ژنتیک نوین
دوره سیزدهم، شماره ۱، بهار ۱۳۹۷
صفحه ۱۳۲ - ۱۱۹

شناسایی، جداسازی و بررسی خصوصیات خانواده ژنی دیفنسین در گیاه عدس (*Lens culinaris* L.)

Identification, isolation and characterization of defensin gene family in lentil (*Lens culinaris* L.)

رضا میردریکوند*[۱]، سید محسن سهرابی[۲]، کامران سمیعی[۳]، علی قربانی[۲]

۱- استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، واحد خرم‌آباد، دانشگاه آزاد اسلامی، خرم‌آباد، ایران
۲- دانش‌آموخته دکتری، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران
۳- استادیار، گروه کشاورزی، واحد کنگاور، دانشگاه آزاد اسلامی، کنگاور، ایران

Mirderikvand R[1*], Sohrabi SM[2], Samiei K[3], Ghorbani A[2]

1- Assistant Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Khorramabad Branch, Islamic Azad University, Khorramabad, Iran
2- Graduated PhD Student, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran
3- Assistant Professor, Department of Agriculture, Kangavar Branch, Islamic Azad University, Kangavar, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: drikvand_r@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۹۶/۹/۲۵ - تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۲/۱۳)

چکیده

دیفنسین‌های گیاهی، خانواده‌ای از پپتیدهای ضد میکروبی کاتیونی غنی از سیستئین هستند. این پپتیدها مولکول‌هایی کوچک با وزن مولکولی ۵ تا ۷ کیلودالتون هستند که دارای هشت اسید آمینه سیستئین محافظت شده بوده که در ایجاد پل‌های دی‌سولفیدی نقش دارند. در مطالعه حاضر با استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیکی، خانواده ژنی دیفنسین از گیاه عدس جداسازی و تعیین خصوصیت شد. به این منظور تمام توالی‌های نوکلئوتیدی مربوط به ژن‌های دیفنسین گیاهان دو لپه‌ای (۵۸۳ توالی) از بانک ژن دریافت شد. توالی‌های دریافت شده، علیه کتابخانه EST گیاه عدس (۹۵۳۹ مورد EST) همردیف و نتایج حاصل با هم مخلوط و سر هم‌بندی شدند. قطعات سرهم بندی شده (کانتیگ‌ها) و قطعات غیر سر هم‌بندی شده (سینگلتون‌ها) با استفاده از BLASTn، علیه پایگاه داده nr هم‌ردیف شدند. کانتیگ‌ها و سینگلتون‌های حاصل، برای وجود چارچوب خوانش باز کامل، دمین‌های عملکردی، سیگنال پپتید، محل تجمع سلولی، خصوصیات فیزیکوشیمیایی، فراوانی اسیدهای آمینه، فعالیت ضد میکروبی و الگوی بیان مورد بررسی بیش‌تر قرار گرفتند. در نهایت با استفاده از واکنش PCR توالی کدکننده کامل دیفنسین‌ها تکثیر و به صورت آزمایشگاهی تأیید شد. نتایج، وجود ٦ کانتیگ که حاوی چارچوب‌های خوانش باز به‌طول ۲۲۲ تا ۲۲۸ جفت‌باز بودند را مشخص کرد. توالی پروتئینی دیفنسین‌های شناسایی شده، حاوی دمین عملکردی Knot1 (Gamma-thionin) بود. این دیفنسین‌ها دارای سیگنال پپتید بودند و تجمع خارج سلولی داشتند. به‌علت فراوانی بالای اسیدهای آمینه آبگریز، دیفنسین‌های شناسایی شده آبگریز بوده و ساختارهای ثانویه پیچیده‌ای تولید می‌کردند. نتایج آنالیز ضد میکروبی *in silico*، فعالیت ضد میکروبی بالا را در دیفنسین‌های جداسازی شده نشان داد. آنالیز بیان ژن *in silico*، الگوی متفاوتی از بیان را برای دیفنسین‌ها نشان داد. شناسایی توالی کدکننده ژن‌های ضد میکروبی و بررسی خصوصیات آن‌ها اولین قدم در مهندسی ژنتیک است. در این پژوهش برای اولین بار، توالی کدکننده کامل ٦ ژن از ژن‌های خانواده دیفنسین از گیاه عدس جداسازی شد و ساختار و ویژگی‌ها و الگوی بیانی آن‌ها مشخص شد.

واژه‌های کلیدی

بیوانفورماتیک

پپتید

دیفنسین

عدس

EST

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-04-19]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.1.11.8]

مقدمه

پپتیدهای ضد میکروبی، پپتیدهایی با جرم مولکولی پایین هستند که توسط تعداد زیادی از ارگانیسم‌های زنده (باکتری‌ها، گیاهان و جانوران) برای مقابله با طیف گسترده‌ای از پاتوژن‌ها تولید می‌شوند. پپتیدهای ضد میکروبی طولی کمتر از ۱۰۰ آمینو اسید داشته و از تنوع بسیار بالایی برخوردار بوده به‌طوری که تاکنون صدها نوع مختلف از آن‌ها شناسایی شده‌است. طی مراحل اولیه پاسخ به پاتوژن‌ها، پپتیدهای ضد میکروبی به‌همراه پپتیدهای مرتبط با تنش و متابولیت‌های ضد میکروبی به‌عنوان ترکیباتی از مکانیسم دفاع عمومی عمل می‌کنند (Holaskova et al. 2015). پپتیدهای ضد میکروبی، هم‌چنین پپتیدهای آنتی‌بیوتیک نامیده می‌شوند و به‌عنوان نسل جدیدی از عوامل ضد میکروبی برای محافظت از گیاهان و هم‌چنین درمان بیماری‌های عفونی در انسان و جانوارن مطرح هستند (Elsbach 2003; Holaskova et al. 2015). برخی از پپتیدهای ضد میکروبی کاتیونی هم‌چنین دارای فعالیت سمیت سلولی علیه سلول‌های سرطانی هستند (Hoskin and Ramamoorthy 2008). تاکنون چندین مکانیسم مختلف برای نحوه عملکرد پپتیدهای ضد میکروبی پیشنهاد شده که از آن جمله این مکانیسم‌ها می‌توان به برهمکنش با غشاهای میکروبی اشاره کرد. در اثر برهمکنش پپتید با غشاء، رخنه‌ای در آن ایجاد شده که منجر به ایجاد میسل، عدم قطبیت غشایی، نشت سیتوپلاسمی، ورود پپتید به درون سلول و آسیب به سنتز ماکرو مولکول‌های درون سلولی می‌شود. پپتیدهای ضد میکروبی گیاهی، به گروه‌های مختلفی شامل تیونین‌ها، دیفنسین‌ها، نوتین‌ها، هوین‌ها، اسنکین‌ها و سیکلوئیدها تقسیم‌بندی می‌شوند (Cools et al. 2017).

دیفنسین‌ها گروهی از پپتیدهای ضد میکروبی گیاهی هستند. این گروه، پپتیدهای کاتیونی کوچک با طولی بین ٤٥ تا ٥٤ اسید آمینه هستند که همه آن‌ها دارای جایگاه‌های سیستئینی حفاظت شده بوده و ۳ تا ٤ پل دی‌سولفیدی را ایجاد می‌کنند. دیفنسین‌های گیاهی همولوگ‌های ساختاری و عملکردی پپتیدهای ضد میکروب موجود در حشرات و پستانداران می‌باشند که نقش آن‌ها در دفاع میزبان به خوبی ثابت شده‌است. این پپتیدها بخشی از سیستم دفاع عمومی گیاهان در برابر پاتوژن‌ها بوده و به‌عنوان جزئی از خانواده پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی تقسیم‌بندی می‌شوند و در زمان حمله پاتوژن‌ها به گیاه القاء شده و با از بین بردن پاتوژن باعث افزایش مقاومت گیاه می‌شوند و در کنار سایر پروتئین‌های دفاعی نقش مهمی در مقاومت گیاه ایفا می‌کنند. خانواده‌ی پپتیدهای دیفنسین در همه‌ی گونه‌های گیاهی یافت شده و دارای تنوع بسیار بالایی هستند. این پپتیدها ابتدا از بذور گیاهی شناسایی و جداسازی شده‌اند، در حالی‌که در برگ‌ها و گل‌ها نیز تجمع پیدا می‌کنند. دیفنسین‌ها مانند سایر پپتیدهای ضد میکروبی گیاهی به‌طور دائم در برخی اندام‌ها مانند اندام‌های ذخیره‌ای بیان می‌شوند و در پاسخ به تنش‌های مختلف زیستی و غیر زیستی و هم‌چنین در پاسخ به مولکول‌های سیگنالینگ مانند متیل جاسمونات، اسید سالسیلیک و اتیلن القاء می‌شوند. اولین دیفنسین‌های گیاهی در سال ۱۹۹۰ از آندوسپرم گندم و جو شناسایی و جداسازی شدند. از آن زمان تاکنون دیفنسین‌های متعددی از گیاهان مختلفی مانند تربچه، یونجه، عدس، شنبلیله، خرما، انگور، آرابیدوپسیس، نخود، لوبیا و گندم جداسازی و شناسایی شدند (Thomma et al. 2002; Janssen et al. 2003). عدس (*Lens culinaris* L.) یکی از مهم‌ترین گیاهان زراعی جهان است. عدس با دارا بودن حدود ۲۵ درصد پروتئین، یکی مهم‌ترین و قدیمی‌ترین منابع غذایی بشر محسوب می‌شود. 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 (Muehlbauer et al. 2006; Yadav et al. 2007; Srivastava and Vasishtha 2012). با این وجود، بیماری‌های قارچی مختلفی مانند پژمردگی آوندی، پوسیدگی و سفیدک‌ها به‌همراه 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. پس از شناسایی، با انتقال این ژن‌ها می‌توان گیاهان تراریخت مقاوم به بیماری را تولید کرد. دیفنسین‌ها گروهی از این ژن‌های ایجاد کننده‌ی مقاومت هستند که علیه طیف وسیعی از پاتوژن‌ها فعالیت دارند. با جداسازی ژن‌های دیفنسین از گیاه عدس، علاوه بر استفاده از آن

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-04-19]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.1.11.8]

در تولید گیاهان تراریخت، می‌توان آن را در سیستم‌های مختلف بیانی تولید کرد و به‌عنوان نسل جدیدی از عوامل ضد میکروبی به‌کار برد (Parachin et al. 2012; Holaskova et al. 2015).

طول ژنوم هاپلوئید عدس در حدود ٤ میلیارد جفت‌باز است و یک تلاش بین‌المللی برای توالی‌یابی ژنوم آن در جریان بوده و منجر به ایجاد توالی سرهم بندی شده اولیه شده‌است. با این حال این توالی هنوز در شکل اولیه بوده و مستندسازی ژنی و دسترسی محدودی دارد. آنالیزهای اضافی در جریان است تا توالی سرهم‌بندی موجود بهبود پیدا کرده و در آینده‌ای نزدیک یک ژنوم مرجع از عدس ایجاد شود. گونه‌هایی با ژنوم هسته‌ای بزرگ مانند عدس، نخود زراعی و باقلا (در بین لگوم‌های فصل سرد) و گندم، ذرت و جو (در بین گروه‌های دیگر) دارای مقدار قابل توجهی از توالی‌های DNA تکراری (حدود ۵۰ تا ۷۰ درصد ژنوم کل ژنوم هسته‌ای)، تعداد زیادی رتروترانسپوزون و عناصر تکرار شده هستند. این نواحی تکراری مشکلاتی را در سرهم بندی ژنوم ایجاد می‌کند (Kumar et al. 2015). امروزه با وجود حجم زیاد اطلاعات ژنومی و ترانسکریپتومی در موجودات مختلف و هم‌چنین دسترسی آسان به ابزارهای بیوانفورماتیکی متعدد، شناسایی و بررسی ویژگی ژن‌های مختلف به سادگی و در کوتاه‌ترین مدت زمان ممکن قابل انجام است. با استفاده از این اطلاعات و بهره‌گیری از ابزارهای بیوانفورماتیکی مختلف می‌توان قبل از اقدام به هر گونه فعالیت آزمایشگاهی به صورت *in silico* ژن یا ژن‌های مورد نظر را شناسایی کرد، ویژگی‌های آن‌ها را بررسی و فعالیت‌هایی را که این ژن‌ها در آن دخیل هستند را شبیه سازی کرد. شناسایی‌ها، پیش‌بینی‌ها و شبیه سازی‌های *in silico* با احتمال بسیار زیادی نزدیک به واقعیت هستند و معمولاً توسط کارهای آزمایشگاهی تأیید می‌شوند (Gill and Sanseau 2000; Periwal and Scaria 2014; Bao et al. 2014). با توجه به دسترسی محدود به توالی اولیه ژنوم عدس و هم‌چنین عدم مستند سازی کامل آن، برای شناسایی ژن‌های جدید در این گیاه باید به سراغ گیاهان هم‌خانواده و یا پایگاه‌های EST و توالی‌یابی نسل بعدی رفت. با استفاده از این پایگاه‌ها می‌توان ژن‌های مورد نظر را شناسایی و جداسازی کرد و برای اهداف اصلاحی عدس از طریق اصلاح نباتات کلاسیک یا روش‌های نوین بیوتکنولوژی به‌کار برد.

پژوهش حاضر با هدف شناسایی برخی اعضای جدید خانواده‌ی پپتیدهای ضدمیکروبی دیفنسین از گیاه عدس و بررسی خصوصیات آن‌ها صورت گرفته است. در این پژوهش، با استفاده از روش‌های بیوانفورماتیکی توالی کدکننده کامل اعضا خانواده ژنی دیفنسین از کتابخانه‌های EST و توالی‌یابی نسل بعدی گیاه عدس جداسازی و تعیین خصوصیت شد. صحت جداسازی بیوانفورماتیکی این ژن‌ها توسط روش‌های آزمایشگاهی تأیید شد.

مواد و روش‌ها

ابتدا تمام ESTهای گیاه عدس (متشکل از ۹۵۳۹ EST) از پایگاه NCBI دریافت شد. از ESTهای دریافت شده با استفاده از نرم‌افزار CLC Genomics Workbench 9.0 یک پایگاه داده سفارشی ایجاد شد. سپس تمام توالی‌های نوکلئوتیدی مربوط به ژن‌های دیفنسین در گیاهان دو لپه‌ای (۵۸۳ توالی) از بانک ژن پایگاه NCBI دریافت شد. در مرحله‌ی بعد با استفاده از نرم‌افزار CLC Genomics Workbench 9.0، ۵۸۳ توالی ژنی دیفنسین علیه پایگاه داده سفارشی ایجاد شده از ۹۵۳۹ EST گیاه عدس مورد هم‌ردیفی قرار گرفت. توالی‌های EST حاصل از هم‌ردیفی تمام ژن‌ها در نرم‌افزار CLC Genomics Workbench 9.0 ذخیره و برای مرحله‌ی بعدی مورد استفاده قرار گرفت.

با استفاده از نرم‌افزارهای CLC Genomics Workbench 9.0 و Vector NTI 10.3 توالی‌های EST حاصل از مرحله‌ی قبل سر هم‌بندی شدند و کانتیگ‌هایی با طول معین ایجاد شدند. سر هم‌بندی قطعات با پارامترهای شباهت بیش‌تر از ۹۸ درصد و طول کانتیگ بیش‌تر از ۲۰۰ جفت‌باز انجام شد. پیش‌بینی چارچوب خوانش باز (ORF) در کانتیگ‌های ایجاد شده با استفاده از ابزارهای ORF Finder و CDD موجود در پایگاه NCBI و نرم‌افزارهای CLC Genomics Workbench 9.0 و Vector NTI 10.3 صورت گرفت. کانتیگ‌های دارای چارچوب خوانش باز کامل که توسط چهار نرم‌افزار مورد تأیید قرار گرفتند به‌منظور تأیید بیش‌تر مورد یک هم‌ردیفی دیگر قرار گرفتند. در این

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-04-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.1.11.8]

هم‌ردیفی، کانتیگ‌ها علیه کتابخانه‌های RNA-seq گیاه عدس موجود در SRA پایگاه NCBI هم‌ردیف شدند. نتایج حاصل از هم‌ردیفی هر کانتیگ، با همان کانتیگ سر هم‌بندی شدند و کانتیگ‌های با صحت بالا ایجاد شدند. با استفاده از این روش هم‌چنین توالی کدکننده کامل ژن مرجع *Ef1α* گیاه عدس نیز شناسایی و جداسازی شد.

از کانتیگ‌های با صحت بالا، برای طراحی آغازگرها استفاده شد. آغازگرها با استفاده از دو نرم‌افزار Vector NTI 10.3 و Allele ID 7.0 طراحی شدند. آغازگرهای مورد نظر برای تکثیر توالی کدکننده کامل ژن‌های خانواده دیفنسین گیاه عدس و بخشی از توالی کدکننده کامل ژن مرجع *Ef1α* به‌عنوان کنترل داخلی طراحی شدند. آغازگرهای طراحی شده پس از طراحی، توسط ابزار Primer BLAST موجود در پایگاه NCBI به‌منظور تعیین اختصاصیت مورد بررسی قرار گرفتند. توالی و خصوصیات آغازگرهای طراحی شده در جدول ۱ ارائه شده‌است.

در این تحقیق، بذور گیاه عدس (*L. culinaris*) در گلدان‌هایی با ترکیب شن، رس و کود حیوانی (با نسبت ۱: ۱: ۱) کشت و به مدت سه هفته در شرایط مناسب نگهداری شدند. بعد از گذشت سه هفته، گیاهچه‌ها در نیتروژن مایع قرار گرفته و برای استخراج RNA مورد استفاده قرار گرفتند. استخراج RNA کل از بافت‌ها، با استفاده از بافر RNX-Plus شرکت سیناژن و طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. به‌منظور حذف آلودگی‌های DNA ژنومی از آنزیم DNase I شرکت Thermo Fisher Scientific استفاده شد. کیفیت و کمیت RNA استخراج شده با استفاده از ژل آگاروز یک درصد و دستگاه نانودراپ تعیین شد. سنتز رشته اول cDNA با استفاده از کیت سنتز cDNA شرکت Thermo Fisher Scientific و طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. واکنش PCR با استفاده از آنزیم *Taq* با برنامه دمایی، واسرشتگی ۳۰ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، اتصال ۳۰ ثانیه در دمای اتصال مربوط به هر جفت آغازگر (جدول ۱) و گسترش ۲۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد طی ۳۵ چرخه انجام شد. هم‌چنین واسرشتگی اولیه پنج دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد و گسترش نهایی ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. پس از انجام واکنش، محصولات PCR روی ژل آگاروز یک درصد بارگذاری و تأیید اندازه شدند.

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 دمین‌های عملکردی موجود در این توالی‌ها مشخص شد (Marchler-Bauer et al. 2014; Jones et al. 2014; Finn et al. 2016).

جدول ۱- آغازگرهای مورد استفاده در تحقیق

نام آغازگر	توالی ('3 -'5)	اندازه قطعه تکثیری (bp)	دمای اتصال (°C)
L-*EF*-F	GCAGGTATGGTTAAGATGGTTCC	۱۳۳	۵۴/۳
L-*EF*-R	TCTCCACACTCTTGATGACTCC		
L-*Def 1*-F	AGAAATCAGTAGGTGTCTTGTC	۲۶۰	۵۲/۹
L-*Def 1*-R	TATATTATGCGTCTTGTATTGGAG		
L-*Def 2*-F	CATGGAGAAGAAAACAGTAGC	۲۴۸	۵۳/۳
L-*Def 2*-R	TTGCGTGTTGGAGAAAGG		
L-*Def 3*-F	TGGATTATGGGGAGGAAAAC	۲۴۸	۵۴/۳
L-*Def 3*-R	GCATGTCCATTGTTGAACTAAC		
L-*Def 4*-F	CTCGTTCAATTTCTTTGGTTTCC	۲۳۰	۵۴/۳
L-*Def 4*-R	CTTTCATCAACAATGTGTAGTGC		
L-*Def 5*-F	ATATTTGAGCCATTATGGAGAGG	۲۴۲	۵۴/۸
L-*Def 5*-R	GAACTAACAAAGACACATACAGC		
L-*Def 6*-F	TGGCTCGTTCAATTCCTATG	۲۲۵	۵۳/۵
L-*Def 6*-R	ATTAACAATGTGTAGTACAGAAAC		

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-04-19]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.1.11.8]

دمین‌های عملکردی تأیید شده به‌وسیله‌ی سه ابزار محاساباتی مذکور به‌عنوان دمین‌های 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).

با استفاده از نرم‌افزار CLC Genomics Workbench 9 و ابزار Phyre2 ساختارهای ثانویه و سه بعدی پروتئین‌ها پیش‌بینی شد. تعیین پارامترهای پروتئین شامل طول، بار خالص، pH ایزوالکتریک، فراوانی اسیدهای آمینه با استفاده از ابزارهای ProtParam و Protein Calculator 3.4 محاسبه شد. پیوندهای دی سولفیدی موجود در پروتئین‌ها با استفاده از سرور DiANNA 1.1 پیش‌بینی شد.

به‌منظور تعیین خاصیت ضدمیکروبی توالی‌های پروتئینی از پایگاه CAMP استفاده شد. توالی‌های پروتئینی با استفاده از چهار الگوریتم Random Forest، Support Vector Machine، Artificial Neural Network و Discriminant Analysis مورد بررسی قرار گرفتند و خاصیت میکروبی آن‌ها پیش‌بینی شد (Waghu et al. 2014).

توالی‌های جداسازی شده به‌همراه خانواده ژنی دیفنسین گونه وحشی عدس (*Lens ervoides*) و گیاه آرابیدوپسیس (*Arabidopsis thaliana*) به‌عنوان یک گیاه مدل مورد تجزیه تحلیل فیلوژنتیکی قرار گرفت. توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار MEGA 6.0 هم‌ردیف شدند و درخت فیلوژنتیکی با استفاده از روش Neighbor-Joining و آزمون Bootstrap با ۱۰۰۰ تکرار ترسیم شد (Tamura et al. 2013).

در آنالیز بیان ابتدا ۷ کتابخانه از داده‌های RNA-seq گیاه عدس زراعی با شماره‌های دسترسی SRX2334831، SRX2334830، SRX2334829، SRX2334828، SRX2334827، SRX2334826 و SRX2334825 از پایگاه SRA سایت NCBI دریافت شد. کتابخانه‌ها به‌ترتیب مربوط به ترانسکریپتوم برگ، ساقه، گل، بذر نابالغ، ریشه، غلاف بذر و غلاف بذر نابالغ بودند. از کتابخانه‌های دریافت شده ۷ پایگاه داده اختصاصی در نرم‌افزار CLC Genomics Workbench 9.0 ایجاد شد. توالی‌های جداسازی شده خانواده ژنی علیه این ۷ پایگاه داده اختصاصی ایجاد شده مورد هم‌ردیفی قرار گرفت و تعداد توالی‌های حاصل از هم‌ردیفی به‌طور جداگانه برای هر پایگاه یادداشت شد. سپس داده‌ها بر اساس فرمول RPKM نرمال شده و در نرم‌افزار IDEG6 و با استفاده از تست‌های Audic and Claverie، Fisher exact test و Chi-squared 2X2 از لحاظ آماری مقایسه شدند.

نتایج و بحث

در اثر سر هم‌بندی قطعات EST حاصل از هم‌ردیفی در گیاه عدس، در مجموع ٦ کانتیگ با طول‌های ۵۸۵، ۵۵۱، ٤۳۷، ٤۵٤، ۵۲۰ و ٤۰۳ جفت‌باز ایجاد شد. کانتیگ‌های ایجاد شده با هم‌ردیفی علیه کتابخانه‌های RNA-seq گیاه عدس تعیین صحت شدند. تجزیه و تحلیل‌های بیش‌تر وجود چارچوب‌های خوانش باز با طول ۲۲۲، ۲۲۵، ۲۲۵، ۲۲۸، ۲۲۵ و ۲۲۵ جفت‌باز را در کانتیگ‌ها مشخص کرد. با ترجمه چارچوب‌های خوانش باز در کانتیگ‌های شناسایی شده گیاه عدس پپتیدهایی با طول ۷۳، ۷٤، ۷٤، ۷۵، ۷٤ و ۷٤ اسید آمینه را مشخص کرد. ژن‌های دیفنسین گیاهی پپتیدهای اولیه‌ای با اندازه ٦۹ تا ۹۷ اسید آمینه را کد می‌کنند که پس از حذف سیگنال پپتید از آن‌ها، پپتیدهای بالغی با طول ٤۵ تا ۵٤ اسید آمینه ایجاد می‌شود (Nawrot et al. 2014). این مورد صحت اولیه جداسازی دیفنسین‌ها را در سطح ژنی و پروتئینی تأیید کرد (جدول ۲). پس از تأیید اولیه جداسازی، توالی‌های شناسایی شده برای ایجاد اطمینان بیش‌تر علیه کتابخانه‌های RNA-seq گیاه عدس مورد هم‌ردیفی قرار گرفتند. نتایج این هم‌ردیفی تغییری در توالی‌های اولیه ایجاد نکرد و تأییدی بر صحت این توالی‌ها بود. 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 سیتئین از خانواده Gamma-thionin‌ها است که در دیفنسین‌های گیاهی و دیفنسین‌های بندپایان یافت می‌شود (Pelegrini and Franco 2005). وجود این دمین عملکردی در تمام پپتیدهای جداسازی شده تأیید دیگری بر صحت جداسازی است.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-04-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.1.11.8]

جدول ۲- خصوصیات خانواده ژنی دیفنسین گیاه عدس

پپتید	طول پپتید (aa)	طول ORF (bp)	موقعیت سیگنال پپتید (aa)	محل تجمع	عملکرد
Lc-*Def* 1	۷۳	۲۲۲	۱-۲۷	خارج سلولی	پاسخ به تنش
Lc-*Def* 2	۷٤	۲۲۵	۱-۲۷	خارج سلولی	پاسخ به تنش
Lc-*Def* 3	۷٤	۲۲۵	۱-۲٤	خارج سلولی	پاسخ به تنش
Lc-*Def* 4	۷۵	۲۲۸	۱-۲۸	خارج سلولی	پاسخ به تنش
Lc-*Def* 5	۷٤	۲۲۵	۱-۲٤	خارج سلولی	پاسخ به تنش
Lc-*Def* 6	۷٤	۲۲۵	۱-۲۷	خارج سلولی	پاسخ به تنش
Cicer arietinum-Def	۷۲	۲۱۹	۱-۲۷	خارج سلولی	پاسخ به تنش
Medicago truncatula-Def	۷٦	۲۳۱	۱-۲٦	خارج سلولی	پاسخ به تنش
Vigna radiate-Def 1	۷۵	۲۲۸	۱-۲٤	خارج سلولی	پاسخ به تنش
Phaseolus vulgaris-Def D2	۷۸	**۲۳۷**	**۱-۲۰**	**خارج سلولی**	**پاسخ به تنش**

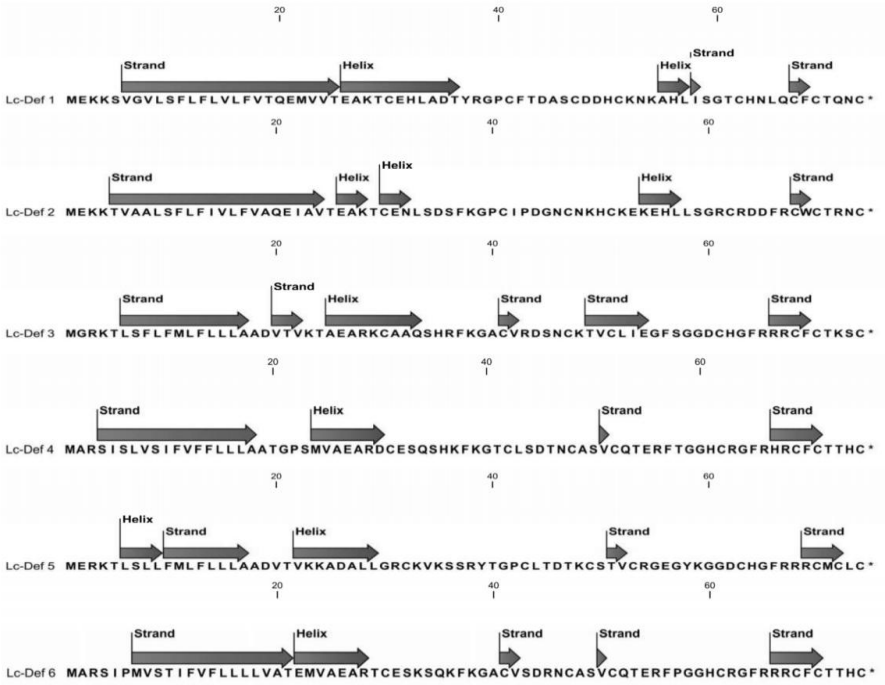
نتایج آنالیز توالی‌های پروتئینی خانواده دیفنسین گیاه عدس با استفاده از ابزارهای SignalP، Phobius و CELLO، وجود سیگنال پپتیدهایی به‌طول ۲٤، ۲۷ و ۲۸ اسید آمینه را در ساختار این پروتئین‌ها مشخص کرد. هم‌چنین مشخص شد که تمام پروتئین‌های این خانواده درخارج از سلول تجمع پیدا کرده و در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیر زیستی نقش دارند (جدول ۲). 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 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).

نتایج تجزیه و تحلیل ساختار ثانویه، وجود مارپیچ‌های آلفا و رشته‌های بتا را در ساختار پروتئینی تمام اعضا خانواده دیفنسین‌ها نشان داد (شکل ۱). نتایج وجود ۲ تا ۵ رشته بتا و هم‌چنین ۱ تا ۳ مارپیچ آلفا را در ساختار این پروتئین‌ها مشخص کرد. مطالعات ساختاری نشان داده‌اند که، دیفنسین‌های گیاهی و دیفنسین‌های سایر موجودات در ساختار خود دارای مارپیچ آلفا و صفحات بتا بوده که در پایداری و عملکرد این پپتیدها نقش عمده‌ای بازی می‌کنند (Thomma et al. 2002; Nawrot et al. 2014).

نتایج آنالیز پارامترهای پروتئینی، جرم مولکولی حدود ۸/۱ تا ۸/٤ کیلودالتون، pH ایزوالکتریک ٦ تا ۹/٤۱، ضریب ناپایداری ۲۰/۸۹ تا ۵۳/٤۳، شاخص آلیفاتیک ۵۹/۸۷ تا ۷۹/۰۵ و GRAVY ۰/۲۳٦- تا ۰/۱۱۳ را برای اعضای خانواده دیفنسین گیاه عدس مشخص کرد (جدول ۳). پپتیدهای دیفنسین داری جرم مولکولی بسیار پایینی بوده و این جرم مولکولی پایین باعث تسریع تولید، انتقال و عملکرد آن‌ها می‌شود (Sels et al. 2008). محدوده‌ی pH ایزوالکتریک محاسبه شده نشان‌دهنده‌ی خاصیت اسیدی کم و خاصیت بازی بالای این پپتیدهاست. دیفنسین‌ها به‌علت فراوانی وجود اسیدهای آمینه‌ای مانند سیستئین، پپتیدهایی با خاصیت بازی هستند (Castro and Fontes 2005; Pelegrini and Franco 2005). شاخص ناپایداری محاسبه شده برای این پپتیدها (به جز در مورد دو دیفنسین ۳ و ٦ که بالاتر از ٤۰ هستند) پایین‌تر از ٤۰ قرار دارد و نشان‌دهنده میزان پایداری و ماندگاری این پپتیدها در محیط است. پایداری بالا، فاکتور مهمی برای اثر ضد میکروبی این پپتیدها است (Guruprasad et al. 1990). شاخص آلیفاتیک محاسبه شده برای پپتیدهای خانواده دیفنسین گیاه عدس، نشان دهنده مقاومت نسبتاً خوب این پروتئین‌ها در برابر حرارت است که احتمالاً به‌علت نسبت بالای اسیدهای آمینه والین، لوسین، و آلانین و هم‌چنین وجود ساختارهای ثانویه و پل‌های دی سولفیدی موجود در این پپتیدهاست. محدوده‌ی شاخص آلفاتیک در پروتئین‌های مختلف متفاوت بوده و از حدود ۱۰ تا بیش‌تر ۱۰۰ است. (Ikai 1980).

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-04-19]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.1.11.8]



شکل ۱- ساختارهای ثانویه پیش‌بینی شده در خانواده دیفنسین گیاه عدس

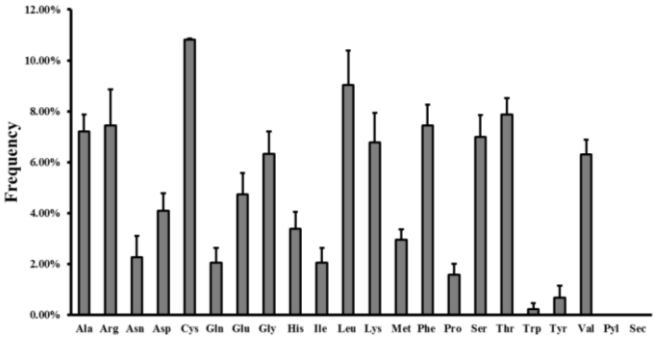
جدول ۳- خصوصیات فیزیک و شیمیایی خانواده ژنی دیفنسین گیاه عدس

پپتید	جرم مولکولی	pH ایزوالکتریک	شاخص ناپایداری	شاخص آلیفاتیک	GRAVY
Lc- *Def 1*	۸۱۶۲/۴۲	۶	۲۴/۰۵	۷۲/۰۵	-۰/۵۶۳
Lc- *Def 2*	۸۴۰۰/۷۴	۷/۵۳	۲۰/۸۹	۶۹/۸۶	-۱/۰۰۴
Lc- *Def 3*	۸۲۰۰/۷	۹/۴۱	۵۳/۴۳	۶۷/۳	-۰/۳۷۵
Lc- *Def 4*	۸۲۶۷/۵۳	۸/۵۲	۳۴/۷۳	۵۹/۸۷	-۰/۷۶۱
Lc- *Def 5*	۸۲۲۷/۸۷	۹/۳۲	۲۸/۶۴	۷۹/۰۵	-۰/۳۸۳
Lc- *Def 6*	۸۲۸۱/۷۵	۹/۱۴	۴۹/۳۲	۶۳/۲۴	-۰/۷۲۵
Cicer arietinum-Def	۸۱۷۱/۵۲	۸/۱	۲۳/۹۶	۶۵	-۰/۰۹۹
Medicago truncatula-Def	۹۰۸۹/۷۲	۹/۰۳	۳۳/۲۶	۶۱/۵۸	-۰/۲۲۵
Vigna radiate-Def 1	۸۷۴۹/۱۵	۶/۶۹	۳۰/۴۹	۵۹/۷۳	-۰/۲۸۱
Phaseolus vulgaris-Def D2	۸۷۸۲/۲۷	۹/۳۷	۴۱/۸۲	۵۸/۷۲	۰/۰۰۴

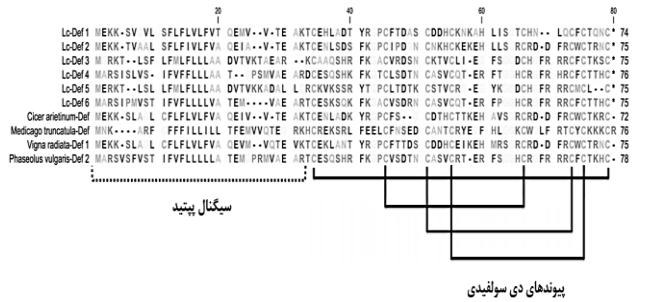
میزان GRAVY محاسبه شده برای پپتیدهای این خانواده منفی است که نشان دهنده آبگریزی نسبتاً خوب این پپتیدها است. در صورتی که مقادیر GRAVY منفی یا نزدیک به صفر باشند نشان دهنده غیر قطبی بودن پپتید مورد نظر است (Kyte and Doolittle 1982) و هم‌چنین نشان می‌دهد که این پپتیدها قابلیت تقابل با مولکول‌های قطبی آب و برهمکنش با مولکول‌های غیر قطبی تشکیل دهنده غشاهای سلولی را دارا هستند. این به‌خصوص در مورد پپتیدهای ضد میکروبی ضروری است، زیرا یکی از مهم‌ترین مکانیسم ضد میکروبی این پپتیدها بر همکنش با غشاهای سلولی پاتوژن‌ها است (Aerts et al. 2008).

نتایج مقایسه فراوانی اسیدهای آمینه تشکیل دهنده پپتیدهای خانواده دیفنسین گیاه عدس نشان داد که اسیدهای آمینه آلانین، آرژنین، سیستئین، گلایسین، گلوتامیک اسید، لوسین، لایزین، فنیل آلانین، سرین، تره‌ئونین و والین بیش‌ترین و اسیدهای آمینه آسپاراژین، آسپارتیک اسید، گلوتامین، ایزولوسین، پرولین، تریپتوفان و تایروزین کمترین فراوانی را بین پپتیدهای این خانواده داشتند (شکل ۲). دیفنسین‌ها، پپتیدهایی غنی از سیستئین هستند.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-04-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.1.11.8]



شکل ۲- فراوانی اسیدهای آمینه موجود در ساختار پپتیدهای خانواده دیفنسین گیاه عدس



شکل ۳- اسیدهای آمینه سیستئین محافظت شده و پل‌های دی سولفیدی تشکیل شده بین آن‌ها در ساختار دیفنسین‌های گیاه

به‌علت تشکیل پل‌های دی سولفید فراوان در ساختار دیفنسین‌ها که در عملکرد آن‌ها نقش حیاتی دارد، فراوانی بالای اسید آمینه سیستئین در ساختار آن‌ها ضروری است (Hogg 2003; Cools et al. 2017). فراوانی بالای اسیدهای آمینه والین، لوسین، و آلانین در خانواده دیفنسین عدس به‌علت بالا بودن شاخص آلیفاتیک این پپتیدها و نشان دهنده مقاومت نسبتاً خوب این پروتئین‌ها در برابر حرارت است (Ikai 1980).

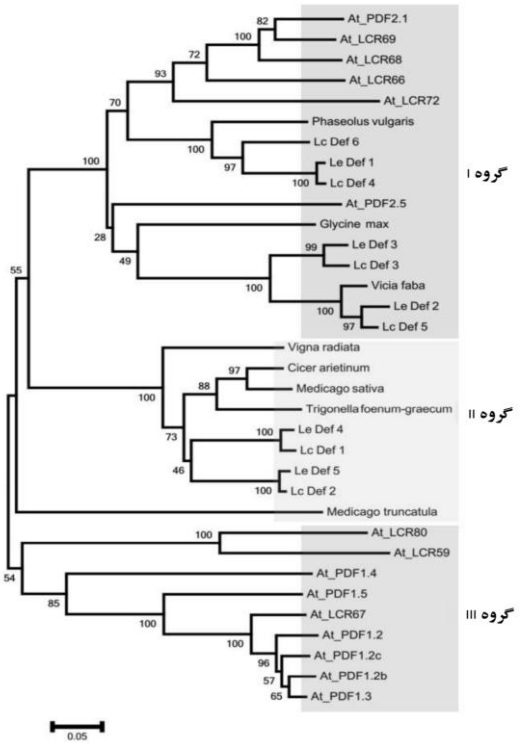
پپتیدهای بالغ دیفنسین در ساختار خود دارای ۸ اسید آمینه سیستئین محافظت شده هستند (Van der Weerden and Anderson 2013; Vriens et al. 2014). اسیدهای آمینه سیستئین محافظت شده با تشکیل ٤ پل دی سولفیدی (شکل ۳)، ساختار ویژه‌ای را به پپتید داده که باعث پایداری آن شده و در برهمکنش پپتید با غشا سلولی پاتوژن‌ها نقش حیاتی بازی می‌کند (Aerts et al. 2008; Vriens et al. 2014).

نتایج پیش‌بینی خاصیت ضد میکروبی خانواده دیفنسین گیاه عدس با استفاده از سایت CAMP، خاصیت ضد میکروبی را در تمام پپتیدهای خانواده دیفنسین مشخص کرد. پس از حذف سیگنال پپتید از دیفنسین‌ها، با استفاده از الگوریتم Support Vector Machine با میزان احتمال بیش‌تر از ۰/۷۳۹، با استفاده از الگوریتم Random Forest با میزان احتمال بیش‌تر از ۰/۷۰۳، با استفاده از الگوریتم Artificial Neural Network با تأیید کامل و با استفاده از الگوریتم Discriminant Analysis با میزان احتمال بیش‌تر از ۰/۵۲۳ خاصیت ضدمیکروبی تمام پپتیدهای خانواده دیفنسین گیاه عدس پیش‌بینی شد (جدول ٤).

جدول ٤- پیش‌بینی خاصیت ضد میکروبی خانواده دیفنسین گیاه عدس

پپتید	SVM	RF	ANN	DA
Lc- *Def 1*	۰/۷۵۱	۰/۷۰۳	✓	۰/۵۲۳
Lc- *Def 2*	۰/۷۳۹	۰/۹۶۶۵	✓	۰/۷۸۸
Lc- *Def 3*	۰/۹۷۸	۰/۹٤۳	✓	۱
Lc- *Def 4*	۰/۸۵۷	۰/۸۵۱۵	✓	۰/۸۱٤
Lc- *Def 5*	۰/۹۸۵	۰/۸۳۳۵	✓	۰/۹۹۸
Lc- *Def 6*	۰/۹۳۷	۰/۷۷۶	✓	۰/۹۸۵
Cicer arietinum-Def	۰/۸۶۳	۰/۵۵۶۵	✓	۰/۶۶۹
Medicago truncatula-Def	۰/۸۵۳	۰/۶۱٤	✓	۰/۶٤۲
Vigna radiate-Def 1	۰/۷۲۹	۰/۳۳۶	×	۰/۳۱۹
Phaseolus vulgaris-Def D2	۰/۹۵٤	۰/۷۶۱	✓	۰/۹۹٤

SVM، RF، ANN و DA الگوریتم‌های مختلف پیش‌بینی هستند.
احتمالات ≤ ۰/۵ به معنی تأیید خاصیت ضد میکروبی هستند.
✓ به معنی تأیید خاصیت ضد میکروبی است.



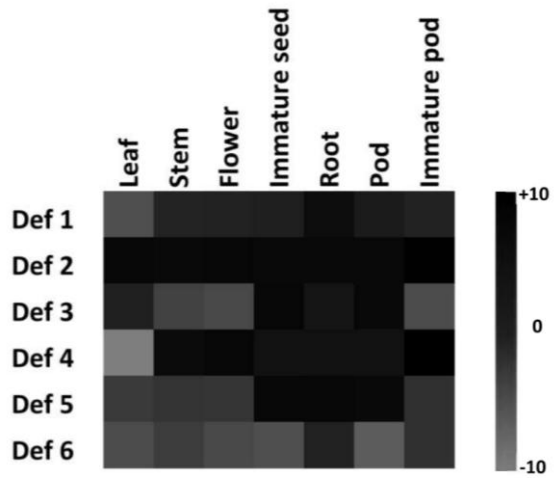
شکل ٤- درخت تکاملی رسم شده برای ژن‌های خانواده دیفنسین گیاه عدس

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-04-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.1.11.8]

نتایج تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی نشان داد که خانواده ژنی دیفنسین گیاه عدس در دو گروه کلی تقسیم‌بندی می‌شوند. ژن‌های دیفنسین ۳، ٤، ۵ و ٦ عدس در گروه شماره ۱ و دیفنسین‌های ۱ و ۲ در گروه شماره ۲ تقسیم‌بندی می‌شوند (شکل ٤). خانواده دیفنسین‌های گیاه آرابیدوپسیس از ۱۵ عضو تشکیل شده است که در سه گروه مختلف تقسیم‌بندی می‌شوند. در درخت فیلوژنتیکی، دیفنسین‌های گیاه عدس و گونه‌ی وحشی عدس در گروه‌های ۱ و ۲ گیاه آرابیدوپسیس تقسیم‌بندی می‌شوند و هیچ عضوی در گروه ۳ گیاه آرابیدوپسیس ندارند (شکل ٤). آنالیز بیان ژن‌های خانواده دیفنسین گیاه عدس در بافت‌های برگ، ساقه، گل، بذر نابالغ، ریشه، غلاف بذر و غلاف بذر نابالغ، نشان داد که اعضای این خانواده ژنی دارای بیان متفاوتی در بافت‌های مختلف هستند. سه آزمون آماری Audic and Claverie، Fisher exact test و Chi-squared 2X2 تفاوت معنی‌داری را در بیان ژن‌های خانواده دیفنسین گیاه عدس بین بافت‌های مختلف نشان داد (شکل ۵ و ٦). دیفنسین ۱ بیش‌ترین میزان بیان را در بافت ریشه داشت و در سایر بافت‌های مورد مطالعه بیان قابل توجهی نداشت. از طرف دیگر، دیفنسین ۲ بیان بسیار بالایی در غلاف بذر نابالغ نشان داد و در سایر بافت‌های برگ، ساقه، گل، بذر نابالغ، ریشه و غلاف بذر نیز بیان قابل توجهی داشت. دیفنسین ۳ بیش‌ترین بیان را در بذر نابالغ و غلاف بذر داشت، در ریشه نیز مقداری بیان داشت و در سایر بافت‌ها بیان قابل توجهی نداشت. دیفنسین ٤ بیان بالایی را در در غلاف بذر نابالغ داشت، هم‌چنین در گل و ساقه نیز مقداری بیان داشت و در سایر بافت‌ها بیان قابل توجهی نشان نداد. دیفنسین ۵ بیان قابل توجهی را در ریشه، غلاف بذر و غلاف بذر نابالغ نشان داد ولی در سایر بافت‌ها بافت‌ها بیان قابل توجهی نداشت. در نهایت، دیفنسین ٦ بیان بالایی در بافت ریشه و غلاف بذر نابالغ نشان داد، در بافت‌های برگ، ساقه و گل نیز مقداری بیان داشت و بیان قابل توجهی را در بذر نابالغ و غلاف بذر نشان نداد.

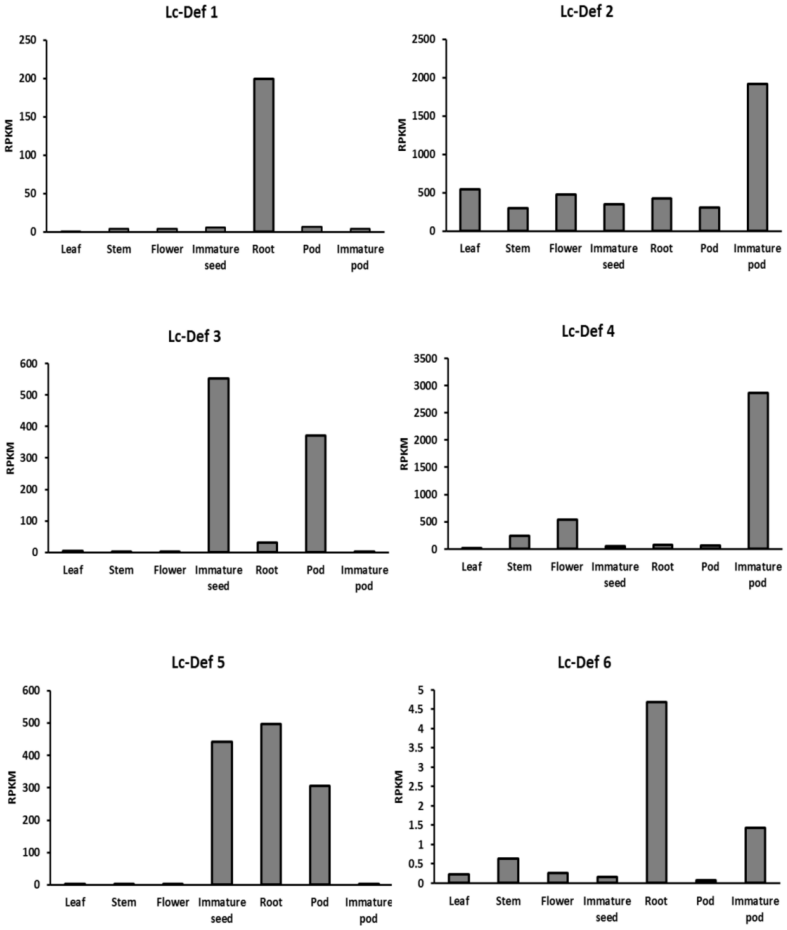
با توجه به نتایج به‌دست آمده از آنالیزهای بیوانفورماتیکی، صحت توالی‌های جداسازی شده خانواده‌ی ژنی دیفنسین گیاه عدس تأیید شد. در مرحله‌ی بعد، برای تأیید آزمایشگاهی آنالیزهای بیوانفورماتیکی، از واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی (جدول ۱) خانواده‌ی ژنی دیفنسین گیاه عدس برای تکثیر استفاده شد. نتایج PCR با ایجاد باندهای اختصاصی در محدوده‌ی مورد نظر، صحت جداسازی بیوانفورماتیکی را ثابت کرد (شکل ۷). تاکنون توالی کد کننده دیفنسین‌های مختلفی از گیاهان جداسازی و بررسی شده‌اند. توالی کد کننده با طول کوتاه، جرم مولکولی پایین، وجود جایگاه‌های سیستئین محافظت شده، وجود پل‌های دی سولفیدی محافظت شده، وجود سیگنال پپتید ترشحی، خاصیت ضدمیکروبی و وجود دمین عملکردی Knot1 از خانواده Gamma-thionin ها از ویژگی‌های مشترک دیفنسین‌های گیاهی است (Cools et al. 2017). تمامی ویژگی‌های یاد شده در مطالعه‌ی حاضر بررسی و در دیفنسین‌های جداسازی شده از گیاه عدس مشاهده شد که خود تأییدی بر صحت جداسازی این ژن‌ها است.

به‌علت نقش‌های دفاعی دیفنسین‌ها در 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).

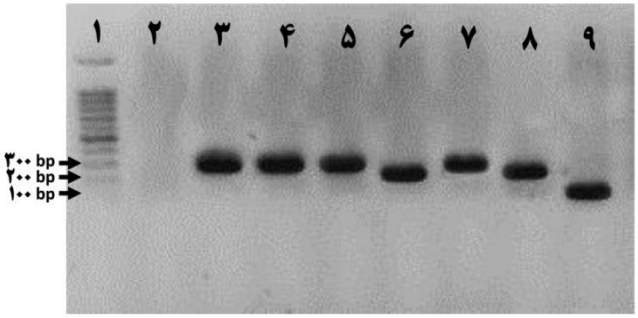


شکل ۵- نمودار حرارتی مقایسه میزان بیان ژن‌های خانواده دیفنسین گیاه عدس بین بافت‌های مختلف

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-04-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.1.11.8]



شکل ٦- بررسی بیان ژن‌های خانواده دیفنسین گیاه عدس در بافت‌های مختلف



شکل ۷- تصویر الکتروفورزی محصولات PCR. ۱- نشانگر مولکولی bp 100، ۲- واکنش کنترل منفی، ۳- دیفنسین ۱، ٤- دیفنسین ۲، ٥- دیفنسین ۳، ٦- دیفنسین ٤، ۷- دیفنسین ٥، ۸- دیفنسین ٦ و ۹- ژن مرجع *Ef1α*.

دیفنسین‌ها برای پایداری و عملکرد مناسب در شرایط مختلف، نیازمند ایجاد پیچ و تاب‌های ویژه در ساختار خود هستند. مارپیچ‌های آلفا، رشته‌های بتا و هم‌چنین پل‌های دی سولفیدی انواعی از این تغییرات ساختاری هستند که در ساختار دیفنسین‌ها ایجاد می‌شوند تا پپتید بتواند در محل تجمع خود پایدار مانده و با بیشترین قابلیت با پاتوژن‌های هدف برهمکنش داشته باشد (Valente et al. 2013; Cools et al. 2017). وجود مارپیچ‌های آلفا، رشته‌های بتا و پل‌های دی سولفید در دیفنسین‌های جداسازی شده در این مطالعه مشخص شد، که خود تأیید دیگری بر صحت جداسازی و روش مورد استفاده در مطالعه بود. یکی از

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-04-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.1.11.8]

مهم‌ترین و عمومی‌ترین مکانیسم‌هایی که پپتیدهای ضدمیکروبی برای مقابله با پاتوژن‌ها به‌کار می‌برند، برهمکنش با غشاهای سلولی است. برای انجام این برهمکنش علاوه بر ساختارهای خاص، دیفنسین‌ها نیازمند ویژگی‌های دیگری نیز هستند که از آن جمله می‌توان به خاصیت هیدروفوبیک اشاره کرد. دیفنسین‌ها برای برهمکنش با غشاهای سلولی که عمدتاً از اسیدهای چرب به صورت دو لایه تشکیل شده‌اند و به شدن خاصیت آبگریزی دارند باید خاصیت آبگریزی خود را افزایش دهند که این مورد را به وسیله‌ی افزایش میزان اسیدهای آمینه آبگریز مانند سیستئین و آلانین در ساختار خود انجام می‌دهند. میزان اسیدهای آمینه آبگریز موجود در ساختار دیفنسین‌های جداسازی شده در این مطالعه و هم‌چنین مقادیر منفی GRAVY محاسبه شده برای آن‌ها تأیید مهمی بر صحت جداسازی است (Gasteiger et al. 2005; Sagaram et al. 2012).

خاصیت ضد میکروبی دیفنسین‌ها و سایر پپتیدهای ضد میکروبی، به‌علت داشتن پارامترهایی مانند آبگریزی، وجود ساختارهای خاص، بار مثبت بالا و غیره صورت می‌گیرد (Zasloff 2002; Cools et al. 2017). بر اساس این پارامترها، ابزاری در پایگاه CAMP ایجاد شده‌است که با استفاده از الگوریتم‌های محاسباتی مختلف، خاصیت ضد میکروبی را در پروتئین‌های مختلف پیش‌بینی می‌کند. الگوریتم‌های ابزار موجود در پایگاه CAMP، تنها در صورتی یک پپتید یا پروتئین را به‌عنوان پپتید ضد میکروبی پیش‌بینی می‌کنند که یک یا چند پارامتر مشترک ضد میکروبی را داشته باشد (Waghu et al. 2014). بررسی دیفنسین‌های جداسازی شده در این مطالعه در پایگاه CAMP با میزان احتمال بالایی و توسط ٤ الگوریتم پیش‌بینی، خاصیت ضد میکروبی این ژن‌ها را مشخص کرد و تأیید نهایی بر صحت جداسازی این ژن‌ها بود.

بررسی بیان دیفنسین‌های جداسازی شده از گیاه عدس، الگوی بیان متفاوتی را برای تمام این ژن‌ها بین بافت‌های مختلف نشان داد (شکل ۵ و ٦). دیفنسین‌ها بافت‌ها و اندام‌هایی مانند برگ، بذر، غلاف بذر، غده، میوه، ریشه و بخش‌های مختلف گل بیان می‌شوند (Lay and Anderson 2005; Wong et al. 2007; Cools et al. 2017). در گیاه آرابیدوپسیس، هر اندامی حداقل یک دیفنسین را بیان کرده و برخی اندام‌ها، دو یا چند دیفنسین را بیان می‌کنند (Silverstein et al. 2005). دیفنسین‌ها طی رشد و نمو طبیعی گیاه بیان می‌شوند. بررسی بیان دیفنسین‌های جداسازی شده از گیاه عدس نشان داد که دیفنسین‌های ۱، ۲، ۵ و ٦ بیش‌ترین میزان بیان را در ریشه داشتند (شکل ۵ و ٦). بافت‌های ریشه به علت قرار گرفتن در خاک که محل تجمع انواع مختلفی از پاتوژن‌هاست، نیاز به محافظت بالایی دارند. یکی از این سیستم‌های محافظتی پپتیدهای دیفنسین هستند که با میزان تولید بالا در بافت‌های ریشه، به‌عنوان یکی از خطوط دفاعی در مقابل حملات احتمالی پاتوژن‌ها عمل می‌کنند. بررسی بیان دیفنسین‌های جداسازی شده از گیاه عدس همچنین نشان داد که، در برگ تنها دیفنسین ۲ بیان شده و فعال است و بقیه‌ی اعضاء این خانواده بیان ناچیزی دارند. در ساقه، گل و غلاف بذر نابالغ، الگویی مشابه اما با میزانی متفاوت از فعالیت دیفنسین‌ها مشاهده شد به‌طوری که در ساقه و گل دیفنسین‌های ۲، ٤ و ٦ تا حدودی بیان داشته ولی در غلاف بذر نابالغ این دیفنسین‌ها بیان بالایی نشان دادند (شکل ۵ و ٦). در بذور نابالغ و غلاف بذر، روند مشابهی از بیان دیفنسین‌ها مشاهده شد به‌طوری که، دیفنسین‌های ۲، ۳ و ۵ در این دو اندام بیان داشته و فعال بودند. بیشتر دیفنسین‌های گیاهی که تاکنون مشخص شده‌اند، از بذور گیاهی جداسازی، شناسایی و بررسی شده‌اند (Stotz et al. 2009; Cools et al. 2017). محتویات بذر و از جمله جنین‌های گیاهی در مرحله‌ی جوانه‌زنی و پس از اینکه پوسته بذر شکافته شد، محافظ اولیه خود را از دست داده و در معرض خاک و میکروارگانیسم‌های موجود در آن قرار می‌گیرند. در این مرحله، میزان بیان دیفنسین‌ها (۳۰ درصد پروتئین کل) افزایش یافته تا جنین را در مقابل پاتوژن‌های موجود در خاک محافظت کند. در اندام‌هایی مثل میوه و غلاف بذر که وظیفه‌ی محافظت از حیاتی‌ترین بخش گیاه یعنی بذور را به‌عهده دارند، میزان بیان عوامل ضد میکروبی و از جمله دیفنسین‌ها افزایش پیدا می‌کند تا سدی در مقابل حمله‌ی پاتوژن‌ها به این بخش‌های حساس ایجاد کنند (Terras et al. 1995; Stotz et al. 2009; de Oliveira Carvalho and Gomes 2009).

بخش عمده‌ای از بیان دیفنسین‌های گیاهی در اندام‌های مختلف، در سلول‌های سطحی این اندام‌ها صورت می‌گیرد که با توجه به

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-04-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.1.11.8]

نقش دیفنسین‌ها در محافظت گیاه در مقابل پاتوژن‌ها قابل توجیه است. این نقش دیفنسین‌ها، همچنین با القاپذیری بیان آن‌ها با محرک‌های پاتوژنی مشخص شده است به‌طوری که، بیان برخی از دیفنسین‌ها در آلودگی‌های پاتوژنی در گیاهان نخود، توتون، آرابیدوپسیس و صنوبر به‌میزان زیادی افزایش یافته است (Thomma et al. 2002; Lay and Anderson 2005; de Oliveira Carvalho and Gomes 2009).

در سال‌های اخیر، توجه به پپتیدهای ضد میکروبی به دو دلیل عمده نیاز به روش‌های جدید در محافظت گیاهان و تقاضا برای عوامل ضد میکروبی جدید در پزشکی به‌طور معنی داری 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 (Lico et al. 2012; Flavia Cancado Viana et al. 2013; Holaskova et al. 2015). اولین قدم در این راه، شناسایی، جداسازی و بررسی این ترکیبات ضد میکروبی از منابع مختلف گیاهی است و تا به حال بیش از ۲۰۰۰ پپتید ضد میکروبی طبیعی شناسایی شده‌است و هم‌چنین هزاران مورد از مشتقات آن‌ها مهندسی شده و به‌طور مصنوعی سنتز شده‌است (Laverty et al. 2011). با این وجود هنوز پپتیدهای مختلفی در گیاهان و دیگر موجودات ناشناخته مانده‌اند. امروزه با استفاده از پایگاه‌های داده EST و داده‌های حاصل از توالی‌یابی نسل بعدی و هم‌چنین کاربرد ابزارهای بیوانفورماتیکی می‌توان در مدت زمان بسیار کم و با کم‌ترین میزان فعالیت آزمایشگاهی توالی ژن‌های بیوسنتزی مورد نظر را شناسایی و جداسازی و برای اهداف مختلفی دستورزی کرد (Dardel and Kepes 2007; Pevsner 2015).

در این پژوهش برای اولین بار، با استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیکی، توالی کدکننده‌ی ٦ ژن از خانواده‌ی دیفنسین گیاه عدس پیش‌بینی و شناسایی شد. سپس، خصوصیات ژن‌های جداسازی شده مانند طول توالی کدکننده، طول توالی پپتید، محل تجمع سلولی، ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی پپتیدی، خاصیت ضد میکروبی و الگوی بیان ژن آن‌ها بررسی شد. در نهایت با استفاده از فرآیند PCR و آغازگرهای اختصاصی قطعات کدکننده‌ی هر کدام از ژن‌های مورد نظر تکثیر شد.

در این پژوهش توالی کدکننده ژن‌های خانواده دیفنسین با استفاده از روش‌های بیوانفورماتیکی در گونه زراعی گیاه عدس شناسایی، جداسازی و تعیین خصوصیت شدند. تکثیر و تولید باندهایی در محدوده شناسایی شده با استفاده از واکنش PCR برای اعضای خانواده ژنی دیفنسین گیاه عدس، صحت جداسازی و همچنین روش بیوانفورماتیکی به کار رفته برای شناسایی را تأیید کرد. در مجموع نتایج این تحقیق نشان داد که، ژن‌های خانواده دیفنسین گیاه عدس همانند سایر دیفنسین‌های گیاهی، هم در سطح ژنی و هم پروتئینی ویژگی‌های ساختاری و عملکردی مشابهی دارند. نتایج هم‌چنین نشان داد که دیفنسین‌های گیاه عدس در اندام‌هایی که تماس بیش‌تری با پاتوژن‌ها دارند (مانند خاک) و هم‌چنین در اندام‌های حیاتی (مانند بذر) بیشتر تولید شده و فعالیت بالاتری دارند. دیفنسین‌ها، دارای نقش کلیدی و مهمی در محافظت از گیاهان در مقابل پاتوژن‌ها بوده و دارای نقش‌های احتمالی در سایر فرآیندهای گیاهی هستند. با شناسایی ژن‌های دیفنسین و سایر پپتیدهای ضد میکروبی و انتقال آن‌ها به گیاهان زراعی، می‌توان گیاهان تراریخت مقاوم نسبت به پاتوژن‌های مختلف تولید کرد. 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 شده‌است که بدین ترتیب قدردانی می‌شود.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-04-19]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.1.11.8]

منابع

Aerts A, François I, Cammue B, Thevissen K (2008) The mode of antifungal action of plant, insect and human defensins. Cellular and Molecular Life Sciences 65:2069-2079.

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 2:67-83.

Castro M, Fontes W (2005) Plant defense and antimicrobial peptides. Protein and Peptide Letters 12:11-16.

Cools TL, Struyfs C, Cammue BP, Thevissen K (2017) Antifungal plant defensins: increased insight in their mode of action as a basis for their use to combat fungal infections. Future Microbiology 12:441-454.

Dardel F, Kepes F, 2007. Bioinformatics: genomics and post-genomics. John Wiley & Sons, United States 252p.

de Oliveira Carvalho A, Gomes VM (2009) Plant defensins—prospects for the biological functions and biotechnological properties. Peptides 30:1007-1020.

Elsbach P (2003) What is the real role of antimicrobial polypeptides that can mediate several other inflammatory responses? Journal of Clinical Investigation 111:1643.

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: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 14:568-579.

Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S e, Wilkins M R, Appel R D, Bairoch A, 2005. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. Springer.

Gill R W, Sanseau P (2000) Rapid in silico cloning of genes using expressed sequence tags (ESTs). Biotechnology Annual Review 5:25-44.

Guruprasad K, Reddy BB, Pandit MW (1990) Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition: a novel approach for predicting in vivo stability of a protein from its primary sequence. Protein Engineering, Design and Selection 4:155-161.

Hogg PJ (2003) Disulfide bonds as switches for protein function. Trends in Biochemical Sciences 28:210-214.

Holaskova E, Galuszka P, Frebort I, Oz M T (2015) Antimicrobial peptide production and plant-based expression systems for medical and agricultural biotechnology. Biotechnology Advances 33: 1005-1023.

Hoskin DW, Ramamoorthy A (2008) Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes 1778:357-375.

Ikai A (1980) Thermostability and aliphatic index of globular proteins. The Journal of Biochemistry 88:1895-1898.

Janssen BJ, Schirra HJ, Lay FT, Anderson MA, Craik DJ (2003) Structure of Petunia hybrida defensin 1, a novel plant defensin with five disulfide bonds. Biochemistry 42:8214-8222.

Jones P, Binns D, Chang HY, Fraser M, Li W, McAnulla C, McWilliam H, Maslen J, Mitchell A, Nuka G (2014) InterProScan 5: genome-scale protein function classification. Bioinformatics 30:1236-1240.

Kyte J, Doolittle RF (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. Journal of Molecular Biology 157:105-132.

Lacerda A F, Vasconcelos É A, Pelegrini PB, de Sa MF G (2014) Antifungal defensins and their role in plant defense. Frontiers in Microbiology 5:1-10.

Laverty G, Gorman SP, Gilmore B F (2011) The potential of antimicrobial peptides as biocides. International Journal of Molecular Sciences 12:6566-6596.

Lay F, Anderson M (2005) Defensins-components of the innate immune system in plants. Current Protein and Peptide Science 6:85-101.

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 31:439-451.

Marchler-Bauer A, Derbyshire M K, Gonzales N R, 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:D222-D226.

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 147:149-165.

Nawrot R, Barylski J, Nowicki G, Broniarczyk J, Buchwald W, Goździcka-Józefiak A (2014) Plant antimicrobial peptides. Folia Microbiologica 59: 181-196.

Nielsen H (2017) Predicting Secretory Proteins with SignalP. Protein Function Prediction: Methods and Protocols: 59-73.

Parachin N S, Mulder KC, Viana A AB, Dias SC, Franco OL (2012) Expression systems for heterologous production of antimicrobial peptides. Peptides 38:446-456.

Pelegrini PB, Franco OL (2005) Plant γ-thionins: novel insights on the mechanism of action of a multi-functional class of defense proteins. The International Journal of Biochemistry and Cell Biology 37:2239-2253.

Periwal V, Scaria V (2014) Bioinformatics Review. Bioinformatics 45:1-9.

Pevsner J, 2015. Bioinformatics and functional genomics. John Wiley and Sons, United States 1160p.

Sagaram US, Kaur J, Shah D, 2012. Antifungal plant defensins: structure-activity relationships, modes of action, and biotech applications. Small Wonders: Peptides for disease control. ACS Publications.

Sels J, Mathys J, De Coninck BM, Cammue BP, De Bolle M F (2008) Plant pathogenesis-related (PR) proteins: a focus on PR peptides. Plant Physiology and Biochemistry 46:941-950.

Silverstein KA, Graham MA, Paape TD, VandenBosch K A (2005) Genome organization of more than 300 defensin-like genes in Arabidopsis. Plant Physiology 138:600-610.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-04-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.1.11.8]

Srivastava R, Vasishtha H (2012) Saponins and lectins of Indian chickpeas (Cicer arietinum) and lentils Lens culinaris. Indian Journal of Agriculture and Biochemistry 25:44-47.
Stotz HU, Thomson J, Wang Y (2009) Plant defensins: defense, development and application. Plant Signaling & Behavior 4:1010-1012.
Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S (2013) MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Molecular Biology and Evolution 30:2725-2729.
Terras FR, Eggermont K, Kovaleva V, Raikhel NV, Osborn RW, Kester A, Rees SB, Torrekens S, Van Leuven F, Vanderleyden J (1995) Small cysteine-rich antifungal proteins from radish: their role in host defense. The Plant Cell 7:573-588.
Thomma BP, Cammue BP, Thevissen K (2002) Plant defensins. Planta 216:193-202.
Valente AP, de Paula VS, Almeida FC (2013) Revealing the properties of plant defensins through dynamics. Molecules 18:11311-11326.
Van der Weerden NL, Anderson MA (2013) Plant defensins: common fold, multiple functions. Fungal Biology Reviews 26:121-131.
Vriens K, Cammue B, Thevissen K (2014) Antifungal plant defensins: mechanisms of action and production. Molecules 19:12280-12303.
Waghu FH, Gopi L, Barai RS, Ramteke P, Nizami B, Idicula-Thomas S (2014) CAMP: Collection of sequences and structures of antimicrobial peptides. Nucleic Acids Research 42:D1154-D1158.
Wong JH, Xia L, Ng T (2007) A review of defensins of diverse origins. Current Protein and Peptide Science 8:446-459.
Yadav SS, McNeil DL, Stevenson PC, 2007.Lentil: An ancient crop for modern times. Springer Netherlands, Netherlands 461p.
Yu CS, Cheng CW, Su WC, Chang KC, Huang SW, Hwang JK, Lu CH (2014) CELLO2GO: a web server for protein subCELlular LOcalization prediction with functional gene ontology annotation. PLoS One 9: e99368.
Zasloff M (2002) Antimicrobial peptides of multicellular organisms. Nature 415:389-395.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-04-19]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.1.11.8]