مطالعه ساختار ژن دفنسین (*Def2*) گیاه شنبلیله (*Trogonella foenum-graecum*) با استفاده از فرم DNA ژنومی و cDNA

Structural Analysis of *Def2* Gene from *Trigonella foenum-graecum* by Characterization of Its Genomic and cDNA

مریم اعتباری[۱]، مصطفی مطلبی[۲*]، محمدرضا زمانی[۳] و زهرا مقدسی جهرمی[۴]

تاریخ دریافت: ۹۲/۱۰/۰۹ تاریخ پذیرش: ۹۵/۰۲/۱۴

چکیده

دفنسین‌ها که جزء خانواده پپتیدی با وزن مولکولی پایین و غنی از سیستئین می‌باشند یک گروه غالب از پروتئین‌های عمل‌کننده غشایی را تشکیل می‌دهند. این پپتیدها در حفاظت از بذر گیاهان در برابر عفونت‌های پاتوژن‌های قارچی نقش مهمی ایفا می‌کنند. در این تحقیق ژن *Def2* از گیاه شنبلیله (*Trigonella foenum-graecum*) شناسایی، همسانه‌سازی و تعیین توالی گردید. بدین‌منظور DNA ژنومی گیاه شنبلیله به روش CTAB استخراج و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی $MDef_f$ و $MDef_r$ ژن *Def2* تکثر شد. قطعه تکثیر شده به طول مورد انتظار ۷۵۰ جفت باز در ناقل pJET1.2 همسانه‌سازی شد. سازه به‌دست آمده پس از تأیید با الگوهای هضم آنزیمی و PCR به نام pJETME3 نام‌گذاری شد. جهت مطالعه ساختار این ژن، mRNA از جوانه ده روزه گیاه شنبلیله استخراج و cDNA آن سنتز شد. cDNA حاصل به طول مورد انتظار ۲۱۹ جفت باز در ناقل pJET1.2 همسانه‌سازی و پس از تأیید با استفاده از الگوی هضم آنزیمی و PCR به نام pJETME4 نام‌گذاری شده و جهت تعیین توالی مورد استفاده قرار گرفت. مقایسه توالی DNA ژنومی و cDNA این ژن نشان داد که ژن *Def2* گیاه شنبلیله حاوی یک اینترون به طول ۴۸۶ جفت باز و Open reading frame آن پپتیدی به طول ۷۲ اسیدآمینه را کد می‌کند. مقایسه توالی اسیدآمینه ای به‌دست آمده از ژن *Def2* از گیاه شنبلیله با توالی‌های مرتبط ثبت شده در بانک ژنی مورد مقایسه قرارگرفت و مشابهتی بین ۹۸/۶ تا ۱۰۰ درصد را نشان داد. از این توالی ژنی و cDNA تأیید شده مربوط به ژن *Def2* می‌توان در مراحل تحقیقاتی بعدی جهت انتقال به گیاه کلزا به‌منظور افزایش مقاومت علیه بیماری‌های قارچی استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: گیاه شنبلیله، پپتید دفنسین، *Def2*، جداسازی ژن، همسانه‌سازی

۱، ۲، ۳ و ۴. به‌ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، استادان و کارشناس ارشد پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران

*: نویسنده مسوول Email: motalebi@nigeb.ac.ir

مقدمه

در طول کشت گیاهان زراعی آسیب‌های مربوط به حمله قارچ‌ها از مهمترین عوامل کاهش محصولات کشاورزی محسوب می‌شود. مشاهدات نشان داده است که برخی گیاهان در برابر پاتوژن‌های قارچی مقاوم بوده و آسیبی به آنها وارد نمی‌شود. این گیاهان مقاوم هنگامی که در معرض پاتوژن‌ها قرار می‌گیرند سیستم دفاعی آنها فعال شده و ژن‌هایی را بیان می‌کنند که محصول این ژن‌ها پروتئین‌هایی است که منجر به مقاوم شدن گیاه در برابر پاتوژن و یا مهار رشد پاتوژن می‌گردد (*مالک و دیتریچ*؛ *مونتسانو* Maleck and Dietrich, 1999; Montesano, 2003). این پروتئین‌ها، پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی (Pathogen Related (PR) proteins) نام‌گذاری شده و براساس نوع عملکرد و ساختار به انواع مختلفی تقسیم‌بندی می‌شوند (*کاروالهو و گمز* Carvalho and Gomes, 2009) که یکی از این انواع دفنسین‌های گیاهی هستند که پپتیدهای کوچک (بین ۷۲ الی ۸۰ اسیدآمینه) با خاصیت ضدقارچی می‌باشند. این پپتیدهای ضدقارچی در بسیاری از گیاهان وجود دارند. میزان زیاد بیان این پپتیدها در خانواده Fabaceace و همچنین توالی حفاظت شده بین انواع آنها نشان‌دهنده اهمیت این پپتیدها برای گیاه می‌باشد (*الی و کرتی* Olli and Kirti, 2006). در میان اعضای خانواده Fabaceace گیاه شنبلیله دارای ۲ ژن دفنسین متفاوت می‌باشد. *الی و کرتی* نشان دادند که دفنسین‌های مذکور فعالیت ضدقارچی قابل‌توجهی را در برابر قارچ‌های *Rhisoctonia solani*، *Phaeoisariopsis personata* و *Fusarium monoliformae* نشان داده‌اند (*الی و کرتی*، 2006).

نوع و میزان فعالیت مهاری و غلظت مورد نیاز برای مهار پاتوژن، به نوع قارچ و همچنین به نوع پپتید دفنسین گیاهی بستگی دارد (*پارک* Park, 2002). به نحوی‌که برخی از آنها مانند دفنسین گیاه *Raphanus sativus* باعث مهار رشد و همچنین باعث ایجاد هیف‌های تغییر شکل یافته در قارچ‌ها می‌شود درحالی‌که دفنسین گیاه *Dahlia merckii* ضمن مهار رشد قارچ، هیچ‌گونه تغییر شکلی را ایجاد نمی‌کند (*اسبرن* Osborn, 1995).

ساختار ژنی دفنسین‌ها از دو اگزون و یک و یا دو اینترون تشکیل شده است. اگزون اول تقریباً به‌طور کامل یک پپتید سیگنال را کد می‌کند. توالی توسط یک اینترون با اندازه متغیر گسیخته می‌شود و اگزون دوم دومین اصلی دفنسین را کد می‌کند (*چن*؛ *پلگرینی*؛ *بیر و ویور* Chen, 2004; Pelegrini, 2008; Beer and Viver, 2008).

با توجه به اهمیت دفنسین در ایجاد مقاومت علیه پاتوژن‌های قارچی، هدف از این تحقیق شناسایی، تکثیر، همسانه‌سازی و بررسی ساختار ژن *Def2* گیاه شنبلیله می‌باشد که نهایتاً بتوان از آن جهت انتقال به گیاهان زراعی استفاده نمود.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق از بذور گیاه و شنبلیله (*Trigonella foenum-graecum*) استفاده شد. بذرهای این گیاه از بانک ژن گیاهی ملی ایران تهیه گردید.

روش استخراج DNA

برای تهیه برگ گیاه شنبلیله، بذور این گیاه در گلدان حاوی ورمیکولیت- پرلیت (۱:۱) کشت داده شد. پس از رشد گیاهچه‌ها، برگ‌های جوان جمع‌آوری و توسط ازت مایع به‌صورت پودر درآمده و استخراج DNA ژنومی آن به‌روش CTAB انجام شد (*دویل و دویل* Doyle and Doyle, 1987). DNA به‌دست آمده در ۵۰ میکرولیتر آب مقطر سترون حل و در ۲۰- درجه سانتی‌گراد برای استفاده بعدی نگهداری گردید.

روش استخراج mRNA

بذرهای شنبلیله در گلدان حاوی ورمیکولیت- پرلیت (۱:۱) کشت داده شد. جوانه ۱۰ روزه شنبلیله با اسید جاسمونات ۳۰ میلی‌مولار القاء شد و بعد از ۲۴ ساعت از آن نمونه‌گیری به‌عمل آمد. استخراج mRNA از جوانه‌های القاء شده، با استفاده از کیت جداسازی mRNA (mRNA Isolation Kit, Roche Co.) مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد.

طراحی آغازگرهای اختصاصی

طراحی آغازگرهای اختصاصی با نرم‌افزار Oligo5 صورت گرفت و مشخصات آغازگرهای طراحی شده جهت تکثیر ژن *Def2* که از هم‌ردیفی توالی‌های گزارش شده مربوط به گیاه شنبلیله در سایت NCBI توسط *الی و کرتی* (2002) با شماره ثبت‌های AF535089 و AY182163 استفاده شده است، به شرح زیر می‌باشد.

$MDef_f$ 5´GCTCTAGAATGGAGAAGAAATCACTAGCAG3´
$MDef_r$5´GGAGCTCTTAACATCTTTTAGTACACCAACAAC3´

شرایط انجام PCR اختصاصی

PCR اختصاصی پس از بهینه‌سازی در مخلوط واکنشی به حجم ۲۵ میکرولیتر، شامل ۲ میلی‌مولار $MgSO_4$، ۳۰ نانوگرم

DNA، ۰/۳ میکرومولار آغازگر، ۰/۲ میلی‌مولار dNTP، و ۲/۵ واحد آنزیم *Pfu*-DNA polymerase و ۵ میکرولیتر بافر (10X) (۲۰۰ میلی‌مولار Tris-HCl، pH= ۸/۸، ۱۰۰ میلی‌مولار KCl، ۱۰۰ میلی‌مولار $(NH4)_2SO_4$، ۱ درصد تریتون ۱۰۰X و یک میلی‌گرم در میلی‌لیتر از BSA) صورت گرفت. سپس واکنش برای ۳۰ دور، شامل دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۶۰ ثانیه، دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۶۰ ثانیه و در نهایت، دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۶۰ ثانیه انجام گردید. بعد از اتمام ۳۰ دور، واکنش در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفت. محصول PCR روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز گردید.

تهیه cDNA

ساخت cDNA کل با استفاده از آغازگر Oligo (dt) در حجم ۲۰ میکرو لیتر (۱۴میکرولیتر RNA، ۱ میکرولیتر آغازگر Oligo (dt)، ۲ میکرولیتر بافر RT، ۱میکرولیتر آنزیم M-Mulv (Roshe) و ۱ میکرولیتر RNase Inhibitor انجام شد. cDNA مربوط به ژن *Def2* با استفاده از آغازگرهای MDef-F/R و به‌وسیله آنزیم DNA پلی‌مراز *Pfu* (Fermentas) در شرایط ذکر شده در قبل جهت انجام کلونینگ تکثیر شد.

روش استخراج پلاسمید و کلون کردن

استخراج پلاسمید به‌روش Alkaline lysis صورت گرفت *سمبروک و راسل* (Sambrook and Russell, 2001). برای کلون کردن ژن تکثیر شده از کیت Clone JET^{TM}-PCR cloning (Frementas) استفاده شد.

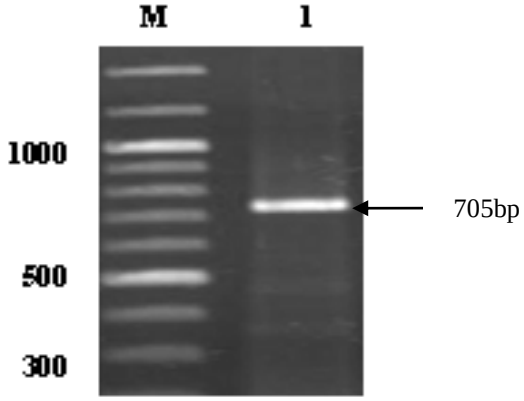
برای کلون کردن این ژن ابتدا استخراج و تخلیص محصول *Pfu*-PCR با استفاده از کیت PCR Product Purification Kit (Roche)) انجام گرفت. DNA خالص شده (فرم DNA ژنومی و cDNA) پس از ligation با وکتور pJET1.2، به سلول‌های مستعد تازه تهیه شده باکتری *E. coli* DH5α منتقل گردید. کلنی‌های حاوی وکتور نوترکیب در محیط SOB (باکتوتریپتون ۲٪، کلریدسدیم ۱۰ میلی‌مولار، عصاره باکتو- مخمر ۰/۵٪، سولفات منیزیم ۱۰ میلی‌مولار، کلریدمنیزم ۱۰ میلی‌مولار، کلریدپتاسیم ۲/۵ میلی‌مولار) حاوی ۱۰۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر آمپی‌سیلین گسترش داده شدند. در این مرحله کلونی‌های حاصله به‌عنوان کلون‌های حاوی قطعات موردنظر انتخاب گردید. قطعات کلون شده پس از تأیید توسط الگوی PCR و هضم آنزیمی جهت تعیین توالی (توسط شرکت SeqLab Gottingen, Germany) با استفاده از آغازگرهای اختصاصی pJET1.2 مورد استفاده قرار گرفت.

تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیک

بررسی مشابهت توالی ژن *Def2* با اطلاعات موجود در بانک ژنی توسط برنامه نرم‌افزاری Blast انجام شد. مقایسه توالی نوکلئوتیدی و اسیدآمینه‌ای ژن *Def2* با توالی‌های ثبت شده در بانک ژنی توسط برنامه نرم‌افزاری CLUSTAL W انجام گرفت. پیش‌بینی ساختمان سه بعدی Catalytic Core Domain آنزیم *Def2* با استفاده از برنامه SWISS-Model صورت گرفت.

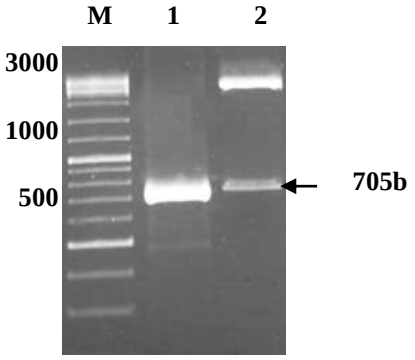
نتایج

دفنسین‌ها ازجمله پپتیدهای ضدقارچی هستند که توانایی حفاظت بذور گیاهان مختلف در مواجهه با قارچ‌های بیماری‌زا را دارا می‌باشند. این پپتیدها، بذور را هنگام جوانه‌زنی از حمله قارچ‌های بیماری‌زا حفاظت می‌کند. گیاه شنبلیله (*Trigonella foenum-graecum*) ازجمله گیاهانی است که خاصیت ضدقارچی دفنسین آن گزارش شده است (*الی و کرتی*، 2006). لذا در این تحقیق از DNA ژنومی گیاه شنبلیله جهت شناسایی و تکثیر ژن دفنسین (*Def2*) استفاده شد. آغازگرهای اختصاصی (MDef-F/R) برای تکثیر ژن کامل *Def2* با استفاده از توالی‌های مربوط به این ژن در بانک ژن طراحی و واکنش PCR با استفاده از آنزیم *pfu* پلی‌مراز انجام گرفت. طول DNA تکثیر شده توسط این آغازگرها براساس توالی مربوط به ژن *Def2* گیاه شنبلیله ۷۰۵ جفت باز مورد انتظار می‌باشد. بررسی قطعه تکثیر شده فوق در شرایط بسیار اختصاص، نشان می‌دهد که این آغازگرها، DNA با طول مورد انتظار را تکثیر می‌نمایند (شکل ۱).



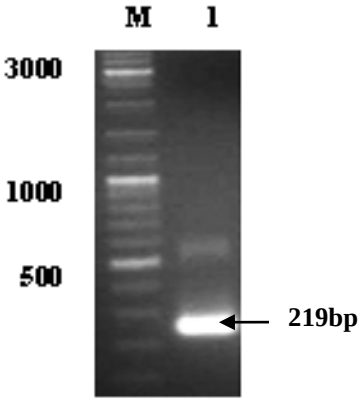
شکل ۱: تکثیر ژن *Def2* از گیاه شنبلیله با استفاده از آغازگرهای MDef-F/R (ردیف ۱)، M= مارکر 100bp ladder (Fermentas)

Fig. 1: Amplification of *Def2* gene from *Trigonella foenum-graecum* using MDef-F/R as primers, M= 100bp ladder (Fermentas)



شکل ۲: تأیید سازه نوترکیب pJETME3 حاوی فرم ژنومی ژن *Def2* توسط: ۱) الگوی PCR با استفاده از آغازگرهای MDef-F/R، ۲) الگوی هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم *Xba*I، M= مارکر 100 bp ladder (Fermentas)

Fig. 2: Confirmation of pJETME3, containing genomic DNA of *Def2* gene by 1) PCR pattern using MDef-F/R primers, 2) digestion pattern using *Xba*I, M= 100bp ladder (Fermentas)

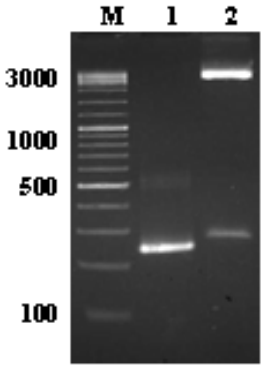


شکل ۳: تکثیر cDNA ژن *Def2* از گیاه شنبلیله با استفاده از آغازگرهای MDef-F/R (ردیف ۱)، M= مارکر 100bp ladder (Fermentas)

Fig. 3: Amplification of cDNA of *Def2* gene from *Trigonella foenum-graecum* using MDef-F/R primers, M= 100bp ladder (Fermentas)

استخراج و تخلیص محصول PCR از ژل آگارز جهت همسانه‌سازی این ژن انجام گرفت. محصول واکنش اتصال DNA خالص شده و ناقل pJET1.2 به سلول‌های مستعد تازه تهیه شده باکتری *E. coli* DH5α منتقل شد. از کلونی‌های

به‌دست آمده استخراج پلاسمید انجام شد. اندازه قطعه کلون شده توسط الگوی PCR و هضم آنزیمی تأیید شد (شکل ۲) و صحت آن با تعیین توالی مورد تأیید قرار گرفت. اطلاعات به‌دست آمده از تعیین توالی نشان داد که طول قطعه تکثیر شده مربوط به ژن *Def2* برابر ۷۰۵ جفت باز (شکل ۵) می‌باشد. سازه حاصل پس از تأیید نهایی به نام pJETME3 نام‌گذاری گردید.



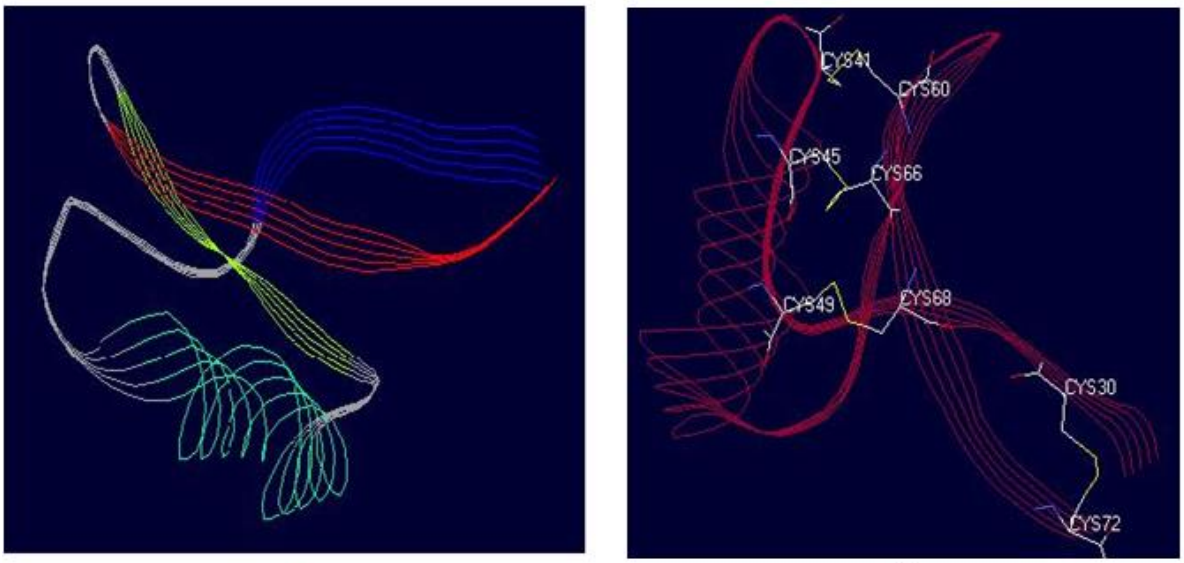
شکل ۴: تأیید سازه نوترکیب pJETME4 حاوی cDNA ژن *Def2* توسط: ۱) الگوی PCR با استفاده از آغازگرهای MDef-F/R، ۲) الگوی هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم‌های *Xba*I و *Xho*I، M= مارکر 100 bp ladder (Fermentas)

Fig. 4: Confirmation of pJETME4, containing cDNA of *Def*2 gene by 1) PCR pattern using MDef-F/R primers, 2) digestion pattern using *Xba*I and *Xho*I, M= 100bp ladder (Fermentas)

```
ATG GAG AAG AAA TCA CTA GCT GGC TTG TGC TTC CTC TTC CTC GTT
M   E   K   K   S   L   A   G   L   C   F   L   F   L   V
CTC TTT GTT GCA C gtaattaagtccatcattctttgtattaattatatactgta
L   F   V   A   Q
tttgttatatttaattatcgtcttacgtgctttttttataaaaaaaaatagagacaaaaataaataaatcaaagaagtctt
gaagacgtcaaaattatatatcaatttaatttttatatatgtctctatttttaatttttctaataatgatatttgatttttt
ttttggaacatcagagaatttgtaaataagagacataaaaaaaattctaataatgttattaaaaaatttgtattatttgtt
tttgaaagagaaaaaaaaaattagtgagtagtgacatattagtatgttagtagttttttttttttttttaaagaagtatgt
tagtagttgttaatgttagttttttgttgtgggtgggagttaaacccacaattatttttttgttaatgttataattatatc
tatatgtaatattctaatattgttgtaatggtacatgcag AA GAA ATT GTG GTG ACT GAA
                                          E   I   V   V   T   E
GCC AAA ACT TGT GAG AAT TTG GCT GAT AAA TAC AGG GGA CCA TGC
A   K   T   C   E   N   L   A   D   K   Y   R   G   P   C
TTC AGT GGC TGT GAC ACT CAT TGC ACA ACC AAA GAA CAC GCA GTT
```

شکل ۵: توالی ژن *Def2* از گیاه شنبلیله و توالی اسیدآمینه‌ای پروتئین مربوطه: توالی اگزونی با حروف بزرگ و توالی اینترونی با حروف کوچک نشان داده شده است. توالی Signal peptide به‌صورت Underline مشخص شده است

Fig. 5: Nucleotide and deduced amino acid sequences of *Def*2 gene from *Trigonella foenum-graecum*. The exon and intron sequences are shown in capital and small letters respectively. Signal peptide sequence is underlined



شکل ۶: ساختار فضایی پپتید DEF2 گیاه شنبلیله. ۱) نمایانگر مارپیچ A وصفحات B، ۲) نمایش پیوندهای دی سولفیدی درون رشته‌ای در پپتید DEF2

Fig. 6: 3D structure of Def2 peptide from *Trigonella foenum-graecum.* 1) α-helix and β-sheet structures, 2) demonstration of disulfide bond in Def2 peptide

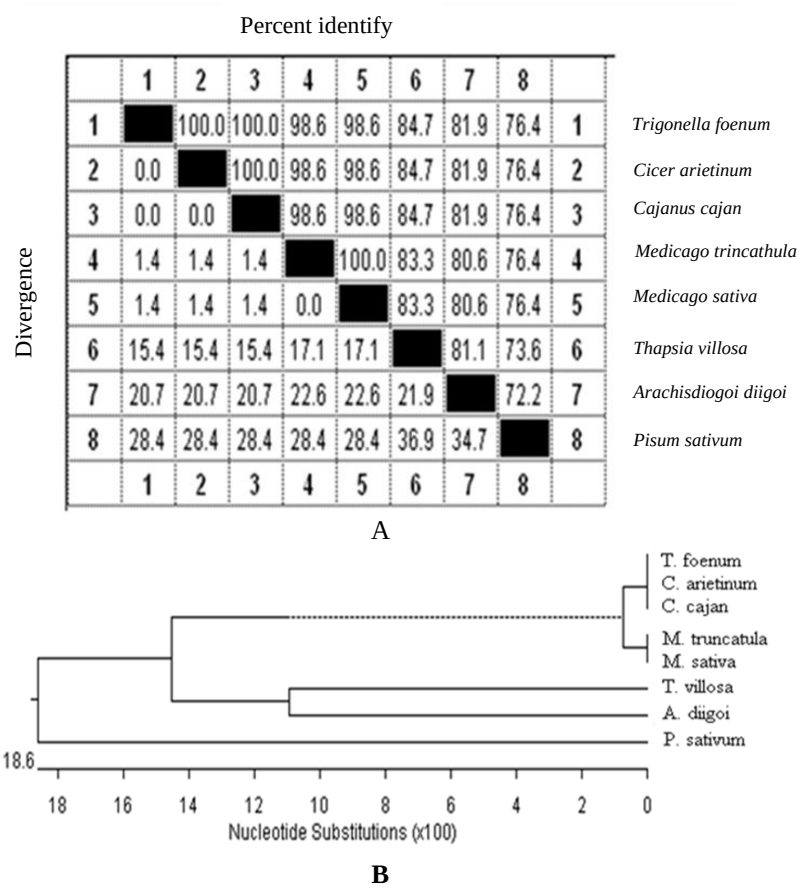
جهت استخراج mRNA از جوانه ۱۰ روزه گیاه شنبلیله که توسط اسید جاسمونیک القاء شد استفاده گردید. سپس RT-PCR و سنتز cDNA جهت بررسی حضور اینترون ژن *Def2* انجام گرفت. بدین‌منظور با استفاده از پرایمر Oligo (dt)18 و آنزیم Reverse Transcriptase اولین رشته از cDNA سنتز گردید. سپس توسط آغازگرهای اختصاصی MDef-F/R و آنزیم *Pfu* پلی‌مراز، cDNA تهیه گردید. نتایج به‌دست آمده نشان داد که cDNA به‌دست آمده به طول ۲۱۹ جفت باز تکثیر شده است (شکل ۳). cDNA سنتز شده نیز در ناقل pJET1.2 همسانه‌سازی و پس از تأیید توسط الگوی PCR و هضم آنزیمی (شکل ۴) به نام pJETME4 نام‌گذاری و جهت تعیین توالی قطعه کلون شده استفاده گردید. توالی به‌دست آمده نشان داد که طول cDNA این ژن که در برگیرنده ORF آن می‌باشد با احتساب کدون خاتمه برابر ۲۱۹ جفت باز می‌باشد.

مقایسه توالی‌های ژنومی و cDNA ژن *Def2* شنبلیله نشان می‌دهد که ژن مذکور دارای یک اینترون به طول ۴۸۶ جفت باز می‌باشد. توالی اینترون از نوکلئوتیدهای ۵۹ الی ۵۴۴ در توالی ژن *Def2* واقع شده است (شکل ۵).

مقایسه توالی DNA ژنومی با توالی cDNA ژن *Def2* به‌دست آمده در این تحقیق نشان می‌دهد که این ژن یک پلی‌پپتید به طول ۷۲ اسید آمینه (شکل ۵) با وزن مولکولی ۸/۲ کیلودالتون را کد می‌نماید.

بررسی ساختار فضایی پپتید دفنسین شنبلیله نشان می‌دهد که طول این پپتید ۷۲ اسیدآمینه می‌باشد. این پپتید از دو قسمت پپتید نشانه (۲۷ اسید امینه) و پپتید بالغ (۴۵ اسید آمینه) تشکیل شده است. پپتید بالغ دارای ۸ اسیدآمینه سیستئین بوده که در موقعیت اسیدآمینه‌های ۳۰، ۴۱، ۴۵، ۴۹، ۶۰، ۶۶، ۶۸ و ۷۲ در پپتید واقع شده‌اند و منجر به شکل‌گیری ۴ پیوند دی‌سولفیدی درون‌رشته‌ای می‌گردند که این به نوبه‌خود پایداری ساختار سه بعدی پپتید را به‌دنبال دارد. این پیوندهای دی‌سولفیدی موتیف CSαβ را شکل می‌دهند. همان‌طورکه مشاهده می‌شود این پپتید دارای یک مارپیچ α و ۳ صفحه β می‌باشد (شکل ۶).

مقایسه توالی اسیدآمینه به‌دست آمده از ژن دفنسین با توالی‌های ثبت شده در بانک ژنی با استفاده از برنامه CLUSTAL W نشان داد که این پپتید با پپتید دفنسین گیاهان *Cajanus cajan* و *Cicer ariethinum* به میزان ۱۰۰ درصد و با دفنسین گیاهان *Medicago sativa* و *M. truncatula* به میزان ۹۸/۶ شباهت دارد (شکل ۷).



شکل ۷: A) درصد مشابهت و تفاوت توالی اسید آمینه‌ای پپتید Def2 از گیاه شنبلیله، با توالی اسید آمینه‌ای پپتیدهای مشابه در بانک ژنی، B) درخت ژنی حاصل از آنالیز توالی های اسید آمینه‌ای دفنسین گیاهان *Trigonella foenum*، *Cicer arietinum*، *Cajanus cajan*، *Medicago trincathula*، *M. sativa*، *Thapsia villosa*، *Arachisdiogoi diigoi* و *Pisum sativum*

Fig. 7: A) Percentage of sequence similarity and divergence between amino acid sequence of Def2 peptide and those of other plant defensins in GenBank. B) Phylogenetic tree and sequence distances of Def2 amino acid sequences comparing with defensins from *Trigonella foenum, Cicer arietinum, Cajanus cajan, Medicago trincathula, M. sativa, Thapsia villosa, Arachisdiogoi diigoi and Pisum sativum*

بحث

فعالیت‌های بیولوژیکی متنوع دفنسین‌های گیاهی ازجمله توانایی بالقوه آنها در مهار رشد پاتوژن‌های قارچی *الی و کرتی* (2006)، فعالیت‌های ضدمیکروبی و حتی فعالیت ضدانگلی، آنها را به‌عنوان کاندیداهای مناسبی برای استفاده در مهندسی ژنتیک و تولید گیاهان تراریخت مقاوم به آفات و بیماری‌ها مطرح می‌کند. دفنسین‌ها جزء خانواده پپتیدی با وزن مولکولی پایین و غنی از سیستئین می‌باشند و یک گروه غالب از پروتئین‌های عمل‌کننده غشایی را تشکیل می‌دهند. این گروه از پروتئین‌ها در پستانداران، حشرات و گیاهان یافت شده‌اند *تیس و استال* (Theis and Stahl, 2004). همچنین این پپتیدها در حفاظت از بذر گیاهان در برابر عفونت‌های پاتوژن‌های قارچی نقش مهمی ایفا می‌کنند *بروئکارت* (Broekaert, 1997) .

با توجه به اهمیت ژن‌های دفنسین، شناسایی و کلون کردن و مطالعه این ژن‌ها به‌منظور استفاده از آنها برای انتقال به گیاه جهت ایجاد مقاومت در مقابل پاتوژن‌های قارچی ضروری می‌باشد. در این تحقیق از گیاه شنبلیله که در گزارشات نشان داده شده است که دارای فعالیت ضدقارچی بالایی می‌باشد (۴۷ و ۴۸ پ)، ژن *Def2* در دو فرم ژنومی و cDNA شناسایی، تکثیر، کلون و تعیین توالی گردید. مطالعه ساختار این ژن نشان داد که فرم ژنومی این ژن دارای طولی برابر ۷۰۵ نوکلئوتید و یک اینترون به طول ۴۸۶ نوکلئوتید می‌باشد. مقایسه توالی اسید آمینه‌ای این ژن با ژن دفنسین گیاهان *Cicer ariethinum* و *Cajanus cajan* گزارش شده توسط *الی و کرتی* (2002 و 2003) نشان داد که این دو ژن ۱۰۰ درصد مشابهت دارند ضمن اینکه با دفنسین گزارش شده از گیاه *Medicago sativa* توسط *هانکز* و همکاران (2005) و گیاه *M. truncatula* توسط *اسپلبرینک* و همکاران (2004) ۹۸/۶ درصد شباهت را نشان می‌دهد.

اغلب دفنسین‌های گیاهی کدکننده پلی‌پپتیدی هستند که به دو بخش تقسیم می‌شود. بخش اول پپتید نشانه‌ای است که

در انتهای آمینی‌پلی پپتید قرار دارد و پپتید را به فضای خارج سلولی راهنمایی می‌کند. بخش دوم، بخش پپتید بالغ است که نقش دفاعی را بر عهده دارد.

بخش پردازش شده دفنسین بالغ، دارای ۴۵-۵۵ اسید آمینه بوده که دارای وزن مولکولی ۵-۷ کیلودالتون می‌باشد. مشخصاً ۸ اسید آمینه سیستئین به‌صورت حفاظت شده در داخل توالی این پپتیدها وجود داشته که منجر به ایجاد ۴ پیوند دی‌سولفیدی درون رشته‌ای می‌شود که این به نوبه خود باعث پایداری ساختار سه بعدی پپتید می‌گردد. این پیوندهای دی-سولفیدی درون رشته‌ای، موتیف CSαβ را شکل می‌دهند. وجود این موتیف در پپتیدهای دارای نقش ضدمیکروبی به‌طور گسترده به اثبات رسیده است *میکلسون* (Michaelson, 1992).

در پپتیدهای بالغ دفنسین به استثنای اسیدهای آمینه سیستئین، توالی اسیدهای آمینه دیگر عمدتاً متغیر می‌باشند. علت این امر احتمالاً به‌دلیل تکامل سریع پپتیدهای ضدمیکروبی که خود ناشی از رقابت فشرده بین پاتوژن‌ها است، می‌باشد (*میکلسون*، 1992).

مطالعات منتشر شده نشان می‌دهد که از ژن‌های دفنسین به‌دست آمده از برخی گیاهان جهت انتقال به گیاهان زراعی استفاده شده است و نشان داده شده است که این ژن‌ها دارای فعالیت ضدقارچی بسیار قوی بوده و قادرند علیه چندین بیماری قارچی مقاومت مطلوبی را ایجاد نمایند *گائو*؛ *کانزاکی*؛ *ژو* (Gao, 2000; Kanzaki, 2002; Zhu, 2007). مطالعات مختلف نشان می‌دهد که گیاهان زراعی مهمی نظیر گندم، کلزا، چغندرقند و نیشکر *لی*؛ *ونگ و انجی*؛ *مونتیرو*؛ *تیس و استال*؛ *بکر و اسپل* (Leah, 1991; Wang and Ng, 2001; Monteiro, 2003; Theis and Stahl, 2004; Beckers and Spoel, 2006) در معرض بیماری‌های قارچی قرار می‌گیرند و خسارات بسیار زیادی را متحمل می‌شوند. ژن *Def2* مورد مطالعه در این تحقیق که از گیاه شنبلیله شناسایی و کلون شده است می‌تواند با استفاده از ناقل‌های بیانی گیاهی مناسب، جهت انتقال به گیاهان زراعی ایران که در معرض بیماری‌های قارچی می‌باشند مورد بهره‌برداری قرار گیرد.

منابع:

جهت مطالعه منابع به صفحه ۲۱-۲۰ متن انگلیسی مراجعه شود.