

جداسازی، شناسایی و بررسی ساختار ژن دفسین (*Def1*)تریچه خوراکی (*Raphanus sativus*)

مریم اعتباری، مصطفی مطلبی*، محمدرضا زمانی و زهرا مقدسی جهرمی

ایران، تهران، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، بخش زیست‌فناوری گیاهی

تاریخ پذیرش: ۹۶/۸/۳۰

تاریخ دریافت: ۹۶/۵/۲۵

چکیده

امروزه مطالعات نشان داده است که گیاهان، با تولید پپتیدهای ضدقارچی به نام دفسینها، سبب ایجاد منافذی در غشای سلولی قارچ مهاجم و در نتیجه خروج ترکیبات سلولی به بیرون ازغشاء، تغییر در پتانسیل غشاء و نهایتاً مرگ سلولی را منجر می‌شوند. هدف این تحقیق جداسازی، شناسایی و بررسی ساختار ژن *Def1* تریچه خوراکی (*Raphanus sativus*) با کلون کردن و تعیین توالی آن است. برای این منظور پس از استخراج DNA ژنومی به روش CTAB، تکثیر این ژن با استفاده از آغازگرهای اختصاصی *RDef1* و *RDef1* انجام شد. قطعه تکثیر شده به طول تقریبی ۳۵۶ جفت باز در ناقل pJET1.2 کلون شد. سازه به دست آمده با استفاده از الگوهای هضم آنزیمی و PCR تأیید شد. همچنین cDNA این ژن، که به طول تقریبی ۲۴۳ جفت باز بود، پس از استخراج RNA با استفاده از آغازگرهای اختصاصی فوق سنتز گردید. قطعه تکثیرشده از cDNA پس از تأیید در ناقل pJET1.2 کلون و تعیین توالی گردید. مقایسه توالی DNA ژنومی و cDNA این ژن نشان داد که ژن *Def1* گیاه تریچه حاوی یک اینترون به طول ۱۱۳ جفت باز بوده و open reading frame آن یک پپتید به طول ۸۰ اسید آمینه را کد می‌کند. مقایسه توالی پپتید به دست آمده از ژن *Def1* از گیاه تریچه با توالیهای ثبت شده مرتبط در بانک ژنی مشابهتی بین ۹۰ تا ۹۸/۸ درصد را نشان داد.

شناسایی و همسانه سازی این ژن می‌تواند در آینده در راستای مدیریت کنترل و مبارزه با بیماریهای قارچی مورد استفاده قرار گیرند.

واژه های کلیدی: گیاه تریچه، پپتید دفسین، *Def1*، جدا سازی ژن، همسانه سازی.

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱۴۴۷۸۷۳۶۳، پست الکترونیکی: motalebi@nigeb.ac.ir

مقدمه

این پپتیدهای ضدقارچی، دیواره سلولی، غشای پلاسمایی و نهایتاً خروج ترکیبات درون سلولی قارچ می‌باشد (۱۳). از مهم ترین پپتیدهای ضد قارچی می‌توان گروه پپتیدی دفسین را نام برد.

دفسینها، پپتیدهایی با وزن مولکولی کم حدود ۵ kDa و غنی از سیستئین می‌باشند که در هر دو گروه گیاهان تک لپه و دولپه ای وجود دارند. این پپتیدها برای قارچها سمی بوده (۲ و ۸) و در حفاظت از دانه در برابر قارچهای

پپتیدهای ضد قارچی (Antifungal Peptides) نقش محافظت از گیاهان در برابر حملات قارچی را به عهده دارند. این پروتئینها در گیاهان، قارچها، باکتریها، حشرات و پستانداران شناسایی شده اند و در مقاومت دائمی و القایی در برابر حملات قارچی نقش ایفاء می‌کنند (۱۳، ۲۰). به طور ویژه، دانه های گیاهان، غنی از پپتیدهای ضد قارچی می‌باشند به طوری که میزان این پروتئینها در دانه ها چندین برابر سایر قسمت‌های گیاه می‌باشد (۲۷). اهداف

علاوه بر به دست آمدن RNA مناسب و با کیفیت، کمترین آلودگی DNA را در بر داشت.

آغازگرها و شرایط انجام PCR اختصاصی: با استفاده از توالیهای ثبت شده ازواربته های مختلف گیاه تربچه در بانک داده ژنی NCBI (۲۵،۲۴)، به شماره ثبتهای RSU18557، RSU18556، X97319 و X97318، آغازگر رو به جلوی RDefr، که دارای جایگاه برش برای آنزیم XbaI در بالادست بود، با توالی 5' GCTCTAGAATGGCTAAGTTTTCGTCATCAT C و آغازگر معکوس RDefr، که دارای جایگاه برش برای آنزیم SacI در بالادست بود، با توالی 5' GGAGCTCTTAACAAGGAAAGTAGCAGATA CAC جهت تکثیر و کلون کردن ژن Defl طراحی و ساخته شد.

جهت تکثیر قطعه ژنی مورد نظر از واکنش PCR در حجم کلی ۵۰ میکرولیتر با ۲۰ نانو گرم DNA ژنومی، ۰/۲ میکرو مول از هر پرایمر، ۲۰۰ میکرو مول از هر dNTP و ۲ واحد از آنزیم Pfu پلی مرز انجام گرفت. اجزای واکنش در دستگاه ترموسایکلر قرار گرفت تا طبق برنامه چرخه-های گرمایی تکثیر انجام پذیرد. چرخه‌های دمایی واکنشهای تکثیر شامل یک چرخه آغازین و اسرشت ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد، ۳۵ چرخه شامل ۱ دقیقه در ۹۴ درجه، ۱ دقیقه در ۵۵ درجه، ۲ دقیقه در ۷۲ درجه و یک مرحله اتصال پایانی شامل ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه می باشد. محصول PCR به وسیله الکتروفورز در ژل آگارز ۱ درصد مورد بررسی قرار گرفت. محصول PCR به وسیله کیت (High Pure DNA Purification KIT Roche) از روی ژل جداسازی و خالص سازی شد.

تهیه cDNA: برای تهیه زنجیره اول (first strand cDNA)، از آنزیم نسخه برداری معکوس و پرایمر RDefr در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد استفاده گردید و در مرحله بعد با انجام PCR در شرایطی که قبلاً ذکر شد با استفاده از

بیماری زا نقش مهمی ایفا می کنند (۲). به طوری که قادر به مهار رشد چندین گونه قارچی نظیر *Aspergillus niger*، *Saccharomyces cerevisiae* و *Neurospora crassa*، همچنین مهار رشد عوامل بیماری زای گیاهی نظیر *Botrytis cinerea*، *A. solani*، *Alternaria brassicola*، *C. sphaerospermum*، *Cladosporium colocasiae*، *Diploidia maydis*، *Colletotrichum lindemuthianum*، *F. graminearum*، *Fusarium culmorum* و ... می باشند (۲۴). سویه قارچ و همچنین نوع پیتید دفنسنین گیاهی از طرفی در کیفیت و میزان فعالیت مهاری و ازسوی دیگر در غلظت دفنسنین مورد نیاز برای مهار مؤثر است (۱۶). به طور مثال دفنسنین گیاه *Dahlia merckii* علی رغم مهار رشد قارچ، هیچگونه تغییر مورفولوژیکی در قارچ ایجاد نمی کند در حالیکه برخی از آنها مانند دفنسنین تربچه با ایجاد هیفهای تغییر شکل یافته در قارچها باعث مهار رشد آنها می شوند (۱۵).

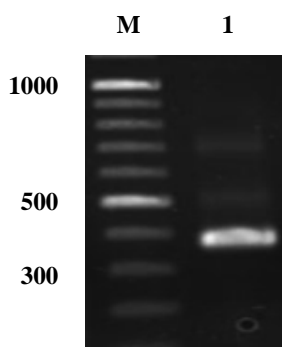
با توجه به موارد ذکر شده در مورد دفنسنینها واهمیت آنها در ایجاد مقاومت علیه پاتوژنهای قارچی، هدف این تحقیق شناسایی، تکثیر، کلون و بررسی ساختار ژن *Defl* گیاه تربچه خوراکی بوده که سرانجام می توان از آن برای انتقال سازه مورد نظر به گیاهان زراعی استفاده کرد.

مواد و روشها

تهیه بذر، کشت و استخراج DNA: در این تحقیق از بذرهای گیاه تربچه (*Raphanus sativus*) که از بانک ژن گیاهی ملی ایران تهیه شد، استفاده گردید. بذرها در گلدان حاوی ورمیکولیت- پرلیت (با نسبت ۱:۱) کشت و رشد داده شدند. استخراج DNA ژنومی، از برگهای جوان به روش عمومی CTAB انجام گرفت (۶).

استخراج mRNA: استخراج mRNA از برگهای جوان گیاه تربچه با استفاده از روش ارائه شده کیت (mRNA) Isolation kit, Roche، صورت پذیرفت. در این روش

همچنین نقش حفاظتی این پپتید در بذرهای مختلف به خصوص بذر تریچه هنگام جوانه زنی، در این تحقیق از DNA ژنومی گیاه تریچه جهت شناسایی و تکثیر ژن *Def1* (دفنسین) استفاده شد. پس از طراحی آغازگرهای اختصاصی (*RDef_f/Rdef_r*) با استفاده از توالیهای مربوط به این ژن در بانک ژنی، واکنش PCR با استفاده از آنزیم *Pfu* پلی مرز، که دارای توانایی proofreading می باشد، انجام گرفت. طول DNA تکثیر شده توسط این آغازگرها براساس توالی مربوط به ژن *Def1* گیاه تریچه ۳۷۰ جفت باز (با احتساب توالی مربوط به جایگاههای آنزیمی آغازگرها) می باشد. بررسی قطعه تکثیر شده فوق نشان دهنده تکثیر DNA با طول مورد انتظار است (شکل ۱).



شکل ۱- تکثیر ژن *Def1* از گیاه تریچه: ستون ۱= محصول PCR با استفاده از آغازگرهای *RDef_f/Rdef_r* = M مارکر 100bp ladder جهت همسانه سازی این ژن، ابتدا استخراج و تخلیص محصول PCR انجام گرفت. مخلوط واکنش اتصال شامل DNA خالص شده و ناقل pJET1.2 به سلولهای مستعد تازه تهیه شده باکتری *E. coli* DH5a منتقل و سپس DNAی سازه نو ترکیب استخراج شد. صحت قطعه کلون شده توسط الگوی PCR و هضم آنزیمی (شکل ۲) تأیید شده و برای تعیین توالی مورد استفاده قرار گرفت. با بررسی نتایج به دست آمده از تعیین توالی مشخص گردید که طول قطعه تکثیر شده مربوط به ژن *Def1* مورد نظر برابر ۳۵۶ جفت باز (شکل ۵) می باشد. سازه حاصل پس از تأیید نهایی به نام pJETME1 نام گذاری شد.

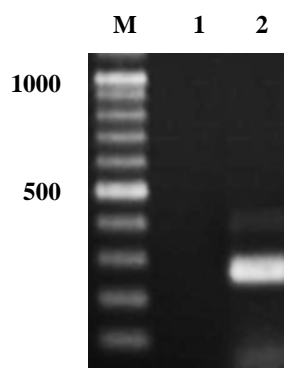
آنزیم *Pfu* پلی مرز، cDNA دو زنجیره ای جهت انجام کلونینگ به دست آمد.

روش استخراج پلاسمید و کلون کردن: استخراج پلاسمید به روش عمومی لیز قلیایی صورت پذیرفت (۱۹). جهت کلون کردن ژن تکثیر شده کیت CloneJET™-PCR (Frementas) cloning استفاده شد. برای این منظور پس از استخراج و تخلیص محصول *Pfu*-PCR با استفاده از کیت PCR Product Purification Kit (Roche)، واکنش ligation با حضور DNA خالص شده (فرم DNA ژنومی و cDNA) و ناقل pJET1.2 صورت پذیرفت و به سلولهای مستعد تازه تهیه شده باکتری *E. coli* DH5a منتقل شدند. سلول های ترانسفورم شده روی محیط کشت جامد LB (حاوی 1% NaCl، 1% Bacto tryptone، 0.5% Yeast extract و ۱۰۰ میکروگرم در هر میلی لیتر آمپی سیلین بود) گسترش داده شدند. کلونهای حاصله پس از تأیید، جهت حضور قطعه ژنی مورد نظر توسط الگوی PCR و هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم *XbaI* بررسی شدند، سپس به منظور تعیین توالی قطعه ژنی مورد نظر با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ناقل pJET1.2 برای شرکت SeqLab Gottingen آلمان فرستاده شد.

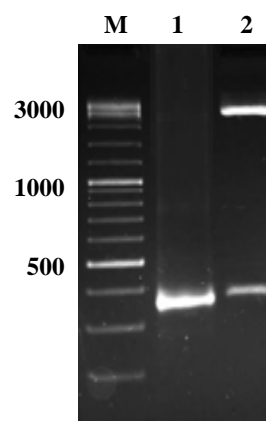
تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیک: با استفاده از برنامه نرم افزاری Blast مشابهت توالی ژن *Def1* با اطلاعات موجود در بانک ژنی مورد بررسی قرار گرفت. برنامه نرم افزاری CLUSTAL W جهت مقایسه توالی نوکلئوتیدی و اسید آمینه ای ژن *Def1* با توالیهای ثبت شده در بانک ژنی به کار گرفته شده و با استفاده از برنامه SWISS-MODEL پیش بینی ساختمان سه بعدی catalytic core domain آنزیم *Def1* صورت گرفت.

نتایج

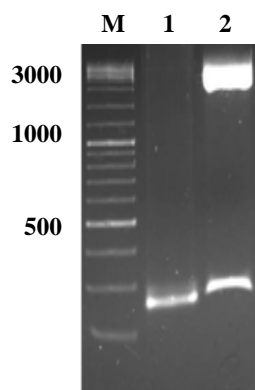
با توجه به اهمیت فعالیت ضد قارچی پپتید دفنسنین در مقابل طیف وسیعی از عوامل بیماری زای قارچی و



شکل ۳- تکثیر cDNA ژن *Def1* گیاه تربچه: ستون ۱= کنترل منفی، ستون ۲= محصول PCR با استفاده از آغازگرهای $RDef1/Rdef1$.
M= مارکر 100bp ladder



شکل ۲- تأیید سازه نوترکیب pJETME1 حاوی ژنومی ژن *Def1*: ستون ۱= الگوی PCR با استفاده از آغازگرهای $RDef1/Rdef1$. ستون ۲= الگوی هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم *XbaI*، M= مارکر 100 bp ladder



شکل ۴- تأیید سازه نوترکیب pJETME2 حاوی cDNA ژن *Def1*: ستون ۱= الگوی PCR با استفاده از آغازگرهای $RDef1/Rdef1$. ستون ۲= الگوی هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم *XbaI*، M= مارکر 100bp ladder

بررسی ساختار فضایی پپتید دفنسنین تربچه نشان می‌دهد که پپتید فوق دارای ۸ اسیدآمینو سیستئین در موقعیت اسیدآمینو های ۳۳، ۴۴، ۵۰، ۵۴، ۶۵، ۷۴، ۷۶ و ۸۰ بوده و منجر به شکل گیری ۴ پیوند دی سولفیدی درون رشته ای می‌گردند که این پیوندها خود باعث افزایش پایداری در ساختار سه بعدی پپتید می‌شود. پیوندهای دی سولفیدی باعث شکل گیری موتیف $CS\alpha\beta$ شده است. از دیگر ویژگیهای این پپتید وجود یک مارپیچ α و ۳ صفحه β است (شکل ۶).

جهت تعیین جایگاه اینترون و اگزونهای ژن *Def1* گیاه تربچه، از mRNA استخراج شده از بذره‌های گیاه تربچه برای RT-PCR جهت سنتز cDNA استفاده گردید. لذا با استفاده از پرایمر $RDef1$ و آنزیم reverse transcriptase اولین رشته از cDNA سنتز گردید. پس از آن cDNA دو رشته ای با استفاده از آغازگرهای اختصاصی $RDef1$ و $RDef1$ و آنزیم *Pfu* پلی مرز تهیه گردید. نتایج به دست آمده حاکی از تکثیر cDNA به دست آمده به طول ۲۴۳ جفت باز می‌باشد (شکل ۳). cDNA سنتز شده در ناقل pJET1.2 همسانه سازی گردید. سازه نوترکیب به دست آمده توسط الگوی PCR، هضم آنزیمی (شکل ۴) و نهایتاً تعیین توالی مورد تأیید قرار گرفته و به نام pJETME2 نام گذاری شد.

مقایسه توالیهای ژنومی و cDNA ژن *Def1* تربچه نشان دهنده وجود یک اینترون به طول ۱۱۳ جفت باز می‌باشد. توالی اینترون از نوکلئوتیدهای ۶۵ الی ۱۷۷ در توالی ژن *Def1* واقع شده است (شکل ۵). از طرفی این مقایسه حاکی از کد شدن یک پلی پپتید به طول ۸۰ اسید آمینو (شکل ۵) و وزن مولکولی ۸/۷ کیلو دالتون است.

با استفاده از برنامه CLUSTAL W و مقایسه توالی اسیدآمینه پپتید دفنسنین فوق با توالیهای ثبت شده در بانک ژنی نشان داده شد که این پپتید با پپتید دفنسنین گیاهان *Orychophragmus violaceus*، *Brassica juncea*، *Arabidopsis halleri*، *Sinapis alba*، *B. oleracea*، *Eutrema wasabi* و *B. rapa* به ترتیب به میزان ۹۸/۸، ۹۶/۲، ۹۳/۲۸، ۹۲/۵، ۹۱/۲، ۹۰ و ۹۰ درصد شباهت دارد (شکل ۷).

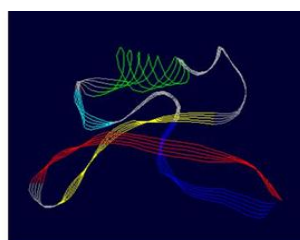
```

ATG GCT AAG TTT GCG TCC ATC ATC GCA CTT CTT TTT GCT GCT CTT
M   A   K   F   A   S   I   I   A   L   L   F   A   A   L
-----
GTT CTT TTT GCT GCT TTC G  gtgagtagtgacctgcttatcacatgctgcgca
V   L   F   A   A   F   E
-----
tgaaaaatttagattttagtatttttttttagttttcatattaatttgatatctaactt

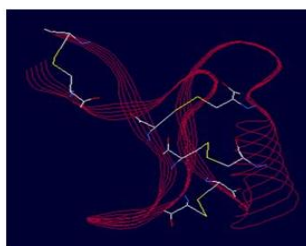
gtgagatctatgtattttacag AA GCA CCA ACA ATG GTG GAA GCA CAC AA
                        A   P   T   M   V   E   A   Q   K
-----
G TTG TGC GAA AGG CCA AGT GGG ACA TGG TCA GGA GTC TGT GGA A
  L   C   E   R   P   S   G   T   W   S   G   V   C   G   N
-----
AC AAT AAC GCA TGC AAA AAT CAG TGC ATT AAC  CTT GAG AAA GCA
  N   N   A   C   K   N   Q   C   I   N   L   E   K   A
-----
CGA CAT GGA TCT TGC AAC TAT  GTC TTC CCA GCT CAC AAG TGT AT
R   H   G   S   C   N   Y   V   F   P   A   H   K   C   I
-----
C TGC TAC TTT CCT TGT TAA
  C   Y   F   P   C   *

```

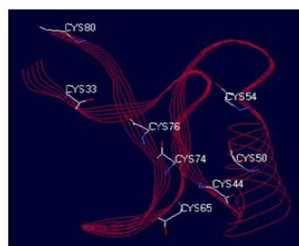
شکل ۵- توالی ژن *Def1* گیاه تربچه و توالی اسیدآمینه ای پروتئین آن: توالی اگزونی با حروف بزرگ و توالی اینترونی با حروف کوچک و توالی اسید آمینه ای *signal peptide* با زیرخط نشان داده شدند.



1

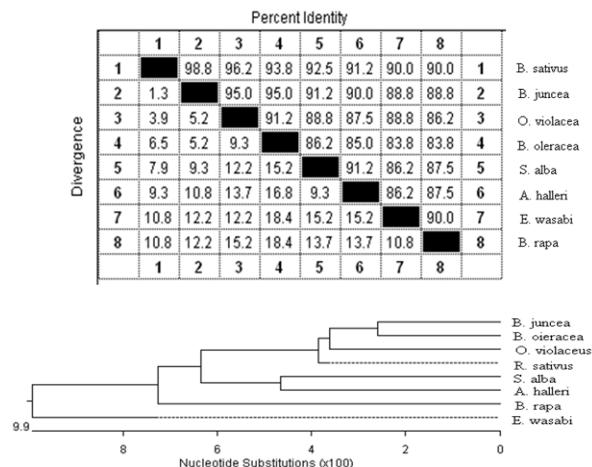


3



2

شکل ۶- ساختار فضایی پپتید *Def1* گیاه تربچه: ۱= نمایانگر مارپیچ α و صفحات β . ۲=نمایش اسیدآمینه های سیستئین در پپتید. ۳= نمایش پیوندهای دی سولفیدی درون رشته ای در پپتید *Def1*.



شکل ۷- A) درصد مشابهت توالی اسید آمینه ای پپتید Def1 گیاه تربچه، با توالی اسید آمینه ای ژنهای مشابه در بانک ژنی (B) دندروگرام حاصل از آنالیز توالیهای اسید آمینه ای دهنسین گیاهان *B. juncea*، *Brassica sativus*، *Orychophragmus violaceus*، *Entrema wasabi* و *Arabidopsis halleri*، *Sinapis alba*، *B. rapa*، *B. oleracea*

بحث

وجود یک ایترون کوتاه به طول ۱۱۳ نوکلئوتید در ساختار این ژن با طولی برابر ۳۵۶ نوکلئوتید می باشد. مقایسه پپتیدی این ژن با ژن دهنسین گیاه *B. juncea* (۲۱) ۹۸/۸ درصد مشابهت و با ژن دهنسین گیاه *B. rapa* (۱۷) ۹۰ درصد شباهت را نشان می دهد.

با مقایسه تفاوت‌های موجود بین اسیدآمینه‌های پپتید دهنسین گیاه تربچه با پپتید دهنسین از گیاه *B. juncea* مشاهده شد که تنها در یک اسیدآمینه در قسمت پپتید نشانه با هم تفاوت دارند و با پپتید دهنسین از گیاه *O. violaceus* علاوه بر دو اسیدآمینه در پپتید نشانه، دارای تفاوت در یک اسیدآمینه در قسمت پپتید بالغ نیز می باشد به طوری که به جای اسیدآمینه گلوتامیک اسید در پپتید دهنسین تربچه، اسیدآمینه گلوتامین قرار گرفته است. با بررسی بقیه پپتیدها مشاهده شد که تغییرات بیشتری در قسمت پپتید بالغ مشاهده می شود و تغییرات به گونه ای است که یک نوع اسیدآمینه از یک گروه به یک گروه دیگر تغییر یافته است. به عنوان مثال اسیدآمینه غیر قطبی به نوع قطبی با بار مثبت تبدیل شده است. باید توجه داشت که تغییر اسید آمینه در قسمت پپتید بالغ می تواند بر نوع عملکرد و همچنین میزان فعالیت پپتید اثرگذار باشد. به عبارتی، تغییر اسید آمینه در

با توجه به اهمیت دهنسینها و توانایی بالقوه آنها در مهار رشد عوامل بیماری زایی قارچی (۱۴)، این پپتیدها می‌توانند به عنوان کاندیداهای مناسبی برای تولید گیاهان تراریخت مقاوم به قارچها مورد استفاده قرار گیرند. دهنسینها متعلق به خانواده پپتیدی غنی از سیستمین و با وزن مولکولی پایین می باشند و به صورت عمده روی غشاهای سلولی اثر می گذارند. وجود این گروه از پروتئینها در پستانداران، حشرات و گیاهان گزارش شده است (۴، ۱۲، ۲۶). از ویژگیهای این گروه از پروتئینها سمیت علیه قارچها (۲ و ۸) و در نتیجه حفاظت از بذر گیاهان در برابر قارچهای بیماری زا می باشد (۲).

از آنجایی که گزارشات نشان از فعالیت ضد قارچی بالایی در گیاه تربچه دارد (۲۲، ۲۴)، و همچنین با توجه به اهمیت ژنهای دهنسین، ژن *Def1* در دو فرم ژنومی و cDNA شناسایی، همانند سازی، کلون و تعیین توالی گردید. ساختار ژنی دهنسینها از دو آگزون که آگزون اول یک سیگنال پپتید و آگزون دوم دمین اصلی دهنسین را شامل می‌شود تشکیل شده است (۳، ۵ و ۱۸). مطالعات حاکی از

در معرض برخی از عوامل بیماری‌زای قارچی قرار می‌گیرند. جهت جلوگیری از خسارات احتمالی وارده بر گیاهان می‌توان از ژنهای دفسین استفاده نمود. در مطالعه قبلی این گروه ژن دفسین گیاه شنبلیله به نام *Tfgd2* شناسایی و مطالعه شده است (۷). در این تحقیق ژن *Def1* از گیاه تربچه مورد مطالعه، شناسایی و کلون قرار گرفته که این ژنها در آینده می‌توانند برای انتقال به گیاهان زراعی ایران با استفاده از ناقله‌های بیانی گیاهی مناسب، مورد بررسی و بهره‌برداری قرار گیرند.

یک گروه اسیدآمینو ای و یا تغییر آن از یک گروه به گروه دیگر اسیدآمینو حائز اهمیت است (به عنوان مثال اسیدآمینو اسیدی به اسیدآمینو بازی تبدیل شود).

بررسی مقالات منتشر شده نشان دهنده انتقال برخی از ژنهای دفسین گیاهی به گیاهان زراعی می‌باشد که این امر منجر به فعالیت ضد قارچی بسیار قوی شده و مقاومت قابل توجهی را در برابر چندین بیماری قارچی ایجاد می‌نمایند (۹، ۲۸، ۱۰). از طرفی گزارشات حاکی از خسارات بسیار زیادی در برخی از گیاهان زراعی نظیر گندم، کلزا، چغندر قند و نیشکر می‌باشد (۱، ۱۱، ۲۶، ۲۷) که این گیاهان

منابع

- Beckers, G.J.M., Spoel, S.H., 2006. "Fine-Tuning Plant Defence Signalling: Salicylate versus Jasmonate", *Plant biology*; 8(01) 1-10.
- Broekaert, W.F., Rev., 1995. "Plant defensins: novel antimicrobial peptides as components of the host defense system", *Plant physiology*, 16 297-304.
- Chen, J., 2004. "Cloning and Functional Expression of a Mungbean Defensin VrD1 in *Pichia pastoris*", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 52(8) 2256-2261.
- Daneshmand, F., 2014 "Identification and purification of an antimicrobial peptide from *Ziziphus jujuba*", *Journal of cellular and molecular researches*: 27(2) 211-223.
- De Beer, A., Vivier, M., 2008. "Vv-AMP1, a ripening induced peptide from *Vitis vinifera* shows strong antifungal activity", *BMC Plant Biology*; 8(1) 75-83
- Doyle, J. J., Doyle, J.L., 1987. "A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue", *Phytochem. Bull.*; 19 11-15.
- Etebari, M., Motallebi, M., Zamani, M.R., Moghaddassi Jahromi, Z., 2016. "Structural Analysis of *def2* Gene from *Trigonella foenum-graecum* by Characterization of Its Genomic and cDNA", *Journal of Agricultural Biotechnology*: 7(01) 79-86.
- Evans, I.J., Greenland, A.J., 1998. "Transgenic approaches to disease protection: applications of antifungal proteins" *Pesticide Science*; 54(4) 353-359.
- Gao, A.G., 2000. "Fungal pathogen protection in potato by expression of a plant defensin peptide", *Nature Biotechnology*; 18(12) 1307-1310.
- Kanzaki, M., 2002. "Overexpression of the wasabi defensin gene confers enhanced resistance to blast fungus (*Magnaporthe grisea*) in transgenic rice", *TAG Theoretical and Applied Genetics*; 105(6) 809-814.
- Monteiro, S., 2003. "Environmental conditions during vegetative growth determine the major proteins that accumulate in mature grapes", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 51(14) 4046-4053.
- Mortazavi, S. M., Saffar, B., Mirakhorli, N., Mobini Dehkordi, M., 2016 "Design, synthesis, cloning, expression and evaluation of the antibacterial effect of wheat defensin (*Triticum aestivum*) in *E. coli* host" *Journal of cellular and molecular researches*: 29(1) 114-125.
- Ng, T.B., 2004. "Antifungal proteins and peptides of leguminous and non-leguminous origins", *Peptides*; 25(7) 1215-1222.
- Olli, S., Kirti, P.B., 2006. "Cloning, Characterization and Antifungal Activity of Defensin *Tfgd1* from *Trigonella foenum-graecum L.*", *J. Biochem Mol Biology*; 39(3) 278-283.
- Osborn, R.W., 1995. "Isolation and characterization of plant defensins from seeds of Asteraceae, Fabaceae, Hippocastanaceae and Saxifragaceae", *FEBS Letters*; 368(2) 257-262.
- Park, H.C., 2002. "Characterization of a stamen-specific cDNA encoding a novel plant defensin

- in Chinese cabbage”, *Plant Molecular Biology*; 50(1) 57-68.
17. Park, Y.S., Cho, T.J., 2003. “Isolation and characterization of methyl jasmonate-inducible genes in chinese cabbage”, *Korean Journal of Biological Sciences*, 7(4) 337-343.
 18. Pelegrini, P.B., 2008. “Novel insights on the mechanism of action of alpha-amylase inhibitors from the plant defensin family”, *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*; 73(3) 719-729.
 19. Sambrook, J., Russell, D.W., 2001. “Molecular cloning”, Cold Spring Harbor: New York.
 20. Selitrennikoff, C.P., 2001. “Antifungal Proteins”, *Applied and environmental microbiology*; 67(7) 2883-2894.
 21. Swathi, A.T., Kirti, P.B., 2005. “Cloning and sequencing of a genomic clone of defensin from *Brassica juncea*”, Direct submission to NCBI, AN: ABB59549.
 22. Terras, F., 1995. “Small cysteine-rich antifungal proteins from radish: their role in host defense”, *Plant Cell*; 7(5) 573-588.
 23. Terras, F.R., 1992. “Analysis of two novel classes of plant antifungal proteins from radish (*Raphanus sativus* L.) Seeds”, *Journal of Biological Chemistry*; 267(22) 15301-15309.
 24. Terras, F.R.G., Eggermont, K., Kovaleva, V., Raikhel, N.V., Osborn, R.W., Kester, A., Rees, S.B., Torrekens, S., Van Leuven, F., Vanderleyden, J., Cammue, B.P.A., Broekaert, F.W., 1995. “Small cysteine – rich antifungal proteins from radish: their role in host defense”, *Plant Cell*; 7 568-573.
 25. Terras, F.R.G., Goderis, I.J., Penninckx, I.J., Osborn, R.W., Broekaert, F.W., 1996. “*Raphanus sativus* mRNA for antifungal protein3”, Direct submission to NCBI, AN: X97319.
 26. Theis, T., Stahl, U., 2004. “Antifungal proteins: targets, mechanisms and prospective applications”, *Cellular and Molecular Life Sciences*; 61(4) 437-455.
 27. Wang, H., Ng, T.B., 2001. “Isolation of a Novel Deoxy ribonuclease with Antifungal Activity from *Asparagus officinalis* seeds”, *Biochemical and Biophysical Research Communications*; 289(1) 120-124.
 28. Zhu, Y., Agbayani, R., Moore, P., 2007. “Ectopic expression of *Dahlia merckii* defensin Damp 1 improves papaya resistance to *Phytophthora palmivora* by reducing pathogen vigor”, *Planta*; 226(1) 87-97.

Isolation, identification and study of defensin gene structure (*Def1*) in *Raphanus sativus*

Etebari M., Motallebi M., Zamani M.R., and Moghaddassi-Jahromi Z.

National Institute of Genetic Engineering & Biotechnology (NIGEB), Tehran, I.R. of Iran.

Abstract

Different studies have demonstrated that the plants, by producing antifungal peptides, such as defensins, cause the pores in the fungal plasma membrane which leads to efflux and influx of cellular components. These changes ultimately lead to fungal cell death. The purpose of this research was to isolate, identify, and study of defensin gene structure in *Raphanus sativus* by cloning and sequencing. The genomic DNA extraction from *Raphanus sativus* was achieved by CTAB method. Amplification of this gene was performed using the specific primers (RDeff /RDefr). The amplified DNA fragment (356bp) was cloned into pJET1.2 cloning vector and the constructs were confirmed via enzyme digestion and PCR patterns. Also, the cDNA of this gene, which was about 243bp, was synthesized after extraction of RNA by specific primers. The amplified fragment of the cDNA was confirmed, cloned in the pJET1.2 vector and sequenced. Comparison of genomic DNA and cDNA sequences showed that *Def1* gene contains one intron (113bp) and its open reading frame encodes a peptide with a length of 80 amino acids. Alignment of the amino acid sequence of *Def1* shows 90 to 98.8% homology with other reported defensin sequences.

The identification and cloning of this gene could be used in future for fungal diseases management.

Key words: *Raphanus sativus*, Defensin, *Def1* gene, gene isolation, cloning.