

شناسایی و تحلیل بیوانفورماتیکی ژن‌های ضد میکروبی دیفنسین از شش ژنوتیپ گیاه عدس

رضا میر دریکوند^{۱*}، سید محسن سهرابی^۲، کامران سمیعی^۳

۱. استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، واحد خرم‌آباد، دانشگاه آزاد اسلامی، خرم‌آباد، ایران،
۲. محقق، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد خرم‌آباد، دانشگاه آزاد اسلامی، خرم‌آباد، ایران
۳. استادیار، گروه کشاورزی، واحد کنگاور، دانشگاه آزاد اسلامی، کنگاور، ایران
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۲/۲ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۷/۱/۲۹)

Identification and molecular cloning of defensin antimicrobial genes from six lentil genotypes

Reza Mir Derikvand^{1*}, Seyyed Mohsen Sohrabi², Kamran Samiei³

1. Assistant Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Khorramabad Branch, Islamic Azad University, Khorramabad, Iran
2. Researcher, Young Researchers and Elite Club, Khorramabad branch, Islamic Azad University, Khorramabad, Iran
3. Assistant Professor Department of Agronomy and Plant Breeding, Kangavar Branch, Islamic Azad University, Iran
(Received: Apr. 22, 2017 - Accepted: Apr. 18, 2018)

Abstract

Plant defensins are a large family of cysteine-rich antimicrobial peptides. These peptides are small molecules with molecular mass between 5 and 7kD and eight conserved cysteines that are involved in disulfide bond formation. In the present study, some members of defensin gene family were isolated and characterized from lentil genotypes. All coding sequences of the defensin genes of dicotyledon plants were retrieved from GenBank. The retrieved coding sequences were aligned against lentil EST library and the resulted sequences were pooled and assembled. The resulted contigs and singletons were aligned against GenBank nr database using BLASTn tool. The contigs and singletons with the full open reading frame were used to primer design. In the next step, DNA extraction was performed from Gachsaran, Mahali, Filip2003-2L, Filip2003-9L, Filip2005-2L and Filip2006-10L genotypes. Finally, by using PCR, genomic sequence of defensins were amplified, cloned into pTZ57R/T plasmid and sequenced. The results showed complete identity among the isolated defensins from all genotypes. The identified genes also contain conserved introns with variable length that comprised of regulatory elements for response to different factors and conditions. For first time in this study, genomic sequences of three members of defensin gene family were isolated from lentil genotypes and structures and features of them were determined.

Keywords: Antimicrobial peptides, defensins, gene isolation, intron, lentil.

چکیده

دیفنسین‌های گیاهی، خانواده‌ای بزرگ از پپتیدهای ضد میکروبی غنی از سیستئین هستند. این پپتیدها، مولکول‌هایی با جرم مولکولی ۵ تا ۷ کیلودالتون و دارای هشت آمینه سیستئین محافظت شده هستند که در ایجاد پیوندهای دی‌سولفیدی نقش دارند. در این پژوهش برخی اعضای خانواده ژنی دیفنسین در ژنوتیپ‌های مختلف گیاه عدس جداسازی و بررسی شدند. ابتدا، تمام توالی‌های کد کننده ژن‌های دیفنسین گیاهان دو لپه‌ای از بانک ژن دریافت شد. توالی‌های کد کننده دریافت شده، در کتابخانه EST گیاه عدس هم‌ردیف و نتایج حاصل با هم مخلوط و سر هم‌بندی شدند. کانتیگ‌ها و سینگلتون‌های حاصل از سرهم‌بندی با استفاده از ابزار BLASTn. علیه پایگاه داده nr هم‌ردیف شدند. از کانتیگ‌ها و سینگلتون‌های دارای چارچوب خوانش باز کامل دیفنسین برای طراحی آغازگرها استفاده شد. در مرحله بعدی، از ژنوتیپ‌های گچساران، محلی، Filip2003-2L، Filip2003-9L، Filip2005-2L و Filip2006-10L گیاه عدس استخراج DNA صورت گرفت. در نهایت، توالی ژنومی دیفنسین‌ها با استفاده از واکنش PCR تکثیر شد و پس از همسانه‌سازی در ناقل pTZ57R/T مورد توالی‌یابی قرار گرفت. نتایج، شباهت کامل را در دیفنسین‌های جداسازی شده از ژنوتیپ‌های مورد بررسی نشان داد. ژن‌های شناسایی شده همچنین دارای اینترون‌هایی با طول متغیر بودند که ساختاری محافظت شده داشتند و حاوی عناصر تنظیمی برای پاسخ به عوامل و شرایط مختلف بودند. در این پژوهش برای اولین بار، توالی ژنومی سه ژن از ژن‌های خانواده دیفنسین از ژنوتیپ‌های مختلف گیاه عدس جداسازی و ساختار و ویژگی‌های آن‌ها مشخص شد.

واژه‌های کلیدی: اینترون، دیفنسین‌ها، پپتیدهای ضد میکروبی، جداسازی ژن، عدس.

مقدمه

عدس (*Lens culinaris* L.) گیاهی دیپلوئید ($2n=2x=14$) خودگشن از تیره (Fabacea) و یکی از مهم‌ترین گیاهان زراعی جهان است. عدس با دارا بودن حدود ۲۵ درصد پروتئین، یکی از مهم‌ترین و قدیمی‌ترین منابع غذایی بشر محسوب می‌گردد. عدس در میان حبوبات بعد از سویا بیشترین مقدار پروتئین و کمترین میزان روغن را داشته و یکی از قابل هضم‌ترین پروتئین‌های گیاهی بوده لذا مصارف انسانی آن به سرعت افزایش یافته است. از طرفی بقایای گیاه عدس شامل ساقه، کاه و کلش و پوسته غلاف آن دارای ارزش غذایی بالایی بوده و برای مصرف دام‌های اهلی مناسب است. به علت وجود پروتئین بالا، مواد معدنی، فیبر و کربوهیدرات‌ها منبع غذایی مهمی برای انسان بوده و نقش حیاتی را در جبران عدم تغذیه و سوء تغذیه در کشورهای فقیر و در حال توسعه دارد (Muehlbauer *et al.*, 2006; Yadav *et al.*, 2007; Srivastava and Vasishtha, 2012).

پیتیدهای ضد میکروبی، پیتیدهایی با جرم مولکولی پایین هستند که در تمامی ارگانسیم‌های زنده مانند باکتری‌ها، قارچ‌ها، گیاهان و جانوران یافت می‌شوند. این پیتیدها طولی کمتر از ۱۰۰ اسید آمینه داشته و از تنوع ساختاری و عملکردی بسیار بالایی برخوردار هستند. تا به حال چندین هزار نوع پیتید ضد میکروبی طبیعی از موجودات مختلف شناسایی شده و هزاران مورد آنالوگ پیتیدی بر اساس آن‌ها به طور مصنوعی ساخته شده است (Lavery *et al.*, 2011). پیتیدهای ضد میکروبی در پاسخ به پاتوژن‌ها به همراه سایر ترکیبات ضد میکروبی به عنوان بخشی از مکانیسم دفاع عمومی وارد عمل می‌شوند (Holaskova *et al.*, 2015). این پیتیدها، همچنین پیتیدهای آنتی‌بیوتیک نیز نامیده می‌شوند و برای محافظت از گیاهان و همچنین درمان بیماری‌های عفونی انسان مطرح شده‌اند (Holaskova *et al.*, 2015; Elsbach, 2003; Hoskin and

Ramamoorthy, 2008). تاکنون روش‌های مختلفی برای نحوه‌ی عمل پیتیدهای ضد میکروبی پیشنهاد شده است که از آن جمله می‌توان به برهمکنش با غشاهای میکروبی و تخریب آن‌ها، القاء نشت محتویات سیتوپلاسم سلول، به هم زدن قطبیت غشاء و آسیب به پروسه‌های درون سلولی اشاره کرد (Cools *et al.*, 2017).

پیتیدهای ضد میکروبی گیاهی، بر اساس ساختار خود به گروه‌های متنوعی شامل تیونین‌ها، نوتین‌ها، سیکلوتیدها، هوئین‌ها، اسنیکین‌ها و دیفنسین‌ها تقسیم‌بندی می‌شوند. دیفنسین‌ها گروهی از این پیتیدها هستند که، پیتیدهایی کاتیونی با جرم مولکولی پایین و با طولی بین ۴۵ تا ۵۴ اسید آمینه بوده و تعداد ۶ تا ۸ اسید آمینه سیستئین حفاظت شده دارند که ۳ تا ۴ پیوند دی‌سولفیدی را ایجاد می‌کنند. دیفنسین‌های گیاهی از لحاظ عملکردی و ساختاری مشابه پیتیدهای ضد میکروبی پستانداران و حشرات هستند و نقش آن‌ها در ایمنی میزبان ثابت شده است. دیفنسین‌ها بخشی از سیستم دفاعی گیاهی بوده و در زمان حمله پاتوژن‌ها به گیاه القاء شده و باعث افزایش مقاومت گیاه می‌شوند. این پیتیدهای ضد میکروبی در تمام گیاهان وجود داشته و از تنوع بالایی برخوردار هستند. دیفنسین‌ها برای اولین بار از بذور گیاهان جداسازی شدند و بعد از آن در اندام‌هایی مانند برگ و گل‌ها نیز شناسایی شدند. پیتیدهای ضد میکروبی دیفنسین به طور دائم در اندام‌های ذخیره‌ای بیان شده و در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیر زیستی و موادی مانند متیل جاسمونات، اسید سالیسیلیک و اتیلن القاء و تولید می‌شوند. این پیتیدها ابتدا در سال ۱۹۹۰ از آندوسپرم بذور گیاهان گندم و جو شناسایی و جداسازی شدند و پس از آن از گیاهان مختلفی مانند تربچه، یونجه، عدس، شنبلیله، خرما، انگور، آرابیدوپسیس، نخود، لویا و گندم جداسازی شده‌اند (Thomma *et al.*, 2002; Janssen *et al.*, 2003).

گیاه عدس (۹۵۳۹ مورد EST) از پایگاه NCBI دریافت شد. از EST‌های گیاه عدس در نرم‌افزار CLC Genomics Workbench 9.0 یک پایگاه داده تولید شد. در مرحله‌ی بعد، تمام توالی‌های نوکلئوتیدی ژن‌های دیفنسین گیاهان دو لپه‌ای (۵۸۳ توالی) از بانک ژن پایگاه NCBI دریافت شد. سپس، ۵۸۳ توالی ژنی دیفنسین علیه پایگاه داده ایجاد شده در نرم‌افزار CLC Genomics Workbench 9.0، مورد هم‌ردیفی قرار گرفتند. توالی‌های EST حاصل از هم‌ردیفی با هم مخلوط و ذخیره شدند. با استفاده از دو نرم‌افزار CLC Genomics Workbench 9.0 و Vector NTI 11.0، توالی‌های EST ذخیره شده سرهم‌بندی شدند و کانتیگ‌هایی با طول معین ایجاد کردند. سرهم‌بندی توالی‌های EST با پارامترهای شباهت بیشتر از ۹۸ درصد و طول بیشتر از ۲۰۰ جفت باز انجام شد. چارچوب‌های خوانش باز (ORF) در کانتیگ‌ها با استفاده از ابزارهای ORF Finder و CDD موجود در پایگاه NCBI و نرم‌افزارهای CLC Genomics Workbench 9.0 و Vector NTI 11.0 پیش‌بینی شدند (Marchler-Bauer *et al.*, 2010). پس از تعیین قاب صحیح خوانش باز در کانتیگ‌ها، با استفاده از نرم‌افزار Vector NTI 10.3 توالی‌های نوکلئوتیدی آن‌ها در چارچوب خوانش باز اختصاصی خود به پروتئین ترجمه شد. سپس با استفاده از ابزارهای CDD موجود در پایگاه NCBI، Interproscan و Pfam دامین‌های عملکردی موجود در این توالی‌ها مشخص شد (Marchler-Bauer *et al.*, 2014; Jones *et al.*, 2014; Finn *et al.*, 2016). دامین‌های عملکردی تأیید شده به وسیله‌ی سه ابزار محاسباتی مذکور بعنوان دامین‌های اصلی انتخاب شدند. با استفاده از ابزارهای SignalP، Phobius و CELLO وجود یا عدم وجود سیگنال پپتید در پروتئین‌ها و همچنین محل تجمع پروتئین‌ها مشخص شد (Yu *et al.*, 2014; Nielsen 2017). از کانتیگ‌های با چارچوب‌های خوانش باز کامل،

ژنوم عدس اندازه‌ای در حدود ۴ میلیارد جفت باز دارد و توالی‌یابی ژنوم آن در حال انجام است که منجر به ایجاد یک توالی اولیه شده است. با این حال، این توالی اولیه مستندسازی ژنی و دسترسی محدودی دارد. آنالیزهای دیگری در جریان است تا توالی اولیه بهبود پیدا کرده و ژنوم مرجع عدس ایجاد شود (Kumar *et al.*, 2015). حجم بالای اطلاعات مختلف ژنومیک و ترانسکریپتومیک موجودات مختلف که امروزه در دسترس محققین است به همراه دسترسی آسان به ابزارهای مختلف محاسباتی و بیوانفورماتیکی، شناسایی، جداسازی و بررسی ویژگی ژن‌های مختلف را در کوتاه‌ترین زمان ممکن و به سادگی امکان‌پذیر کرده است. با استفاده از این امکانات مختلف می‌توان قبل از شروع فعالیت آزمایشگاهی، ژن یا ژن‌های مورد نظر را به صورت *in silico* شناسایی و ویژگی‌ها و فعالیت‌های آن‌ها را شبیه‌سازی کرد (Periwal and Scaria, 2014; Bao *et al.*, 2014; Gill and Sanseau 2000). با توجه به محدودیت دسترسی به توالی اولیه ژنوم عدس و مستندسازی کامل آن، برای شناسایی ژن‌های جدید در این گیاه باید از داده‌های ترانسکریپتومی مانند پایگاه‌های EST و توالی‌یابی نسل بعدی کمک گرفت. با استفاده از این داده‌ها، می‌توان ژن‌های مورد نظر را شناسایی و جداسازی کرد و برای اهداف اصلاحی عدس از طریق اصلاح نباتات کلاسیک یا روش‌های نوین بیوتکنولوژی به کار برد. در پژوهش حاضر، با استفاده از روش‌های بیوانفورماتیکی توالی کدکننده کامل برخی اعضاء خانواده ژنی دیفنسین، از کتابخانه‌های EST گیاه عدس شناسایی شد. سپس با استفاده از روش‌های آزمایشگاهی، وجود این ژن‌ها و همچنین ساختار آن‌ها در برخی ارقام این گیاه مشخص شد.

مواد و روش‌ها

شناسایی بیوانفورماتیکی

در مرحله‌ی اول این تحقیق، تمام EST‌های مربوط به

برای طراحی آغازگرها استفاده شد. آغازگرها با استفاده از دو نرم‌افزار Vector NTI 11.0 و Allele ID 7.0 طراحی شدند. توالی و خصوصیات آغازگرهای طراحی شده در جدول ۱ ارائه شده است.

کمیت DNA استخراج شده با استفاده از ژل آگاروز یک درصد و دستگاه نانودراپ تعیین و DNA استخراج شده پس از رقیق‌سازی برای کاربردهای بعدی در دمای مناسب نگهداری شد.

کشت گیاهان، نمونه برداری و استخراج DNA

بذور ژنوتیپ‌های گچساران، رقم محلی و لاین‌های امید بخش Filip2003-2L، Filip2003-9L، Filip2005-2L و Filip2006-10L، گیاه عدس (*L. culinaris*) از مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی لرستان تهیه و در گلدان‌هایی با ترکیب رس و کود حیوانی (نسبت ۱:۱) کشت شدند. گلدان‌های کشت شده به مدت سه هفته در شرایط مناسب گلخانه‌ای نگهداری شدند. بعد از گذشت سه هفته، بافت‌های گیاهچه‌های کشت شده در نیتروژن مایع قرار گرفته و برای استخراج DNA مورد استفاده قرار گرفتند. استخراج DNA کل از بافت‌ها، با استفاده از روش Doyle انجام شد (Doyle, 1987). کیفیت و

تکثیر و همسانه‌سازی ژن‌ها

از DNA ژنومی استخراج شده از ارقام مختلف گیاه عدس، به عنوان الگو در واکنش PCR استفاده شد. واکنش PCR با استفاده از آنزیم *Taq* پلی‌مراز شرکت سیناژن انجام شد. اجزا و مقادیر واکنش PCR و همچنین شرایط دمایی آن به ترتیب در جدول ۲ و جدول ۳ ارائه شده است. پس از انجام واکنش PCR، محصولات در ژل آگاروز ۱ درصد بارگذاری و تأیید اندازه شدند. پس از بررسی نتایج و تأیید اندازه قطعات تکثیری روی ژل آگاروز، قطعات مورد نظر با استفاده از کیت استخراج از ژل شرکت Thermo Fisher Scientific طبق دستورالعمل شرکت سازنده، خالص‌سازی شدند.

جدول ۱. آغازگرهای مورد استفاده

نام آغازگر	توالی آغازگر	دمای اتصال (درجه سانتی‌گراد)
<i>Defensin</i> 1-F	5'-AGAAATCAGTAGGTGCTTGTC-3'	۵۲/۹
<i>Defensin</i> 1-R	5'-TATATTATGCGTCTTGATTGGAG-3'	
<i>Defensin</i> 3-F	5'-TGGATTATGGGGAGGAAAAC-3'	۵۴/۳
<i>Defensin</i> 3-R	5'-GCATGTCCATTGTTGAACTAAC-3'	
<i>Defensin</i> 6-F	5'-TGGCTCGTTCAATTCCTATG-3'	۵۳/۵
<i>Defensin</i> 6-R	5'-ATTAACAATGTGTAGTACAGAAAAC-3'	

جدول ۲. اجزا و مقادیر واکنش PCR

اجزا	مقادیر
Buffer (10X)	2.5 µl
dNTPs (10 mM)	0.5 µl
Forward Primer (10 µM)	1 µl
Reverse Primer (10 µM)	1 µl
<i>Taq</i> (2.5 u/µl)	0.5 µl
Template	1 µl
DDW-Water	to 25 µl

جدول ۳. شرایط دمایی واکنش PCR

مدت	دما (درجه سانتی‌گراد)	مرحله واکنش
۱۰ دقیقه	۹۴	واسرشته‌سازی اولیه
۳۰ ثانیه	۹۴	واسرشته‌سازی
۳۰ ثانیه	دمای اتصال هر جفت آغازگر (جدول ۱)	اتصال
۵۰ ثانیه	۷۲	گسترش
۳۰ دقیقه	۷۲	گسترش نهایی

پیش‌بینی نواحی تنظیمی اینترون‌ها

نواحی تنظیمی احتمالی موجود در اینترون‌ها، با استفاده از ابزارهای PlantCARE و PlantPAN مورد پیش‌بینی قرار گرفت. در این ابزارها مجموعه‌ای از نواحی تنظیمی و عناصر متصل شونده‌ی به آن‌ها وجود دارند. توالی‌های بالادست و پایین دست ژنی و همچنین توالی‌های اینترونی ژن‌ها با نواحی تنظیمی موجود در این ابزارها و با استفاده از الگوریتم‌های خاص، مقایسه شده و نواحی تنظیمی با اطمینان بالای موجود در آن‌ها شناسایی می‌شوند. تنها نواحی به عنوان نواحی تنظیمی ژنی توسط این ابزارها پیش‌بینی می‌شوند که از حدود اطمینان کافی برخوردار باشند (Lescot *et al.*, 2002; Chang *et al.*, 2008).

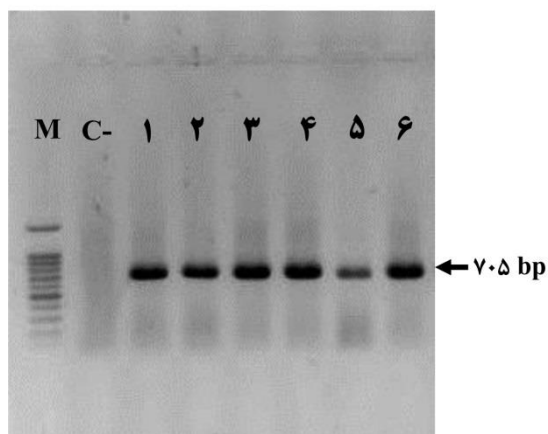
نتایج و بحث

نتایج تکثیر با استفاده از واکنش PCR وجود قطعاتی به طول ۳۴۷، ۳۱۵ و ۷۰۵ جفت باز را به ترتیب برای ژن‌های *Defensin 1*، *Defensin 3* و *Defensin* 6 در تمامی ژنوتیپ‌های مورد بررسی گچساران، محلی، Filip2003-2L، Filip2003-9L، Filip2005-2L و Filip2006-10L نشان داد (شکل ۱-۳). تجزیه و تحلیل نتایج توالی‌یابی صحت جداسازی ژن‌های *Defensin 1*، *Defensin 3* و *Defensin 6* را در تمام ژنوتیپ‌های مورد بررسی گچساران، محلی، Filip2003-2L، Filip2003-9L، Filip2005-2L و Filip2006-10L نشان داد. دیفنسین‌های جداسازی شده از ژنوتیپ‌های گچساران، محلی، Filip2003-2L، Filip2003-9L، Filip2005-2L و Filip2006-10L دارای چارچوب‌های خوانش بازی در محدوده‌ی ۲۲۲ تا ۲۲۵ جفت باز بودند. ابتدا تصور می‌شد که دیفنسین‌های گیاهی تعداد ژن‌های محدودی در ژنوم گیاهان دارند و متعلق به یک خانواده چند ژنی کوچک هستند. در تحقیقات بعدی مشخص شد که دیفنسین‌های گیاهی

پس از تکثیر و خالص‌سازی، قطعات خالص‌سازی شده مربوط به هر ژن، به همراه پلاسمید pTZ57R/T شرکت Thermo Fisher Scientific در واکنش‌های اتصال وارد و با استفاده از آنزیم T4 شرکت Thermo Fisher Scientific به هم متصل شدند. پلاسمیدهای pTZ57R/T نو ترکیب حاصل، با استفاده از کیت همسانه سازی شرکت Thermo Fisher Scientific به سویه DH5 α از باکتری *E. coli* انتقال پیدا کردند. پس از گذشت مدت یک شبانه روز، کلنی‌های سفید روی محیط LB جامد حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر انتخاب شدند و برای واکنش کلنی PCR مورد استفاده قرار گرفتند. واکنش کلنی PCR، با استفاده از آغازگرهای اختصاصی مربوط هر ژن (جدول ۱)، برای تأیید همسانه‌سازی انجام شد. از کلنی‌های مثبت حاوی پلاسمیدهای نو ترکیب pTZ57R/T، کشت‌هایی در محیط LB مایع داده شد. استخراج پلاسمید از کشت‌های باکتریایی با استفاده از کیت استخراج پلاسمید شرکت Thermo Fisher Scientific انجام شد. پلاسمیدهای نو ترکیب pTZ57R/T حاوی قطعات مورد نظر، برای توالی‌یابی به شرکت Bioneer ارسال شدند و توالی‌یابی با استفاده از آغازگرهای عمومی M13 انجام گرفت.

تجزیه و تحلیل نتایج توالی‌یابی

نتایج توالی‌یابی پس از ویرایش اولیه، با استفاده از نرم‌افزارهای CLC Genomics Workbench 9.0، Vector NTI 10.3 سرهم‌بندی شدند. کانتینگ‌های ایجاد شده، با استفاده از ابزار BLAST_n موجود در NCBI علیه بانک ژن مورد هم‌ردیفی قرار گرفتند. در این مرحله صحت اولیه جداسازی ژن‌های مورد نظر بررسی شد. به منظور بررسی نواحی اینترونی و اگزونی، از ابزار FGENESH استفاده شد (Solovyev *et al.*, 2006).

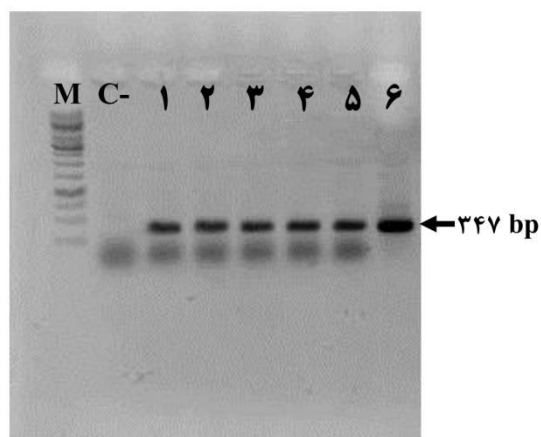


شکل ۳. تصویر الکتروفورزی محصولات PCR ژن *Defensin 6* در ژنوتیپ‌های مختلف. M- نشانگر مولکولی 100 bp، C- کنترل منفی، ۱- گچساران، ۲- محلی، ۳- Filip2003-2L، ۴- Filip2003-9L، ۵- Filip2005-2L و ۶- Filip2006-10L.

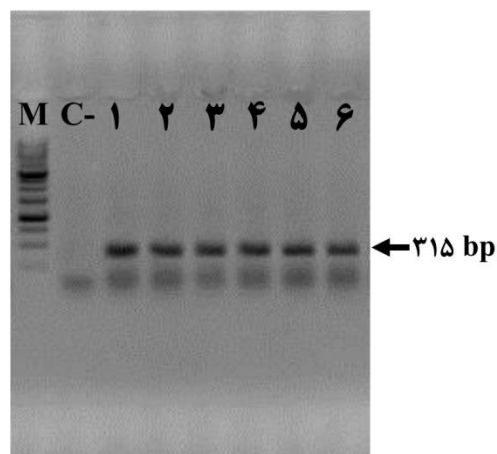
جستجوی دمین‌های عملکردی، وجود دمین عملکردی Knot1 از خانواده Gamma-thioninها را با میزان اطمینان بالا در ساختار تمام پپتیدهای شناسایی شده، مشخص کرد. دمین Knot1 نوعی تاخوردگی پایدار غنی از سیستین از خانواده Gamma-thioninها است که در دیفنسین‌های گیاهی و دیفنسین‌های بندپایان یافت می‌شود (Pelegriani and Franco 2005).

نتایج هم‌ردیفی، شباهت ۱۰۰ درصدی ژن *Defensin 1* را بین تمام ژنوتیپ‌های مورد بررسی گچساران، محلی، Filip2003-2L، Filip2003-9L، Filip2005-2L و Filip2006-10L نشان داد. نتایج تجزیه و تحلیل ژن *Defensin 1* در ابزار FGENESH مشخص کرد که این ژن در ساختار خود حاوی تنها یک اینترون به طول ۸۷ جفت باز است (شکل‌های ۴ و ۵). نتایج هم‌ردیفی، شباهت ۱۰۰ درصدی ژن *Defensin 3* را بین تمام ژنوتیپ‌های مورد بررسی گچساران، محلی، Filip2003-2L، Filip2003-9L، Filip2005-2L و Filip2006-10L نشان داد. نتایج تجزیه و تحلیل ژن *Defensin 3*

دارای اعضای بیشتری بوده و در واقع یک خانواده بزرگ چند ژنی هستند. تحقیقات بیشتر، وجود حداقل ۱۶ ژن دیفنسین در گیاه یونجه و ۳۰ ژن دیفنسین در گیاه آراییدوپسیس را مشخص کرد (Silverstein *et al.*, 2005; Hanks *et al.*, 2005).



شکل ۱. تصویر الکتروفورزی محصولات PCR ژن *Defensin 1* در ژنوتیپ‌های مختلف. M- نشانگر مولکولی 1Kb، C- کنترل منفی، ۱- گچساران، ۲- محلی، ۳- Filip2003-2L، ۴- Filip2003-9L، ۵- Filip2005-2L و ۶- Filip2006-10L.

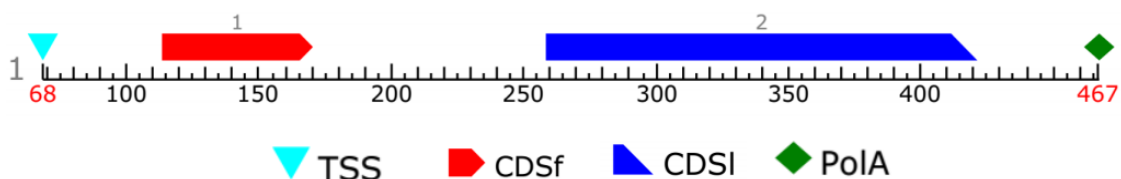


شکل ۲. تصویر الکتروفورزی محصولات PCR ژن *Defensin 3* در ژنوتیپ‌های مختلف. M- نشانگر مولکولی 1Kb، C- کنترل منفی، ۱- گچساران، ۲- محلی، ۳- Filip2003-2L، ۴- Filip2003-9L، ۵- Filip2005-2L و ۶- Filip2006-10L.

6 در تمام ژنوتیپ‌های مورد بررسی گچساران، محلی، Filip2003-2L، Filip2003-9L، Filip2005-2L و Filip2006-10L از نوع GT-AG بوده و در ژنوتیپ‌های مختلف به صورت کاملاً محافظت شده قرار گرفته بودند. اینترون‌های شناسایی شده در ابتدا با دی نوکلئوتید GT شروع شده و در پایان به دی نوکلئوتید AG ختم می‌شود. بنظر می‌رسد ژن‌های *Defensin 1*، *Defensin 3* و *Defensin 6* با وجود یک اینترون قابلیت انجام پیرایش متناوب را نداشته و تنها یک محصول پروتئینی تولید می‌کند. این مورد معمولاً در ژن‌های تک اینترونی اتفاق می‌افتد زیرا پیرایش متناوب تنها در اگزون‌های داخلی صورت می‌گیرد و اگزون‌های اول و آخر ژن در فرایند پیرایش متناوب درگیر نمی‌شوند (Matlin et al., 2005; Ast, 2004). ساختار ژنی دیفنسین‌ها به طور معمول از دو اگزون و یک اینترون تشکیل شده است. البته استثناهایی با دو اینترون نیز گزارش شده است. اگزون اول دیفنسین‌ها، تقریباً به طور کامل سیگنال پپتید را کد می‌کند. اگزون دوم، پپتید اصلی را کد می‌کند (De Beer and Vivier, 2008).

در ابزار FGENESH مشخص کرد که این ژن در ساختار خود حاوی تنها یک اینترون به طول ۶۷ جفت باز است (شکل‌های ۶ و ۷). نتایج هم‌ردیفی، شباهت ۱۰۰ درصدی ژن *Defensin 6* را بین تمام ژنوتیپ‌های مورد بررسی گچساران، محلی، Filip2003-2L، Filip2003-9L، Filip2005-2L و Filip2006-10L نشان داد. نتایج تجزیه و تحلیل ژن *Defensin 6* در ابزار FGENESH مشخص کرد که این ژن در ساختار خود حاوی تنها یک اینترون به طول ۴۸۰ جفت باز است (شکل‌های ۸ و ۹). از نظر ساختار ژنی، دیفنسین‌های گیاهان تک لپه‌ای شباهت بالایی به هم نشان داده و از طرفی دیفنسین‌های گیاهان دو لپه‌ای نیز شباهت بالایی با هم دارند. در سطح پروتئینی، دیفنسین‌های گیاهان دو لپه‌ای و تک لپه‌ای دارای میزان شباهت قابل توجهی هستند (Cools et al., 2017).

طول اینترون‌های موجود در ژن‌های دیفنسین، ممکن است بین ژن‌های مختلف در یک گونه یا در گونه‌های مختلف متفاوت باشد (De Beer and Vivier, 2008). تمامی اینترون‌های شناسایی شده ژن‌های *Defensin 1*، *Defensin 3* و *Defensin 6*



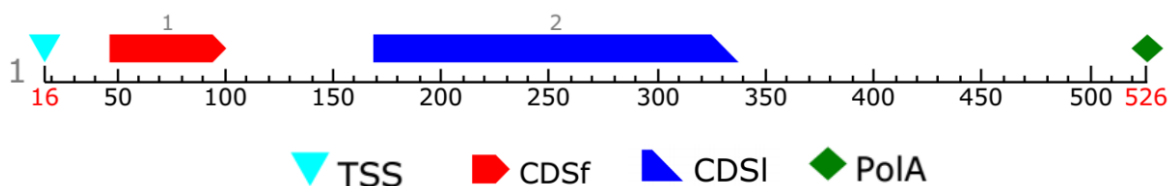
شکل ۴. نتایج پیش‌بینی ژن *Defensin 1* توسط ابزار FGENESH که در آن جایگاه شروع نسخه برداری TSS، توالی‌های اگزونی CDSf و CDSi و نشانه دم پلی A مشخص شده‌اند.

```

1 ATGGAGAAGA AATCAGTAGG TGTCTGTCC TTCCTCTCC TCGTTCTCTT TGTTACAGT AAGTAATCAT TAATATTGCT TAGTTAGTT CAATATTCAA
TACCTCTTCT TTATGCATCC ACAGAACAGG AAGGAGAAGG AGCAAGAGAA ACAATGTGCA TTCATTAGTA ATTATAACGA ATCAAATCAA GTTATAAGTT
101 GATCACTTTA TAATTAATAT TTGTTGTATT GGTATCTTGA TGCAGAAGAA ATGGTGGTGA CTGAGGCAAA GACTTGTGAG CATTGGCTG ATACATACAG
CTAGTGAAT ATTAATTATA AACAAATAA CCATAGAACT ACGTCTTCTT TACCACCACT GACTCCGTTT CTGAACACTC GTAAACCGAC TATGTATGTC
201 GGGACCATGC TTTACAGATG CTAGCTGTGA CGATCACTGC AAGAACAAG CCCACTTAAT TAGTGGCACA TGCCATAACT TGCAATGTTT CTGCACTCAA
CCCTGGTACG AAATGTCTAC GATCGACT GCTAGTGAGC TTCTGTGTTT GGGTGAATTA ATCACCCTGT ACGGTATTGA ACGTTACAAA GACGTGAGTT
301 AACTGTTAG
TTGACAATC

```

شکل ۵. توالی کد کننده کامل ژن *Defensin 1* که اینترون موجود در آن پر رنگ شده است.

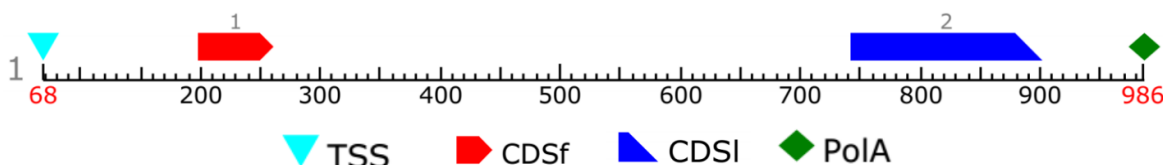


شکل ۶. نتایج پیش‌بینی ژن *Defensin 3* توسط ابزار FGENESH که در آن جایگاه شروع نسخه برداری TSS، توالی‌های اگزونی CDSf و CDSI و نشانه دم پلی A مشخص شده‌اند.

```

1 ATGGGGAGGA AAACACTCAG CTTTTTGTTC ATGCTCTTTC TTCTCTTAGC AGCTGGTAAA TACAATGTAC ATACTGATAT TCTTCTTTTC AAATATTATG
TACCCCTCCT TTTGTGAGTC GAAAAACAAG TACGAGAAAG AAGAGAATCG TCGACCATT ATGTTACATG TATGACTATA AGAAGAAAAG TTTATAATAC
101 TGTTTGATCA TTTCTGTTAC AGATGTTACG GTGAAGACAG CAGAGGCGAG AAAGTGTGCG GCTCAAAGCC ACAGGTTTAA AGGAGCATGT GTGAGGGACA
ACAAACTAGT AAAGACAATG TCTACAATGC CACTTCTGTC GTCTCCGCTC TTTCACACGC CGAGTTTCGG TGTCCAAATT TCCICGTACA CACTCCCTGT
201 GCAACTGTAA AACGGTATGC TTGATAGAAG GTTTCAGTGG TGCGCATGTT CACGGCTTTC GCCGCCGCTG TTTTTCGACC AAGTCTTGTT AG
CGTTGACATT TTGCCATACG AACTATCTTC CAAAGTCACC ACCGCTAACA GTGCCGAAAG CGGCGGCGAC AAAAACGTGG TTCAGAACAA TC
    
```

شکل ۷. توالی کد کننده کامل ژن *Defensin 3* که اینترون موجود در آن پر رنگ شده است.



شکل ۸. نتایج پیش‌بینی ژن *Defensin 6* توسط ابزار FGENESH که در آن جایگاه شروع نسخه برداری TSS، توالی‌های اگزونی CDSf و CDSI و نشانه دم پلی A مشخص شده‌اند.

```

1 ATGGCTCGTT CAATTCCTAT GGTTCACC ATCTTTGCT TCCTTCTGCT TCTTGTAGCT ACTGGTGGGT GTTCTTGAT GCTTAATTA TAGCTCCTAT
TACCGAGCAA GTTAAGGATA CCAAAGTGG TAGAACAGA AGGAAGACGA AGAACATCGA TGACCACCCA CAAAGAACTA CGAATTAATT ATCGAGGATA
101 ATTCTTTTTC ATTTGTTCCC TTTTGTATT TTTTATGAGA TATTTGTCTT TTTTGTATT ATAAATATTC ATCACTATTT ATCATTCCAT TTCACTTATT
TAAGAAAAG TAAACAAGG AAAACAATAA AAAATACTCT ATAAACAGAA AAAACATAA TATTTATAAG TAGTGATAAA TAGTAAGGTA AAGTGAATAA
201 TCAATTTTCT CAATAAATAG TTAAGGATAC TATTAACAAA ACAATAGTTA ATCTTGTAA ATTAATATTA AAACTTTGA AACCAAAAGA TAAGAATAAA
AGTTAAAGAG GTTATTTATC AATTCCTATG ATAATTGTTT TGTTATCAAT TAGAACATTA TAATTATAAT TTTGAAACTT TTGGTTTCT ATTCTTATTT
301 AAGCGACAAA GAAACATAAG GAATAATCAA TACCATCATT ATTTTGTGTT TGCTACTATC TATGGACTAA AGCACACTTA CATGACATAA TATAATATTT
TTCGCTGTTT CTTTGTATTC CTTATTAGTT ATGGTAGTAA TAAAACAACA ACGATGATAG ATACCTGATT TCGTGTGAAT GTACTGTATT ATATTATAAA
401 AATATGTATA TATTGACTTA TTTAAATAAT ATTTTGTGCT TATAAAAAAA ATTAGTATGT GGTTTTATTT TTATTTCCAT TCATGAATTA ATTTTGATAG
TTATACATAT ATAACTGAAT AAATTTATTA TAAAAACGA ATATTTTTTT TAATCATAACA CAAAATAAA AATAAAGGTA AGTACTTAAT TAAAACATC
501 AAGTGTGTTT GTTAATGAAT TTGATTTTGT GATATGTTAT ATAGAGATGG TGGCAGAGGC AAGGACATGT GAGTCAAAA GTCAAAAATT CAAAGGAGCA
TTCACAACAA CAATTACTTA AACTAAAACA CTATACCATA TATCTCTACC ACCGCTCTCG TTCCGTGACA CTCAGTTTTT CAGTTTTTAA GTTTCCTCGT
601 TGTGTGATG ATCGCAATTG TGCTTCTGTG TGCCAAACGG AACGTTTCCC TGGAGGCGAC TGCCGTGGAT TCCGTCGTAG ATGTTTCTGT ACTACACATT
ACACACTCAC TAGCGTTAAC ACGAAGACAC ACGGTTTGCC TTGCAAAGGG ACCTCCCGTG ACGGCACCTA AGGCAGCATC TACAAAGACA TGATGTGTAA
701 GTTAA
CAATT
    
```

شکل ۹. توالی کد کننده کامل ژن *Defensin 6* که اینترون موجود در آن پر رنگ شده است.

تمام پروتئین‌های این خانواده در خارج از سلول تجمع پیدا کرده و در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیر زیستی نقش دارند. محل تجمع دیفنسین‌های گیاهی با نقش دفاعی آن‌ها رابطه مستقیمی دارد. این ژن‌ها در برگ‌ها، غده‌ها، گل‌ها، غلاف بذر و بذرها یافت شده و نقش مهمی در محافظت از بذرهای در

نتایج آنالیز توالی‌های پروتئینی ژن‌های *Defensin 1*، *Defensin 3* و *Defensin 6* در تمام ژنوتیپ‌های مورد بررسی با استفاده از ابزارهای SignalP و CELLO، وجود سیگنال پپتیدهایی به طول ۲۷، ۲۴ و ۲۷ اسید آمینه را در ساختار این پروتئین‌ها مشخص کرد. همچنین مشخص شد که

مقابل عوامل بیماری‌زا، این پپتیدها پس از تولید و ایجاد ساختارهای ثانویه به خارج از سلول ترشح می‌شوند تا در خطوط دفاعی اولیه سلول به مبارزه با پاتوژن‌های باکتریایی، قارچی و ویروسی بپردازند. وجود سیگنال پپتید ترش‌حی که دیفنسین‌ها را به خارج از سلول و محل مبارزه هدایت کند، در ساختار آن‌ها ضروری بوده و وجود این نوع سیگنال پپتید ترش‌حی در دیفنسین‌ها در مطالعه‌ی حاضر و سایر مطالعات مشخص شده است (Sagaram *et al.*, 2012).

بررسی اینترون‌های موجود در ساختار ژن‌های *Defensin 1*، *Defensin 3* و *Defensin 6* با استفاده از ابزارهای PlantCARE و PlantPAN، وجود عناصر تنظیمی مختلفی را در ساختار آن‌ها نشان داد (جدول ۴).

حال جوانه‌زنی و گیاهچه‌های در حال توسعه بازی می‌کند. علاوه بر این، آوندها، روزنه‌ها و سلول‌های روزنه، سلول‌های پارانشیمی و سایر بافت‌های سطحی یافت شده‌اند (Lacerda *et al.*, 2014).

تمامی پپتیدهای دیفنسین جداسازی شده از ژنوتیپ‌های مختلف، دارای سیگنال پپتید ترش‌حی تجمع خارج سلولی بوده و در پاسخ به تنش‌های محیطی زیستی و غیر زیستی نقش داشتند. محل تجمع دیفنسین‌های گیاهی با نقش دفاعی آن‌ها ارتباط مستقیمی دارد. دیفنسین‌ها و بخش عمده‌ای از پپتیدهای ضد میکروبی برای انجام فعالیت ضد میکروبی خود که عمدتاً با استفاده‌ی از مکانیسم برهمکنش با غشاهای میکروبی صورت می‌گیرد، باید از سلول به محیط خارج سلولی و فضای بین سلول‌ها منتقل شوند. به علت نقش‌های دفاعی دیفنسین‌ها در

جدول ۴. عناصر تنظیمی موجود در ساختار اینترون‌ها

نام فاکتور نسخه‌برداری	توالی مورد توافق	<i>Defensin 1</i>	<i>Defensin 3</i>	<i>Defensin 6</i>
AT-Hook	aAATTAattc	✓	✓	✓
ARR-B	tctTATCTtt	✓	✓	✓
MYB-related	caaATATCtc	✓	-	-
Myb/SANT, G2-like	aGAATatagg	✓	✓	✓
Dof	gtgCTTTAgtc	✓	✓	✓
MADS box, MIKC	tagtCCATAgatagtagc	✓	-	-
bZIP, HD-ZIP	aaatggaATGATaaatagtagt	✓	✓	✓
AP2, B3, RAV	aCAACAaa	✓	-	-
ARF	ttTGTCGct	✓	-	-
C2H2	aACACTt	✓	-	-
CSD	aATAAAaa	✓	-	-
TCR, CPP	aTTTAAat	✓	-	✓
Homeodomain	aaaaaTATTAtt	✓	✓	✓
NAC, NAM	aaGTCAAta	✓	-	✓
Sox, YABBY	tatTAATTaa	✓	-	✓
TBP	aaTATAT	✓	-	-
WRKY	aaGTCAAt	✓	-	-
ZF-HD	ATTAA	✓	✓	✓
GATA, tify	ATATC	✓	✓	✓
ERF	ATCAA	✓	✓	✓
B3	TCATG	✓	✓	✓
NF-YB, NF-YA, NF-YC	ATAGG	✓	✓	✓
TCP	GGAGC	✓	-	-
Trihelix	GAAAC	✓	✓	✓
bHLH	cAAATG	✓	-	-

مولکولی پایین، توالی کد کننده با طول کوتاه، اسیدهای آمینه سیستئین و پیوندهای دی‌سولفیدی محافظت شده، وجود سیگنال پپتید ترشح خارج سلولی و وجود دمین عملکردی Knot1 از خانواده Gamma-thioninها از ویژگی‌های مشترک دیفنسین‌های گیاهی است (Cools *et al.*, 2017). تمامی ویژگی‌های یاد شده در مطالعه‌ی حاضر بررسی و در دیفنسین‌های جداسازی شده از ژنوتیپ‌های گچساران، محلی، Filip2003-2L، Filip2003-9L، Filip2005-2L و Filip2006-10L گیاه عدس مشاهده شد که خود تأییدی بر صحت جداسازی این ژن‌ها است.

در سال‌های اخیر، توجه به پپتیدهای ضد میکروبی به علت نیاز به روش‌های محافظتی جدید در گیاهان و نیاز به عوامل ضد میکروبی جدید، در پزشکی به طور معنی‌داری افزایش پیدا کرده است. پپتیدهای ضد میکروبی طبیعی و مصنوعی به عنوان نامزدهای احتمالی می‌توانند تقاضای کشاورزی و پزشکی را برای ترکیبات ضد میکروبی جدید از طریق روش‌های مختلف بیوتکنولوژی پاسخ دهند (Flavia Cancado Viana *et al.*, 2013; Lico *et al.*, 2015; Holaskova *et al.*, 2012). نتایج تحقیق حاضر، نشان داد که دیفنسین‌ها یک خانواده چند ژنی را در گیاه عدس تشکیل می‌دهند. در این پژوهش برای اولین بار، توالی ژنومی کامل ۳ ژن از خانواده‌ی دیفنسین گیاه عدس با استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیکی و آزمایشگاهی مختلف، از ژنوتیپ‌های گچساران، محلی، Filip2003-2L، Filip2003-9L، Filip2005-2L و Filip2006-10L این گیاه شناسایی و جداسازی شد. در مرحله‌ی بعد، خصوصیات ژن‌های جداسازی شده مانند طول اگزون‌ها، طول اینترون‌ها، محل تجمع سلولی و نواحی تنظیمی موجود در اینترون‌های آن‌ها بررسی شد.

در مجموع نتایج این تحقیق نشان داد که،

عناصر تنظیمی موجود در ساختار اینترون‌ها از گروه‌های متفاوتی بوده و فاکتورهای نسخه‌برداری مختلفی از خانواده‌های مختلف به آن‌ها متصل می‌شوند (جدول ۴). عناصر تنظیمی شناسایی شده شامل عناصر پاسخ به نور، عناصر تشدید کننده، عناصر پاسخ به تنش‌های محیطی، عناصر پاسخ به هورمون‌های گیاهی، عناصر پاسخ به رشد و نمو بودند. بررسی ساختاری اینترون‌های مختلف نشان داد که این توالی‌ها دارای عناصر تنظیمی تشدید کننده بیان ژن، هسته پروموتری و عناصر پاسخ به تنش‌ها و محرک‌های محیطی هستند. وجود این عناصر، نقش تکاملی مهم اینترون‌ها و دیگر عناصر غیر کد کننده را در ژنوم موجودات زنده مشخص می‌کند. عناصر تنظیمی تشدید کننده بیان ژن باعث افزایش رونویسی و بیان ژن می‌شوند. عناصر هسته پروموتری، عناصر تنظیمی ضروری برای بیان هر ژن هستند. عناصر پاسخ به تنش‌ها و محرک‌های محیطی، همان‌طوری که از نامشان مشخص است، برای پاسخ به تنش‌ها و محرک‌های محیطی موجودات ضروری هستند (Ast, 2004).

عدس (*Lens culinaris* L.) یکی از مهم‌ترین گیاهان زراعی جهان و یکی از مهم‌ترین و قدیمی‌ترین منابع غذایی بشر محسوب می‌شود (Muehlbauer *et al.*, 2006; Yadav *et al.*, 2012; Srivastava and Vasishtha, 2007). با این وجود، بیماری‌های قارچی مختلفی مانند پژمردگی آوندی، پوسیدگی و سفیدک‌ها به همراه سایر بیماری‌های باکتریایی و ویروسی همواره رشد این گیاه را تهدید کرده و تولید محصول آن را کاهش می‌دهند. یکی از راه‌های ایجاد مقاومت نسبت به این بیماری‌ها، تولید گیاهان تراریخت مقاوم به بیماری است. برای تولید این گیاهان، ابتدا باید ژن‌های مقاومت را در گیاهان شناسایی کرد.

تاکنون توالی کد کننده دیفنسین‌های مختلفی از گیاهان مختلف جداسازی و بررسی شده‌اند. جرم

محیطی شد. از طرف دیگر، با بیان و خالص‌سازی این پپتیدها در سیستم‌های مختلف بیانی یوکاریوتی و پروکاریوتی، می‌توان از آن‌ها در پزشکی و دامپزشکی به عنوان عوامل ضد میکروبی جدید در مقابله با پاتوژن‌های انسانی و دامی استفاده کرد.

سپاسگزاری

مقاله حاضر بخشی از نتایج طرح پژوهشی است که بودجه آن از طرف دانشگاه آزاد اسلامی واحد خرم‌آباد تامین شده است که بدین ترتیب قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

- Ast G (2004) How did alternative splicing evolve? *Nature Reviews Genetics*. 5 (10): 773-782.
- Bao R, Huang L, Andrade J, Tan W, Kibbe WA, Jiang H, Feng G (2014) Review of current methods, applications, and data management for the bioinformatics analysis of whole exome sequencing. *Cancer informatics*. Sup 2: 67-83.
- Chang W-C, Lee T-Y, Huang H-D, Huang H-Y, Pan R-L (2008) PlantPAN: Plant promoter analysis navigator, for identifying combinatorial cis-regulatory elements with distance constraint in plant gene groups. *BMC genomics*. 9 (1): 561.
- Cools TL, Struyfs C, Cammue BP, Thevissen K (2017) Antifungal plant defensins: increased insight in their mode of action as a basis for their use to combat fungal infections. *Future Microbiology*. 12 (5): 441-454.
- De Beer A, Vivier MA (2008) Vv-AMP1, a ripening induced peptide from *Vitis vinifera* shows strong antifungal activity. *BMC plant biology*. 8 (1): 75.
- Doyle JJ (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull Bot Soc Am*. 19: 11-15.
- Elsbach P (2003) What is the real role of antimicrobial polypeptides that can mediate several other inflammatory responses? *Journal of Clinical Investigation*. 111 (11): 1643.
- Finn RD, Coggill P, Eberhardt RY, Eddy SR, Mistry J, Mitchell AL, Potter SC, Punta M, Qureshi M, Sangrador-Vegas A (2016) The Pfam protein families database: towards a more sustainable future. *Nucleic acids research*. 44 (D1): D279-D285.
- Flavia Cancado Viana J, Campos Dias S, Luiz Franco O, Lacorte C (2013) Heterologous production of peptides in plants: Fusion proteins and beyond. *Current Protein and Peptide Science*. 14 (7): 568-579.
- Gill RW, Sanseau P (2000) Rapid in silico cloning of genes using expressed sequence tags (ESTs). *Biotechnology annual review*. 5: 25-44.
- Hanks JN, Snyder AK, Graham MA, Shah RK, Blaylock LA, Harrison MJ, Shah DM (2005) Defensin gene family in *Medicago truncatula*: structure, expression and induction by signal molecules. *Plant molecular biology*. 58 (3): 385-399.
- Holaskova E, Galuszka P, Frebort I, Oz MT (2015) Antimicrobial peptide production and plant-based expression systems for medical and agricultural biotechnology. *Biotechnology advances*. 33 (6): 1005-1023.
- Hoskin DW, Ramamoorthy A (2008) Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. 1778 (2): 357-375.
- Janssen BJ, Schirra HJ, Lay FT,

ژن‌های خانواده دیفنسین گیاه عدس، محافظت شدگی بالایی بین ژنوتیپ‌های مختلف داشته و هیچ تفاوتی بین آن‌ها مشاهده نشد. نتایج همچنین نشان داد که اینترون‌های موجود در این ژن‌ها حاوی عناصر تنظیمی هستند که در فرایندهای گیاهی نقش مهمی بازی می‌کنند. با توجه به نقش مهم این ژن‌ها در فرایندهای گیاهی و پاسخ آن‌ها به تنش‌های محیطی، با جداسازی، دست‌ورزی ژنتیکی و انتقال این ژن‌ها می‌توان باعث افزایش مقاومت گیاهان به عوامل پاتوژن و بهبود پاسخ‌های احتمالی گیاهان به تنش‌های

- Anderson MA, Craik DJ (2003) Structure of *Petunia hybrida* defensin 1, a novel plant defensin with five disulfide bonds. *Biochemistry*. 42 (27): 8214-8222.
- Jones P, Binns D, Chang H-Y, Fraser M, Li W, McAnulla C, McWilliam H, Maslen J, Mitchell A, Nuka G (2014) InterProScan 5: genome-scale protein function classification. *Bioinformatics*. 30 (9): 1236-1240.
- Kumar S, Rajendran K, Kumar J, Hamwieh A, Baum M (2015) Current knowledge in lentil genomics and its application for crop improvement. *Frontiers in plant science*. 6: 78.
- Lacerda AF, Vasconcelos ÉA, Pelegri PB, de Sa MFG (2014) Antifungal defensins and their role in plant defense. *Frontiers in microbiology*. 5: 1-10.
- Laverty G, Gorman SP, Gilmore BF (2011) The potential of antimicrobial peptides as biocides. *International journal of molecular sciences*. 12 (10): 6566-6596.
- Lescot M, Déhais P, Thijs G, Marchal K, Moreau Y, Van de Peer Y, Rouzé P, Rombauts S (2002) PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. *Nucleic acids research*. 30 (1): 325-327.
- Lico C, Santi L, Twyman RM, Pezzotti M, Avesani L (2012) The use of plants for the production of therapeutic human peptides. *Plant cell reports*. 31 (3): 439-451.
- Marchler-Bauer A, Derbyshire MK, Gonzales NR, Lu S, Chitsaz F, Geer LY, Geer RC, He J, Gwadz M, Hurwitz DI (2014) CDD: NCBI's conserved domain database. *Nucleic acids research*. 43 (D1): D222-D226.
- Marchler-Bauer A, Lu S, Anderson JB, Chitsaz F, Derbyshire MK, DeWeese-Scott C, Fong JH, Geer LY, Geer RC, Gonzales NR (2010) CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins. *Nucleic acids research*. 39 (suppl_1): D225-D229.
- Matlin AJ, Clark F, Smith CW (2005) Understanding alternative splicing: towards a cellular code. *Nature reviews Molecular cell biology*. 6 (5): 386-398.
- Muehlbauer FJ, Cho S, Sarker A, McPhee KE, Coyne CJ, Rajesh P, Ford R (2006) Application of biotechnology in breeding lentil for resistance to biotic and abiotic stress. *Euphytica*. 147 (1-2): 149-165.
- Nielsen H (2017) Predicting Secretory Proteins with SignalP. *Protein Function Prediction: Methods and Protocols*. 59-73.
- Pelegri PB, Franco OL (2005) Plant γ -thionins: novel insights on the mechanism of action of a multi-functional class of defense proteins. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 37 (11): 2239-2253.
- Periwal V, Scaria V (2014) *Bioinformatics Review*. *Bioinformatics*. 45: 1-9.
- Sagaram US, Kaur J, Shah D (2012) Antifungal plant defensins: structure-activity relationships, modes of action, and biotech applications. In: *Small Wonders: Peptides for disease control*. ACS Publications, pp 317-336
- Silverstein KA, Graham MA, Paape TD, VandenBosch KA (2005) Genome organization of more than 300 defensin-like genes in *Arabidopsis*. *Plant physiology*. 138 (2): 600-610.
- Solovyev V, Kosarev P, Seledsov I, Vorobyev D (2006) Automatic annotation of eukaryotic genes, pseudogenes and promoters. *Genome biology*. 7 (1): S10.
- Srivastava R, Vasishtha H (2012) Saponins and lectins of Indian chickpeas (*Cicer arietinum*) and lentils *Lens culinaris*. *Indian Journal of Agriculture and Biochemistry*. 25 (1): 44-47.
- Thomma BP, Cammue BP, Thevissen K (2002) Plant defensins. *Planta*. 216 (2): 193-202.
- Yadav SS, McNeil DL, Stevenson PC (2007) *Lentil: An ancient crop for modern times*. 1 edn. Springer Netherlands, Netherlands
- Yu C-S, Cheng C-W, Su W-C, Chang K-C, Huang S-W, Hwang J-K, Lu C-H (2014) CELLO2GO: a web server for protein subCELLular LOcalization prediction with functional gene ontology annotation. *PLoS One*. 9 (6): e99368.