ژنتیک نوین
دوره دوازدهم، شماره ۱، بهار ۱۳۹۶
صفحه ۵۹ - ۴۹

# افزایش بیان ژن دفنسین (*Rs-AFP1*) با منشا گیاه تربچه (*Raphanus sativus*) در گیاه کلزا (*Brassica napus*) به‌منظور ارتقا مقاومت نسبت به بیماری پوسیدگی اسکلروتینیایی ساقه

# Overexpression of radish (*Raphanus sativus*) defensin gene (*Rs-AFP1*) in canola (*Brassica napus*) improves resistance to Sclerotinia stem rot disease

نسیم زرین‌پنجه[۱]، مصطفی مطلبی*[۱]، محمدرضا زمانی[۱]، محبوبه ضیایی[۱]، عصمت جورابچی[۱]

۱- به‌ترتیب دانشجوی سابق دکتری، استادان، دانشجوی سابق دکتری، کارشناس ارشد، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران

**Zarinpanjeh N[1], Motallebi M*[1], Zamani MR[1], Ziaei M[1], Jourabchi E[1]**

1- Former PhD Student, Professors, Former PhD Student, MSc, National institute of Genetic Enginering and Biotechnology, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: motalebi@nigeb.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۵/۲/۲۲ - تاریخ پذیرش: ۹۵/۳/۱۱)

## چکیده

**پوسیدگی اسکلروتینیایی ساقه با عامل بیماری *Sclerotinia sclerotiorum* یکی از بیماری‌های مهم قارچی کلزا (*Brassica napus*) محسوب می‌شود. کاربرد روش‌های مهندسی ژنتیک از طریق افزایش بیان ژن‌های مفید در گیاه، می‌تواند نوید بخش جایگزینی برای روش‌های کنترل شیمیایی باشد. دفنسین‌ها، پپتیدهای ضد میکروبی هستند که با نفوذپذیرکردن غشای سلول مهاجم، باعث از بین رفتن آن‌ها می‌شوند و می‌توانند کاندید مناسبی جهت تراریختی باشند. در این تحقیق، ژن دفنسین (*Rs-AFP1*) با منشا گیاه تربچه (*Raphanus sativus*) در وکتور بیانی pBI121 تحت پروموتور CaMV35S همسانه‌سازی شد. سازه نوترکیب حاصل (pBINZP1) از طریق تراریختی با آگروباکتریوم به گیاه کلزا منتقل شد. گیاهان تراریخت نسل $T_0$ توسط واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز و آزمون سادرن بلات تائید شدند. نرخ تراریختی ۴/۲ درصد به‌دست آمد و تعداد نسخه‌های تراژن در ژنوم گیاهان تراریخت بین یک الی سه متغیر بود. فعالیت ضد قارچی گیاهان تراریخت تک نسخه در نسل $T_0$ و گیاهان تراریخت هموزیگوت در نسل $T_2$ به‌ترتیب توسط آزمون‌های زیست سنجی درون شیشه‌ای و آزمون گلخانه‌ای بررسی شدند. نتایج نشان داد که بیان ژن دفنسین در کلزای تراریخت، باعث ارتقا مقاومت در برابر این قارچ بیمارگر نسبت به گیاهان غیر تراریخت شده‌است.**

**واژه‌های کلیدی**

دفنسین(*Rs-AFP1*)
فعالیت ضد قارچی
کلزا
گیاه تراریخت
*Sclerotinia sclerotiorum*

[ Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-29 ]

[ DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.1.6.6 ]

## مقدمه

کلزا یکی از محصولات عمده روغنی در جهان است که همانند بسیاری از محصولات زراعی تولید آن با چالش‌های متعددی ازجمله انواع تنش‌های زیستی و غیر زیستی همراه است (Grover and Pental 2003; Dutt et al. 2005; Ullah et al. 2010). پوسیدگی ساقه اسکلروتینیا با عامل بیماری *Sclerotinia sclerotiorum* یکی از مهم‌ترین بیماری‌های کلزاست. این قارچ که برای بسیاری از دانه‌های روغنی، عامل بیماری‌زا بوده، در سرتاسر جهان نیز پراکنش داشته (Hemmati et al. 2009) و باعث کاهش ۱۰ تا ۸۰ درصدی عملکرد و کیفیت روغن کلزا می‌شود (Gao et al. 2014). از میان راهکارهای متداول برای کنترل بیماری‌های قارچی از جمله به کار بردن نهاده‌های شیمیایی و اجرای اصلاح سنتی که اغلب با محدودیت‌هایی روبرو هستند، مهندسی ژنتیک رویکردی مهم در کنترل بیماری‌های گیاهی است که امکان به‌کارگیری ژن‌های سودمند در گیاهان را جهت کنترل بیماری‌ها امکان‌پذیر می‌سازد. از مزایای این رهیافت می‌توان به روش‌های انتقال اشاره کردکه قادر به تولید پروتئین‌هایی هستند که میزان مقاومت در برابر بیماری را بهبود می‌بخشند (van der Biezen et al. 2001). بسیاری از پروتئین‌های ضد میکروبی جهت القا پاسخ‌های ایمنی در گیاهان به‌طور کامل شناسایی شده‌اند (Francois et al. 2002). از میان پروتئین‌های ضد قارچ، پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی مانند دفنسین‌ها به لحاظ ایجاد مقاومت در برابر آلودگی قارچی در بسیاری از گیاهان نسبت به بقیه شناخته شده‌تر هستند. مانند دفنسین Rs-AFP با منشا گیاه تربچه (*Raphanus sativus*)، دفنسین Ah-AMP با منشا شاه بلوط هندی (*Aesculus hippocatanum*) و دفنسین AlfAFP با منشا یونجه (*Medicago sativa*) (Prema1 and Pruthvi 2012). دفنسین‌ها طبقه‌ای از پپتیدهای غنی از سیستئین، به شدت بازی، با وزن مولکولی پایین (پنج کیلو دالتون) هستند که به لحاظ تکاملی و ساختاری کوچک (٤٥ تا ٥٥ اسید آمینه) محسوب می‌شوند (Thomma et al. 2002). این پروتئین‌ها در اندام‌های مختلف گیاهی مانند برگ‌ها، گل‌ها، غلاف، بذر و غده‌ها شناسایی شده‌اند (Wong and Ng 2005). این پروتئین‌ها در غشای پلاسمایی قارچ‌های پاتوژن نفوذپذیری ایجاد کرده و در نهایت از رشد و نمو قارچ بدون اینکه هیچ نوع مسمومیتی برای گیاه و یا جاندار داشته باشند جلوگیری می‌کنند (Thomma et al. 2002). دفنسین‌های گیاهی مختلفی تاکنون شناسایی شده‌اند که فعالیت بازدارندگی علیه طیف وسیعی از پاتوژن‌های قارچی را نشان می‌دهند. به‌عنوان مثال، فعالیت بازدارندگی *Tfgd1* با منشا *Trigonella foenum-graecum* علیه *Rhizoctonia solani* (Olli and Kirti 2005)، *PgD5* با منشا *Picea glauca* علیه *R. solani* (Picart et al. 2012) و *Rs-AFP2* با منشا *R. sativus* علیه *R. solani*، *Alternaria longipes* و *Magnoporthe oryzae* (Jha and Chattoo 2010) شناسایی شده‌اند.

افزایش بیان ژن‌های رمز کننده دفنسین‌ها در گیاهان مختلفی بررسی شده و نتایج مثبت و ارزنده‌ای را در پی داشته است. از جمله، ادغام و بیان پایدار ژن دفنسین جدا شده از یونجه (MSDef1) به گوجه‌فرنگی، که باعث افزایش مقاومت لاین‌های تراریخت نسبت به قارچ بیماری‌زای *F. oxysporum* شده‌است (Abdallah et al. 2010). قارچ‌های *M.* oryzae و *R. solani* ازجمله مهم‌ترین پاتوژن‌های برنج هستند که باعث محدودیت شدید در قابلیت تولید آن می‌شوند. *Dm-AMP1* یک دفنسین گیاهی جدا شده از *Dahlia merckii* است که جهت افزایش مقاومت به قارچ‌های بیماری‌زا مذکور به برنج منتقل شده‌است. نتایج نشان دادند که بیان دائم *Dm-AMP1* باعث سرکوب رشد *M. oryzae* و *R. solani* به‌ترتیب تا ٨٤ و ٧٢ درصد شد (Jha et al. 2009). دفنسین ضد قارچی یونجه (*alfAFP*)، فعالیت قابل توجهی در مقابله با پاتوژن قارچی *V. dahlia* که به لحاظ کشاورزی مهم است از خود نشان می‌دهد. بیان این پپتید در سیب زمینی، باعث افزایش مقاومت در شرایط گلخانه و مزرعه شد (Gao et al. 2000). افزایش بیان ژن دفنسین *Rs-AFP2* با منشا گیاه تربچه *R. sativus* از طریق *A. tumefaciens* در برنج انجام شد. نتایج نشان داد که افزایش بیان ژن *Rs-AFP2*، رشد قارچ‌های *M. oryzae* و *R. solani* را به‌ترتیب تا ٧٧ درصد و ٤٥ درصد محدود کرده است (Jha and Chattoo 2010). در خربزه نیز افزایش بیان ژن دفنسین با منشا *Wasabi japonica L* موجب افزایش مقاومت لاین‌های تراریخت نسبت به قارچ‌های *A. solani* و *F. oxysporum* شده‌است (Ntui et al. 2011).



[ Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-29 ]

[ DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.1.6.6 ]

این تحقیق، به‌منظور ادغام و بیان ژن دفنسین از گیاه تربچه *R. Sativus* (*Rs-AFP1*) به گیاه کلزا از طریق تراریختی با استفاده از *Agrobacterium tumefaciens* انجام شد. دفنسین گیاهی *Rs-AFP1* برای اولین بار توسط Terras et al. (1992) از بذر گیاه تربچه جدا شد. این پپتید از آنجاکه می تواند علیه بسیاری از قارچ‌ها نظیر *Fusarium oxysporum*، *Necttria haematococca*، *F.culmorum* و *Botrytis cinerea* فعالیت مهاری داشته باشد (Prema1 and Pruthvi 2012)، به‌منظور تراریختی گیاه کلزا انتخاب شد. لاین‌های تراریخت حاصل نسبت به گیاهان غیر تراریخت سطوح بالاتری از مقاومت را نسبت به *S. sclerotiorum* نشان دادند که می‌تواند منبع ژرم پلاسم بالقوه‌ای برای افزایش مقاومت در برابر سایر پاتوژهای قارچی مهم را فراهم آورد.

## مواد و روش‌ها

در این تحقیق از بذر کلزا (*Brassica napus* L.) رقم R line Hyola 308 استفاده شد. این بذور از شرکت توسعه کشت دانه-های روغنی تهیه و تا زمان استفاده در دمای چهار درجه سانتی-گراد نگهداری شد. از گونه *S. sclerotiorum* برای زیست سنجی گیاهان تراریخت استفاده شد. از سویه DH5α باکتری *Escherichia coli* جهت تکثیر و نگهداری سازه و از سویه LBA4404 باکتری *A. tumefaciens* برای انتقال ژن مورد نظر به گیاه کلزا استفاده شد. این باکتری‌ها از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری تهیه شدند.

از سازه pJETME2 (Etebari et al. 2010) واجد cDNA ژن *RS-AFP1* (ژن دفنسین) با منشا گیاه تربچه (*R. sativus*) و هم‌چنین از ناقل pBI121 (از شرکتNovagene) واجد ژن *gus* و نشانگر انتخابی مقاومت به کانامایسین برای تهیه سازه ژنی جهت انتقال به گیاه استفاده شد. آنزیم Taq DNA-polymarase برای انجام واکنش PCR و آنزیم‌های مورد نیاز جهت هضم آنزیمی DNA شامل *Xba*I ، *Sac*I و *Hin*dIII و هم‌چنین آنزیم لیگاز جهت واکنش اتصال از شرکت Fermentas تهیه شد. مواد شیمیایی مورد نیاز ونیز کیت خالص‌سازی DNA از شرکت Roche و مواد مورد

جدول ۱- آغازگرهای به کار رفته در آنالیزهای PCR و سادرن بلات

| نام آغازگر | توالی الیگونوکلئوتید |
|---|---|
| $RDef_f$ | 5′-GCTCTAGAATGGCTAAGTTTGCGTCCATCATC-3′ |
| $RDef_r$ | 5′-GGAGCTCTTAACAAGGAAAGTAGCAGATACAC-3′ |
| 35S | 5′-GCGAACAGTTCATACAGAGTCT-3′ |
| NOSR | 5′-GTGAAGCTTCCCGATCTAGTAACAT-3′ |
| CaMV35SF | 5′-GGACTAACTGCATCAAGAACACAG-3′ |
| CaMV35SR | 5′-GAAGGATAGTGGGATTGTGCGTC-3′ |
| virGf | 5′-ATGATTGTACATCCTTCACG-3′ |
| virGr | 5′-TGCTGTTTTTATCAGTTGAG-3′ |

نیاز جهت تهیه محیط کشت گیاهی و باکتریایی و نیز تنظیم‌کننده رشد گیاهی از شرکت Sigma تهیه شدند. تهیه باکتری‌های مستعد، واکنش انتقال به باکتری‌های مستعد، هضم آنزیمی و استخراج DNA پلاسمیدی طبق دستورالعمل Sambrooke and Russel (2001) انجام شد.

تعداد هشت آغازگر در مراحل مختلف ساخت، تایید سازه و همینطور تایید گیاهان تراریخت مورد استفاده قرار گرفتند (جدول۱). پلاسمید pJETME2 حاوی cDNA ژن دفنسین و همینطور پلاسمید pBI121 توسط آنزیم‌های برشی *Xba*I و *Sac*I هضم شدند. پس از بارگذاری محصولات هضم شده بر روی ژل آگاروز یک درصد، قطعات مورد نظر شامل cDNA ژن دفنسین و پلاسمید pBI121 فاقد ژن *GUS* از روی ژل آگاروز بازیافت شدند. سپس قطعات بازیافت شده پس از هضم آنزیمی توسط آنزیم‌های برشی *Xba*I و *Sac*I توسط آنزیم لیگاز به همدیگر متصل شدند و در نهایت محصول واکنش اتصال به باکتری مستعد *E. coli* منتقل شد. پس از کشت باکتری روی محیط LB حاوی کانامایسین با غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به‌عنوان نشانگر انتخابی، برای اطمینان از حضور ژن دفنسین در سازه نوترکیب، از کلونی‌های نوترکیب حاصل، استخراج پلاسمید صورت گرفت. سپس واکنش PCR با استفاده از ترکیب آغازگرهای اختصاصی دو سر ژن و بدنه وکتور وهم‌چنین واکنش هضم آنزیمی توسط آنزیم‌های برشی *Eco*RI و *Hin*dIII جهت تائید همسانه‌سازی انجام شد.

به‌منظور انتقال سازه نوترکیب به گیاه کلزا، ابتدا بذور کلزا، ۳-۲ بار با آب‌مقطر استریل، شستشو داده شده و سپس به مدت ۲۰ ثانیه در اتانول ۷۰ درصد غوطه ور شدند. بعد از آن نمونه‌ها با استفاده از محلول شوینده (هیپوکلریت سدیم) یک درصد که به



[ Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-29 ]
[ DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.1.6.6 ]

آن یک قطره دترجنت اضافه شده بود، به مدت ۱۵ دقیقه با تکان دادن استریل و در نهایت سه مرتبه با آب‌مقطر استریل شستشو داده شدند. بذور فوق برای جوانه زدن روی محیط کشت MS $\frac{1}{2}$ کشت داده شدند. محیط MS $\frac{1}{2}$، همان محیط MS ( Murashige and Skoog 1962) است که غلظت نمک‌های آن به نصف کاهش یافته است. بذرهای کشت شده، در اتاق کشت بافت تحت شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. برگ‌های لپه‌ای گیاهان پنج روزه که طول دمبرگ آن‌ها حدود ۲-۵ میلی‌متر بود، جدا و جوانه انتهایی آن‌ها کاملاً قطع شد. سپس دمبرگ‌ها به‌مدت ٤٨ ساعت به محیط القای نوساقه (پیش‌کشت) که همان محیط پایه MS دارای mg/L ۳/۵ BAP، ۳۰g/L ساکاروز، و ۷ g/L آگار با pH =۵/۸ است، منتقل شدند. ریزنمونه‌ها پس از این مرحله آماده دریافت آگروباکتریوم می‌باشند.از کشت شبانه آگروباکتریوم تراریخت شده ($OD_{650}$=1) رسوب تهیه شد (با سرعت ۳۵۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه)، سپس رسوب در محلول آغشتگی شامل MS $\frac{1}{2}$ و ٦۰g/L ساکاروز، ۱۰g/l گلوکز و فاقد هورمون و حاوی استوسیرینگون (۱۹٦mg/L) و با pH=۵/۲ حل شد و پس از سه ساعت هوادهی در شیکر ۱۸۰ rpm مورد استفاده قرار گرفت. ریزنمونه‌های مورد استفاده شامل برگ‌های لپه‌ای شکل بودند که ٢٤ ساعت بر روی محیط کشت القاء نوساقه (پیش کشت) قرار داده شده بودند. دمبرگ‌های برگ‌های لپه‌ای شکل، به مدت ۱۰-۵ دقیقه در محیط سوسپانسیون اگروباکتریوم قرار داده شدند (نمونه‌هایی که علاوه بر دمبرگ، برگ آن‌ها نیز به مقدار زیاد با سوسپانسیون آغشته شده بودند، بر روی کاغذ صافی استریل قرار داده شدند تا نسبتاً خشک شوند). سپس نمونه‌ها در محیط هم‌کشتی (MS، BAP۳/۵mg/L، ۳۰gr/L ساکاروز و ۷g/Lآگار) pH=5/8 کشت داده شدند و به مدت ۷۲ ساعت در تاریکی و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس ریزنمونه‌ها به محیط انتخابگر القاء نوساقه (MS، BAP۳/۵mg/L، ۳۰gr/L ساکاروز و ۷g/Lآگار)، که حاوی ۲۰۰mg/L سفوتاکسیم، ۱۵mg/L کانامایسین است، منتقل شدند. ریزنمونه‌ها حدود ۲۱ روز در این محیط نگهداری شدند و به فاصله حدود ۱۰ روز پس از کشت، نوساقه‌های متعددی روی بعضی از ریزنمونه‌ها به‌وجود آمدند. تعدادی از این نوساقه‌های تولید شده بر روی محیط انتخابی فوق سبز و زنده باقی ماندند و بقیه به‌علت عدم دریافت ژن مقاومت به کانامایسین سفید یا بنفش شده و از بین رفتند. به نظر می‌رسد نوساقه‌های زنده مانده، سازه نوترکیب را دریافت نموده و تراریخت شده‌اند. نوساقه‌های سبز باززایی شده روی محیط انتخابگر به محیط طویل شدن ساقه و ریشه (MS، ۳۰gr/L ساکاروز، ۷ g/L آگار، IBA۰/۲ mg/L و pH=۵/۸) که حاوی ۲۰۰ mg/L سفوتاکسیم است منتقل شدند. گیاهچه‌های ریشه‌دار شده به گلدان‌های نیمه پر حاوی ترکیب مساوی از پیت، پرلیت، ورمی‌کولیت منتقل و به‌وسیله پاکت‌های پلاستیکی پوشانده شدند. منافذ کوچکی درون پاکت‌ها ایجاد شد تا سازگاری با شرایط رطوبتی فیتوترون ایجاد شود. به‌تدریج این منافذ بیشتر و در نهایت پاکت‌های پلاستیکی پس از ۷۲ ساعت حذف شدند.

جهت استخراج DNA ژنومی از روش تغییر یافته Dellaporta et al. (1983) استفاده شد. به‌منظور ارزیابی خلوص و کیفیت DNA استخراج شده از روش الکتروفورز روی ژل آگارز یک درصد استفاده شد. جهت تکثیر ژن *Rs-AFP1* از آغازگرهای $RDef_f$ و NOSR استفاده شد. PCR پس از بهینه‌سازی در مخلوط واکنشی به حجم ۲۵ میکرولیتر، شامل ۱/۵ میلی‌مولار $MgCl_2$، ۳۰ نانوگرم DNA الگو، ۰/۳ میکرومولار آغازگر، ۰/۲ میلی‌مولار dNTP، یک واحد آنزیم Taq DNA-polymarase و ۲/۵ میکرولیتر بافر (10X) صورت گرفت. سیکل اول با یک تکرار در دمای ٩٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه، سیکل دوم با چهل تکرار شامل دمای ٩٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ٦۰ ثانیه، دمای ۵۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ٦۰ ثانیه و دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ٦۰ ثانیه و سیکل سوم با یک تکرار در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت.

هدف از استفاده از آزمون سادرن بلات، بررسی بیش‌تر حضور و تعداد نسخه‌های ژن‌های منتقل شده به ژنوم گیاه کلزا است. در این روش ابتدا پروب نشاندار شده با استفاده از PCR و آغازگرهای CaMV35SF/ CaMV35SR و Dig labeled-dNTP با الگو قراردادن پروموتر CaMV35S به طول حدود ٦۳۱ bp تهیه شد. سپس مراحل این آزمون شامل هضم آنزیمی نمونه‌های



[ Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-29 ]

[ DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.1.6.6 ]

DNA استخراج شده از گیاهان تراریخت به‌وسیله آنزیم *Hin*dIII، الکتروفورز نمونه‌ها، انتقال به غشا، هیبریداسیون و در نهایت آشکارسازی غشا انجام گرفت. جهت انجام سادرن بلات از DNA ژنومی گیاه کلزای غیر تراریخت به‌عنوان کنترل منفی و از سازه بیانی pBINZP1 به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

برای انجام آزمون زیستی به روش انتشار شعاعی ( Radial diffusion assay) از روش تغییر یافته Borglie et al. (1991) استفاده شد. در این روش قارچ های نامبرده در مرکز پلیت حاوی محیط کشت Potato Dextrose agar کشت و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند تا زمانی‌که قطر رشد میسیلیوم قارچ‌ها به ۳-۲/۵ سانتی‌متر رسید. با توجه به میزان سرعت رشد قارچ، چاهک‌هایی با فاصله ۵-۲ میلی‌متر از انتهای رشد میسیلیوم‌ها ایجاد شدند. سپس پروتئین کل از برگ‌های جوان و هم سن گیاهان تراریخت و غیر تراریخت (شاهد) در مرحله چهار برگی استخراج شد. غلظت پروتئین‌های استخراجی به روش Bradford (1976) اندازه‌گیری شد. جهت تعیین غلظت مناسب پروتئین گیاهان تراریخت در مهار رشد قارچ‌های مختلف، مجموعه آزمایشات Serial Dilution مربوط به هر قارچ انجام شد. سپس به میزان مساوی (بر اساس نتایج بدست آمده از مجموعه آزمایشات Serial Dilution مربوط به هر قارچ) از پروتئین‌های استخراج شده از گیاهان تراریخت و شاهد (غیر تراریخت) به چاهک‌های تعبیه شده بر روی محیط کشت و در اطراف کلنی قارچ رشد یافته، اضافه شد ونتایج پس از ٤٨ ساعت بررسی شدند. این آزمون برای هر نمونه، سه بار تکرار شده‌است. برای بررسی میزان نفوذپذیری غشای پلاسمایی از رنگ SYTOX Green و روش تغییر یافته Thevissen et al. (1999) استفاده شد. بدین منظور قطعه ای از قارچ (۵ میلی‌متر مربع) به همراه ۷۵۰ میکرولیتر از محیط کشت Potato Dextrose Broth ۱/۲، پنج میلی‌مول کلرید جیوه و میزان ۵۰-٤۵ میکروگرم پروتئین استخراج شده از گیاهان تراریخت و غیر تراریخت (بر اساس نتایج بدست آمده از مجموعه آزمایشات Serial Dilution) به مدت ٢٤ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد با میزان ۱۰۰ دور در دقیقه انکوبه شدند. سپس نمونه‌ها با محلولTris– HCl یک مولار (pH=۸) شست و شو داده شدند، به آن‌ها ۰/۲ میکرومول رنگ SYTOX GREEN اضافه شد و برای مدت شش ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد با ۱۰۰ دور در دقیقه انکوبه شدند. این آزمون برای هر نمونه، سه بار تکرار شده‌است. در نهایت نمونه‌ها با میکروسکوپ نوری و فلورسنت با طول موج excitation ٤٨٠-٤٦٠ نانومتر بررسی شدند.

برای انجام آزمون تفرق نتاج از روش تغییر یافته Liu et al. (2011) استفاده شد. از میان لاین‌های تراریخت تک نسخه، آن‌هایی که بیش‌ترین فعالیت ضد قارچی را بر اساس نتایج به‌دست آمده از آزمون‌های زیست سنجی و همین‌طور آزمون نفوذ پذیری غشا پلاسمایی نشان دادند یعنی لاین‌های T5 و T13) جهت انتقال به نسل $T_2$ انتخاب شدند. جهت جلوگیری از دگرگرده افشانی گل‌ها زیر پوشش پلاستیک شفاف قرار گرفتن ودر نهایت غلاف‌های خشک شده برداشت و در دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. در نسل $T_2$ جهت بررسی نحوه تفرق تراژن ها از روش ارزیابی مقاومت لاین‌ها نسبت به آنتی بیوتیک کانامایسین استفاده شد. تعداد ٦٠-٥٠ بذر از هر لاین تراریخت $T_2$ بر رو محیط کشت MS جامد به همراه ۳۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی بیوتیک کانامایسین کشت داده شدند. پس از گذشت ۱۰ روز نحوه تفرق تراژن ها از طریق ارزیابی مقاومت گیاهچه‌های حاصل نسبت به کانامایسین مورد بررسی قرار گرفت. حضورگیاهچه‌های سبز در محیط حاوی کانامایسین نشان دهنده وجود ژن مقاومت و حضور گیاهچه‌های سفید و یا ارغوانی در محیط حاوی کانامایسین، نشان دهنده عدم دریافت ژن مقاومت بود. نمونه‌هایی که تمام گیاهچه‌های رشد یافته آن‌ها در محیط حاوی کانامایسین سبز بودند، هموزیگوت و نمونه‌هایی که در آن‌ها برخی گیاهچه‌ها سبز و برخی سفید یا ارغوانی بودند، همی زیگوت در نظر گرفته شدند و در نهایت نمونه‌هایی که تمام گیاهچه‌های رشد یافته آن‌ها در محیط حاوی کانامایسین سفید یا ارغوانی بودند غیر تراریخت در نظر گرفته شدند.

## نتایج و بحث

برای انجام این آزمایش از روش تغییر یافته Wu et al. (2009) استفاده شد. در این آزمون گیاهان تراریخت نسل $T_2$ در مرحله

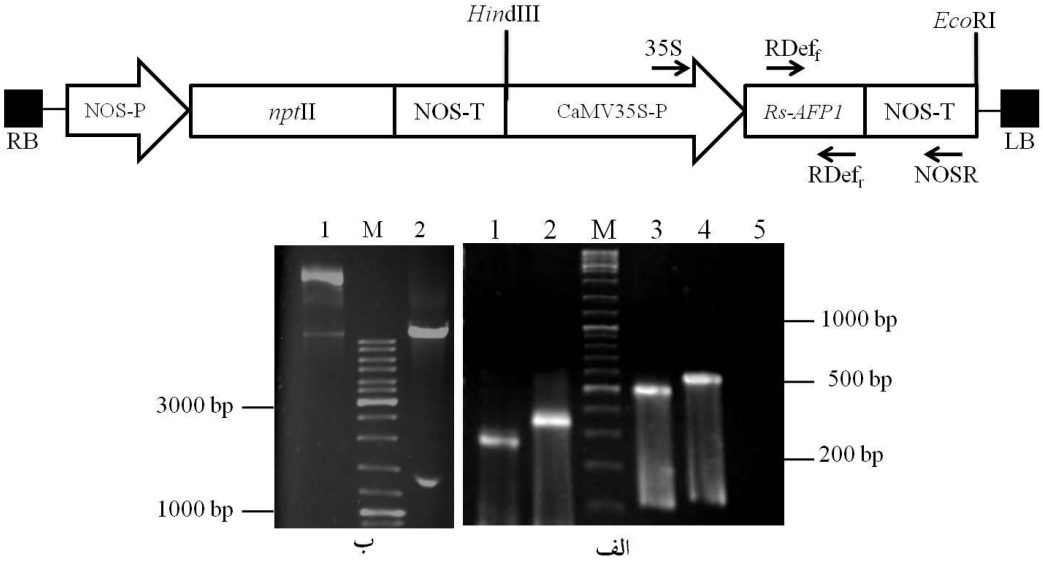


[ Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-29 ]
[ DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.1.6.6 ]

پنج برگی (۳۰ روز پس از کشت) توسط قارچ اسکلروتینیا آلوده شدند. به این منظور از هر لاین تراریخت مورد نظر و همینطور گیاه غیر تراریخت سه گلدان انتخاب و از هر گلدان دو برگ با اندازه مناسب انتخاب شده و یک تکه از محیط کشت جامد (دایره ای به قطر چهار میلی‌متر) حاوی قارچ اسکلروتینیا به صورت وارونه، روی سطح بالایی برگ قرار گرفت. میزان آلودگی برگ گیاهان، ۷۲ ساعت پس از تلقیح با قارچ، بررسی و عکسبرداری شد. قطر ناحیه آلوده به قارچ (برحسب میلی‌متر) نیز به‌عنوان شاخص میزان آلودگی مورد استفاده و مقایسه قرار گرفت.

در آزمون‌های زیست سنجی که نیاز به تجزیه و تحلیل واریانس داشت از نرم‌افزار SPSS (Ver. 15, USA) استفاده شد.

پلاسمید pJETME2 حاوی CDNA ژن دفنسین و همین‌طور پلاسمید pBI121 توسط با آنزیم‌های برشی *Xba*I و*Sac*I هضم شده و مراحل کلون کردن و انتقال به باکتری انجام گرفت. پس از تائید اولیه توسط Colony PCR با آغازگرهای اختصاصی $RDef_f$/$RDef_r$ (داده‌ها نشان داده نشده‌اند)، کلنی‌های مختلف جهت تائید ساخت سازه واجدcDNA ژن *Rs-AFP1* با استفاده از الگوی PCR و هضم آنزیمی مورد بررسی قرار گرفتند (شکل۱). همان‌طور انتظار می‌رفت از هضم آنزیمی سازه نوترکیب با آنزیم-های برشی *Eco*RI و *Hin*dIII قطعه bp ۱۳۳۱خارج شود.




شکل۱- الف) بررسی صحت ساخت سازه pBINZP1 واجد ژن *Rs-AFP1* با آنالیز PCR؛ جایگاه اتصال آغازگرها در واکنش PCR در شکل شماتیک مشخص شده است. ۱) محصول PCR با آغازگرهای $RDef_f$ و$RDef_r$ وتکثیر قطعه ۲۴۳ جفت‌بازی مورد انتظار، ۲) محصول PCR با آغازگرهای CaMV35S و $RDef_r$ وتکثیر قطعه حدودا ۳۰۰ جفت‌بازی مورد انتظار، ۳) محصول PCR با آغازگرهای $Rdef_f$ و NosR وتکثیر قطعه ۴۹۸ جفت‌بازی مورد انتظار، ٤) محصول PCR با آغازگرهای CaMV35S و NosR وتکثیر قطعه ۵۵۱ جفت‌بازی مورد انتظار، ۵)کنترل منفی، M) سایز مارکر DNA Ladder Mix؛ ب) بررسی صحت ساخت سازه pBINZP1 واجد ژن *Rs-AMP1* با الگوی هضم آنزیمی؛ جایگاه شناسایی آنزیم‌های برشی در شکل شماتیک مشخص شده‌است.۱) سازه نوترکیب بدون هضم آنزیمی، ۲) هضم سازه نوترکیب با آنزیم‌های برشی *Eco*RI و *Hin*dIII و خروج قطعه ۱۳۳۱ جفت‌بازی مورد انتظار، M) سایز مارکر DNA Ladder Mix.

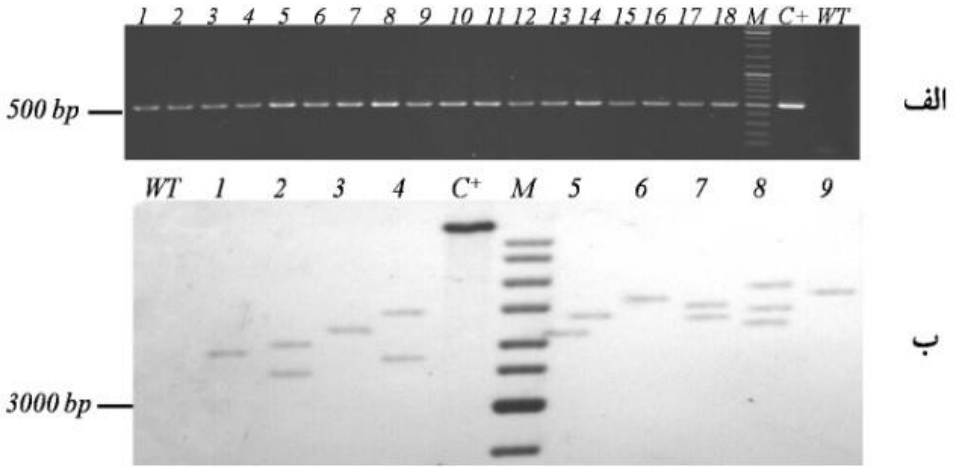
سازه نوترکیب به‌دست آمده پس از تائید pBINZP1 نام‌گذاری شد. ژن همسانه‌سازی شده در سازه نوترکیب pBINZP1 توسط آغازگرهای اختصاصی دو سر ژن، تعیین توالی شد. مقایسه توالی به‌دست آمده با توالی ژن دفنسین موجود در سازه pJETME2 صحت تکثیر ژن دفنسین را تایید کرد.

پس از انتقال سازه بیانی به گیاه کلزا از طریق آگروباکتریوم به-منظور بررسی مولکولی گیاهان تراریخت، DNA ژنومی از برگ-های جوان و سبز گیاهان کلزای تراریخت و شاهد استخراج شد. سپس با آغازگرهای $RDef_f$ وNOSR برای اثبات حضور T-DNA مورد نظر، PCR انجام گرفت (شکل ۲ الف). نرخ تراریختی ٤/۲



[ Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-29 ]
[ DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.1.6.6 ]

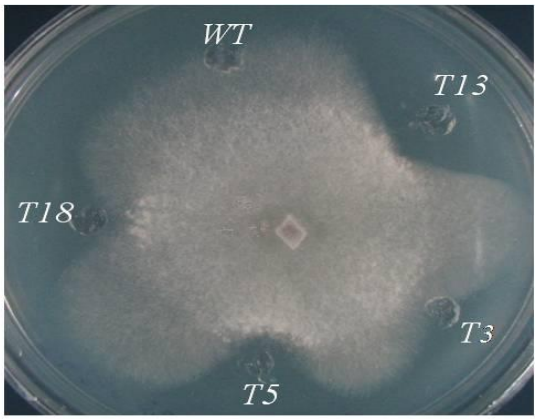
درصد، به‌دست آمد که مشابه مقادیر به‌دست آمده برای *B. napus* (Liu et al. 2011; Ziaei et al. 2016; Wang et al. 2005) و دیگر گونه‌های براسیکا مانند *B. rapa* و *B. juncea* (Cho et al. 2001) بود. محصول استخراج DNA ژنومی هم‌چنین با آغازگرهای مربوط به ژنوم آگروباکتریوم (virGf/virGr) توسط PCR تست شد تا آلودگی احتمالی به آگروباکتریوم بررسی شود (داده‌ها نشان داده نشدند). به‌منظور اطمینان بیشتراز ادغام و هم‌چنین تعیین تعداد نسخه‌های تراژن‌ها، از ۱۸ گیاه PCR مثبت ۹ گیاه به‌صورت تصادفی انتخاب شدند و پس از استخراج DNA ژنومی، آزمون سادرن بلات در مورد آن‌ها انجام شد. طبق نتایج به‌دست آمده، چهار لاین شامل T3، T5، T13 و T18 فقط یک نسخه و چهار لاین شامل T2، T6، T10 و T15 دو نسخه و لاین T9 سه نسخه از ژن مورد نظر (ژن دفنسین) را دریافت کرده‌اند (شکل ۲ ب). این روش به‌منظور غربال کردن تراریخت‌های پایدار و تعیین تعداد نسخه‌های تراژن در گیاهان مختلف مانند ژن *Dm-AMP1* در برنج (Jha et al. 2009)، *RsAFP2* در گندم (Li et al. 2011) مورد استفاده قرار گرفته است. سایت برشی منحصر به فرد *Hin*dIII در ناحیه T-DNA این امکان را فراهم آورد که بتوان تعداد کپی‌های تراژن را برای هر لاین تراریخت بر اساس تعداد هیبریداسیون به‌دست آورد. وجود تک کپی در سادرن بلاتینگ حاکی از ادغام یک نسخه و وجود باند ها با اندازه های مختلف در میان لاین های تراریخت، نشان دهنده رخدادهای مستقل تراریختی است (Das and Rahman 2012). از آنجاکه هر چه تعداد نسخه از تراژن ادغام شده در ژنوم بیش‌تر باشد، اغلب با خاموشی تراژن همراه است (Finnegan and McElroy 1994)، لاین‌هایی که تنها یک نسخه از تراژن را دریافت کردند جهت انجام آزمون‌های بیشتر انتخاب شدند.



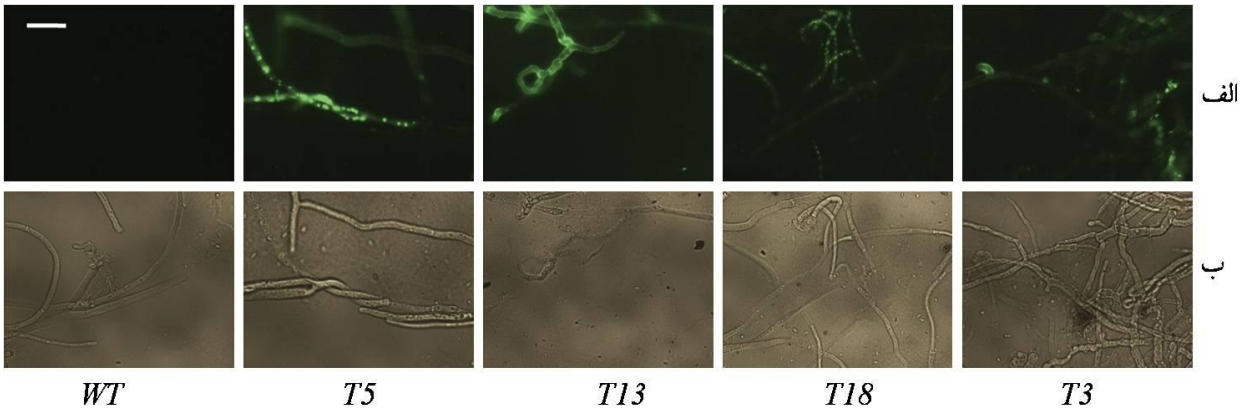

شکل ۲- الف) آنالیز PCR بر روی DNA استخراج شده از گیاهانی که با سازه pBINZP1 تراریخت شدند؛ چاهک۱ الی ۱۸) محصول PCR با آغازگرهای $RDef_f$ و NOSR و تکثیر قطعه ۵۰۰ جفت بازی مورد انتظار،C+) کنترل مثبت، WT) تیپ وحشی، M) سایز مارکر DNA Ladder Mix ؛ ب) غشای آشکارسازی شده آزمون سادرن بلات مربوط به گیاهان تراریخت $T_0$ حاوی سازه بیانی pBINZP1؛ C+) کنترل مثبت (پلاسمید pBINZP1)، WT) تیپ وحشی، ۱) گیاه تراریخت T5، ۲) گیاه تراریخت T10،۳ ) گیاه تراریخت T13، ٤) گیاه تراریخت T6، ٥) گیاه تراریخت T2، ٦) گیاه تراریخت T18، ۷) گیاه تراریخت T15، ۸) گیاه تراریخت T9، ۹) گیاه تراریخت T3، M) سایز مارکر DNA Ladder Mix.



[ Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-29 ]
[ DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.1.6.6 ]




شکل ۳- تاثیر پروتئین‌های استخراج شده از گیاهان تراریخت $T_0$ حاوی سازه pBINZP1 بر روی میزان رشد قارچ‌های بیماری‌زا به روش انتشار شعاعی قارچ *Sclerotinina sclerotiorum*، T3، T5، T13 و T18 ) لاین‌های گیاهان تراریخت، WT) گیاه نوع وحشی.




شکل٤- تاثیر پروتئین‌های استخراج شده از گیاهان تراریخت $T_0$ دارای سازه pBINZP1 (حامل ژن دفنسین) بر روی میزان نفوذپذیری غشای پلاسمایی قارچ *S. sclerotiorum*؛ الف) عکس‌های ثبت شده توسط میکروسکوپ فلورسنت، ب) عکس‌های ثبت شده توسط میکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی ٤٠، T3، T5، T13 و T18) لاین‌های گیاهان تراریخت، WT) گیاه نوع وحشی، مقیاس = ۲۰ میکرومتر.

شکل ٥- آزمون گلخانه‌ای گیاهان تراریخت هموزیگوت (حاوی ژن دفنسین) در نسل $T_2$ جهت بررسی مقاومت نسبت به قارچ *S. sclerotiorum* ؛ T5 وT13) لاین‌های گیاهان تراریخت، WT) گیاه نوع وحشی.

در این بررسی تأثیر پروتئین‌های استخراج شده از گیاهان تراریخت و غیر تراریخت روی میزان رشد قارچ *S.sclerotiorum* مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج بدست آمده، میزان بازدارندگی رشد قارچ در اطراف حفره حاوی پروتئین‌های استخراج شده از گیاهان تراریخت در مقایسه با گیاهان شاهد را به‌صورت هاله‌ای از عدم رشد (Inhibition zone) نشان می‌دهد (شکل ۳). نتایج چندین آزمون بازدارندگی درون شیشه‌ای در گزارشات پیشین نیز حاکی از آن بوده که دفنسین‌ها در برابر دامنه وسیعی از پاتوژن-



[ Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-29 ]
[ DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.1.6.6 ]

های قارچی، فعالیت بازدارندگی قابل توجهی از خود نشان می-دهند (Jha et al. 2009; Jha and Chattoo 2010; Picart et al. 2012).

پروتئین‌های استخراج شده از گیاهان تراریخت حاوی ژن دفنسین در صورتی‌که دارای عملکرد ضد قارچی باشند، قادر خواهند بود با نفوذپذیر کردن غشا پلاسمایی قارچ پاتوژن سبب نفوذ رنگ به داخل سلول قارچ شوند. SYTOX Green که خاصیت فلورسنس نیز دارد، پس از نفوذ به داخل سلول قارچ، جذب اسید های نوکلئیک می‌شود. بدین ترتیب بررسی میزان فعالیت ضد قارچی پروتئین‌های استخراج شده از گیاهان حاوی ژن دفنسین با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت امکانپذیر می‌باشد. فعالیت ضد قارچی (نفوذپذیر کردن غشا پلاسمایی) پروتئین‌های استخراج شده از گیاهان تراریخت حاوی سازه pBINZP1 (T3، T5، T13 وT18) بر روی قارچ *S. sclerotiorum* در مقایسه با پروتئین استخراج شده از گیاه غیر تراریخت در شکل ٤ نشان داده شده‌است. کاربرد SYTOX Green در ارزیابی قابلیت نفوذپذیر کردن غشای پلاسمایی پاتوژن‌های قارچی توسط دفنسین‌های گیاهی، در مطالعه دفنسین *Nicotiana alata* بر روی *F. Oxysporum* (van der Weerden et al. 2008)، دفنسین *M. sativa* بر روی *F.graminearum* (Sagaram et al. 2011) و دفنسین *Picea glauca* بر روی *B. cinerea* ، *F. oxysporum* و *Verticillium dahlia* (Picart et al. 2012) گزارش شده‌است.

از میان لاین‌های گیاهان تراریخت تک نسخه‌ای حاوی ژن دفنسین، لاین‌هایی که بیش‌ترین فعالیت ضد قارچی را بر اساس نتایج به‌دست آمده از آزمون‌های زیست سنجی و همین‌طور آزمون نفوذپذیری غشا پلاسمایی نشان دادند یعنی لاین‌های T5 و T13، جهت انتقال به نسل $T_2$ انتخاب شدند. پس از انجام آزمون تفرق نتاج جهت دستیابی به لاین‌های هموزیگوت، بذور لاین‌های تراریخت هموزیگوت نسل$T_2$، جهت بررسی مقاومت نسبت به قارچ *S. sclerotiorum* در شرایط گلخانه‌ای کشت داده شدند. گیاهان یک ماهه به روشی که در بخش مواد و روش‌ها توضیح داده شده‌است، با قارچ تلقیح شدند. پس از گذشت ۷۲ ساعت از تلقیح، علائم بیماری به صورت نکروزهای بیضوی شکل خاکستری رنگ بر روی برگ‌ها نمایان شدند. نتایج حاکی از آن بود که بین گیاهان تراریخت و غیر تراریخت نسبت به قارچ بر اساس اندازه نکروز ایجاد شده تفاوت قابل ملاحظه‌ای وجود دارد (شکل۵). میانگین قطر نکروز ایجاد شده بر روی گیاه غیر تراریخت $mm^2$ ۲۲/۳٦±۱/۳۳ محاسبه شده‌است. در حالی‌که میانگین قطر نکروز ایجاد شده بر روی لاین‌های تراریخت T5 و T13 حاوی ژن دفنسین به‌ترتیب $mm^2$ ۱۳/٤±۱/۱۹ و $mm^2$ ۱۳/۸±۱/۲٤ به‌دست آمدند. گزارشات مشابهی نیز درباره مقاومت افزایش یافته در برابر پاتوژن قارچی در ارزیابی‌های گلخانه‌ای توسط گیاهان تراریخت حاوی دفنسین، گزارش شده‌اند (Jha and Chattoo 2009; Portieles et al. 2010).

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که بیان ژن دفنسین با منشا تربچه در کلزای تراریخت مقاومت در برابر پوسیدگی اسکلروتینیایی ساقه را بهبود می‌دهد و متعاقبا هزینه، ریسک سلامتی و نگرانی‌های زیست محیطی در مورد کاربرد قارچ کش-های شیمیایی را کاهش خواهد داد. این لاین‌های تراریخت (T5 و T13) منبع ژرم پلاسم بالقوه‌ای را برای افزایش مقاومت در برابر سایر پاتوژهای قارچی مهم فراهم می‌آورند.

## سپاسگزاری

از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری به‌علت تـامین بودجه پژوهشی این تحقیق تشکر و قدردانی می شود.

## منابع

Abdallah NA, Shah D, Abbas D, Madkour M (2010) Stable integration and expression of a plant defensin in tomato confers resistance to fusarium wilt. Genetically Modified 1:345-350.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Analytical biochemistry 72: 248-254.

Broglie K, Chet I, Holliday M, Cressman R, Biddle P, Knowlton S, Mauvais CJ, Broglie R, (1991.)Transgenic plants with enhanced resistance to the fungal pathogen *Rhizoctonia solani*. Science 254: 1194-1197.



[ Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-29 ]
[ DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.1.6.6 ]

Cho HS, Cao J, Ren JP, Earle ED (2001) Control of Lepidopteran insect pests in transgenic Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp pekinensis) transformed with a synthetic *Bacillus thuringiensis* cry1C gene. Plant Cell Reports 20:1-7.

Das DK, Rahman A (2012) Expression of a rice chitinase gene enhances antifungal response in transgenic litchi (cv. Bedana). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 109:315-325.

Dellaporta S, Wood J, Hicks JB (1983) A plant DNA minipreparation: version II. Plant molecular biology reporter 1: 19-21.

Dutta I, Majumder P, Saha P, Ray K, Das S (2005) Constitutive and phloem specific expression of Allium sativum leaf agglutinin (ASAL) to engineer aphid (*Lipaphis erysimi*) resistance in transgenic Indian mustard (*Brassica juncea*). Plant Science 169: 996-1007.

Etebari M, Zamani MR, Motallebi M (2010) Isolation and cloning of Genomic DNA and cDNA from plant defensin gene. Nationa Institute of Genetic Engineering and Biotechnology,Iran. (In Farsi)

Finnegan J, McElroy D (1994) Transgene inactivation: plants fight back. Bio/Technology 12:883-888.

Francois IE, De Bolle MF, Dwyer G, Goderis IJ, Woutors PF, Verhaert PD et al. (2002) Transgenic expression in Arabidopsis of a polyprotein construct leading to production of two different antimicrobial proteins. Plant physiology 128:1346-1358.

Gao A, Hakimi SM, Mittanck CA, Wu Y, Woerner MB, Stark DM, Shah DM, Liang J, Rommens CMT.(2000) Fungal pathogen protection in potato by expression of a plant defensin peptide. nature Biotechnology 18: 1307-1310.

Gao X, Han Q, Chen Y, Qin H, Huang L, Kang Z (2014) Biological control of oilseed rape Sclerotinia stem rot by *Bacillus subtilis* strain Em7. Biocontrol Science and Technology 24: 39-52.

Grover A, Pental D (2003) Breeding objectives and requirements for producing transgenics for major field crops of India. Current science 84: 310-320.

Hemmati R, Javan-Nikkhah M, Linde CC (2009) Populationgenetic structure of *Sclerotinia sclerotiorum* on canola in Iran. European journal of plant pathology 125: 617-628.

Jha S, Chattoo BB (2010) Expression of a plant defensin (Rs-AFP2 *Raphanus sativus)* in rice confers resistance to fungal phytopathogens. Transgenic research 19:373-384.

Jha S, Tank HG, Prasad BD, Chattoo BB (2009.)Expression of Dm-AMP1 in rice confers resistance to *Magnaporthe oryzae* and *Rhizoctonia solani*. Transgenic research 18:59-69

Li Z, Zhou M, Zhang Z, Ren L, Du L, Zhang B, Xu H. Xin Z (2011) Expression of a radish defensin in transgenic wheat confers increased resistance. Functional and Integrative Genomics 11:63-70.

Liu H, Guo X, Naeem MS, Liu D, Xu L, Zhang W, Tang G, Zhou W (2011) Transgenic *Brassica napus* L. lines carrying a two gene construct demonstrate enhanced resistance against *Plutella xylostella* and *Sclerotinia sclerotiorum*. Plant Cell, Tissue and organ Culture 106:143-151.

Murashige T and Skoog (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiology Plant 15: 473-497.

Ntui VO, Thirukkumaran G, Azadi P, Sher Khan R, Nakamura I, Mii M (2010) Stable integration and expression of wasabi defensin gene in ‘‘Egusi’’ melon (*Colocynthis citrullus* L.) confers resistance to Fusarium wilt and Alternaria leaf spot. Plant cell reports 29:943-954.

Olli S, Kirti PB (2006) Cloning, Characterization and Antifungal Activity of Defensin Tfgd1 from Trigonella foenum-graecum L. Journal of Biochemistry and Molecular Biology 39: 278-283.

Picart P, Pirttilä AM, Raventos D, Kristensen HH, Sahl HG (2012) Identification of defensin-encoding genes of Picea glauca: characterization of PgD5, a conserved spruce defensin with strong antifungal activity. BioMedical Central Plant Biology 12:180.

Portieles R, Ayra C, Gonzalez E, Gallo A, Rodriguez R, Chacon O, Lopez Y, Rodriguez M, Castillo J, Pujol M, Enriquez G, Borroto C, Trujillo L, Thomma B, Hidalgo OB (2010) NmDef02, a novel antimicrobial gene isolated from *Nicotiana megalosiphon* confers high-level pathogen resistance under greenhouse and field conditions. Plant biotechnology J 8: 678-690.

Prema1 GU, Pruthvi TPM (2012) Antifungal plant defensins. Current Biotica 6: 254-270.

Sagaram US, Pandurangi R, Kaur J, Smith TJ, Shah DM (2011) Structure-Activity Determinants in Antifungal Plant Defensins MsDef1 and MtDef4 with Different Modes of Action against *Fusarium graminearum*. PLoS ONE 6: e18550.

Sambrook J and Russell DW (2001) Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Press NewYork. ISBN 978-1-936113-41-5.

Terras FR (1992) Analysis of two novel classes of plant antifingal proteins from radish (*Raphanus sativus* L.) seeds. Journal of Biological Chemistry 267: 15301-15309.

Thevissen K, Terras FRG, Broekaert W (1999) Permeabilization of Fungal Membranes by Plant Defensins Inhibits Fungal Growth. Applied and Enviromental microbiology 65: 5451-5458.

Thomma BPJ, Cammue BPA, Thevissen K (2002) Plant defensins. Planta 216: 193-202.

Ullah F, Banu A, Nosheen A (2012) Effects of plant growth regulators on growth and oil quality of canola (*Brassica napus* L.) under drought stress. Pakistan journal of botany 44: 1873-1880.

Van der Biezen EA (2001) Quest for antimicrobial genes toengineer disease-resistant crops. Trends in plant science 6:89-91.

van der Weerden NL, Lay FT, Anderson MA (2008) The Plant Defensin, NaD1, Enters the Cytoplasm of *Fusarium Oxysporum* Hyphae. The journal of biological chemistry 283: 14445-14452.

Wang J, Chen Z, Du J, Sun Y, Liang A (2005) Novel insect resistance in *Brassica napu*s developed by transformation of chitinase and scorpion toxin genes. Plant cell reports 24:549-555.



[ Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-29 ]
[ DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.1.6.6 ]

Ziaei M, Motallebi M, Zamani MR, Zarin Panjeh N (2016) Co-expression of chimeric chitinase and a polygalacturonase-inhibiting protein in transgenic canola (*Brassica napus*) confers enhanced resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. Biotechnology letters DOI 10.1007/s10529-016-2058-7.

Wong JH, Ng TB (2005) Sesquin, a potent defensin-like antimicrobial peptide from ground beans with inhibitory activities toward tumor cells and HIV-1 reverse transcriptase. Peptides 26:1120-6.

Wu J, Wu LT, Liu ZB, Qian L, Wang MH, Zhou LR, Yanh Y, Li XF (2009) A plant defensin gene from *Orychophragmus violaceu* can improve *Brassica napus'* resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. African journal of Biotechnology 8: 6101-6109.



[ Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-29 ]
[ DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.1.6.6 ]