

Identification, Isolation and Characterization of Some Members of the Snakin/GASA Genes Family in *Echinacea purpureae*

Mahtab Zeynivand¹ , Ahmad Ismaili^{2*} , Seyed Sajad Sohrabi³  and Nezam Armand⁴ 

1. Former M.Sc. Student, Department of Production Engineering and Plant Genetics, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Iran
- 2- Professor, Department of Production Engineering and Plant Genetics, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Iran
- 3- Assistant Professor, Department of Production Engineering and Plant Genetics, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Iran
4. Associate Professor, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Khatam Al-Anbia University of Technology Behbahan, Iran

*Corresponding author ✉: ismaili.a@lu.ac.ir

Citation: Zeynivand, M., Ismaili, A., Sohrabi, S.S. and Armand, N. (2025). Identification, isolation and characterization of some members of the Snakin/GASA genes family in *Echinacea purpureae*. *Plant Genetic Researches*, **11(2)**: 99-118. <http://dx.doi.org/10.22034/PGR.11.2.7>

(Received: July 31, 2024; Final Revised: October 04, 2024; Accepted: Revised: October 11, 2024; Published online: March 17, 2025)

Extended abstract

Introduction

The Snakin/GASA protein family in plants plays a crucial role in regulating plant growth, defense, and bacteriostasis. These proteins are involved in various signaling pathways that help plants respond to pathogens. Additionally, they have been found to interact with other proteins to modulate gene expression and promote plant development. These peptides play a crucial role in protecting plants from pathogens by disrupting their cell membranes or interfering with their cellular processes. The Snakin/GASA proteins also have the ability to induce systemic resistance in plants, enhancing their overall defense mechanisms against various threats. Furthermore, it has been established that these peptides play a role in the development of plant adaptations to a wide range of abiotic stresses. Overall, the multifunctional nature of Snakin/GASA proteins highlights their importance in plant defense and adaptation mechanisms. Their diverse roles make them valuable targets for further research in improving crop resilience and productivity in challenging environments. Therefore, in this study Snakin/GASA family members were identified and analyzed in *Echinacea purpurea*.

Materials and methods

To identify the members of the Snakin/GASA gene family in the transcriptome of *E. purpurea*, RNA sequencing data from different tissues and growth periods of *E. purpurea* were obtained from the NCBI database and after processing the data, transcriptome assembly was performed. The obtained transcripts were documented using the BLASTx tool against non-repetitive protein (NR) data. After mapping the clean reads with the reference assembly, the expression level of the transcripts was calculated in terms of FPKM (Fragments Per Kilobase of transcript per Million mapped reads: FPKM). In the next step, protein sequences related to the Snakin/GASA antimicrobial peptide family of different plants were obtained from the NCBI database, and a consensus sequence was created using multiple alignments. Then, the consensus protein sequence obtained from the multiple alignment, which was conserved in all Snakin, was compared against the *Echinacea* transcriptome assembly using the tBLASTn tool with an e-value threshold of less than 0.001. After bioinformatic confirmation of the identified sequences, RNA extraction, cDNA library preparation, amplification, and sequencing of target genes were performed to confirm



©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.

the sequences of the identified genes and downstream analysis. Also, gene and protein structure analysis, physicochemical properties, and evolutionary and phylogenetic relationships were performed for the target sequences. Finally, the *in silico* relative expression of the identified Snakin/GASA genes in different Echinacea tissues was evaluated.

Results and discussion

In the current study, a comprehensive *de novo* transcriptome assembly of *E. purpurea* was achieved using RNA-seq data, yielding over 698 million raw reads from different tissues. After quality control and trimming, approximately 533 million clean reads remained, indicating that about 24% of the raw reads were discarded, highlighting the importance of data preprocessing in transcriptomic studies. The assembly generated 27,679 unique transcripts, with an N50 value of 1373 and the longest transcript being 8823 nucleotides. These metrics indicate high assembly quality. BLASTx annotation against the non-redundant protein database revealed that 81.16% of the unigenes (22,466) had significant similarity to known sequences, and 7,740 were functionally annotated with Gene Ontology (GO) terms. The study identified six members of the Snakin/GASA gene family in *E. purpurea* through tBLASTn and domain confirmation using InterProScan, Pfam, and CDD databases. These genes, designated as Epu-Snakin1 to Epu-Snakin6, ranged in sequence length from 530 to 700 nucleotides and showed GC content between 36% and 41%. Amplification using specific primers confirmed the presence of full open reading frames (ORFs), further supported by sequencing analyses. The physicochemical profiling revealed molecular weights between 9.59 and 11.86 kDa, mostly under 12 kDa, consistent with findings in other species such as olive and lettuce. The isoelectric points ranged from 8.61 to 9.28, and instability indices suggested that most proteins are potentially unstable *in vitro* except Epu-Snakin6. These proteins exhibited diverse aliphatic indices and GRAVY scores, indicating a range of solubility and structural properties. Signal peptide analysis identified N-terminal signal sequences of 20–36 amino acids in all six proteins, suggesting their potential for extracellular localization or secretion. Transmembrane helix predictions indicated that all except Epu-Snakin5 contained at least one transmembrane domain, implicating roles in signal transduction or membrane-associated processes. Functional prediction using the CAMP database indicated strong antimicrobial properties for all six proteins, with high confidence from SVM, RF, and ANN algorithms. These results support the potential utility of *E. purpurea* Snakin/GASA peptides in developing antimicrobial agents. Conserved motif analysis using MEME revealed three motifs across the family members, with only Epu-Snakin2 and Epu-Snakin6 containing all three. Disulfide bond analysis revealed 5–6 intra-molecular disulfide bridges, consistent with the structural stability and biological activity roles attributed to Snakin/GASA proteins. Phylogenetic reconstruction using Arabidopsis, sunflower, and *E. purpurea* Snakin/GASA proteins placed the six genes into three main clades, reflecting both evolutionary and likely functional relationships. Notably, Epu-Snakin2 and Epu-Snakin6 clustered with sunflower homologs, reinforcing the phylogenetic proximity observed in transcriptome-wide analysis. Expression profiling revealed tissue-specific expression patterns. Genes in Group III (Epu-Snakin1, 3, 4) showed broad expression across ten tissue types, suggesting fundamental roles in growth and development. In contrast, Group I (Epu-Snakin2, 6) was flower-specific, and Epu-Snakin5 expressed solely in vegetative tissues.

Conclusion

This study presents the first in-depth identification and characterization of six Snakin/GASA genes *E. purpurea*. The structure and physicochemical properties of these genes, as well as how they are expressed in different tissues, show that they have a wide range of possible biological functions. The presence of key features such as GASA domains, signal peptides, transmembrane helices, and multiple disulfide bonds, along with strong predictions of antimicrobial activity, shows that these proteins could have many different functions. Expression profiling analysis suggested both general and tissue-specific roles, particularly with Group III genes being expressed across most tissues, indicating involvement in core physiological processes, while other genes showed restricted expression patterns, hinting at specialized functions. Phylogenetic analysis also placed these genes into distinct evolutionary clades, highlighting their divergence and potential for functional novelty. Overall, the findings suggest that Snakin/GASA proteins in *E. purpurea* may play important roles in plant development, defense mechanisms, and stress response. Given their predicted antimicrobial activity, these proteins are promising candidates for pharmaceutical exploration and bioengineering applications in medicinal plants. More studies are suggested to test how well these proteins fight germs in lab tests, check how they work in different systems, and see how stable and effective they are in making plant-based medicines.

Keywords: *Echinacea purpureae*, Biotic and abiotic stresses, Antimicrobial peptides



شناسایی، جداسازی و تعیین خصوصیات برخی از اعضای خانواده ژنی Snakin/GASA در سرخارگل (*Echinacea purpurea*)

مهتاب زینی‌وند^۱، احمد اسماعیلی^{۲*}، سید سجاد سهرابی^۱ و نظام آرمنند^۳

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد

۲- استاد، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد

۳- استادیار، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد

۴- دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه صنعتی خاتم‌الانبیاء بهبهان، بهبهان

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۵/۱۰؛ تاریخ آخرین ویرایش: ۱۴۰۳/۰۷/۱۳؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۷/۲۰؛ تاریخ انتشار برخط: ۱۴۰۳/۱۲/۲۷)

چکیده

خانواده ژنی پپتیدهای ضد میکروبی Snakin/GASA به دلیل نقش‌های کلیدی خود در فرآیندهای فیزیولوژیکی گیاهان از جمله تنظیم رشد، پاسخ به تنش‌ها و دفاع ضد میکروبی، به عنوان یکی از مهم‌ترین گروه از خانواده پپتیدهای ضد میکروبی شناخته شده‌اند. این پپتیدها در مسیرهای پیام‌رسانی متنوعی مشارکت دارند و در تنظیم بیان ژن‌ها و القای مقاومت به تنش‌های زیستی نقش مهمی ایفا می‌کنند. در این مطالعه، شش عضو از خانواده Snakin/GASA برای نخستین بار در گیاه دارویی *Echinacea purpurea* شناسایی و مورد بررسی مولکولی قرار گرفتند. سرهم‌بندی نوپدید ترنسکرپتوم بر پایه داده‌های RNA-seq از بافت‌های مختلف سرخارگل، منجر به شناسایی ۲۷۶۷۹ رونوشت شد. در میان آن‌ها، شش ژن با نام‌های Epu-Snakin1 تا Epu-Snakin6 از طریق تجزیه و تحلیل‌های بیوانفورماتیکی و تأیید PCR شناسایی شدند. پروتئین‌های حاصل، دارای وزن مولکولی کمتر از ۱۲ کیلو دالتون و نقاط ایزوالکتریک بین ۸/۶۱ تا ۹/۲۸ بودند. در تمامی توالی‌ها پپتید سیگنال در ناحیه آمینی مشاهده شد و در پنج مورد نیز وجود حداقل یک مارپیچ گذرنده از غشا پیش‌بینی شد. پیش‌بینی‌های عملکردی بر پایه الگوریتم‌های یادگیری ماشین، خاصیت ضد میکروبی قوی را برای تمامی پپتیدهای شناسایی شده تأیید کرد. تحلیل موتیف‌های حفاظت‌شده و پیوندهای دی‌سولفیدی درون مولکولی، ثبات ساختاری این پروتئین‌ها را نشان داد. علاوه بر این تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی، این ژن‌ها را در سه گروه اصلی طبقه‌بندی کرد که قرابت نزدیکی با ژن‌های همولوگ در آفتابگردان داشتند. الگوی بیانی (این سیلیکو) ژن‌های شناسایی شده نیز نشان داد که برخی به صورت گسترده در بافت‌های مختلف بیان می‌شوند، در حالی که برخی دیگر دارای الگوی بیانی اختصاصی در بافت‌های گل یا رویشی هستند. نتایج این پژوهش دیدگاه تازه‌ای از ساختار و عملکرد ژن‌های Snakin/GASA در سرخارگل ارائه می‌دهد و کاربردهای بالقوه آن‌ها را در توسعه داروهای گیاهی و زیست‌فناوری کشاورزی پیشنهاد می‌کند.

واژگان کلیدی: سرخارگل، تنش زیستی و غیرزیستی، پپتیدهای ضد میکروبی

مقدمه

گیاهان به‌عنوان موجوداتی بی‌تحرك در تمامی دوره زندگی خود با طیف گسترده‌ای از تنش‌های زیستی (مانند باکتری‌ها، قارچ‌ها، ویروس‌ها، تک‌یاخته‌ها، حشرات) و غیرزیستی (مانند شوری، خشکسالی، گرما، سرما، فلزات سنگین، ازن، اشعه ماوراء بنفش و کمبود مواد مغذی) مواجه هستند که به‌صورت معنی‌داری بر رشد و بهره‌وری آن‌ها تأثیر می‌گذارد. با توجه پدیده گرمایش جهانی و تغییرات اقلیمی آن، ارائه راهکارهای مناسب برای مواجه با تنش‌های زیستی و غیرزیستی با هدف تأمین امنیت غذایی جهانی از اهمیت بالایی برخوردار است (Campos et al., 2018; Mareri et al., 2022). درک دقیق به‌هژادگران از مکانیسم‌های زیستی و عوامل مؤثر در تحمل به تنش‌های زیستی و غیرزیستی، احتمال موفقیت برنامه‌های به‌هژادی برای تولید ارقام متحمل به تنش‌ها را تقویت می‌نماید. در طی تکامل، گیاهان برای مقابله با انواع مختلف تنش‌های زیستی و غیرزیستی، مکانیسم‌های دفاعی مولکولی پیچیده‌ای که اغلب همراه با تنظیم مجدد بیان ژن‌هاست، ایجاد کرده‌اند. پپتیدهای ضد میکروبی یکی از مهم‌ترین عناصر دفاعی گیاهان در مقابله با این شرایط آسیب‌رسان به‌شمار می‌روند (Mareri et al., 2022).

در گیاهان، پپتیدهای دفاعی میزبان (Host Defense Peptides: HDPs)، که به‌عنوان پپتیدهای ضد میکروبی (Anti-microbial Peptides: AMPs) نیز شناخته می‌شوند، یکی از رایج‌ترین موانع زیستی علیه انواع مختلفی از بیمارگرهای گیاهی به‌شمار می‌روند (Campos et al., 2018). HDPهای گیاهی سلاح‌های دفاعی باستانی هستند که اجزای اساسی سیستم ایمنی ذاتی گیاه را تشکیل می‌دهند (Matsuzaki, 2019). AMPها به‌عنوان پپتیدهای کوچک، پایدار حرارتی و دارای بار مثبت شناخته می‌شوند که عموماً شامل پپتیدهایی با کمتر از ۱۰۰ اسید آمینه با بار خالص کلی ۲+ تا ۹+ هستند (Samriti et al., 2018). این پپتیدهای کوچک همچنین دارای نسبت قابل توجهی از اسیدهای آمینه آبگریز (بیش از ۳۰ درصد) در یک ساختار خطی یا حلقوی می‌باشند (Schmidt and Wong, 2013). نتایج برخی از مطالعات مشخص نمود که پپتیدهای ضد میکروبی در موجودات

مختلف، دارای طیف گسترده‌ای از فعالیت‌های ضد قارچی، ضد باکتریایی، ضد ویروسی هستند (Koehbach and Craik, 2019; Zhang et al., 2019). در حالی که اکثر پپتیدهای ضد میکروبی در سیستم دفاعی میزبان با رویکردی مستقیم عمل می‌کنند، برخی از این عناصر به‌عنوان تعدیل‌کننده‌هایی عمل می‌کنند که به‌طور غیرمستقیم پاسخ ایمنی میزبان را تنظیم می‌کنند (Luong et al., 2020). پپتیدهای ضد میکروبی می‌توانند ارگانسیم‌های بیماری‌زا را در غلظت‌های میکرومولاری، معمولاً با مکانیسم‌های غیر اختصاصی، مهار کرده یا از بین ببرند (Ageitos et al., 2017). دفاع غیر اختصاصی به‌طور بالقوه به AMPها کمک می‌کند تا از ایجاد مقاومت در ارگانسیم‌های هدف اجتناب کنند و AMPها را جایگزین امیدوارکننده‌ای برای آنتی‌بیوتیک‌های معمولی می‌کند (Lazzaro et al., 2020).

پپتیدهای ضد میکروبی تنوع گسترده‌ای در اندازه، توالی، ساختار و مکانیسم عمل نشان می‌دهند که بر اساس تشابه توالی و ساختار، و همچنین تعداد و آرایش اسیدهای آمینه سیستمین در توالی اولیه، AMPهای گیاهی را می‌توان به هشت خانواده اصلی، از جمله دیفنسین‌ها، تیونین‌ها، پروتئین‌های غیر اختصاصی انتقال‌لیپید (LTPs) پپتیدهای مانند هونین، اسنیکین-ها، نوتین‌ها، α -هیروپینین‌ها و سیکلوتیدها طبقه‌بندی نمود (Nawrot et al., 2014). در میان گروه‌های متعدد پپتیدهای ضد میکروبی گیاهی، خانواده ژنی Snakin/GASA به‌عنوان اصلی‌ترین پپتید غنی از سیستمین توجه ویژه‌ای را به خود جلب نموده است (Filiz and Kurt, 2020; Rodríguez-Decuadro et al., 2021; Rodríguez-Decuadro et al., 2024; Uncu et al., 2024). اعضای خانواده ژنی Snakin/GASA در انتهای آمینی خود دارای توالی راهنما به طول ۱۵ تا ۲۰ اسید آمینه و در انتهای کربوکسیلی خود دارای یک ناحیه‌ی متغیر از لحاظ طول و ترکیب اسید آمینه به طول تقریبی ۶۰ اسید آمینه هستند. تشکیل ۶ پیوند دی‌سولفیدی در پروتئین یکی از ویژگی‌های مشترک اعضای خانواده ژنی Snakin/GASA می‌باشد. پیوند دی‌سولفیدی نه تنها در ساختار ثانویه پپتید نقش دارد در فعالیت زیستی این پروتئین نیز نقش مهمی ایفا می‌کند (Harris et al., 2014; Mansour et al., 2014; Nahiriak et al., 2012; Porto and Franco, 2013). تا کنون اعضای خانواده ژنی

می‌توان به آکامیدها (Alkamides)، ترکیبات فنولی (از جمله اکیناکوسید (Echinacoside)، اسید سیکوریک (Chicoric acid) یا اسید کاسنی و دیگر مشتقات مانند اسید کافئیک (Caffeic acid) اشاره نمود. همچنین بررسی‌ها نشان می‌دهد که استفاده از عصاره حاصل از ریشه‌ها و قسمت‌های هوایی گیاه یا مخلوطی از هر دو می‌تواند در ایجاد بهبود پاسخ‌های ایمونولوژیک حیوانات مؤثر باشد (Coelho et al., 2020). تفاوت اقلیم‌های مختلف برای کشت اکیناسه و خصوصیات ژنتیکی اختصاصی در واریته‌های این گیاه، از جمله دلایل تفاوت در ترکیبات شیمیایی و فعالیت بیولوژیکی انواع اکیناسه محسوب می‌شوند (Dobrange et al., 2019). با توجه به خصوصیات ضد میکروبی و همچنین سایر خصوصیات کاربردی گیاه سرخارگل، پژوهش حاضر با هدف شناسایی، جداسازی و تعیین خصوصیات برخی از اعضای خانواده ژنی Snakin/GASA در گیاه سرخارگل با استفاده از روش‌های مختلف پیش‌بینی بیوانفورماتیکی و روش‌های آزمایشگاهی، طراحی و اجرا شد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری داده‌های بیانی و سرهم‌بندی ترنسکرپتوم سرخارگل: ابتدا داده‌های حاصل از توالی‌یابی RNA بافت‌ها و دوره‌های رشدی مختلف سرخارگل (جدول ۱)، از پایگاه داده NCBI به آدرس <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra> دریافت شدند. پس از تعیین کیفیت داده‌ها توسط نرم‌افزار FastQC و در نظر گرفتن حد آستانه میانگین نمره کیفیت (Phred quality score) ۳۰ برای خوانش‌ها، داده‌های کم کیفیت در فرآیند تریم توسط نرم‌افزار Trimmomatic (نسخه ۰/۲۷) حذف و در نهایت پس از ادغام کتابخانه‌های مختلف توسط نرم‌افزار CLC genomics workbench (نسخه ۲۰) سرهم‌بندی ترنسکرپتوم انجام شد. مستندسازی رونوشت‌های به‌دست آمده توسط ابزار BLASTx علیه داده‌های پروتئین‌های غیر تکراری (NR) انجام شد. پس از نقشه‌یابی خوانش‌ها با اسمبلی ایجاد شده، میزان بیان رونوشت‌ها بر حسب FPKM (Fragments Per Kilobase of transcript per Million mapped reads) محاسبه شد.

Snakin/GASA در اندام‌های مختلف گیاهی و در طیف وسیعی از گونه‌های گیاهی تک‌لپه و دولپه شناسایی شده‌اند (Filiz and Kurt, 2020; Oliveira-Lima et al., 2017b; Rodríguez-Decuadro et al., 2021; Rodríguez-Decuadro et al., 2024; Uncu et al., 2024). این گروه از پپتیدهای ضد میکروبی نقش‌های متفاوتی در پاسخ به انواع تنش‌های زیستی و غیرزیستی ایفا می‌کنند. از نقش‌های تکاملی این ژن‌ها در گیاهان می‌توان به ایجاد ریشه‌های جانبی، توسعه برگ، القای گلدهی، تنظیم سائز سلول‌ها، توسعه بذر و جوانه‌زنی آن در گیاهان تک‌لپه و دولپه اشاره کرد (Oliveira-Lima et al., 2017a). چنین ویژگی‌هایی باعث شده است که پپتیدهای خانواده Snakin/GASA به‌عنوان منبع زیستی مهمی در ساخت داروهای ضد میکروبی شناخته شود. همچنین با بهره‌گیری از اطلاعات ژنتیکی این خانواده ژنی می‌توان در برنامه‌های به‌نژادی گیاهی با هدف تولید ارقام متحمل به انواع مختلف تنش‌های زیستی و غیرزیستی استفاده کرد. با توجه به اهمیت این خانواده از پپتیدهای ضد میکروبی، شناسایی منابع گیاهی جدید این پپتید دارای اهمیت است.

سرخارگل با نام علمی *Echinaceae purpurea* یکی از گیاهان تیره (Asteraceae) است. این گیاه بومی آمریکای شمالی بوده ولی امروزه در اکثر نقاط اروپا و آسیا و همچنین ایران کشت می‌شود (Agha Alikhani et al., 2013; Hajimehdipoor et al., 2009; Vural and Dağeri, 2009). در گذشته این گیاه برای درمان مارگزیدگی، بیماری‌های لثه و دهان، سرماخوردگی و گلو درد استفاده می‌شد (Agha Alikhani et al., 2013). این گیاه در طب سنتی به‌عنوان آرام‌بخش و ضدالتهاب در درمان متعددی از بیماری‌ها از جمله بیماری‌های روماتیسمی، دردهای عضلانی، سردرد، مشکلات پوستی و کاهش فشار خون کاربرد داشته و امروزه نیز به‌دلیل خواص ضد ویروسی، ضدقارچی و ضدباکتریایی شهرت جهانی یافته و ترکیبات حاصل از آن در گروه مواد تقویت‌کننده سیستم ایمنی به‌شمار می‌روند (Agha Alikhani et al., 2013; Hajimehdipoor et al., 2009; Vural and Dağeri, 2009). مرور منابع نشان می‌دهد که سرخارگل دارای ترکیبات شیمیایی مهمی است که از مهم‌ترین آن‌ها

جدول ۱- خلاصه آماری از آزمایش‌های RNA-seq استفاده شده در این مطالعه

Table 1. Statistical summary of RNA-seq experiments tests used in this study

ردیف Row	شماره دسترسی Run Run Accession	شماره دسترسی آزمایش Experiment Accession	بافت Tissue	تعداد خوانش خام Raw read counts	تعداد خوانش تمیز شده Clean read counts	خوانش‌های از دست رفته Loss reads	درصد خوانش‌های از دست رفته % Loss Reads
1	SRR315727	SRX084374	برگ نابالغ Immature leaf	14,930,941	11,944,753	2,986,188	20
2	SRR315728	SRX084882	ساقه Stem	31,892,917	22,325,042	9,567,875	30
3	SRR315729	SRX084883	ریشه‌های جانبی Lateral roots	30,814,438	23,110,829	7,703,610	25
4	SRR315730	SRX084884	ساقه-اپیکال اولیه Primary stem-apical	33,008,735	25,746,813	7,261,922	22
5	SRR315732	SRX084885	برگ نابالغ Immature leaf	33,414,114	28,401,997	5,012,117	15
6	SRR315733	SRX084886	گل بالغ Mature flower	29,995,398	21,596,687	8,398,711	28
7	SRR315734	SRX084887	گل جوان Young flower	31,171,210	21,508,135	9,663,075	31
8	SRR315735	SRX084888	گل نابالغ Immature flower	29,638,726	20,747,108	8,891,618	30
9	SRR315736	SRX084889	گل نابالغ Immature flower	25,783,201	21,657,889	4,125,312	16
10	SRR315737	SRX084890	گل نابالغ Immature flower	27,048,630	22,179,877	4,868,753	18
11	SRR315927	SRX084946	ریشه مویی Hairy root	30,223,222	25,689,739	4,533,483	15
12	SRR315928	SRX084947	گل Flower	33,898,591	22,373,070	11,525,521	34
13	SRR315929	SRX084948	گل Flower	32,568,652	26,706,295	5,862,357	18
14	SRR315930	SRX084949	گل Flower	33,418,715	19,717,042	13,701,673	41
15	SRR315931	SRX084950	گل Flower	31,826,551	23,869,913	7,956,638	25
16	SRR315932	SRX084951	گل نابالغ Immature flower	29,849,994	23,879,995	5,969,999	20
17	SRR316175	SRX085000	ریشه Root	23,464,335	17,598,251	5,866,084	25
18	SRR316176	SRX085001	گل Flower	34,592,971	28,712,166	5,880,805	17
19	SRR316177	SRX085002	ساقه Stem	34,237,705	27,732,541	6,505,164	19
20	SRR316178	SRX085003	ساقه Stem	34,912,734	28,977,569	5,935,165	17
21	SRR316207	SRX085115	گل بالغ، ساقه اولیه، ساقه اولیه میانی، برگ Mature flower, primary stem, intermediate primary stem, leaf	31,147,183	22,737,444	8,409,739	27
22	SRR316208	SRX085116	گل بالغ، ساقه اولیه، ساقه اولیه میانی، برگ Mature flower, primary stem, intermediate primary stem, leaf	30,947,051	23,829,229	7,117,822	23
23	SRR316209	SRX085117	ریشه Root	30,195,171	22,193,451	8,001,720	27
مجموع (Sum)				698,981,185	533,235,833	165,745,352	

در گیاه سرخارگل ابتدا توالی پروتئینی مربوط به ژن‌های خانواده
پپتیدهای ضد میکروبی Snakin/GASA گیاهان مختلف (تک‌په

شناسایی توالی ژن‌های Snakin/GASA در ترنسکریپتوم
گیاه سرخارگل: برای شناسایی توالی ژن‌های Snakin/GASA

سه جنبه‌ی عملکرد مولکولی، فرایندهای زیستی و اجزا سلولی مورد بررسی قرار گرفتند.

پیش‌بینی خاصیت ضد میکروبی، وجود پپتید راهنما و ماریپچ‌های گذرنده از غشا: جهت مشخص کردن خاصیت ضد میکروبی توالی‌های پروتئینی Snakin/GASA از پایگاه بر خط CAMP (Collection of Antimicrobial Peptide) استفاده شد. توالی‌های پروتئینی به کمک الگوریتم‌های ماشین بردار پشتیبان (Support Vector Machine: SVM)، شبکه عصبی مصنوعی (Artificial Neural Network: ANN) و جنگل تصادفی (Random Forest: RF) مورد بررسی قرار گرفته و خاصیت میکروبی بالقوه آن‌ها پیش‌بینی شد (Waghu *et al.*, 2014). علاوه بر این جهت تعیین پپتید راهنما و تعیین ماریپچ‌های گذرنده از غشا از سرورهای SignalP و پایگاه بر خط TMHMM (Krogh *et al.*, 2001) استفاده شد.

تعیین موتیف‌های حفاظت شده و پیوندهای دی‌سولفیدی: موتیف‌های حفاظت شده پروتئین‌های Snakin/GASA با استفاده از پایگاه اطلاعاتی MEME (نسخه ۵/۳/۰)، تعیین و مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت (Bailey *et al.*, 2009). پیوندهای دی‌سولفیدی موجود در پروتئین‌ها نیز با استفاده از سرور DiANNA (نسخه ۱/۱) پیش‌بینی شد (Ferrè and Clote, 2005).

تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی ژن‌های Snakin/GASA شناسایی شده: تعیین روابط فیلوژنتیکی بین ژن‌های Snakin/GASA شناسایی شده در سرخارگل و دو گیاه مدل شامل آراییدوپسیس و آفتابگردان از هم‌ترازی توالی چندگانه با استفاده از ابزار Clustal Omega استفاده شد (Sievers *et al.*, 2011). درخت فیلوژنتیکی با استفاده از نرم‌افزار MEGA X، با روش Maximum-likelihood ایجاد و اعتبار آن به روش بوت‌استرپ (bootstrap) با ۱۰۰۰ تکرار مورد ارزیابی قرار گرفت (Kumar *et al.*, 2018).

بررسی الگوی بیان ژن‌های Snakin/GASA در بافت‌های سرخارگل: به منظور تعیین الگوی بیان ژن‌های Snakin/GASA در بافت‌های مختلف سرخارگل، از داده‌های RNA-Seq مندرج در جدول ۱ استفاده شد. در

و دولپه) از پایگاه داده NCBI دریافت و با استفاده از هم‌ردیفی چندگانه در نرم‌افزار Vector NTI (نسخه ۱۱) توالی مورد توافق ایجاد شد. سپس توالی پروتئینی مورد توافق حاصل از هم‌ردیفی چندگانه که در تمامی اسنکین‌ها محافظت شده بود، با استفاده از ابزار tBLASTn با حد آستانه ارزش مورد انتظار کمتر از ۰/۰۰۱ در برابر ترنسکریپتوم سرخارگل مورد هم‌ردیفی قرار گرفت. نتایج tBLASTn با یکدیگر ادغام و با استفاده از نرم‌افزار CLC Genomics Workbench (نسخه ۲۲) سرهم‌بندی مجدد صورت گرفت. توالی‌های دارای چارچوب خوانش باز (Open Reading Frame: ORF) کامل ژن Snakin/GASA، با استفاده از ابزار BLASTn در برابر پایگاه داده نوکلئوتیدی (nt) مورد جستجو قرار گرفته و صحت جداسازی آن‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت.

تعیین دمین‌های عملکردی: پس از ترجمه چارچوب‌های خوانش باز موجود در توالی‌ها به پروتئین با استفاده از نرم‌افزار Vector NTI (نسخه ۱۰/۳)، توالی‌های پروتئینی حاصل با به‌کارگیری پایگاه داده Pfam، Interproscan و CDD برای وجود یا عدم وجود دمین‌های عملکردی محافظت شده مورد بررسی قرار گرفتند. تنها دمین‌های عملکردی محافظت شده‌ای که توسط هر سه نرم‌افزار مذکور تأیید شده بودند، به‌عنوان دمین‌های اصلی پروتئین‌های Snakin/GASA انتخاب شدند.

تعیین خصوصیات فیزیکی شیمیایی پپتیدهای خانواده Snakin/GASA: خصوصیات فیزیکی شیمیایی پروتئین‌های Snakin/GASA شامل طول، وزن مولکولی، بار خالص، pH ایزوالکتریک، شاخص آلفایتیک، شاخص پایداری، میانگین کل هیدروپاتی (GRAVY)، فراوانی اسیدهای آمینه با استفاده از نرم‌افزار ProtParam محاسبه شد (Gasteiger *et al.*, 2005).

تعیین هستی‌شناسی و پیش‌بینی مکان تجمع در سلول ژن‌های شناسایی شده: از نرم‌افزار OmicsBox برای تجزیه و تحلیل هستی‌شناسی ژن (Gene ontology: GO) استفاده شد. این تجزیه و تحلیل جهت پیش‌بینی عملکرد، نقش و خصوصیات ژن‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. بر اساس تجزیه و تحلیل هستی‌شناسی، ژن‌های Snakin/GASA از

با استفاده از کیت سنتز cDNA شرکت سیناکلون و با توجه به شیوه‌نامه شرکت مربوطه سنتز cDNA صورت گرفت.

طراحی آغازگر و تکثیر توالی با استفاده از واکنش PCR:

به منظور طراحی آغازگر از نرم‌افزار AlleleID (نسخه ۶) و توالی‌های دارای چارچوب خوانش‌باز کامل ژن‌های Snakin/GASA به‌عنوان الگو استفاده شد. واکنش PCR برای تکثیر قطعات ژنی با استفاده از مسترمیکس (PCR (2x) شرکت سیناکلون (SinaClon BioScience, Iran) و cDNA سنتز شده به‌عنوان الگو با استفاده از دستگاه ترموسایکلر انجام شد. ترکیب و مقادیر مورد نیاز جهت انجام واکنش در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس، ۱ میکرولیتر آغازگر رفت و برگشت، ۸ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز و ۲/۵ میکرولیتر cDNA بود. برنامه حرارتی جهت تکثیر ژن‌ها شامل واسرشته‌سازی اولیه به مدت ۱۰ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد و ۳۵ سیکل شامل: واسرشته‌سازی درون چرخه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگر در دمای اتصال مربوط به هر جفت آغازگر (جدول ۲) به مدت ۳۰ ثانیه و گسترش آغازگر درون سیکل‌ها در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و در نهایت گسترش نهایی ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. در نهایت پس از انجام واکنش، محصولات PCR روی ژل آگارز یک درصد بارگذاری و تأیید اندازه شدند. پس از تأیید اندازه، محصولات PCR به صورت دو طرفه توالی‌یابی شدند.

نهایت پس از کمی‌سازی بیان ژن‌های مورد نظر از نقشه حرارتی به همراه تجزیه خوشه‌ای برای مشخص نمودن الگوی بیان ژن استفاده شد.

تهیه نمونه گیاهی، کشت و نمونه‌برداری: پس از تهیه نشاء گیاه سرخارگل از شرکت زرین گیاه (آذربایجان غربی، ارومیه) مواد گیاهی تهیه شده در گلدان‌های پلاستیکی حاوی خاک و ترکیب کودهای شیمیایی و حیوانی مناسب کشت و تا زمان گلدهی در گلخانه تحقیقاتی گیاهان دارویی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه با شرایط نوری کامل با سایه جزئی با شرایط دمایی ۱۸-۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از گلدهی نمونه‌برداری از کل گیاه صورت گرفت و نمونه‌ها بلافاصله در ازت مایع منجمد شده و در نهایت به یخچال با دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد منتقل و تا زمان استخراج RNA در آزمایشگاه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی دانشگاه لرستان نگهداری شدند.

استخراج RNA و کیفیت سنجی نمونه‌های استخراج شده و سنتز cDNA: استخراج RNA از بافت‌های گیاه سرخارگل، با استفاده از کیت استخراج RNA شرکت سیناکلون و بر اساس شیوه‌نامه شرکت سازنده صورت گرفت. کمیت و کیفیت RNA استخراجی با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (نانو دراپ) و همچنین با استفاده از ژل آگارز ۱ درصد سنجیده شد. به منظور حذف بقایای DNA ژنومی از تیمار *DNase I* (شرکت دنازیست) استفاده شد. همچنین

جدول ۲- نام، توالی و دمای اتصال آغازگرهای مورد استفاده در واکنش PCR

Table 2. Name, sequence and annealing temperature of primers used in PCR reaction

شناسه کانتیگ Contig_ID	نام ژن Name of gene	توالی پیشرو آغازگر (5'→3') Forward primer sequence (5'→3')	توالی پسرو آغازگر (5'→3') Reverse primer sequence (5'→3')	دمای اتصال آغازگر (سانتی‌گراد) Annealing temperature (°C)
contig_25176	Epu-Snakin1	AGCAGTGGTATCAACGCAGAG	TCTATGGGCATTGGGATCACC	55.2
contig_10958	Epu-Snakin2	ACCCACTACTTTTATGTTTCCAG	ATTCGTTTCATCAATCAACCATTAC	53.5
contig_25536	Epu-Snakin3	TTCCGTTTCCGATCCTCTTCTC	TTGCTTTTGCCCTTGGAGTTCTTC	59
contig_23765	Epu-Snakin4	TAAGCAGTGGTATCAACGCAGAG	ATCACGAGAACAACAAGTCAAACC	56.2
contig_27452	Epu-Snakin5	GCAGTGGTATCAACGCAGAG	AACGAAGGCTTCAGATTAAGATG	56.1
contig_16768	Epu-Snakin6	TGGATTACACCTCGTATTCTCTG	TGATGTCGTTCTCGTTTCTTTAGC	54.6

نتایج و بحث

سرهم‌بندی نوپدید ترنسکریپتوم سرخارگل: جمع‌آوری داده‌های حاصل از توالی‌یابی RNA از بافت‌های مختلف سرخارگل در مجموع شامل بیش از ۶۹۸ میلیون خوانش خام (Raw Reads) بود. پس از فرآیند تریمنینگ (پیرایش و پالایش داده‌ها و حذف خوانش‌های با کیفیت پایین و حذف توالی‌های آدپتور از خوانش‌های خام)، بیش از ۵۳۳ میلیون خوانش تمیز شده (Clean Reads) باقی ماند. نتایج نشان داد که به‌طور میانگین ۲۴ درصد از خوانش‌های خام در تمامی نمونه‌ها پس از فرآیند تریمنینگ حذف شده‌اند (جدول ۱). سرهم‌بندی نوپدید ترنسکریپتوم سرخارگل با استفاده از خوانش‌های تمیز شده از طریق نرم‌افزار CLC Genomics Workbench انجام شد. پس از زدودن توالی‌های تکراری از اسمبلی اولیه، ۲۷۶۷۹ یونی ژن به‌دست آمد. درنهایت، طول بلندترین رونوشت سرهم‌بندی شده و N50 به ترتیب ۸۸۲۳ و ۱۳۷۳ محاسبه شد (جدول ۳)، که نشان‌دهنده کیفیت بالای سرهم‌بندی ایجاد شده بود (Haas et al., 2013). تمام یونی ژن‌ها با استفاده از BLASTx (cutoff E-value < 10⁻⁵) علیه پایگاه داده‌های پروتئین‌های غیرتکراری (NR) بلاست شدند. در مجموع ۲۲۴۶۶ یونی ژن توسط پایگاه داده NR (۸۱/۱۶ درصد) مستندسازی شدند. علاوه بر این، به ۷۷۴۰ توالی نیز کد GO اختصاص داده شد که نشان‌دهنده مستندسازی عملکردی قابل توجهی برای پروفایل بیانی سرخارگل بود (Conesa et al., 2005). همچنین نتایج بلاست نشان داد که گیاه آفتابگردان (*Helianthus annuus*) بیشترین قرابت را از نظر محتوای ترنسکریپتوم با سرخارگل دارد (شکل ۱) که این یافته‌ها اهمیت تطابق ترنسکریپتوم‌های گیاهان نزدیک به هم را نشان می‌دهد و می‌تواند در مطالعات فیلوژنتیکی و کاربردی مفید باشد. در رتبه دوم و سوم قرابت ژنتیکی، به ترتیب گیاهان ابروسای کوتاه‌قد (*Ambrosia artemisiifolia*) و تاک تلخ (*Mikania micrantha*) قرار گرفتند (شکل ۱).

شناسایی و جداسازی برخی از اعضای خانواده ژنی **Snakin/GASA**: نتایج tBlastn توالی پروتئینی مورد توافق Snakin/GASA علیه ترنسکریپتوم سرخارگل و تطبیق آن‌ها

برای تایید دمین خانواده ژنی Snakin/GASA با پایگاه داده پایگاه داده Pfam، Interproscan و CDD، منجر به شناسایی ۶ کانتینگ (contig_25176، contig_10958، contig_25536، contig_23765، contig_27452 و contig_16768) به‌عنوان اعضای خانواده ژنی Snakin/GASA در گیاه سرخارگل شد. کمترین و بیشترین طول کانتینگ مربوط به توالی‌های contig_10958 (۵۳۰ نوکلئوتید) و contig_25536 (۷۰۰ نوکلئوتید) بود. همچنین نتایج نشان داد که درصد GC برای توالی‌های شناسایی شده از ۳۶ تا ۴۱ درصد متغیر بود. نتایج حاصل از تکثیر با آغازگرهای اختصاصی طراحی شده، قطعاتی با طول ۳۴۴، ۴۵۹، ۳۰۱، ۴۶۵، ۴۱۰ و ۴۱۷ جفت‌بازی را به ترتیب برای Epu-Snakin1، Epu-Snakin2، Epu-Snakin3، Epu-Snakin4، Epu-Snakin5 و Epu-Snakin6 نشان داد (شکل ۲). تجزیه و تحلیل نتایج توالی‌یابی، وجود چارچوب‌های خوانش باز را برای تمامی ژن‌های Snakin/GASA شناسایی شده در سرخارگل را تأیید نمود (شکل ۳). نتایج پژوهش‌های متعدد نشان می‌دهند که Snakin/GASA در گیاهان، یک خانواده بزرگ چند ژنی را شامل می‌شوند به طوری که تاکنون به ترتیب تعداد ۱۶، ۱۵، ۱۰، ۹ و ۷ عضو از این خانواده در گیاه سیب‌زمینی، آرابیدوپسیس، ذرت، برنج و پیاز شناسایی شده‌اند (Boroun et al., 2021; Nahiriak et al., 2016; Zhang and Wang, 2008; Zimmermann et al., 2010).

ویژگی‌های فیزیکی‌شیمیایی پروتئین‌های Snakin/GASA

سرخارگل: بررسی خصوصیات پروتئین‌های Snakin/GASA سرخارگل مانند وزن مولکولی، نقطه ایزوالکتریک، شاخص ناپایداری، میانگین کل هیدروپاتیک (GRAVY)، محتوای اسید آمینه اصلی و شاخص آلفاتیک نشان داد که پروتئین‌های Snakin/GASA شناسایی شده در سرخارگل، دارای وزن مولکولی از ۹/۵۹ (Epu-Snakin1) تا ۱۱/۸۶ (Epu-Snakin4) کیلو دالتون بودند. اغلب پروتئین‌های Epu-Snakin وزن مولکولی کمتر از ۱۲ کیلو دالتون داشتند. همچنین، نقطه ایزوالکتریک بین ۸/۶۱ (Epu-Snakin1) و ۹/۱۲ (Epu-Snakin4) متغیر بود. علاوه بر این نتایج نشان داد که اغلب پروتئین‌های Snakin/GASA شناسایی شده (به جز

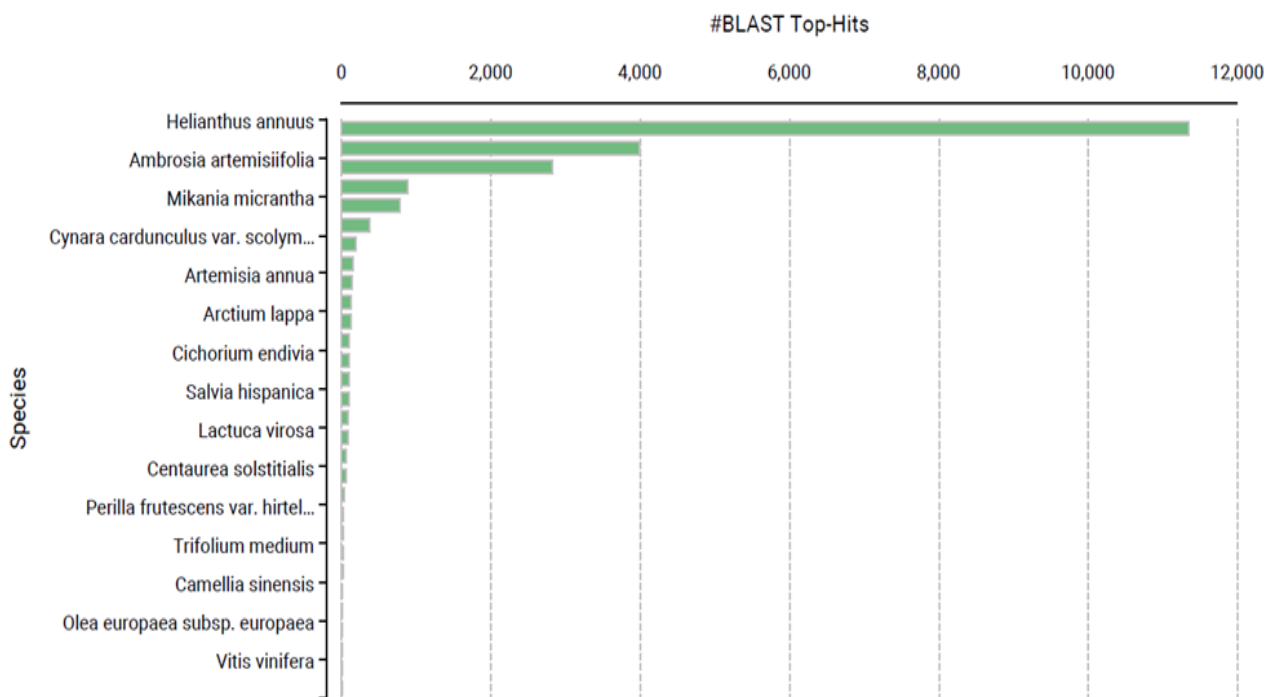
شد (Su et al., 2020). طول پپتیدهای خانواده Snakin/GASA شناسایی شده در پژوهش مذکور بین ۳۳ گونه گیاهی، به‌طور قابل توجهی متفاوت و از ۶۴ تا ۱۰۹۹ اسیدآمینو متغیر بود (Zhang and Wang, 2017). علاوه بر این، تعداد اعضای خانواده Snakin/GASA در گونه‌های مختلف گیاهی از ۵ تا ۳۷ متغیر بود و مقادیر pI (نقطه ایزوالکتریک) این پروتئین‌ها نیز بین ۱۱/۴ تا ۱۴/۱۰ گزارش شده بود. این تنوع قابل توجه نشان‌دهنده ضرورت توصیف ساختاری و عملکردی بیشتر ژن‌های Snakin/GASA برای روشن کردن ارتباط بیولوژیکی آن‌ها، علی‌رغم تشابه بالای توالی، می‌باشد.

Epu-Snakin 6 دارای مقادیر شاخص ناپایداری بالای ۴۰ بودند. مقادیر شاخص آلیفاتیک ۶۷/۶۱ (Epu-Snakin1) تا ۸۳/۸۹ (Epu-Snakin4) متغیر بود. در سایر گیاهان مدل، طول پپتید از ۶۵ در پنبه تا ۶۶۲ اسید آمینو در کاهو متغیر بود در حالی که بیشتر پپتیدها ۸۵ تا ۲۰۰ اسید آمینو طول داشتند. کمترین وزن مولکولی در زیتون با ۹/۵۹ کیلودالتون و بیشترین ۹۵/۷ در کاهو گزارش شده است (Bouteraa et al., 2023)، در صورتی که تعداد زیادی از پپتیدهای بررسی شده، کمتر از ۱۲ کیلودالتون وزن داشتند. در یک مطالعه با تجزیه و تحلیل توالی ژنوم ۳۳ گونه گیاهی، حدود ۵۴۵ ژن کد کننده پروتئین‌های Snakin/GASA شناسایی

جدول ۳- خلاصه‌ای از کمیت و کیفیت مرجع ترنسکریپتومی سرخارگل

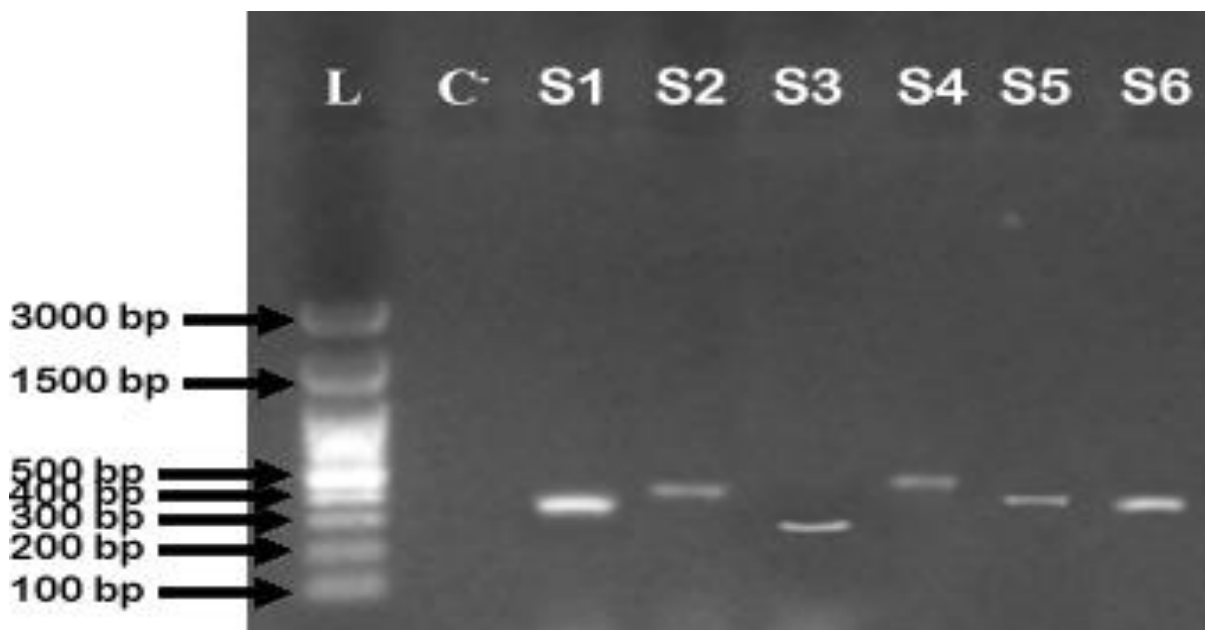
Table 3. A summary of the quantity and quality of *Echinacea purpurea* transcriptome reference

پارامترها Parameters	ارزش Value
تعداد رونوشت Number of transcripts	27679
کوتاه‌ترین طول رونوشت (نوکلئوتید) Length of the smallest transcript (nt)	200
بلندترین طول رونوشت (نوکلئوتید) Length of the largest transcript (nt)	8823
تعداد نوکلئوتید Number of bases (nt)	26493340
میانگین طول رونوشت‌ها (نوکلئوتید) Mean length of the transcripts (nt)	957.1639
تعداد رونوشت با طول بیشتر از ۱ کیلو نوکلئوتید Number of transcripts greater than 1kb	10025
تعداد رونوشت‌های دارای قاب خوانش باز Number of transcripts with ORF	13325
N90 (nt)	447
N70 (nt)	911
N50 (nt)	1373
N30 (nt)	1882
N10 (nt)	2846
GC%	41.77



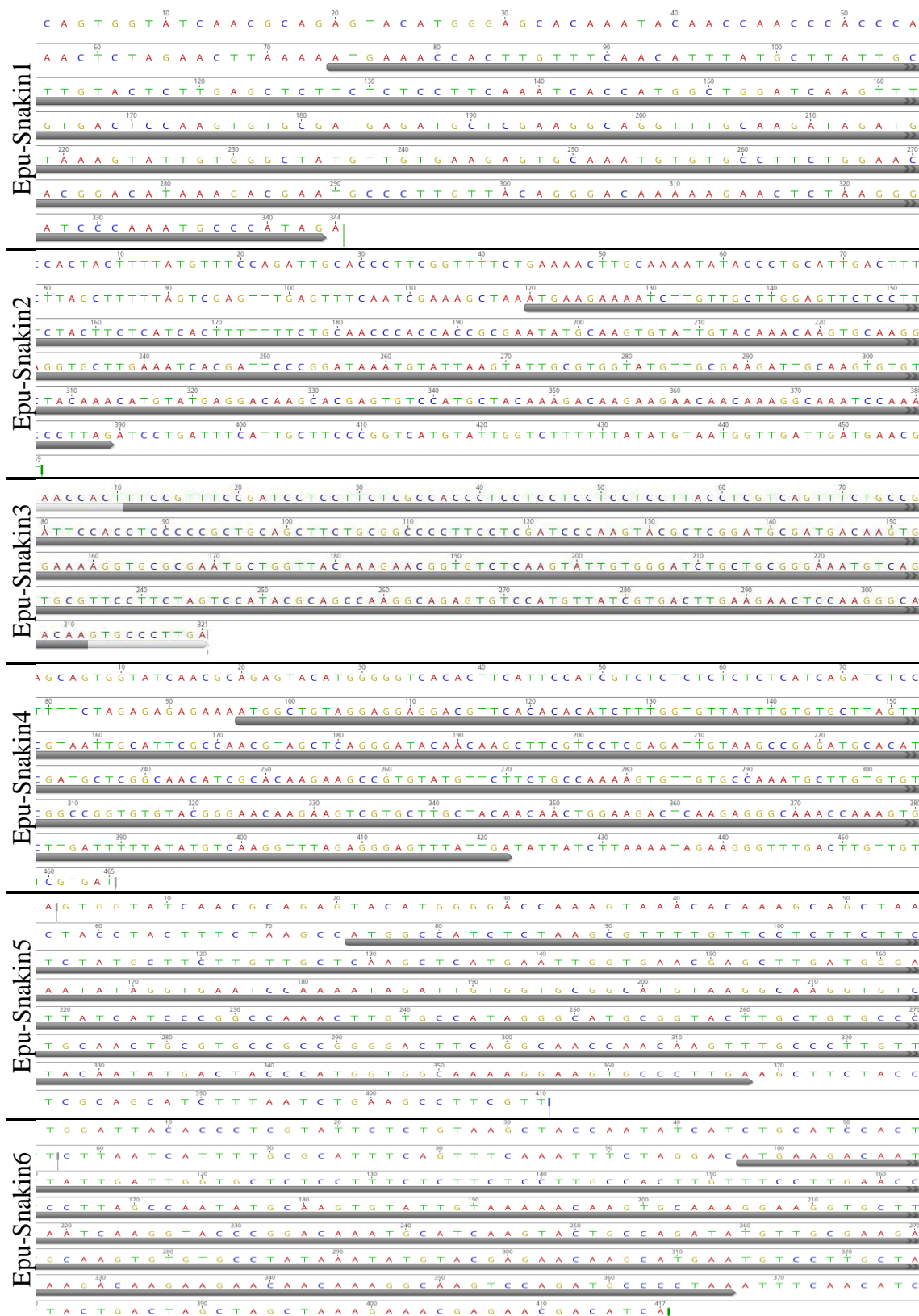
شکل ۱- توزیع فراوانی گونه‌های گیاهی با همولوژی بالا با ترنسکریپتوم سرخارگل

Figure 1. Frequency distribution of plant species with high homology to *Echinacea purpurea* transcriptome



شکل ۲- الگوی بانندی حاصل از PCR ژن‌های Snakin/GASA جداسازی شده در سرخارگل بر روی ژل آگارز یک درصد.

Figure 2. The PCR band pattern of isolated Snakin/GASA in *Echinacea purpurea* on 1% agarose gel. From left to right, the wells show, 100 bp DNA ladder, negative control, and amplified bands of Snakin/GASA genes isolated in *Echinacea purpurea*, respectively.



شکل ۳- توالی تکثیر و قاب خوانش باز شش ژن Snakin/GASA شناسایی شده در سرخارگل

Figure 2. The amplification sequence and open reading frame of six Snakin/GASA genes identified in *Echinacea purpurea*

تعیین دمین‌های عملکردی در ساختار پروتئین‌های Snakin/GASA: نتایج نشان داد که در همه پروتئین‌های شناسایی شده، دمین GASA وجود داشت. علاوه بر این یک پپتید سیگنال در انتهای آمینی شامل ۲۰ تا ۳۶ اسید آمینه در تمام پروتئین‌های شناسایی شد (شکل ۴). همچنین بررسی ماریچ‌های گذرنده از غشا در تمام پروتئین‌های Epu-Snakin نشان داد که به جز Epu-Snakin5 تمامی پروتئین‌های شناسایی شده حداقل دارای یک ماریچ‌های گذرنده از غشا می‌باشند (شکل ارائه نشده است). وجود ماریچ‌های گذرنده از غشا در اکثر پروتئین‌های Snakin/GASA شناسایی شده در سرخارگل، نشان‌دهنده این است که این پروتئین‌ها ممکن است در فرآیندهای مرتبط با غشا مانند حس و انتقال پیام، انتقال مواد و پاسخ به تنش‌های محیطی نقش داشته باشند (Ahmad et al., 2020).

خاصیت ضد میکروبی پروتئین‌های Snakin/GASA: بررسی اسنیکن‌های شناسایی شده در سرخارگل پس از حذف سیگنال پپتید، در پایگاه CAMP، خاصیت ضد میکروبی را با احتمال بالایی در تمامی این پپتیدها نشان داد. الگوریتم SVM با میزان احتمال ۱۰۰ درصد، الگوریتم RF با متوسط میزان احتمال ۹۲/۴۵ درصد و الگوریتم ANN با تأیید کامل، خاصیت ضد میکروبی در تمامی اسنیکن‌های شناسایی شده را پیش‌بینی کرد (جدول ۵). تأیید این ویژگی توسط الگوریتم‌های مختلف برای تمامی پپتیدهای شناسایی شده؛ نشان‌دهنده ظرفیت بالای این پپتیدها برای استفاده در کاربردهای ضد میکروبی است. این ویژگی می‌تواند به توسعه داروها و درمان‌های جدید برای مبارزه با میکروارگانیزم‌های بیماری‌زا کمک کند (Guo et al., 2024; Iqbal and Khan, 2023; Nahiriñak et al., 2024; (Taieb Boutraa et al., 2024; Uncu et al., 2024

جدول ۴- ویژگی‌های فیزیکیوشیمیایی ژن‌های Snakin/GASA شناسایی شده در سرخارگل

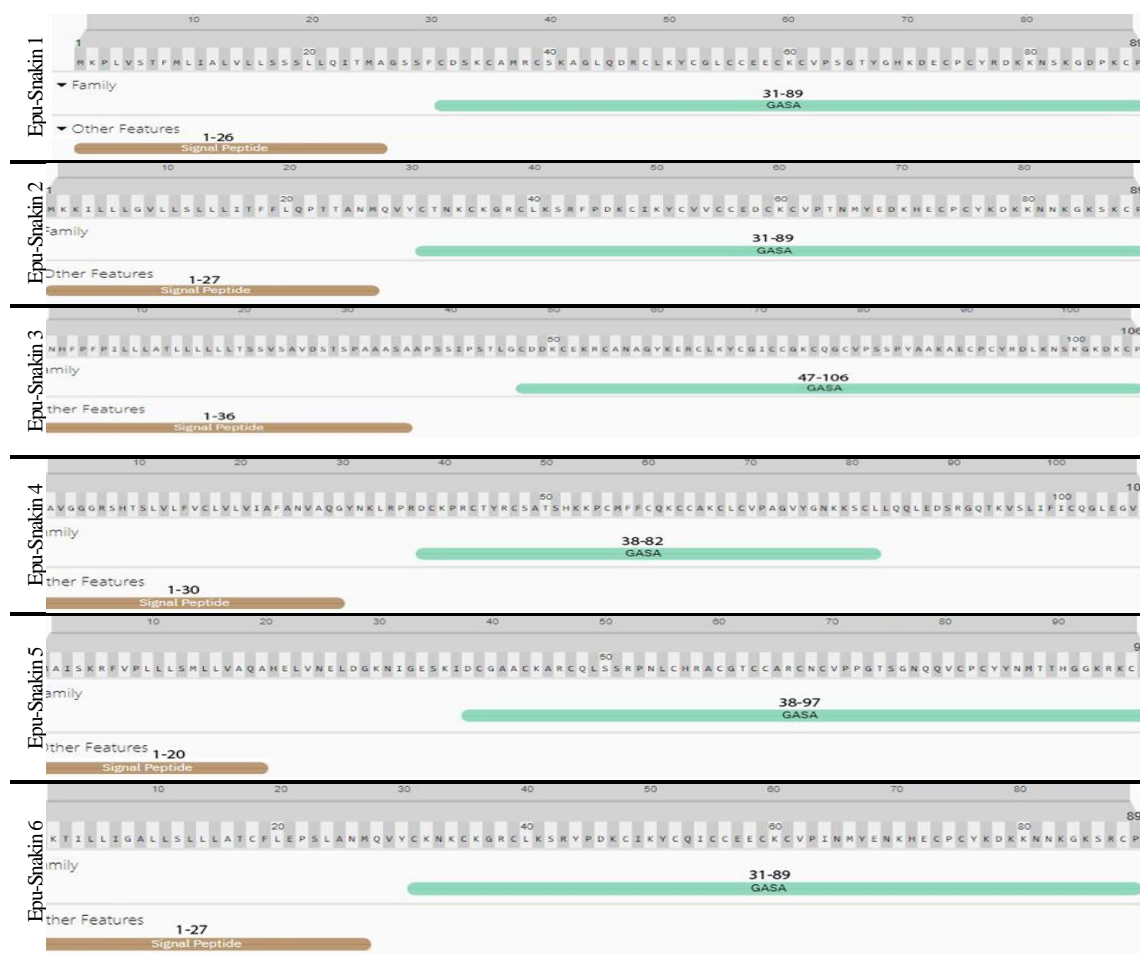
Table 4. Physicochemical characteristics of Snakin/GASA genes identified in *Echinacea purpurea*

نام	وزن مولکولی (کیلودالتون)	نقطه ایزوالکتریک	شاخص ناپایداری	شاخص آلیفاتیک	GRAVY
Name	Molecular weight (kDa)	Isoelectric point	Instability index	Aliphatic index	
Epu-Snakin1	9.59	8.62	49.53	67.61	-0.119
Epu-Snakin2	10.25	9.12	34.42	74.38	-0.243
Epu-Snakin3	11.16	8.61	46.75	74.72	-0.012
Epu-Snakin4	11.86	9.28	40.92	83.89	0.186
Epu-Snakin5	10.44	8.91	43.91	71.44	-0.143
Epu-Snakin6	10.24	9.07	39.67	75.62	-0.324

جدول ۵- ویژگی‌های ضد میکروبی پروتئین‌های Snakin/GASA شناسایی شده در سرخارگل

Table 5. Antimicrobial properties of Snakin/GASA proteins identified in *Echinacea purpurea*

نام	الگوریتم SVM	الگوریتم RF	الگوریتم ANN
Name	Support Vector Machine Algorithm	Random Forest Algorithm	Artificial Neural Network Algorithm
Epu-Snakin1	1.00	0.9205	تأیید confirm
Epu-Snakin2	1.00	0.9625	تأیید confirm
Epu-Snakin3	1.00	0.821	تأیید confirm
Epu-Snakin4	1.00	0.958	تأیید confirm
Epu-Snakin5	1.00	0.911	تأیید confirm
Epu-Snakin6	1.00	0.9745	تأیید confirm



شکل ۴- جایگاه دامین‌های عملکردی در ساختار پروتئین‌های Snakin/GASA شناسایی شده در سرخارگل
Figure 4. Position of functional domains in the structure of Snakin/GASA proteins identified in *Echinacea purpurea*

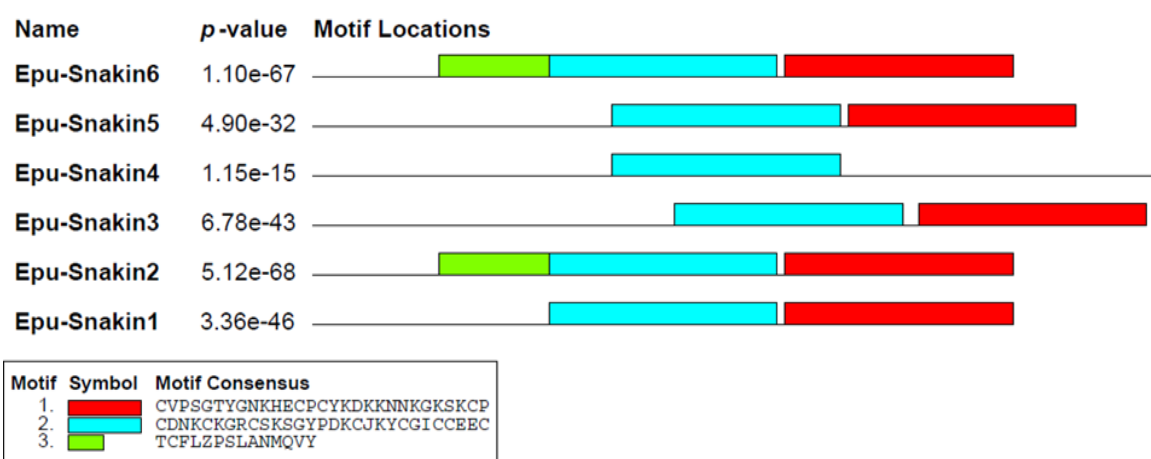
(شکل ۵). بررسی وجود پیوندهای دی‌سولفیدی در ساختار پروتئین‌های Snakin/GASA شناسایی شده در سرخارگل، ۱۲ اسید آمینه سیستمین حفظ شده را نشان داد که پنج تا شش پیوند دی‌سولفیدی درون مولکولی را تشکیل می‌دهند (جدول ۶). وجود موتیف‌های حفاظت‌شده و پیوندهای دی‌سولفیدی در پروتئین‌های Epu-Snakin به تبیین عملکردهای بیولوژیکی این پروتئین‌ها کمک می‌کند. موتیف‌ها به‌عنوان بازوهای عملکردی هستند و نقش‌های مشابهی را در پروتئین‌های مختلف ایفا می‌کنند. پیوندهای دی‌سولفیدی نیز با پایداری ساختاری پروتئین‌ها و حفاظت از آنها در برابر تغییرات محیطی مرتبط هستند (Patil et al., 2015).

بررسی موتیف‌های حفاظت‌شده و پیوندهای دی‌سولفیدی: موتیف‌ها به‌طور کلی به‌عنوان توالی‌های حفظ‌شده تکاملی در ساختارهای اولیه پروتئین‌ها شناخته می‌شوند. از آنجایی که موتیف‌ها در سیر تکامل حفاظت شده‌اند دارای نقش، عملکردی خاصی نیز می‌باشند. با استفاده از سرور اطلاعاتی بر خط MEME موتیف‌های حفاظت‌شده در پروتئین‌های Snakin/GASA شناسایی شده در سرخارگل، مشخص شدند. سه نوع موتیف پروتئینی حفاظت‌شده در پروتئین‌های مورد بررسی شناسایی شد. تنها ژن‌های Epu-Snaki2 و Epu-Snaki6 دارای هر سه موتیف بودند. ۳ ژن Epu-Snaki1، Epu-Snaki3 و Epu-Snaki5 دارای دو موتیف ۱ و ۲ بودند؛ این در حالی بود که ژن Epu-Snaki4 تنها شامل موتیف ۲ بود

جدول ۶- فراونی و جایگاه پیوندهای دی سولفید در ساختار پروتئین‌های Snakin/GASA شناسایی شده در سرخارگل

Table 6. Frequency and position of disulfide bond in the structure of Snakin/GASA proteins identified in *Echinacea purpurea*

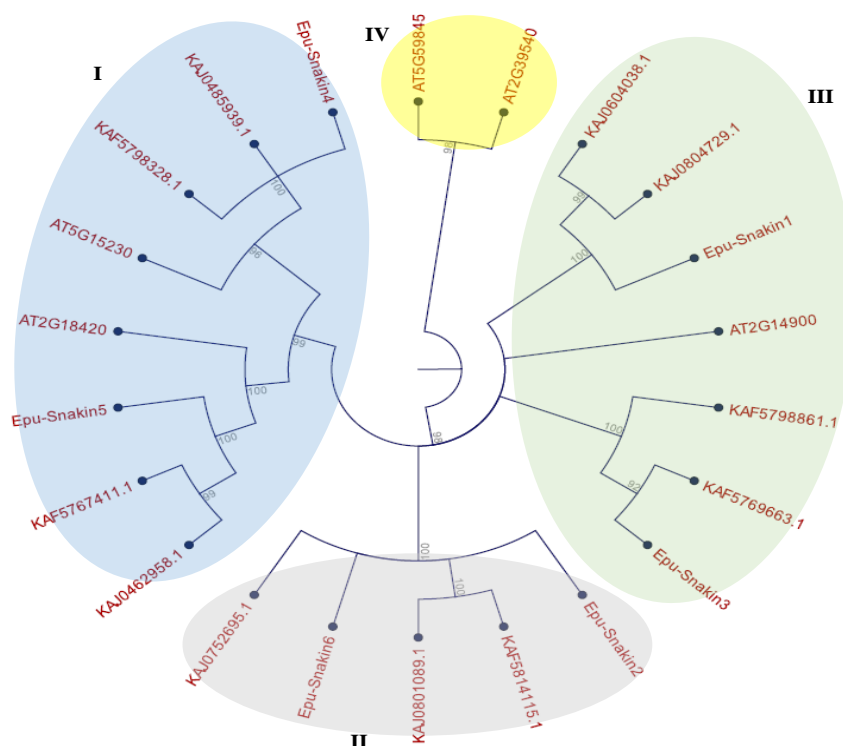
نام Name	تعداد پیوندهای دی سولفیدی Number of disulfide bonds	موقعیت ششمین	موقعیت پنجمین	موقعیت چهارمین	موقعیت سومین	موقعیت دومین	موقعیت اولین
		پوند دی سولفید Position of the sixth disulfide bond	دی سولفید Position of the fifth disulfide bond	دی سولفید Position of the fourth disulfide bond	پیوند دی سولفید Position of the third disulfide bond	دی سولفید Position of the second disulfide bond	پیوند دی سولفید Position of the first disulfide bond
Epu-Snakin1	5	-	61-88	31-39	56-73	35-48	59-75
Epu-Snakin2	6	52-59	48-61	39-55	75-88	56-73	31-35
Epu-Snakin3	6	71-105	68-75	47-55	51-64	72-90	78-92
Epu-Snakin4	5	-	67-101	47-60	43-63	69-81	39-56
Epu-Snakin5	5	-	47-60	69-96	64-81	67-83	39-43
Epu-Snakin6	6	61-88	39-52	35-48	56-73	59-75	31-55



شکل ۵- فراونی و جایگاه موتیف‌های حفاظت شده در ساختار پپتیدهای Snakin/GASA شناسایی شده در سرخارگل

Figure 5. Frequency and position of conserved motifs in the structure of Snakin/GASA proteins identified in *Echinacea purpurea*

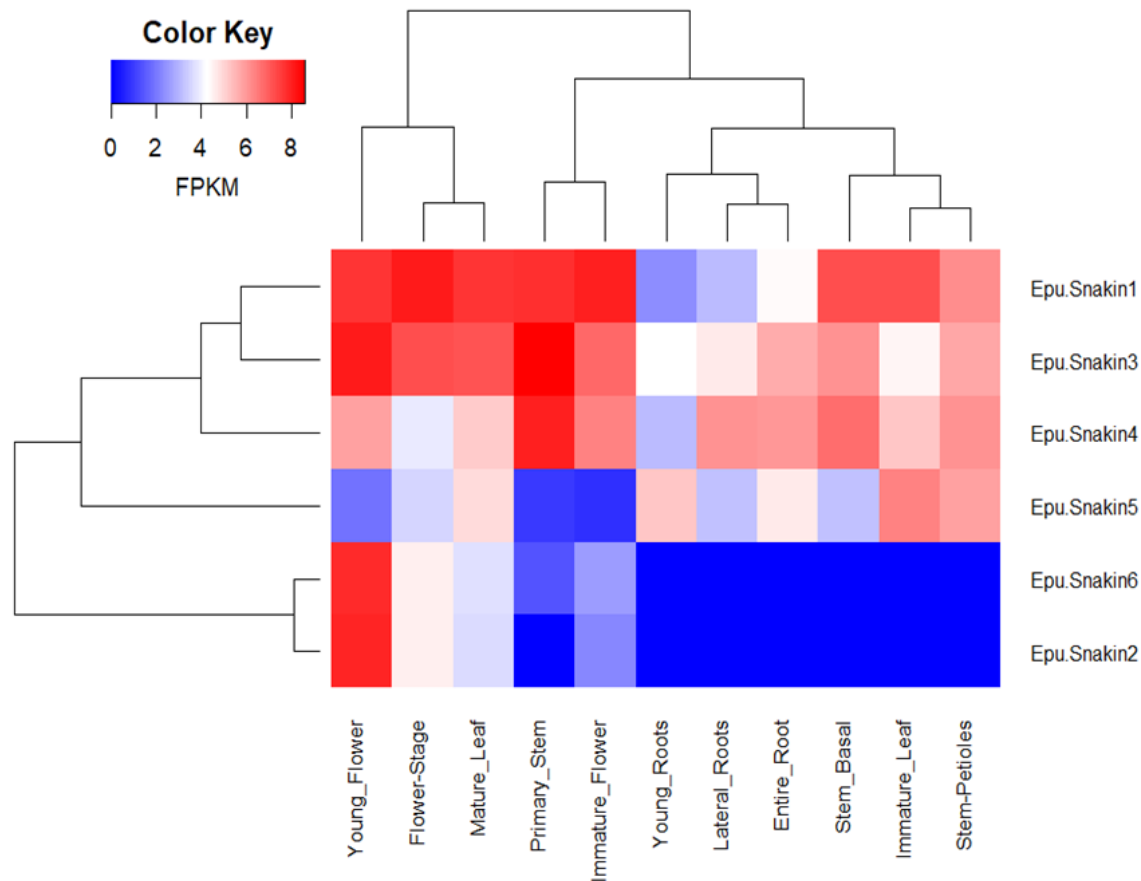
بازسازی درخت فیلوژنتیکی پروتئین‌های Snakin/GASA شناسایی شده در سرخارگل: درخت فیلوژنتیک با استفاده از توالی‌های پروتئین Snakin/GASA از گیاهان آراییدوپسیس، آفتابگردان و سرخارگل برای درک بهتر ارتباطات تکاملی ایجاد شد. بر اساس درخت فیلوژنتیک، ژن‌های Snakin/GASA شناسایی شده در سرخارگل در چهار گروه طبقه‌بندی شدند؛ به طوری که ژن‌های Epu-Snakin4 و Epu-Snakin5 در گروه I، Epu-Snakin2 و Snakin6 در گروه II و Epu-Snakin3 و Epu-Snakin1 در گروه III قرار گرفتند (شکل ۶). تجزیه و تحلیل گروه‌های ایجاد شده نشان داد که توالی‌های شناسایی شده قرابت بیشتری با ژن‌های همولوگ خود در آفتابگردان دارند. بر اساس یافته‌های این بخش می‌توان چنین اظهار نمود که ژن‌های قرار گرفته درون یک گروه از نظر تکاملی و احتمالاً عملکردی قرابت بالایی با یکدیگر دارند و بین گروه‌ها نیز فواصلی از نظر زمان تکامل و تشابه توالی و عملکردی وجود دارد (Nawaz et al., 2019; Savolainen and Chase, 2003).



شکل ۶- درخت فیلوژنتیکی پروتئین‌های Snakin/GASA شناسایی شده در سرخارگل
Figure 6. Phylogenetic tree of Snakin/GASA proteins identified in *Echinacea purpurea*

نشان داده است (شکل ۷). در خصوص بیان ژن‌های Snakin/GASA شناسایی شده در سرخارگل به‌طور کلی می‌توان گفت که تفاوت در بیان مشاهده شده ژن‌های مورد بررسی می‌تواند به نقش‌های متنوع و اختصاصی هر ژن در فرآیندهای زیستی مختلف گیاه سرخارگل اشاره داشته باشد. بیان بالای ژن‌های گروه III در اغلب بافت‌ها نشان‌دهنده نقش‌های کلیدی این ژن‌ها در عملکردهای حیاتی گیاه است، در حالی که بیان اختصاصی ژن‌های گروه I و II در بافت‌های خاص ممکن است به نقش‌های اختصاصی آن‌ها در رشد و توسعه گیاه اشاره داشته باشد. تحلیل نقشه حرارتی نیز نشان‌دهنده تفاوت‌های معنی‌دار در سطح بیان ژنی بین گروه‌های مختلف بود که می‌تواند مبنای مطالعات بیشتر در زمینه عملکرد و نقش‌های بیولوژیکی این ژن‌ها باشد (Darqui et al., 2021).

الگوی بیان ژن‌های Snakin/GASA شناسایی شده در سرخارگل: بررسی بیان اختصاصی ژن‌های Snakin/GASA شناسایی شده در سرخارگل (شکل ۷) نشان داد که ژن‌های مورد نظر در سه خوشه جداگانه قرار می‌گیرند. ژن‌های Epu-Snakin6 و Epu-Snakin2 در گروه I، ژن‌های Epu-Snakin4 و Epu-Snakin3، Epu-Snakin1 در گروه III و ژن Epu-Snakin5 به‌طور مجزا در یک گروه قرار گرفتند. علاوه بر این نتایج تجزیه و تحلیل نقشه حرارتی نشان داد که بیان ژن‌های مورد نظر در گروه‌های شکل گرفته به‌صورت $III > II > I$ می‌باشد. همچنین نتایج نشان داد که ژن‌های گروه I تنها در بافت گل بیان مطلوبی داشته این در حالی بود که ژن‌های گروه III در اغلب بافت‌ها (۱۰ بافت گیاهی) بیان مطلوبی نشان داده‌اند. ژن Epu-Snakin5 نیز تنها در بافت‌های رویشی بیان مناسبی را



شکل ۷- نقشه حرارتی بیان ژن‌های Snakin/GASA در بافت‌های مختلف سرخارگل

Figure 7. Heat map visualization of the Snakin/GASA genes expression in different tissues of *Echinacea purpurea*

فردی هستند که می‌تواند به نقش مختلف آن‌ها در فرآیندهای رشد، پاسخ به تنش و تنظیم فرآیندهای متابولیکی مرتبط باشد. در نهایت نتایج این تحقیق می‌تواند به درک بهتر نقش‌های زیستی و ظرفیت کاربردی پروتئین‌های Snakin/GASA در گیاه سرخارگل بیانجامد و امید می‌رود یافته‌های پژوهش حاضر به توسعه روش‌های جدید برای تولید محصولات دارویی با ارزش افزوده بالا کمک نماید.

در پژوهش حاضر برای اولین بار توالی ۶ ژن از خانواده Snakin/GASA در گیاه دارویی سرخارگل شناسایی شد. نتایج پژوهش حاضر مشابهت ساختاری و عملکردی بالایی بین توالی‌های شناسایی شده در این گیاه با ژن‌های ارتولوگ در سایر گونه‌های گیاهی نشان داد. به‌طور کلی یافته‌های مطالعه حاضر نشان داد که پروتئین‌های Snakin/GASA شناسایی شده در سرخارگل دارای ویژگی‌های ساختاری و بیوشیمیایی منحصر به

References

- Ageitos, J., Sánchez-Pérez, A., Calo-Mata, P. and Villa, T. (2017). Antimicrobial peptides (AMPs): Ancient compounds that represent novel weapons in the fight against bacteria. *Biochemical Pharmacology*, **133**: 117-138.
- Agha Alikhani, M., Iranpour, A. and Naghdi Badi, H. (2013). Changes in agronomical and phytochemical yield of purple coneflower (*Echinacea purpurea* (L.) Moench) under urea and three biofertilizers application. *Journal of Medicinal Plants*, **12**: 121-136.
- Ahmad, B., Yao, J., Zhang, S., Li, X., Zhang, X., Yadav, V. and Wang, X. (2020). Genome-wide characterization and expression profiling of GASA genes during different stages of seed development in

- grapevine (*Vitis vinifera* L.) predict their involvement in seed development. *International Journal of Molecular Sciences*, **21**: 1088.
- Bailey, T.L., Boden, M., Buske, F.A., Frith, M., Grant, C.E., Clementi, L., Ren, J., Li, W.W. and Noble, W.S.** (2009). MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. *Nucleic Acids Research*, **37**: 202-208.
- Boroun, H., Siahpoosh, A., Sohrabi, S.M., Nikbakht, M.R., Ghasemian Yadegari, J., Mohammadi, M. and Sohrabi, S.S.J.C.B.** (2021). Identification and characterization of some snakin gene family members in onion (*Allium cepa* L.). *Crop Biotechnology*, **10**: 79-92 (In Persian).
- Bouteraa, M.T., Ben Romdhane, W., Baazaoui, N., Alfaifi, M.Y., Chouaibi, Y., Ben Akacha, B., Ben Hsouna, A., Kačániová, M., Čavar Zeljković, S. and Garzoli, S.** (2023). GASA proteins: Review of their functions in plant environmental stress tolerance. *Plants*, **12**: 2045.
- Campos, M.L., de Souza, C.M., de Oliveira, K.B.S., Dias, S.C. and Franco, O.L.** (2018). The role of antimicrobial peptides in plant immunity. *Journal of Experimental Botany*, **69**: 4997-5011.
- Coelho, J., Barros, L., Dias, M.I., Finimundy, T.C., Amaral, J.S., Alves, M.J., Calhelha, R.C., Santos, P.F. and Ferreira, I.C.** (2020). *Echinacea purpurea* (L.) Moench: chemical characterization and bioactivity of its extracts and fractions. *Pharmaceuticals*, **13**: 125.
- Conesa, A., Götz, S., García-Gómez, J.M., Terol, J., Talón, M. and Robles, M.** (2005). Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics*, **21**: 3674-3676.
- Darqui, F.S., Radonic, L.M., Beracochea, V.C., Hopp, H.E. and López Bilbao, M.** (2021). Peculiarities of the transformation of Asteraceae family species: the cases of sunflower and lettuce. *Frontiers in Plant Science*, **12**: 767459.
- Dobrange, E., Peshev, D., Loedolff, B. and Van den Ende, W.** (2019). Fructans as immunomodulatory and antiviral agents: The case of Echinacea. *Biomolecules*, **9**: 615.
- Ferrè, F. and Clote, P.** (2005). DiANNA: a web server for disulfide connectivity prediction. *Nucleic Acids Research*, **33**: 230-232.
- Filiz, E. and 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., Wilkins, M.R., Appel, R.D. and Bairoch, A.** (2005). Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. *The proteomics protocols handbook*: 571-607.
- Guo, X., Zhu, S., Xue, Y., Lin, Y., Mao, J., Li, S., Liang, C., Lu, X. and Tian, J.** (2024). The stylo cysteine-rich peptide sgsnakin1 is involved in aluminum tolerance through enhancing reactive oxygen species scavenging. *International Journal of Molecular Sciences*, **25**(12): 6672.
- Haas, B.J., Papanicolaou, A., Yassour, M., Grabherr, M., Blood, P.D., Bowden, J., Couger, M.B., Eccles, D., Li, B. and Lieber, M.** (2013). De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. *Nature Protocols*, **8**: 1494-1512.
- Hajimehdipoor, H., Khanavi, M., Shekarchi, M., Abedi, Z. and Pirali Hamedani, M.** (2009). Investigation of the best method for extraction of phenolic compounds from *Echinacea purpurea* L. (Moench). *Journal of Medicinal Plants*, **8**: 145-152.
- Harris, P.W., Yang, S.H., Molina, A., López, G., Middleditch, M. and Brimble, M.A.** (2014). Plant antimicrobial peptides snakin-1 and snakin-2: chemical synthesis and insights into the disulfide connectivity. *Chemistry—A European Journal*, **20**: 5102-5110.
- Iqbal, A. and Khan, R.S.** (2023). Snakins: antimicrobial potential and prospects of genetic engineering for enhanced disease resistance in plants. *Molecular Biology Reports*, **50**: 8683-8690.
- Koehbach, J. and Craik, D.J.** (2019). The vast structural diversity of antimicrobial peptides. *Trends in Pharmacological Sciences*, **40**: 517-528.
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G. and Sonnhammer, E.L.** (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *Journal of Molecular Biology*, **305**: 567-80.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Nnyaz, C. and Tamura, K.** (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution*, **35**: 1547-1549.
- Lazzaro, B.P., Zasloff, M. and Rolff, J.** (2020). Antimicrobial peptides: Application informed by evolution. *Science*, **368**: eaau5480.
- Luong, H.X., Thanh, T.T. and Tran, T.H.** (2020). Antimicrobial peptides—Advances in development of therapeutic applications. *Life Sciences*, **260**: 118407.
- Mansour, S.C., Pena, O.M. and Hancock, R.E.** (2014). Host defense peptides: front-line immunomodulators. *Trends in Immunology*, **35**: 443-450.
- Mareri, L., Parrotta, L. and Cai, G.** (2022). Environmental Stress and Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, **23**(10): 5416.

- Matsuzaki, K.** (2019). *Antimicrobial Peptides*. Springer, Singapore, SG.
- Nahirñak, V., Almasia, N.I., Hopp, H.E. and Vazquez-Rovere, C.** (2012). Snakin/GASA proteins: involvement in hormone crosstalk and redox homeostasis. *Plant signaling & Behavior*, **7**: 1004-1008.
- Nahirñak, V., Almasia, N.I., Lia, V.V., Hopp, H.E. and Vazquez Rovere, C.** (2024). Unveiling the defensive role of Snakin-3, a member of the subfamily III of Snakin/GASA peptides in potatoes. *Plant Cell Reports*, **43**(2): 47.
- Nahirñak, V., Rivarola, M., Gonzalez de Urreta, M., Paniego, N., Hopp, H.E., Almasia, N.I. and Vazquez-Rovere, C.J.A.j.o.p.r.** (2016). Genome-wide analysis of the Snakin/GASA gene family in *Solanum tuberosum* cv. Kennebec. **93**: 172-188.
- Nawaz, Z., Kakar, K.U., Ullah, R., Yu, S., Zhang, J., Shu, Q.-Y. and Ren, X.-I.** (2019). Genome-wide identification, evolution and expression analysis of cyclic nucleotide-gated channels in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Genomics*, **111**: 142-158.
- Nawrot, R., Barylski, J., Nowicki, G., Broniarczyk, J., Buchwald, W. and Goździcka-Józefiak, A.** (2014). Plant antimicrobial peptides. *Folia Microbiologica*, **59**: 181-196.
- Oliveira-Lima, M., Benko-Iseppon, A.M., Neto, J.R.C.F., Rodríguez-Decuadro, S., Kido, E.A., Crovella, S. and Pandolfi, V.** (2017a). Snakin: Structure, roles and applications of a plant antimicrobial peptide. *Current Protein and Peptide Science*, **18**(4): 368-374.
- Oliveira-Lima, M., Maria Benko-Iseppon, A., Ribamar Costa Ferreira Neto, J., Rodríguez-Decuadro, S., Akio Kido, E., Crovella, S. and Pandolfi, V.** (2017b). Snakin: structure, roles and applications of a plant antimicrobial peptide. *Current Protein and Peptide Science*, **18**: 368-374.
- Patil, N.A., Tailhades, J., Hughes, R.A., Separovic, F., Wade, J.D. and Hossain, M.A.** (2015). Cellular disulfide bond formation in bioactive peptides and proteins. *International journal of molecular sciences*, **16**: 1791-1805.
- Porto, W.F. and Franco, O.L.** (2013). Theoretical structural insights into the snakin/GASA family. *Peptides*, **44**: 163-167.
- Rodríguez-Decuadro, S., da Rosa, G., Radío, S., Barraco-Vega, M., Benko-Iseppon, A.M., Dans, P.D., Smircich, P. and Cecchetto, G.** (2021). Antimicrobial peptides in the seedling transcriptome of the tree legume *Peltophorum dubium*. *Biochimie*, **180**: 229-242.
- Rodríguez-Decuadro, S., Ramos, S., Rodríguez-Ustra, M.J., Marques, A., Smircich, P. and Vaio, M.** (2024). Transcriptome analysis of the allotetraploids of the Dilatata group of Paspalum (Poaceae): effects of diploidization on the expression of defensin and Snakin/GASA genes. *Functional and Integrative Genomics*, **24**(6): 190.
- Samriti, Biswas, R. and Biswas, K.** (2018). Plant antimicrobial peptides: a novel approach against drug resistant microorganisms. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, **9**: 1-15.
- Savolainen, V. and Chase, M.W.** (2003). A decade of progress in plant molecular phylogenetics. *Trends in Genetics*, **19**: 717-724.
- Schmidt, N.W. and Wong, G.C.** (2013). Antimicrobial peptides and induced membrane curvature: Geometry, coordination chemistry, and molecular engineering. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, **17**: 151-163.
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T.J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Söding, J., Thompson, J.D. and Higgins, D.G.** (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology*, **7**: 539.
- Su, T., Han, M., Cao, D. and Xu, M.** (2020). Molecular and biological properties of snakins: the foremost cysteine-rich plant host defense peptides. *Journal of Fungi*, **6**(4): 220.
- Taieb Bouteraa, M., Ben Akacha, B., Kačániová, M., Čmiková, N., Ben Romdhane, W., Baazaoui, N., Soltani, N., Chouaibi, Y., Ben Hsouna, A., Garzoli, S. and Ben Saad, R.** (2024). Exploring the antimicrobial and antioxidant properties of TdGASA2 protein: From molecular insights to a promising natural preservative for Tunisian cheese shelf-life enhancement. *Food Bioscience*, **61**: 104884.
- Uncu, A.T., Patat, A.S. and Uncu, A.O.** (2024). Whole-genome sequencing and identification of antimicrobial peptide coding genes in parsley (*Petroselinum crispum*), an important culinary and medicinal Apiaceae species. *Functional and Integrative Genomics*, **24**(5): 142.
- Vural, H.C. and Dağeri, A.** (2009). Optimization of DNA isolation for RAPD-PCR analysis of selected (*Echinacea purpurea* L. Moench) medicinal plants of conservation concern from Turkey. *Journal of Medicinal Plants Research*, **3**: 16-19.
- 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**: 1154-1158.

- 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.
- Zhang, D., He, Y., Ye, Y., Ma, Y., Zhang, P., Zhu, H., Xu, N. and Liang, S.** (2019). Little antimicrobial peptides with big therapeutic roles. *Protein and Peptide Letters*, **26**: 564-578.
- Zhang, S. and Wang, X.** (2008). Expression pattern of GASA, downstream genes of DELLA, in Arabidopsis. *Chinese Science Bulletin*, **53**: 3839-3846.
- Zhang, S. and Wang, X.** (2017). One new kind of phytohormonal signaling integrator: Up-and-coming GASA family genes. *Plant Signaling & Behavior*, **12**: e1226453.
- Zimmermann, R., Sakai, H. and Hochholdinger, F.** (2010). The gibberellic acid stimulated-like gene family in maize and its role in lateral root development. *Plant Physiology*, **152**: 356-365.