپیچ آلفا و ۱ تا ۵ رشته بتا مشخص شد. پپتید Def10 تنها دارای رشته‌های بتا می‌باشند، اما سایر پپتیدهای دیفنسین دارای مارپیچ آلفا و رشته‌های بتا هستند (شکل ۳). در پروتئین‌های دیفنسین، در مجموع ۷۸ رویداد فسفوریلاسیون احتمالی روی آمینواسیدهای سرین، ترئونین و تیروزین، پیش‌بینی شد. پیش‌بینی می‌شود که اکثر رویدادهای فسفوریلاسیون بر روی سرین (۴۷)، سپس ترئونین (۳۱) و در نهایت تیروزین (۱) ایجاد می‌شود. بیشترین جایگاه‌های فسفوریلاسیون (۹ جایگاه) در پروتئین‌های دیفنسین در Def01 پیش‌بینی شده، در حالی که رویدادهای فسفوریلاسیون



شکل ۱- تصاویر ژل الکتروفورز محصولات PCR ژن‌های دیفنسین. در تمام تصاویر چاهک ۱: نشانگر ۱۰۰bp، چاهک ۲:

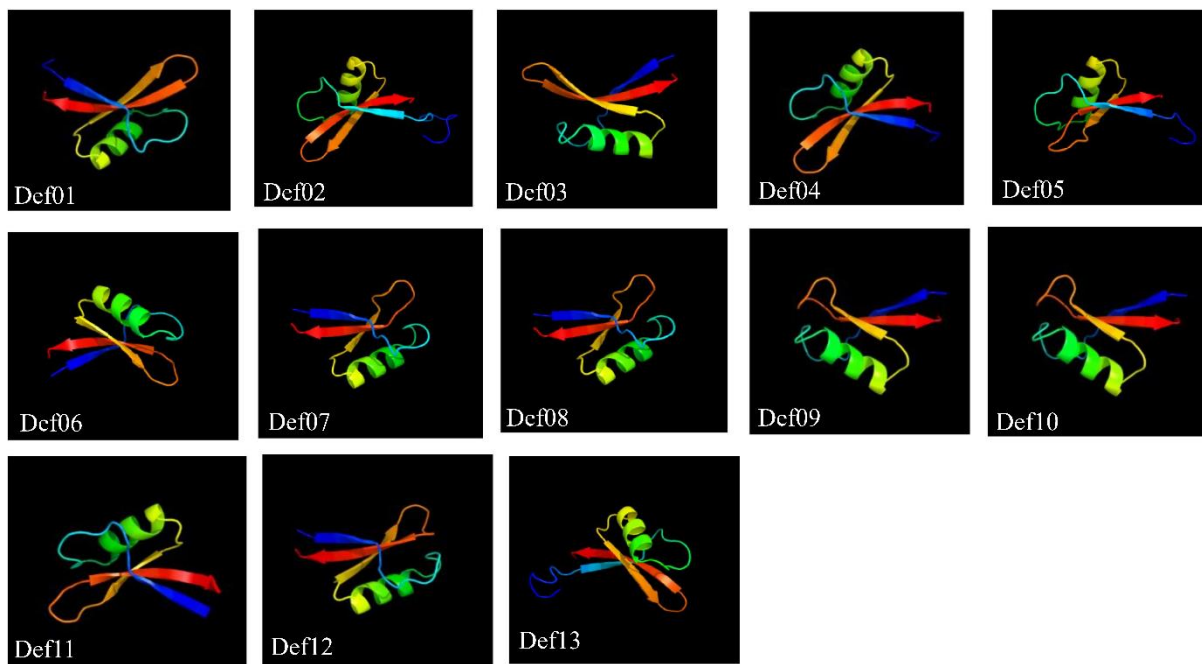
توالی تکثیر شده ژن مورد نظر روی DNA جو رقم زهک و ۳: کنترل منفی

Figure 1. Gel electrophoresis of PCR products targeting barley defensin genes. In all images: Lane 1: 100 bp marker, Lane 2: Amplified sequence of the target gene on *Hordeum vulgare* cv. Zahak DNA, and Lane 3: Negative control.



شکل ۲- همترازی دمین اصلی پروتئین‌های دینسین جو. ستون‌های سبز نشان دهنده ۸ سیستئین حفظ شده آن‌ها است.

Figure 2. Alignment of the core domain of barley defensin proteins. Arrowheads indicate the eight conserved cysteine residues



شکل ۳- ساختارهای ثانویه پیش‌بینی‌شده در پپتیدهای دینسین گیاه جو. ساختارها با استفاده از Phyre2 و بر پایه مدل‌سازی همولوژی و پیش‌بینی ساختار ثانویه ایجاد شده‌اند.

Figure 3. Predicted secondary structures of defensin peptides in barley. The 3D structures were generated using Phyre2, based on homology modeling and secondary structure prediction.

وزن مولکولی پایین این پپتیدها، تولید سریع، انتقال کارآمد و فعالیت ضد میکروبی بهبود یافته را تسهیل می‌کند. دامنه پیش‌بینی‌شده نقطه ایزوالکتریک (pI) پپتیدهای جداسازی‌شده نشان‌دهنده خاصیت بسیار بازی آن‌ها است که به دلیل فراوانی اسیدهای آمینه بازی مانند سیستئین، آرژینین و لیزین می‌باشد. این ترکیب به خاصیت بازی کلی آن‌ها کمک می‌کند که برای عملکرد آن‌ها در فرآیندهای مختلف بیوشیمیایی، از جمله تکنیک‌های خلص‌سازی

پروتئین‌های دینسین مورد مطالعه در گیاه جو، دارای وزن مولکولی ۷-۹ کیلو دالتون بودند. همچنین، نقطه ایزوالکتریک بین ۷/۲۸ (Def05) و ۱۰ (Def10) متغیر بود. اکثر پروتئین‌های دینسین با مقادیر شاخص ناپایداری بالای ۴۰، به جز Def06 و Def10، ناپایدار شناخته شدند. بر اساس مقادیر GRAVY، Def03، Def04، Def07، Def08، Def11 و Def12 آبدوست و سایر آن‌ها آبگریز بودند. مقادیر شاخص آلفاتیگ ۵/۰۹ (Def11) تا ۸۲/۳۳ (Def12) بود (جدول ۴).

پایگاه اطلاعاتی CAMP ابزاری را توسعه داده است که با استفاده از الگوریتم‌های محاسباتی مختلف و بر اساس ویژگی‌هایی مانند آبگریزی، وجود بار مثبت، فولدینگ و ساختارهای ثانویه، به پیش‌بینی ویژگی ضدمیکروبی در پپتیدها و پروتئین‌های دیگر می‌پردازد. این الگوریتم‌ها تنها در صورتی پروتئین‌ها را به‌عنوان پپتیدهای ضدمیکروبی می‌شناسد، که دارای یک یا چند ویژگی مشترک ضدمیکروبی باشند. در گیاه جو الگوریتم SVM با میانگین احتمال ۰/۸۸، الگوریتم RF با میانگین احتمال بیشتر از ۰/۷۷، الگوریتم DA با میانگین احتمال ۰/۶۹ و الگوریتم ANN با احتمال بیشتر از ۰/۸۴ وجود خاصیت ضدمیکروبی را در تمامی اسنیکین‌های شناسایی شده پیش‌بینی کرد (جدول ۴).

تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی: برای درک بهتر ارتباطات تکاملی درخت فیلوژنتیک با استفاده از توالی‌های پروتئین دیفنسین از گیاهان جو، برنج و آراییدوپسیس ایجاد شد. در این درخت، ژن‌های دیفنسین مربوط به آراییدوپسیس (*AtDef*) به‌طور جداگانه و در یک گروه مجزا قرار گرفته‌اند، که نشان‌دهنده تمایز تکاملی این گیاه دوپله‌ای از تک‌پله‌ای‌ها (جو و برنج) است. ژن‌های دیفنسین در جو (*HvDef*) و برنج (*OsDef*) برخلاف آراییدوپسیس، به‌صورت پراکنده در چندین گروه مختلف قرار گرفته‌اند. این پراکندگی در تک‌پله‌ای‌ها احتمالاً به‌دلیل مسیرهای تکاملی متفاوت و رخدادهای دوگانه‌سازی ژنی است که منجر به تنوع بیشتر در ژن‌های دیفنسین شده است. به‌طور کلی، این ساختار نشان می‌دهد که دوپله‌ای‌ها و تک‌پله‌ای‌ها مسیرهای تکاملی مستقلی داشته‌اند، اما در تک‌پله‌ای‌ها (جو و برنج) تنوع ژنتیکی بیشتری در ژن‌های دیفنسین دیده می‌شود (شکل ۴).

تعیین وضعیت ساختار ژن‌ها: با استفاده از ابزار Gene Structure Display Server ساختارهای آگزون-اینترون بر اساس هم‌ترازی CDS و توالی ژنی ایجاد گردید. هر گروه از ژن‌های دیفنسین ساختارهای ژنتیکی مشترک به‌صورت حفاظت شده داشتند، به طوری که دارای دو یا یک آگزون بودند. به طوری که ژن Def08 دارای یک آگزون و سایر ژن‌ها دارای یک اینترون و دو آگزون بوده و الگوی مشابهی داشتند (شکل ۵). وجود اینترون‌های متعدد در ژن‌ها ظرفیت پیرایش متناوب را افزایش می‌دهد که منجر به تنوع بیشتر پروتئین‌ها و مکانیسم‌های تنظیمی پیچیده‌تر می‌شود.

مانند کروماتوگرافی تبادل یونی و ایزوالکتروفوکوسینگ، ضروری است (Ijaz et al., 2023).

شاخص آلیفاتیک به‌عنوان معیاری برای نشان دادن حجم اشغال شده توسط زنجیره‌های جانبی آلیفاتیک عمل می‌کند و پایداری حرارتی و آبگریزی یک پروتئین را منعکس می‌کند. به‌عنوان مثال، پپتیدهای دیفنسین جو دارای شاخص آلیفاتیک محاسبه‌شده‌ای هستند که نشان‌دهنده مقاومت خوب آن‌ها در برابر تغییرات دمایی است، که می‌توان آن را به وجود ساختارهای ثانویه و پل‌های دی‌سولفیدی در ترکیب آن‌ها نسبت داد. این ویژگی‌های ساختاری پایداری پپتیدها را در برابر تنش‌های حرارتی افزایش می‌دهد (Kaur et al., 2020). میانگین کل هیدروپاتی (GRAVY) یکی دیگر از پارامترهای مهم است که از تقسیم مجموع مقادیر هیدروپاتی برای تمام اسیدهای آمینه بر تعداد کل اسیدهای آمینه به‌دست می‌آید. مقدار منفی GRAVY نشان‌دهنده‌ی خاصیت قطبی است، در حالی که مقدار مثبت آن حاکی از ویژگی‌های غیرقطبی می‌باشد. این ویژگی برای پپتیدهای ضدمیکروبی (AMPs) بسیار مهم است، زیرا آن‌ها با غشاهای سلولی تعامل دارند. خصوصیات هیدروفوبیک، همراه با ساختارهای ثانویه خاص و پیوندهای دی‌سولفیدی، به این پپتیدها اجازه می‌دهد تا به‌طور مؤثر با غشاهای پاتوژن که عمدتاً از اسیدهای چرب آبگریز تشکیل شده‌اند، درگیر شوند. افزایش هیدروفوبیسیته از طریق گنجاندن اسیدهای آمینه غیرقطبی مانند آلانین و لوسین، این تعامل را تقویت می‌کند (Ijaz et al., 2023).

ویژگی‌های ساختاری دیفنسین‌ها علاوه بر نقش‌های ضدمیکروبی خود، به پایداری کلی و چندکاربردی بودن آن‌ها تحت شرایط مختلف تنش کمک می‌کند. وجود پیوندهای دی‌سولفیدی نه تنها پایداری حرارتی را افزایش می‌دهد، بلکه این پپتیدها را در برابر تجزیه‌ی پروتئولیتیک محافظت می‌کند و آن‌ها را به اجزای مستحکم سیستم ایمنی ذاتی گیاه تبدیل می‌نماید. توازن بین هیدروفوبیسیته، ساختار ثانویه و پیوندهای کووالانسی برای اثربخشی آن‌ها در تخریب غشاهای میکروبی ضروری است (Kaur et al., 2020).

عناصر سیس به GA, ABA, اکسین و اسید سالیسیلیک مرتبط هستند. عناصر Cis مرتبط با انواع مختلف پاسخ تنش (LTR, MBS و STRE) و مقاومت به بیماری (تکرارهای غنی از TC, W-box و WUN-motif) در اکثر ژن‌ها شناسایی شدند. عناصر تنظیم سیس متابولسم (zein (O2-Site) و تنظیم اختصاصی بذر (RY-element) نیز در این مناطق از پروموتور شناسایی شدند. علاوه بر این، پروموتورهای اکثر ژن‌های دیفنسین شامل عناصر cis مربوط به تنفس بی هوازی (ARE) و پاسخ نوری GT1-motif, TCT-motif, Box 4, GATA, G-BOX, AE-box و AE-box بودند. یافته‌ها نشان داد که چندین هورمون گیاهی شامل جیبرلیک است، متیل جاسمونیک، اکسین و آبسزیک اسید ممکن است ژن‌های دیفنسین را برای واکنش به تنش‌های مختلف کنترل کنند (شکل ۶).

این پیچیدگی نه تنها عملکردهای بیولوژیکی را بهینه می‌کند، بلکه بر نقش مهم تکاملی ایترون‌ها و عناصر غیر کدکننده در ژنوم موجودات زنده تأکید می‌کند. درک این فرآیندها برای درک چگونگی سازگاری و تکامل موجودات با محیط خود حیاتی است (Lim et al., 2018).

تجزیه و تحلیل عناصر تنظیم‌کننده سیس و فاکتورهای رونویسی: جهت بررسی مکانیسم‌های تنظیمی ژن‌های دیفنسین، ۱۵۰۰ جفت باز بالادست کدون شروع مورد ارزیابی گرفت. عناصر Cis مرتبط با هورمون‌های گیاهی در پروموتورهای ۱۳ ژن دیفنسین در گیاه جو، 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

جدول ۳- طول توالی، خصوصیات فیزیکوشیمیایی (شامل وزن مولکولی، نقطه ایزوالکتریک، شاخص ناپایداری، متوسط

هیدروپاتی کل و شاخص آلیفاتیک) و مکان تجمع سلولی

Table 3. Sequence length, physicochemical properties (including molecular weight, isoelectric point, instability index, grand average of hydropathy (GRAVY), and aliphatic index), and subcellular localization.

نام ژن	طول توالی	وزن مولکولی	نقطه ایزوالکتریک	شاخص هیدروپاتی کل	متوسط GRAVY	شاخص آلیفاتیک	مکان تجمع سلولی
Gene Name	Length (aa)	MW (KDa)	pI	II	GRAVY	Aliphatic Index	Cell localization
Def01	82	8.8	9.48	50.38	0/039	77/43	Extracellular
Def02	83	8.97	9.67	67.18	0/076	72/89	Extracellular
Def03	84	9.2	8.48	49.8	-0/073	68/81	Extracellular
Def04	84	9.44	9.43	53.54	-0/274	63/81	Extracellular
Def05	75	7.85	7.28	58.42	0/384	80/66	Extracellular
Def06	76	8.13	8.94	35.59	0/43	75/65	Extracellular
Def07	82	9.07	9.95	63.91	-0/16	70/24	Extracellular
Def08	82	8.95	9.86	51.91	-0/124	66/77	Extracellular
Def09	76	8.38	8.96	41.55	0/286	87/1	Extracellular
Def10	76	8.27	8.71	37.49	0/35	85/78	Extracellular
Def11	89	9.85	7.42	60.59	-0/336	58/09	Extracellular
Def12	77	8.4	10	56.93	0/014	82/33	Extracellular
Def13	83	9.09	9.42	55.03	-0/116	73/02	Extracellular

جدول ۴- پیش بینی خواص ضد میکروبی، با استفاده از الگوریتم‌های ماشین بردار پشتیبان (SVM)، جنگل تصادفی (RF)،

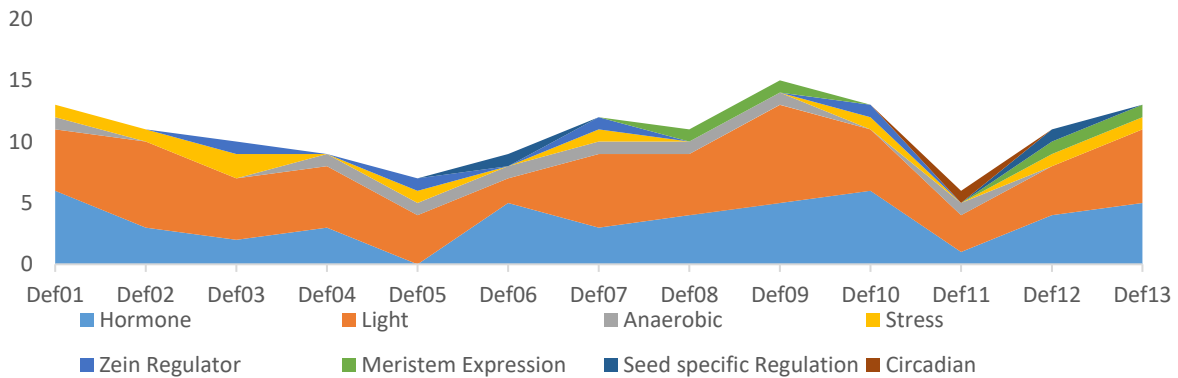
تحلیل تفکیکی (DA) و شبکه عصبی مصنوعی (ANN)

Table 4. Prediction of antimicrobial properties using Support Vector Machine (SVM), Random Forest (RF), Discriminant Analysis (DA), and Artificial Neural Network (ANN) algorithms.

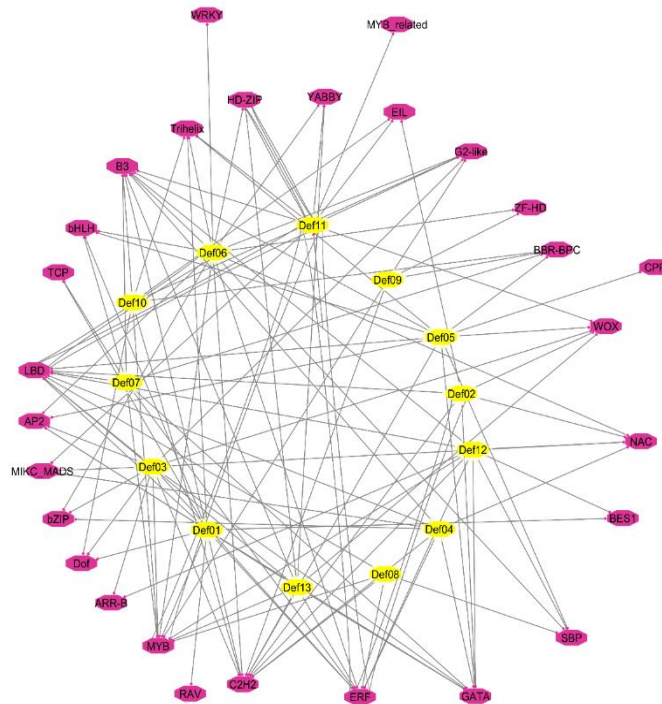
پپتید	ماشین بردار پشتیبان SVM	جنگل تصادفی RF	شبکه عصبی مصنوعی ANN	تحلیل تفکیکی DA
Peptide	SVM	RF	ANN	DA
Def01	0.826	0.897	AMP	0.72
Def02	0.936	0.919	AMP	0.36
Def03	0.62	0.9725	AMP	0.6
Def04	0.98	0.9635	AMP	0.83
Def05	0.841	0.578	AMP	0.41
Def06	0.734	0.332	NAMP	0.78
Def07	0.986	0.9125	AMP	0.94
Def08	0.974	0.915	AMP	0.7
Def09	0.939	0.4155	AMP	0.82
Def10	0.956	0.491	AMP	0.16
Def11	0.967	0.983	NAMP	0.93
Def12	0.984	0.819	AMP	0.98
Def13	0.738	0.9205	AMP	0.738

تغییرات بیان در بافت‌های مختلف گیاه مانند دانه‌های در حال رشد، جنین در حال جوانه‌زنی، گل‌آذین، میانگره، ساقه و ریشه نیز مورد بررسی قرار گرفت و الگوهای بیانی متفاوتی بسته به نوع بافت مشاهده شد. یافته‌ها نشان داد که ژن‌های دیفنسین نقش‌های متنوعی در پاسخ به تنش‌های مختلف و همچنین در مراحل رشدی گوناگون دارند (شکل ۸ و ۹).

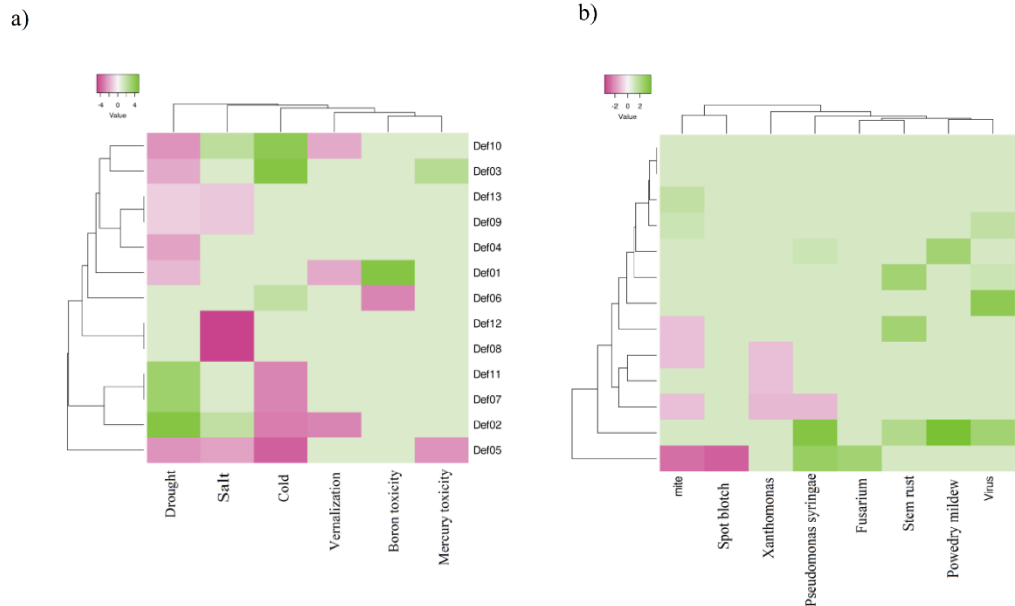
سمیت فلزات سنگین (سمیت بور: GSE14521، جیوه: GSE15295)، بهاره‌سازی (GSE27821) و تنش‌های زیستی از جمله بیماری‌گرها (*Fusarium oxysporum*: GSE33398، پارازیت *Polymyxa graminis*: GSE17238، باکتری *Pseudomonas syringae*: GSE43906 و سفیدک پودری: GSE14930) و آفات، بر بیان ژن‌های دیفنسین تأثیرگذار بوده و این تأثیرات به‌صورت کاهش یا افزایش بیان ژن‌ها مشاهده شد.



شکل ۶- عناصر cis پیش‌بینی شده در پروموتور ژن‌های دیفنسین گیاه جو
Figure 6. Predicted cis-regulatory elements in the promoters of barley defensin genes.

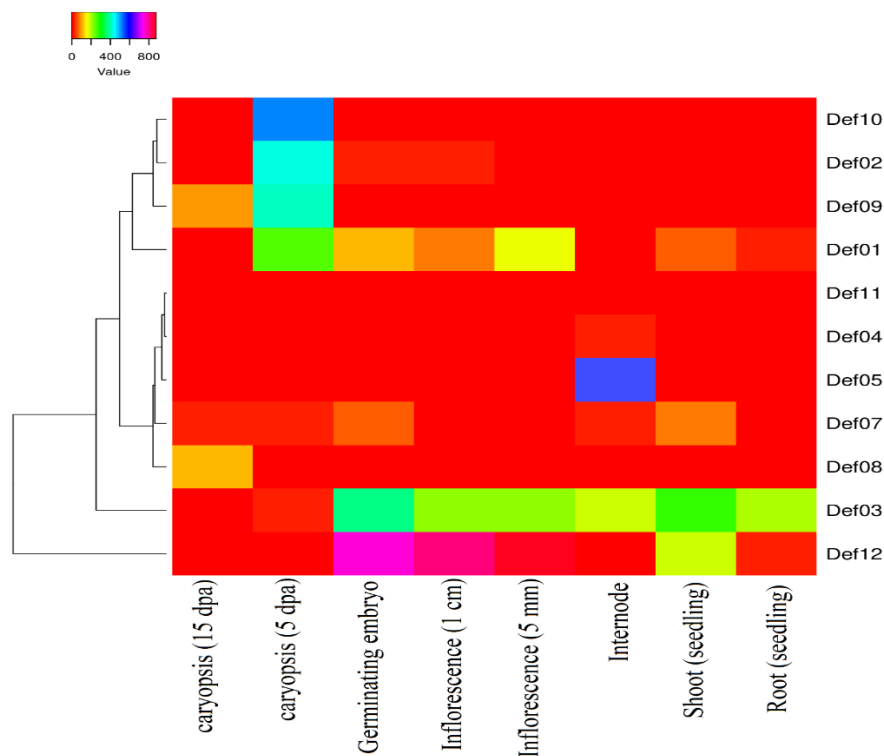


شکل ۷- شبکه تعامل بین ژن‌های دیفنسین و خانواده فاکتور رونویسی
Figure 7. Interaction network between defensin genes and the transcription factor family



شکل ۸- الگوی بیان ژن‌های دیفنسین جو. الف-ا) در پاسخ به تنش‌های غیر زیستی. ب-ب) در پاسخ به تنش‌های زیستی. مقادیر Foldchange از مقیاس ۴- برای کاهش بیان (رنگ بنفش) و ۴ (رنگ سبز) برای افزایش بیان استفاده شده است.

Figure 8. Expression patterns of barley defensin genes. a) In response to abiotic stresses. b) In response to biotic stresses. Fold change values range from -4 (purple) for downregulation to 4 (green) for upregulation.



شکل ۹- تجزیه و تحلیل بیان ویژه بافت در ژن‌های دیفنسین جو. دانه‌های در حال رشد (caryopsis) در دو مرحله زمانی، جنین در حال جوانه‌زنی (Germinating embryo)، گل آذین (Inflorescence) در دو اندازه مختلف (۱ سانتی‌متر و ۵ میلی-متر)، میانگره (Internode)، ساقه (Shoot) و ریشه (Root) در مرحله جوانه‌زنی

Figure 9. Tissue-specific expression analysis of defensin genes in barley. Developing caryopsis at two time points, germinating embryo, inflorescence at two different sizes (1 cm and 5 mm), internode, shoot, and root at the germination stage.

از دیدگاه کاربردی، این پپتیدها می‌توانند به کاهش استفاده از سموم شیمیایی و هزینه‌های تولید محصولات کشاورزی کمک کنند. با بهره‌گیری از تکنیک‌های بیوتکنولوژی و تولید گیاهان تراریخته‌ای که پپتیدهای ضد میکروبی را بیان می‌کنند، می‌توان گیاهانی مقاوم‌تر و سازگارتر با محیط‌های تنش‌زا تولید کرد. این راهکار، نه تنها باعث افزایش مقاومت گیاهان به تنش‌های محیطی می‌شود، بلکه به کاهش اثرات منفی زیست‌محیطی و افزایش پایداری تولید محصولات کشاورزی در مواجهه با تغییرات اقلیمی کمک خواهد کرد. این پژوهش پایه‌ای برای تحقیقات آتی در زمینه بهبود عملکرد گیاهان از طریق مهندسی ژنتیک فراهم می‌کند و استفاده از ژن‌های دیفنسین به‌عنوان یکی از مهم‌ترین کاندیدها برای تقویت دفاع گیاهان و کاهش اتکا به مواد شیمیایی را پیشنهاد می‌دهد.

پژوهش حاضر به شناسایی و تحلیل ژن‌های دیفنسین در گیاه جو پرداخت و نشان داد که این ژن‌ها، با ساختار و عملکرد مشابه دیگر پپتیدهای ضد میکروبی گیاهی، نقش مهمی در دفاع گیاه در برابر تنش‌های زیستی و غیرزیستی ایفا می‌کنند. پپتیدهای ضد میکروبی به دلیل تنوع بالای خود در ترکیب آمینواسیدی و ساختار، فعالیت گسترده‌ای علیه پاتوژن‌های مختلف دارند و به‌عنوان جایگزین‌های طبیعی برای آنتی‌بیوتیک‌ها و مواد شیمیایی در کشاورزی و بهداشت، پتانسیل بالایی دارند. یافته‌های این مطالعه نشان می‌دهد که ژن‌های دیفنسین پس از سنتز، به خارج از سلول ترشح شده و با تعامل با غشاهای میکروبی، دفاع اولیه گیاه را تقویت می‌کنند. این ویژگی‌ها به‌ویژه در شرایط تنش‌های شدید مانند خشکی، شوری و حمله بیمارگرها فعال می‌شوند و به بهبود مقاومت گیاه کمک می‌کنند.

References

- Abedini, R., Shahbazi, M., Shobbar, Z.S., Rad, R.P. and Ebrahimi, A.** (2012). Expression analysis of dehydrins gene family in barley tolerant and sensitive cultivars and wild genotype under drought conditions. *Iranian Journal of Plant Biology*, **4**: 39 (In Persian).
- Apte, A. and Singh, S.** (2007). AlleleID: A Pathogen Detection and Identification System. In: Yuryev, A., Ed., *PCR Primer Design*. pp. 329-345. Humana Totowa, NJ.
- Babicki, S., Arndt, D., Marcu, A., Liang, Y., Grant, J.R., Maciejewski, A. and Wishart, D.S.** (2016). Heatmapper: web-enabled heat mapping for all. *Nucleic acids research*, **44**: W147-W153.
- Balandín, M., Royo, J., Gómez, E., Muniz, L.M., Molina, A. and Hueros, G.** (2005). A protective role for the embryo surrounding region of the maize endosperm, as evidenced by the characterisation of ZmESR-6, a defensin gene specifically expressed in this region. *Plant Molecular Biology*, **58**: 269-282.
- Bleackley, M.R., Payne, J.A., Hayes, B.M., Durek, T., Craik, D.J., Shafee, T.M., Poon, I.K., Hulett, M.D., Van Der Weerden, N.L. and Anderson, M.A.** (2016). *Nicotiana glauca* defensin chimeras reveal differences in the mechanism of fungal and tumor cell killing and an enhanced antifungal variant. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **60**: 6302-6312.
- Blom, N., Sicheritz-Pontén, T., Gupta, R., Gammeltoft, S. and Brunak, S.** (2004). Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *Proteomics*, **4**: 1633-49.
- Chen, J.J., Chen, G.H., Hsu, H.C., Li, S.S. and Chen, C.S.** (2004). Cloning and functional expression of a mungbean defensin VrD1 in *Pichia pastoris*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**: 2256-2261.
- Cordts, S., Bantin, J., Wittich, P.E., Kranz, E., Lörz, H. and Dresselhaus, T.** (2001). ZmES genes encode peptides with structural homology to defensins and are specifically expressed in the female gametophyte of maize. *The Plant Journal*, **25**: 103-114.
- Do, H.M., Lee, S.C., Jung, H.W., Sohn, K.H. and Hwang, B.K.** (2004). Differential expression and in situ localization of a pepper defensin (CADEF1) gene in response to pathogen infection, abiotic elicitors and environmental stresses in *Capsicum annuum*. *Plant Science*, **166**: 1297-1305.
- Dong, Y., Wang, Y., Tang, M., Chen, W., Chai, Y. and Wang, W.** (2023). Bioinformatic analysis of wheat defensin gene family and function verification of candidate genes. *Frontiers in Plant Science*, **14**: 1279502.
- Dowd, P.F. and Johnson, E.T.** (2018). Overexpression of a maize (*Zea mays*) defensin-like gene in maize callus enhances resistance to both insects and fungi. *Agri Gene*, **9**: 16-23.
- Doyle, J.** (1991) DNA Protocols for Plants. In: Hewitt, G.M., Johnston, A.W. Young, J.P.W., Eds., *Molecular Techniques in Taxonomy*. pp. 283-293, Springer Berlin, Heidelberg, DE.

- Finkina, E.I., Shramova, E.I., Tagaev, A.A. and Ovchinnikova, T.V.** (2008). A novel defensin from the lentil *Lens culinaris* seeds. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **371**: 860-865.
- Finn, R.D., Coggill, P., Eberhardt, R.Y., Eddy, S.R., Mistry, J., Mitchell, A.L., Potter, S.C., Punta, M., Qureshi, M. and Sangrador-Vegas, A.** (2016). The Pfam protein families database: towards a more sustainable future. *Nucleic Acids Research*, **44**: D279-D285.
- Fu, J., Zong, X., Jin, M., Min, J., Wang, F. and Wang, Y.** (2023). Mechanisms and regulation of defensins in host defense. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, **8**(1): 300.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S.E., Wilkins, M.R., Appel, R.D. and Bairoch, A.** (2005). Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In: Walker, J.M., Ed., *The Proteomics Protocols Handbook*. pp. 571-607. Springer, Humana Totowa, NJ.
- Graham, M.A., Silverstein, K.A. and VandenBosch, K.A.** (2008). Defensin-like genes: genomic perspectives on a diverse superfamily in plants. *Crop Science*, **48**: S-3-S-11.
- Guo, A.Y., Zhu, Q.H., Chen, X. and Luo, J.C.** (2007). GSDS: a gene structure display server. *Yi Chuan*, **29**: 1023-1026.
- Horton, P., Park, K.J., Obayashi, T., Fujita, N., Harada, H., Adams-Collier, C. and Nakai, K.** (2007). WoLF PSORT: protein localization predictor. *Nucleic Acids Research*, **35**: W585-W587.
- Ijaz, S., Haq, I.U., Malik, R., Nadeem, G., Ali, H.M. and Kaur, S.** (2023). In silico characterization of differentially expressed short-read nucleotide sequences identified in dieback stress-induced transcriptomic analysis reveals their role as antimicrobial peptides. *Frontiers in Plant Science*, **14**: 1168221.
- Jones, P., Binns, D., Chang, H.-Y., Fraser, M., Li, W., McAnulla, C., McWilliam, H., Maslen, J., Mitchell, A. and Nuka, G.** (2014). InterProScan 5: genome-scale protein function classification. *Bioinformatics*, **30**: 1236-1240.
- Käll, L., Krogh, A. and Sonnhammer, E.L.** (2007). Advantages of combined transmembrane topology and signal peptide prediction—the Phobius web server. *Nucleic Acids Research*, **35**: W429-W432.
- Kaur, A., Pati, P.K., Pati, A.M. and Nagpal, A.K.** (2020). Physico-chemical characterization and topological analysis of pathogenesis-related proteins from *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa* using in-silico approaches. *PLoS One*, **15**: e0239836.
- Kelley, L.A., Mezulis, S., Yates, C.M., Wass, M.N. and Sternberg, M.J.** (2015). The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature Protocols*, **10**: 845-858.
- Khakpour, A., Zolfaghari, M. and Sorkheh, K.** (2019). Bioinformatics study and investigation of the expression pattern of several important genes involved in glycyrrhizin synthesis of *Glycyrrhiza glabra* L. in autumn and spring seasons. *Plant Genetic Researches*, **6**(1): 55-68 (In Persian).
- Kumar, M., Yusuf, M.A., Yadav, P., Narayan, S. and Kumar, M.** (2019). Overexpression of chickpea defensin gene confers tolerance to water-deficit stress in *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in Plant Science*, **10**: 290.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. and Tamura, K.** (2018). MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, **35**: 1547.
- Kvansakul, M., Lay, F.T., Adda, C.G., Veneer, P.K., Baxter, A.A., Phan, T.K., Poon, I.K. and Hulett, M.D.** (2016). Binding of phosphatidic acid by NsD7 mediates the formation of helical defensin-lipid oligomeric assemblies and membrane permeabilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **113**(40): 11202-11207.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A. and Lopez, R.** (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, **23**: 2947-2948.
- Lay, F.T., Schirra, H.J., Scanlon, M.J., Anderson, M.A. and Craik, D.J.** (2003). The three-dimensional solution structure of NaD1, a new floral defensin from *Nicotiana glauca* and its application to a homology model of the crop defense protein alfAFP. *Journal of molecular biology*, **325**(1): 175-188.
- Lescot, M., Déhais, P., Thijs, G., Marchal, K., Moreau, Y., Van de Peer, Y., Rouzé, P. and Rombauts, S.** (2002). PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. *Nucleic Acids Research*, **30**: 325-327.
- Li, J., Hu, S., Jian, W., Xie, C. and Yang, X.** (2021). Plant antimicrobial peptides: structures, functions, and applications. *Botanical Studies*, **62**(1): 5.
- Lim, C.S., S.J, T.W., Kleffmann, T. and Brown, C.M.** (2018). The exon-intron gene structure upstream of the initiation codon predicts translation efficiency. *Nucleic Acids Research*, **46**: 4575-4591.
- Luo, J.S., Gu, T., Yang, Y. and Zhang, Z.** (2019). A non-secreted plant defensin AtPDF2.6 conferred cadmium tolerance via its chelation in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology*, **100**: 561-569.
- Marchler-Bauer, A., Derbyshire, M.K., Gonzales, N.R., Lu, S., Chitsaz, F., Geer, L.Y., Geer, R.C., He, J., Gwadz, M. and Hurwitz, D.I.** (2014). CDD: NCBI's conserved domain database. *Nucleic Acids Research*, **43**: D222-D226.

- Mayer, K., Waugh, R., Langridge, P., Close, T., Wise, R., Graner, A., Matsumoto, T., Sato, K., Schulman, A. and Muehlbauer, G. (2012). A physical, genetic and functional sequence assembly of the barley genome. *Nature*, **491**: 711-716.
- McGinnis, S. and Madden, T.L. (2004). BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools. *Nucleic Acids Research*, **32**: W20-W25.
- Melo, F.R., Rigden, D.J., Franco, O.L., Mello, L.V., Ary, M.B., Grossi de Sá, M.F. and Bloch Jr, C. (2002). Inhibition of trypsin by cowpea thionin: characterization, molecular modeling, and docking. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, **48**: 311-319.
- Mir Derikvand, R., Sohrabi, S.S., Sohrabi, S.M. and Samiei, K. (2022). Identification, isolation and expression analysis of hevein gene family in barley (*Hordeum vulgare*). *Plant Genetic Researches*, **8(2)**: 83-102 (In Persian).
- Nielsen, H. (2017). Predicting Secretory Proteins with SignalP. In: Kihara, D., Ed., *Protein Function Prediction: Methods and Protocols*, pp. 59-73. Humana New York, NY, USA.
- Panji, A., Ismaili, A. and Sohrabi, S.M. (2023). Genome-wide identification and expression profiling of snakin/GASA genes under drought stress in barley (*Hordeum vulgare* L.). *3 Biotech*, **13(5)**: 126.
- Pruitt, K.D., Tatusova, T. and Maglott, D.R. (2005). NCBI Reference Sequence (RefSeq): a curated non-redundant sequence database of genomes, transcripts and proteins. *Nucleic Acids Research*, **33**: D501-D504.
- Ramezani, S.S., Soltanloo, H. and Navabpour, S. (2024). Effect of *Blumeria graminis* (powdery mildew) on expression of some genes involved in resistance reaction in barley. *Plant Genetic Researches*, **10(2)**: 47-62 (In Persian).
- Sakai, H., Lee, S.S., Tanaka, T., Numa, H., Kim, J., Kawahara, Y., Wakimoto, H., Yang, C.C., Iwamoto, M. and Abe, T. (2013). Rice Annotation Project Database (RAP-DB): an integrative and interactive database for rice genomics. *Plant and Cell Physiology*, **54**: e6-e6.
- Sathoff, A.E., Velivelli, S., Shah, D.M. and Samac, D.A. (2019). Plant defensin peptides have antifungal and antibacterial activity against human and plant pathogens. *Phytopathology*, **109**: 402-408.
- Segura, A., Moreno, M., Molina, A. and García-Olmedo, F. (1998). Novel defensin subfamily from spinach (*Spinacia oleracea*). *FEBS Letters*, **435**: 159-162.
- Sels, J., Delauré, S.L., Aerts, A.M., Proost, P., Cammue, B. and De Bolle, M.F. (2007). Use of a PTGS-MAR expression system for efficient in planta production of bioactive *Arabidopsis thaliana* plant defensins. *Transgenic Research*, **16**: 531-538.
- Shahzad, Z., Ranwez, V., Fizames, C., Marquès, L., Le Martret, B., Alassimone, J., Godé, C., Lacombe, E., Castillo, T. and Saumitou-Laprade, P. (2013). Plant Defensin type 1 (PDF 1): protein promiscuity and expression variation within the *Arabidopsis* genus shed light on zinc tolerance acquisition in *Arabidopsis halleri*. *New Phytologist*, **200**: 820-833.
- Sharma, K.K., Pothana, A., Prasad, K., Shah, D., Kaur, J., Bhatnagar, D., Chen, Z.Y., Raruang, Y., Cary, J.W. and Rajasekaran, K. (2018). Peanuts that keep aflatoxin at bay: a threshold that matters. *Plant Biotechnology Journal*, **16**: 1024-1033.
- Sher Khan, R., Iqbal, A., Malak, R., Shehryar, K., Attia, S., Ahmed, T., Ali Khan, M., Arif, M. and Mii, M. (2019). Plant defensins: types, mechanism of action and prospects of genetic engineering for enhanced disease resistance in plants. *3 Biotech*, **9**: 192.
- Silverstein, K.A., Graham, M.A., Paape, T.D. and VandenBosch, K.A. (2005). Genome organization of more than 300 defensin-like genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **138**: 600-610.
- Souza Castro, M.D., Fontes, W., Morhy, L. and Bloch, J.C. (1996). Complete amino acid sequences of two g-thionins from maize (*Zea mays* L.) seeds. *Protein and Peptide Letters*, **3**: 267-274.
- Tian, F., Yang, D.C., Meng, Y.Q., Jin, J. and Gao, G. (2020). PlantRegMap: charting functional regulatory maps in plants. *Nucleic Acids Research*, **48**: D1104-D1113.
- Vi, T.X.T., Nguyen, T.N.L., Pham, T.T.N., Nguyen, H.Q., Nguyen, T.H.Y., Tu, Q.T., Le, V.S. and Chu, H.M. (2019). Overexpression of the ZmDEF1 gene increases the resistance to weevil larvae in transgenic maize seeds. *Molecular Biology Reports*, **46**: 2177-2185.
- Vijayan, S., Singh, N.K., Shukla, P. and Kirti, P.B. (2013). Defensin (TvD1) from *Tephrosia villosa* exhibited strong anti-insect and anti-fungal activities in transgenic tobacco plants. *Journal of Pest Science*, **86**: 337-344.
- Waghu, F.H., Gopi, L., Barai, R.S., Ramteke, P., Nizami, B. and Idicula-Thomas, S. (2014). CAMP: Collection of sequences and structures of antimicrobial peptides. *Nucleic Acids Research*, **42**: D1154-D1158.
- Wiegmann, M., Maurer, A., Pham, A., March, T.J., Al-Abdallat, A., Thomas, W.T.B., Bull, H.J., Shahid, M., Eglinton, J., Baum, M., Flavell, A.J., Tester, M. and Pillen, K. (2019). Barley yield formation under abiotic stress depends on the interplay between flowering time genes and environmental cues. *Scientific Reports*, **9(1)**: 6397.
- Yang, F., Miao, Y., Liu, Y., Botella, J.R., Li, W., Li, K. and Song, C.P. (2022). Function of protein kinases in leaf senescence of plants. *Frontiers in Plant Science*, **13**: 864215.
- Yu, C.S., Cheng, C.W., Su, W.C., Chang, K.C., Huang, S.W., Hwang, J.K. and Lu, C.H. (2014). CELLO2GO: a web server for protein subCELLular LOCALization prediction with functional gene ontology annotation. *PLoS One*, **9**: e99368.