

Identification, Sequencing, and Characterization of the Defensin Gene Family Members in Three Cultivars of Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.)

Yasaman Neisi  | Seyyed Mohsen Sohrabi*  | Karim Sorkheh 

Department of Production engineering and Plant Genetics, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

*Corresponding author ✉: sm.sohrabi@scu.ac.ir

Article Info

Article type:
Research Article

Article history:

Received: April 7, 2026;
Received in revised form: June 8, 2026;
Accepted: June 15, 2026;
Available online: June 30, 2026

Keywords:

Gene expression,
Antimicrobial peptides,
Bioinformatics analysis,
Defensin,
Common bean

ABSTRACT

Plant defensins are among the most important families of antimicrobial peptides involved in plant defense against pathogens. This study aimed to identify, sequence, and characterize the structural, evolutionary, and functional features of the defensin gene family in three cultivars of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Defensin genes were identified through homology searches against the reference bean genome, and gene-specific primers were subsequently designed. Following genomic DNA extraction, the target genes were amplified by PCR and sequenced using the Sanger method. Gene and protein characteristics were analyzed using bioinformatics tools. Phylogenetic relationships, predicted antimicrobial activity, and gene expression patterns under different conditions were also investigated. The results revealed the presence of 10 defensin genes distributed across 4 chromosomes of the common bean genome. The coding sequences of all identified genes were completely conserved among the three cultivars. All predicted proteins contained the characteristic Knot1 domain, an N-terminal signal peptide, eight conserved cysteine residues, the γ -core motif. Computational analyses also confirmed the high antimicrobial potential of these proteins. Phylogenetic and in silico expression analyses demonstrated that members of the defensin gene family exhibit distinct evolutionary and regulatory patterns, with PvDef3 and PvDef8 showing the strongest responses to both biotic and abiotic stresses. Overall, this study provides valuable insights into the defensin gene family in common bean and offers useful genetic resources for breeding disease-resistant cultivars and advancing future biotechnological applications.



Cite this article: Neisi, Y., Sohrabi, S.M. and Sorkheh, K. (2026). Identification, sequencing, and characterization of the defensin gene family members in three cultivars of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Genetic Research*, 13(1): 155–174 (In Persian).

DOI: <https://doi.org/10.22034/pgr.2026.2095430.1042>

Introduction

Plant defensins are small, cysteine-rich antimicrobial peptides that constitute one of the most important components of the innate immune system in plants. These peptides exhibit broad-spectrum antimicrobial activity against fungi, bacteria, and other phytopathogens by disrupting microbial cell membranes. Besides their defensive roles, defensins have also been implicated in plant development, ion homeostasis, reproduction, and tolerance to abiotic stresses. This study aimed to identify, sequence, and characterize defensin genes in three cultivars of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and to investigate their structural features, evolutionary relationships, antimicrobial potential, and expression profiles under different biological conditions.

Materials and Methods

Defensin genes were identified through homology searches against the common bean reference genome using tBLASTn with known plant defensin proteins as queries. Candidate genes were validated using BLAST and CDD analyses, and gene-specific primers were designed accordingly. Genomic DNA was extracted from young leaves of three common bean cultivars. Defensin genes were amplified by PCR, purified, and sequenced using the Sanger sequencing method. Gene organization, open reading frames, exon–intron structures, chromosomal locations, conserved domains, physicochemical properties, signal peptides, disulfide bonds, and subcellular localization were analyzed. The antimicrobial potential of the defensins was predicted using the CAMP database. Phylogenetic analysis was performed using MEGA X. Transcriptomic datasets from GEO and PvGEA databases were used to evaluate tissue-specific expression and transcriptional responses under drought, salinity, heat, cold, fungal, and bacterial stresses.

Results and Discussion

Ten defensin genes were identified in the common bean genome. These genes were unevenly distributed across chromosomes 2, 3, 5, and 9. PCR amplification generated DNA fragments of the expected size for all genes, and sequencing revealed complete conservation of the coding regions among the three cultivars, indicating an exceptionally high level of sequence conservation. The identified genes contained ORFs ranging from 222 to 237 bp and encoded proteins of 73–78 amino acids. All genes possessed a single GT–AG intron. Protein analyses demonstrated that every defensin contained the characteristic Knot1 (gamma-thionin) domain, an N-terminal Sec/SPI signal peptide, extracellular localization signals, and eight highly conserved cysteine residues forming the classical four-disulfide-bond pattern. Furthermore, the conserved γ -core motif was identified in all proteins, confirming their classification as typical plant defensins. Antimicrobial prediction analyses consistently indicated high antimicrobial potential for almost all identified proteins. The highest antimicrobial probability was concentrated within the C-terminal region containing the conserved γ -core motif, highlighting its importance in antimicrobial activity. Phylogenetic analysis clustered bean defensins into several well-supported groups together with homologous proteins from *Medicago truncatula*, *Arabidopsis thaliana*, and *Oryza sativa*. Closely related gene pairs, particularly PvDef3/PvDef10 and PvDef5/PvDef8, suggested relatively recent gene duplication events followed by functional divergence. Despite their structural conservation, expression analyses revealed remarkable transcriptional diversity. The expression analysis demonstrated that members of the defensin gene family exhibit distinct evolutionary and regulatory patterns, with PvDef3 and PvDef8 showing the strongest responses to both biotic and abiotic stresses. These findings indicate that individual defensin genes have undergone regulatory diversification and may participate in distinct defense signaling pathways.

Conclusions

This study represents a comprehensive molecular characterization of the defensin gene family in common bean. The identified genes exhibited highly conserved coding sequences and typical structural features of plant defensins, including the knot1 domain, extracellular signal peptides, conserved cysteine residues, and the γ -core motif. Nevertheless, considerable diversity was observed in their evolutionary relationships and expression patterns, suggesting functional specialization following gene duplication. Among the identified defensins, PvDef3 and PvDef8 emerged as the most promising candidate genes because of their strong responses to both biotic and abiotic stresses. The results of this study provide valuable insights into the defensin gene family in common bean and offer useful genetic resources for breeding disease-resistant cultivars and advancing future biotechnological applications.

Author Contributions

Y. Neisi conducted the experiment and writing the original draft. S.M. Sohrabi and K. Sorkheh designed the experiment, supervised the research, revised and edited the manuscript. S.M. Sohrabi analyzed the data.

Data Availability Statement

Data available on request from the authors.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the Vice Chancellor for Research at the Shahid Chamran University of Ahvaz for their valuable support.

Ethical Considerations

Not applicable.

Funding

This research did not receive any external support.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

شناسایی، توالی‌یابی و بررسی ویژگی‌های اعضای خانواده ژنی دیفنسین در سه رقم لوبیای معمولی (*Phaseolus vulgaris* L.)

یاسمن نیسی  | سید محسن سهرابی*  | کریم سرخه 

گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

اطلاعات مقاله

چکیده

نوع مقاله:

مقاله پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۵/۰۱/۱۸

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۵/۰۳/۱۸

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۵/۰۳/۲۵

تاریخ انتشار: ۱۴۰۵/۰۴/۰۹

واژگان کلیدی:

بیان ژن،

پپتیدهای ضد میکروبی،

تحلیل بیوانفورماتیکی،

دیفنسین،

لوبیای معمولی

دیفنسین‌ها (Defensins) یکی از مهم‌ترین خانواده‌های پپتیدهای ضد میکروبی گیاهی هستند که نقش کلیدی در دفاع گیاهان در برابر عوامل بیماری‌زا ایفا می‌کنند. این پژوهش با هدف شناسایی، توالی‌یابی و بررسی ویژگی‌های ساختاری، تکاملی و عملکردی اعضای خانواده ژنی دیفنسین در سه رقم لوبیای معمولی (*Phaseolus vulgaris* L.) انجام گرفت. ژن‌های دیفنسین با استفاده از جستجوی همولوژی در ژنوم مرجع لوبیا شناسایی و آغازگرهای اختصاصی طراحی شدند. پس از استخراج DNA، ژن‌ها با PCR تکثیر و محصولات به روش سنگر تعیین توالی شدند. ویژگی‌های ژنی و پروتئینی با ابزارهای مختلف بیوانفورماتیکی بررسی و روابط فیلوژنتیکی، خاصیت ضد میکروبی احتمالی و الگوی بیان ژن‌ها در شرایط مختلف تحلیل شد. نتایج این مطالعه نشان داد که تعداد ده ژن دیفنسین در ژنوم لوبیا وجود دارد که بر روی چهار کروموزوم مختلف قرار گرفته‌اند. توالی ناحیه کدکننده این ژن‌ها در هر سه رقم کاملاً یکسان بود. تمامی پروتئین‌ها دارای دومین اختصاصی Knot1، سیگنال پپتید ترش‌حی، هشت سیستئین حفاظت‌شده و موتیف γ -core بودند. نتایج تجزیه و تحلیل صورت گرفته همچنین ظرفیت بالای فعالیت ضد میکروبی این پروتئین‌ها را تأیید کرد. تحلیل فیلوژنتیکی و بررسی بیان ژن‌ها در شرایط *in silico* نشان داد که اعضای این خانواده دارای الگوهای تکاملی و تنظیمی متفاوت بوده و ژن‌های PvDef3 و PvDef8 بیشترین پاسخ را به تنش‌های زیستی و غیرزیستی نشان دادند. نتایج این پژوهش اطلاعاتی مفید در مورد خانواده ژنی دیفنسین در لوبیا فراهم کرده و می‌تواند در به‌تزادی ارقام مقاوم به بیماری‌ها و توسعه کاربردهای زیست‌فناورانه مورد استفاده قرار گیرد.

مقدمه

گیاهان همواره در معرض طیف گسترده‌ای از عوامل بیماری‌زا از جمله قارچ‌ها، باکتری‌ها، ویروس‌ها و سایر میکروارگانیسم‌ها قرار دارند. هر ساله بخش قابل توجهی از تولیدات کشاورزی جهان به دلیل بیماری‌های گیاهی از بین می‌رود و این مسئله علاوه بر کاهش عملکرد و کیفیت محصولات، خسارات اقتصادی فراوانی را به بخش کشاورزی وارد می‌کند (Nazarov *et al.*, 2020; Strange and Scott, 2005). اگرچه استفاده از قارچ‌کش‌ها و آنتی‌بیوتیک‌های شیمیایی نقش مهمی در کنترل بیماری‌ها داشته است، اما مصرف بی‌رویه این ترکیبات موجب ظهور سویه‌های مقاوم، کاهش اثربخشی مواد شیمیایی، آلودگی محیط‌زیست و افزایش نگرانی‌های مرتبط با سلامت انسان شده است؛ از این رو، توسعه راه‌کارهای زیستی و پایدار برای افزایش مقاومت گیاهان در برابر عوامل بیماری‌زا به یکی از مهم‌ترین اهداف پژوهش‌های زیست‌فناوری کشاورزی تبدیل شده است (McLaughlin *et al.*, 2023).

یکی از مهم‌ترین اجزای سیستم ایمنی ذاتی گیاهان، پپتیدهای ضد میکروبی هستند. این ترکیبات، پپتیدهای کوچک، کاتیونی و غنی از اسیدهای آمینه آب‌گریز و سیستمین بوده که در پاسخ به حمله عوامل بیماری‌زا یا تنش‌های محیطی تولید می‌شوند و نقش اساسی در دفاع طبیعی گیاه ایفا می‌کنند. پپتیدهای ضد میکروبی گیاهی بر اساس ویژگی‌های ساختاری و توالی اسیدهای آمینه به خانواده‌های مختلفی شامل تیونین‌ها، نانتین‌ها، هوئین‌ها، اسنیکین‌ها، سیکلوتایدها، پروتئین‌های انتقال‌دهنده لیپید و دیفنسین‌ها تقسیم می‌شوند که در میان آن‌ها، دیفنسین‌ها به دلیل گستردگی، تنوع عملکرد و پایداری بالا، بیشترین توجه پژوهشگران را به خود جلب کرده‌اند (Brahmanjad *et al.*, 2025; Bakare *et al.*, 2022; Iralu *et al.*, 2024; Montesinos, 2023).

دیفنسین‌های گیاهی گروهی از پپتیدهای ضد میکروبی کوچک، دارای بار مثبت و غنی از سیستمین هستند که معمولاً از ۴۵ تا ۵۴ اسید آمینه تشکیل شده‌اند و به وسیله چهار پیوند دی‌سولفیدی ساختار سه‌بعدی بسیار پایداری پیدا می‌کنند. این ساختار موجب مقاومت بالای آن‌ها در برابر تغییرات دما، pH و فعالیت پروتازها شده و نقش مهمی در حفظ عملکرد زیستی این پپتیدها دارد. ویژگی شاخص دیفنسین‌های گیاهی، وجود هشت باقی‌مانده

سیستئین حفاظت‌شده در توالی آن‌ها است که آرایش فضایی ویژه‌ای شامل یک مارپیچ آلفا و سه رشته بتا ایجاد می‌کند و این ساختار، پایه فعالیت ضد میکروبی آن‌ها محسوب می‌شود (Azmi and Hussain, 2021; Kovaleva *et al.*, 2020; Saffar *et al.*, 2024). دیفنسین‌ها تقریباً در تمامی خانواده‌های گیاهی شناسایی شده‌اند. اگرچه نخستین بار از بذر گیاهان جداسازی شدند، اما امروزه حضور آن‌ها در برگ، گل، ریشه، میوه، اندام‌های زایشی و بافت‌های ذخیره‌ای نیز به اثبات رسیده است. بیان ژن‌های دیفنسین معمولاً در پاسخ به حمله عوامل بیماری‌زا، آسیب‌های مکانیکی و تنش‌های غیرزیستی مانند خشکی، شوری و تنش اکسیداتیو افزایش می‌یابد که نشان‌دهنده نقش کلیدی این پپتیدها در سازوکارهای دفاعی و سازگاری گیاهان با شرایط نامساعد محیطی است (Graham *et al.*, 2008; Sher *et al.*, 2002; Khan *et al.*, 2019; Thomma *et al.*, 2002).

مکانیسم عملکرد دیفنسین‌های گیاهی عمدتاً بر پایه برهم‌کنش الکترواستاتیکی با غشای سلول‌های میکروبی است. به دلیل بار مثبت این پپتیدها و بار منفی غشای بسیاری از قارچ‌ها و باکتری‌ها، دیفنسین‌ها به سطح غشاء متصل شده و با ایجاد اختلال در یکپارچگی غشای پلاسمایی، تشکیل منافذ، افزایش نفوذپذیری، نشت محتویات سلولی و در نهایت مرگ سلول میکروبی را موجب می‌شوند. اگرچه مهم‌ترین عملکرد شناخته‌شده دیفنسین‌های گیاهی، فعالیت ضدقارچی آن‌ها است، مطالعات متعدد نشان داده‌اند که این پپتیدها طیف وسیعی از فعالیت‌های زیستی شامل اثرات ضدباکتریایی، ضدویروسی، ضدانگلی و حتی ضدسرطانی دارند. علاوه بر نقش دفاعی، شواهدی مبنی بر مشارکت آن‌ها در تنظیم رشد گیاه، تحمل فلزات سنگین، تولیدمثل، تنظیم کانال‌های یونی و پاسخ به تنش‌های محیطی نیز گزارش شده است. این تنوع عملکرد، دیفنسین‌ها را به یکی از ارزشمندترین خانواده‌های پپتیدهای ضد میکروبی برای مطالعات زیست‌فناوری، اصلاح‌نباتات و توسعه ترکیبات زیستی جدید تبدیل کرده است (Azmi and Hussain, 2021; Ha-Tran and Huang, 2025; Shahmiri *et al.*, 2023).

در سال‌های اخیر، با توسعه فناوری‌های ژنومی و زیست‌اطلاعاتی، شناسایی و بررسی خانواده ژنی دیفنسین در گیاهان مختلف با سرعت زیادی گسترش یافته است. این مطالعات نشان داده‌اند که تنوع توالی، ساختار ژنی، الگوی بیان

و ویژگی‌های عملکردی دیفنسین‌ها در گونه‌ها و ارقام مختلف گیاهی متفاوت بوده و شناسایی ژن‌های جدید می‌تواند به معرفی منابع ارزشمند مقاومت ژنتیکی در برنامه‌های اصلاحی و تولید گیاهان مقاوم به بیماری‌ها منجر شود. بر همین اساس، هدف این پژوهش شناسایی، جداسازی، توالی‌یابی و بررسی ویژگی‌های اعضای خانواده دیفنسین از ارقام لوبیا (*Phaseolus vulgaris* L.) است. در این مطالعه، ژن‌های دیفنسین از ارقام منتخب لوبیا شناسایی و جداسازی شده و پس از تعیین توالی، ویژگی‌های مولکولی و ساختاری آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این پژوهش می‌تواند ضمن افزایش شناخت از خانواده ژنی دیفنسین در لوبیا، زمینه را برای بهره‌گیری از این ژن‌ها در برنامه‌های اصلاحی، تولید ارقام مقاوم به بیماری‌ها و توسعه کاربردهای زیست‌فناورانه در آینده فراهم سازد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و شرایط رشدی: در این پژوهش، بذور سه رقم زراعی مختلف گیاه لوبیا (*Phaseolus vulgaris* L.) شامل لوبیا چیتی (رقم تلاش)، لوبیا قرمز (رقم یاقوت) و لوبیا سفید (رقم درسا) از مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان مرکزی تهیه شد. بذور هر رقم به‌طور جداگانه در گلدان‌هایی با ترکیبی از خاک‌برگ و پیت‌ماس با نسبت ۱:۱ کشت شدند. گلدان‌ها به‌طور منظم هر سه روز یک‌بار آبیاری و هر دو هفته یک‌بار با کود کامل تغذیه شدند. پس از رشد گیاهچه‌ها، بخش هوایی آن‌ها به‌طور جداگانه برداشت شده و در نیتروژن مایع قرار گرفت. گیاهچه‌های حاصل با استفاده از نیتروژن مایع و هاون

چینی به‌خوبی پودر شدند. بافت‌های پودر شده برای استخراج DNA به‌کار برده شدند.

شناسایی ژن‌های دیفنسین و طراحی آغازگرها: ابتدا توالی‌های پروتئینی شناخته‌شده دیفنسین از گونه‌های گیاهی مختلف، به‌ویژه گیاهان خانواده Fabaceae، از پایگاه داده پروتئینی NCBI استخراج شدند. سپس این توالی‌ها به‌عنوان توالی مرجع در جستجوی همولوژی مورد استفاده قرار گرفتند. برای این منظور، با بهره‌گیری از ابزار tBLASTn موجود در پایگاه NCBI، توالی‌های پروتئینی دیفنسین در برابر ژنوم مرجع لوبیا هم‌تراز شدند تا نواحی ژنومی دارای شباهت معنی‌دار شناسایی شوند (Johnson *et al.*, 2008). توالی‌های به‌دست آمده از نتایج جستجو به‌عنوان کاندیداهای اولیه ژن‌های دیفنسین در نظر گرفته شدند. در ادامه، به‌منظور تأیید صحت این توالی‌ها، تجزیه و تحلیل تکمیلی با استفاده از ابزارهای Conserved Domain Database (CDD) و BLASTn انجام گرفت (Marchler-*et al.*, 2014). تنها توالی‌هایی که وجود دامنه‌های اختصاصی دیفنسین را نشان داده و در BLASTn دارای شباهت با دیفنسین‌های گیاهی بودند، مورد تأیید قرار گرفته و به‌عنوان اعضای نهایی خانواده ژنی دیفنسین در لوبیا انتخاب شدند. از این توالی‌ها به‌عنوان الگو برای طراحی آغازگرها استفاده شد. آغازگرها با استفاده از نرم‌افزار AlleleID (نسخه ۷) طراحی شدند (جدول ۱). آغازگرها در نواحی بالادست و پایین‌دست و با فاصله حداقل ۳۰ جفت‌باز از توالی‌های کدکننده ژن‌ها طراحی شدند تا توالی‌یابی با دقت بیشتری انجام شود.

جدول ۱- مشخصات آغازگرهای مورد استفاده برای PCR

Table 1. Characteristics of primers used for PCR

نام آغازگر	توالی آغازگر (5'→3')	دمای اتصال (°C)	طول قطعه تکثیری (جفت‌باز)
Primer name	Primer sequence	T _a (°C)	Product length (bp)
PvDef1-F	GCAATGGACAAGGCACGATTTG	55.6	431
PvDef1-R	ATGATGAAAGTGACAAACCAACGC		
PvDef2-F	GAAGGCAAAGGAGAAAGAAC	52.8	401
PvDef2-R	GGGTGAATGAGCGAATTAAG		
PvDef3-F	CTCAACCATCTTCGTCTTTCTTC	54.7	378
PvDef3-R	CTTAACCTTAACCAACACACAGC		
PvDef4-F	ACTTGGTGAACATAGAGATGAGG	55.3	400
PvDef4-R	TGTGATTTATTGGGTAGTGAGACG		
PvDef5-F	AAACACAAACCGATCATCACACAC	54.5	425
PvDef5-R	GCACCAACAGCGGAAATCATC		
PvDef6-F	TCTTACCCATTCTCTCCCATTC	55.8	375
PvDef6-R	AAGCAGCGGCGAGTGAGG		
PvDef7-F	CTTGAAGAATTGGCGTGTGATG	54.9	424
PvDef7-R	GTGTAGGTGGAGAAAGCAATAATG		
PvDef8-F	AAACACAAACCACTCATCACACAC	54.2	497
PvDef8-R	GCACCAACAGCGGAAATCATC		
PvDef9-F	TTCTCTCCATTCTGCCATAGC	55	426
PvDef9-R	TGGTGTGAGCCCTGTATAGTAATG		
PvDef10-F	TCTGTGTCTTTTCGTCTCAACCATC	56	353
PvDef10-R	TTGAAGTTCTAAGAGCGTTTGTGCG		

با استفاده از نرم‌افزارهای مذکور مشخص شدند. اطلاعات مربوط به موقعیت کروموزومی تمامی اعضای خانواده ژنی دیفنسین از پایگاه‌های داده Phytozome و Plants Ensembl استخراج گردید (Bolser *et al.*, 2016; Goodstein *et al.*, 2012). به منظور بررسی ساختار ژنی، توالی‌های ژنومی و توالی‌های ORF ژن‌های دیفنسین با یکدیگر هم‌ردیف شدند و ساختار اگزون-اینترون هر ژن با استفاده از FGENESH تعیین شد (Salamov and Solovyev, 2000). وجود دمین‌ها و موتیف‌های عملکردی با استفاده از پایگاه‌ها و ابزارهای CDD, Pfam, InterProScan بررسی شدند (Finn *et al.*, 2016; Jones *et al.*, 2014; Marchler-Bauer *et al.*, 2015). ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی پروتئین‌های دیفنسین، پارامترهایی شامل طول توالی اسیدآمینه‌ای، وزن مولکولی، بار خالص، نقطه ایزوالکتریک (pI)، شاخص آلفاتیک، شاخص ناپایداری و میانگین کل آب‌گریزی با استفاده از ابزار ProtParam محاسبه گردید (Gasteiger *et al.*, 2005). پیوندهای دی‌سولفیدی موجود در پروتئین‌ها با استفاده از سرور DiANNA (نسخه ۱/۱) پیش‌بینی شدند (Ferré and Clote, 2006). با استفاده از ابزار SignalP (نسخه ۶) وجود یا عدم وجود سیگنال‌پپتید در پروتئین‌ها مشخص شد (Teufel *et al.*, 2022). همچنین، برای پیش‌بینی محل تجمع و استقرار پروتئین‌های دیفنسین، توالی‌های پروتئینی در سامانه CELLO2GO مورد بررسی قرار گرفتند (Yu *et al.*, 2014). هم‌ردیفی چندگانه پروتئین‌های دیفنسین با استفاده از نرم‌افزار Vector NTI (نسخه ۱۱) ترسیم شد.

پیش‌بینی خاصیت ضد میکروبی: به منظور ارزیابی ظرفیت ضد میکروبی پروتئین‌های دیفنسین، توالی‌های اسیدآمینه‌ای در پایگاه داده Collection of Anti-Microbial Peptides (CAMP) مورد بررسی قرار گرفتند (Waghu *et al.*, 2014). این پایگاه شامل مجموعه‌ای از پپتیدهای ضد میکروبی تأیید شده به صورت تجربی و محاسباتی بوده و امکان پیش‌بینی فعالیت ضد میکروبی توالی‌های جدید را فراهم می‌کند. برای افزایش دقت پیش‌بینی، توالی‌های مورد مطالعه به طور هم‌زمان با استفاده از چهار الگوریتم یادگیری ماشین شامل Support Vector Machine (SVM)، Artificial Random Forest (RF)، Discriminant Analysis (DA) و Neural Network (ANN)

استخراج DNA و تکثیر توالی‌های دیفنسین: استخراج DNA ژنومی از نمونه‌های پودر شده و بر اساس دو روش CTAB و SDS انجام گرفت (Dellaporta *et al.*, 1983; Doyle, 1991). کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از الکتروفورز روی ژل آگاروز یک درصد و دستگاه اسپکتروفوتومتر مورد بررسی قرار گرفت. به منظور تکثیر توالی کامل ژن‌های دیفنسین، واکنش PCR با استفاده از DNA ژنومی به عنوان الگو و آغازگرهای اختصاصی طراحی شده، انجام شد. برای تمامی ژن‌ها از مسترمیکس شرکت Ampliqon (A180301) استفاده شد. برای تهیه مسترمیکس مقدار ۲۰ نانوگرم DNA استخراج شده از هر رقم، یک میکرولیتر از هر کدام از آغازگرهای رفت و برگشت با غلظت ۱۰ میکرومولار به همراه مسترمیکس و آب در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر تهیه شد. برنامه دمایی PCR شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، دمای اتصال هر جفت آغازگر به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه بود که به تعداد ۳۵ چرخه انجام گرفت. واکنش همچنین دارای دو دمای واسرشته‌سازی اولیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد و گسترش نهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد، هر کدام به مدت ۱۰ دقیقه بود. الکتروفورز محصولات PCR بر ژل آگاروز یک درصد انجام و پس از تأیید اندازه قطعات تکثیر شده، باندهای اختصاصی مربوط به ژن‌های مورد نظر از ژل برش خورده و با استفاده از کیت Gel DNA Recovery (EX6151) شرکت سیناکلون خالص‌سازی شدند. محصولات PCR مربوط به هر یک از ژن‌های دیفنسین پس از خالص‌سازی، به صورت جداگانه برای تعیین توالی به شرکت ماکروژن ارسال شدند. به منظور افزایش دقت، توالی‌یابی سنجر به صورت خوانش دوطرفه با استفاده از آغازگرهای رفت و برگشت اختصاصی هر قطعه تکثیری انجام شد.

تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی ژن‌های دیفنسین لوبیا: نتایج حاصل از توالی‌یابی با استفاده از نرم‌افزارهای Vector NTI (نسخه ۱۱) و CLC Genomics Workbench (نسخه ۲۰) از نظر کیفیت مورد بررسی و بازبینی قرار گرفته و سپس پردازش شدند. چارچوب خوانش‌باز (ORF) موجود در ژن‌های دیفنسین با استفاده از نرم‌افزارها و ابزارهای Vector NTI (نسخه ۱۱)، ORF finder و CLC Genomics Workbench (نسخه ۲۰) شناسایی شد. طول ORF، کدون‌های شروع و خاتمه نیز

ارزیابی شدند و احتمال برخورداری آن‌ها از فعالیت ضد میکروبی تعیین گردید. علاوه بر این، به منظور شناسایی نواحی دارای بیشترین پتانسیل ضد میکروبی در ساختار پروتئین‌های دیفنسین، تحلیل قطعات و موتیف‌های عملکردی توالی‌ها نیز با استفاده از ابزارهای موجود در پایگاه CAMP انجام شد.

تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی: به منظور بررسی روابط تکاملی و تعیین جایگاه فیلوژنتیکی پروتئین‌های دیفنسین شناسایی شده، توالی‌های اسید آمینه‌ای ژن‌های دیفنسین لوبیا به همراه توالی‌های متناظر آنها در گیاهان برنج (*Oryza sativa L.*)، آراییدوپسیس (*Medicago truncatula L.*) از پایگاه داده NCBI استخراج شدند. ابتدا هم‌ردیفی چندگانه توالی‌های پروتئینی با استفاده از الگوریتم ClustalW پیاده‌سازی شده در نرم‌افزار MEGA X انجام شد تا نواحی حفاظت‌شده و میزان شباهت بین توالی‌ها مشخص گردد. سپس، درخت فیلوژنتیکی بر اساس روش Neighbor-Joining (NJ) و با استفاده از ماتریس فاصله حاصل از هم‌ردیفی توالی‌ها ترسیم شد. به منظور ارزیابی میزان اطمینان شاخه‌های درخت، آزمون Bootstrap با ۱۰۰۰ تکرار انجام گرفت و تنها مقادیر Bootstrap درج‌شده بر روی گره‌ها به عنوان شاخصی از اعتبار روابط تکاملی مورد استفاده قرار گرفتند (Kumar et al., 2018). درخت نهایی به منظور تعیین گروه‌بندی اعضای خانواده ژنی، بررسی میزان قرابت تکاملی و شناسایی خوشه‌های احتمالی ژن‌های دیفنسین در گونه‌های مختلف مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

تجزیه و تحلیل بیان *in silico* ژن‌های دیفنسین گیاه لوبیا: به منظور بررسی الگوی بیان ژن‌های خانواده دیفنسین در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی، از داده‌های ترنسکریپتومی گیاه لوبیا موجود در پایگاه Gene Expression Omnibus (GEO) سایت NCBI و همچنین پایگاه PvGEA استفاده شد (Edgar et al., 2002; O'Rourke et al., 2014). مجموعه داده‌های انتخاب‌شده شامل آزمایش‌های مرتبط با تنش‌های غیرزیستی نظیر خشکی (GSE123381)، سرما (GSE192891)، شوری (GSE156113) و گرما (PRJNA530739) بودند. همچنین، برای ارزیابی پاسخ

ژن‌ها به تنش‌های زیستی، مجموعه داده‌های مربوط به آلودگی با قارچ *Colletotrichum lindemuthianum* (PRJNA1219552)، قارچ *Botrytis cinerea* (GSE329643) و باکتری *Xanthomonas citri* pv. *fuscans* (GSE227421) مورد استفاده قرار گرفتند. میزان بیان ژن‌های دیفنسین در بافت‌ها و اندام‌های مختلف گیاه لوبیا با استفاده از داده‌های ترنسکریپتومی موجود در پایگاه PvGEA محاسبه گردید. تمامی مجموعه داده‌های مورد استفاده بر اساس حداقل سه تکرار انتخاب شدند و همچنین تنها مجموعه‌های داده مربوط به گیاهان تیپ وحشی فاقد تغییرات ژنتیکی اختصاصی در این بررسی مورد استفاده قرار گرفتند. مقادیر بیان ژن‌ها پس از استخراج و پردازش داده‌ها، به منظور مقایسه الگوی بیان در شرایط مختلف، مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. در نهایت، نقشه‌های حرارتی (Heatmap) با استفاده از ابزار تحت وب Heatmapper ترسیم شدند (Babicki et al., 2016).

نتایج و بحث

بر اساس نتایج حاصل از تحلیل‌های بیوانفورماتیکی، تعداد ده ژن متعلق به خانواده پپتیدهای دیفنسین در ژنوم لوبیا شناسایی شد. نتایج نشان داد که اعضای این خانواده ژنی به صورت یکنواخت در سراسر ژنوم توزیع نشده‌اند، بلکه تنها بر روی چهار کروموزوم از مجموع کروموزوم‌های لوبیا قرار گرفته‌اند (جدول ۲). بررسی پراکندگی کروموزومی نشان داد که کروموزوم شماره ۲ بیشترین تراکم ژن‌های دیفنسین را دارا بوده و چهار ژن بر روی آن شناسایی شد. همچنین، دو ژن بر روی کروموزوم شماره ۳، دو ژن بر روی کروموزوم شماره ۵ و دو ژن دیگر بر روی کروموزوم شماره ۹ قرار داشتند. این الگوی توزیع بیانگر آن است که خانواده ژنی دیفنسین در ژنوم لوبیا به صورت نامتوازن پراکنده شده و این احتمال وجود دارد که طی فرایندهای تکاملی، از جمله تکثیر ژنی و بازآرایی‌های کروموزومی، گسترش یافته است. پراکندگی غیرتصادفی اعضای این خانواده ژنی بر روی تعداد محدودی از کروموزوم‌ها ممکن است نشان از منشأ تکاملی مشترک برخی از ژن‌ها و حفظ آن‌ها در نواحی خاص ژنوم باشد. علاوه بر این، تجمع چندین عضو خانواده دیفنسین بر روی کروموزوم ۲ ممکن است بیانگر وقوع رویدادهای تکثیر تاندیم یا سایر مکانیسم‌های گسترش خانواده ژنی در طول تکامل باشد.

ارقام مختلف لوبیا، سازمان ژنی شامل طول ORF، نوع کدون‌های آغاز و خاتمه و الگوی ایترونی نیز در تمامی ژن‌های بررسی‌شده کاملاً حفظ شده است. این یافته با مطالعات انجام‌شده در سایر حبوبات و گیاهان هم‌خوانی دارد؛ برای مثال، در عدس (*Lens culinaris*) تمامی شش ژن دیفنسین بررسی‌شده دارای تنها یک ایترون با الگوی GT-AG بودند و طول ORF آن‌ها نیز در محدوده ۲۲۲ تا ۲۲۸ جفت‌باز قرار داشت که شباهت قابل‌توجهی با ساختار ژن‌های شناسایی‌شده در لوبیا دارد (Drikvand et al., 2019). این مورد همچنین در دیفنسین‌های گیاهانی مثل یولاف، جو و سیر نیز مشاهده شد (Emamifar et al., 2021; Saffar et al., 2024; Sohrabi et al., 2024).

نتایج بررسی توالی‌های پروتئینی نشان داد که طول پروتئین‌های دیفنسین شناسایی‌شده در لوبیا بین ۷۳ تا ۷۸ اسیدآمینه متغیر بود. این دامنه طولی با ویژگی شناخته‌شده دیفنسین‌های گیاهی که عموماً پروتئین‌هایی کوچک و غنی از سیستئین هستند، مطابقت دارد. نتایج ویژگی‌های ساختاری و عملکردی پروتئین‌های دیفنسین شناسایی‌شده نشان داد که تمامی پروتئین‌های مورد مطالعه دارای دمین اختصاصی Knot1 از خانواده Gamma-thionin هستند که از شاخص‌ترین ویژگی‌های دیفنسین‌های گیاهی محسوب می‌شود (Mulla et al., 2025). این دمین در تمامی پروتئین‌ها در بخش میانی تا انتهایی توالی و عمدتاً در محدوده اسیدهای آمینه ۳۰ تا ۷۸ قرار داشت که بیانگر حفاظت بالای این ناحیه در اعضای خانواده دیفنسین است (Mulla et al., 2025). در مجموع، حضور این دمین حفاظت‌شده در تمامی پروتئین‌ها بیانگر تعلق قطعی آن‌ها به خانواده دیفنسین‌های گیاهی و حفظ ساختار عملکردی این پروتئین‌ها در لوبیا است. بررسی ویژگی‌های ترشحی پروتئین‌ها نیز نشان داد که تمامی اعضای خانواده دیفنسین دارای سیگنال‌پپتید از نوع Sec/SPI هستند که انتقال آن‌ها را از مسیر ترشحی کلاسیک وابسته به شبکه آندوپلاسمی و دستگاه گلژی امکان‌پذیر می‌کند (Vriens et al., 2014). طول سیگنال‌پپتید در پروتئین‌های مختلف بین ۲۴ تا ۳۱ اسیدآمینه متغیر بود. همچنین، پیش‌بینی محل تجمع زیرسلولی نشان داد که هر ۱۰ پروتئین در فضای خارج‌سلولی (Extracellular) مستقر می‌شوند (جدول ۳).

(Parisi et al., 2019). الگوی توزیع نامتوازن ژن‌های دیفنسین در لوبیا با نتایج گزارش‌شده در سایر گیاهان نیز همخوانی دارد. در *A. thaliana*، ژن‌های دیفنسین به‌صورت خوشه‌ای در ژنوم قرار گرفته‌اند و تکثیرهای پشت سر هم و قطعه‌ای از عوامل مهم در گسترش این خانواده ژنی معرفی شده‌اند (Graham et al., 2008). در کلزا نیز ۳۷ ژن دیفنسین در ۱۳ کروموزوم شناسایی شده و الگوی توزیع کروموزومی و تکثیر ژنی، گسترش این خانواده را طی تکامل نشان می‌دهد (Liu et al., 2021). همچنین، در سویا، تعداد ۲۷ ژن دیفنسین در ۱۳ کروموزوم توزیع شده‌اند و وجود خوشه‌های تکثیر پشت سر هم و جفت‌های حاصل از تکثیرهای ژنومی نشان می‌دهد که هر دو مکانیسم در گسترش خانواده دیفنسین نقش داشته‌اند (Yuan et al., 2026).

نتایج تکثیر با PCR نشان داد که تمامی جفت آغازگرها توانستند قطعات DNA با اندازه مورد انتظار را در ارقام مختلف تکثیر کنند. اندازه قطعات تکثیرشده برای ژن‌های PvDef2، PvDef1، PvDef3، PvDef4، PvDef5، PvDef6، PvDef7، PvDef8، PvDef9 و PvDef10 به‌ترتیب برابر با ۴۳۱، ۴۰۱، ۳۷۸، ۴۰۰، ۴۲۵، ۳۷۵، ۴۲۴، ۴۹۷، ۴۲۶ و ۳۵۳ جفت‌باز بود. اندازه‌های مذکور در تمامی ارقام یکسان بود و هیچ تفاوت اندازه‌ای بین آن‌ها مشاهده نشد (شکل ۱).

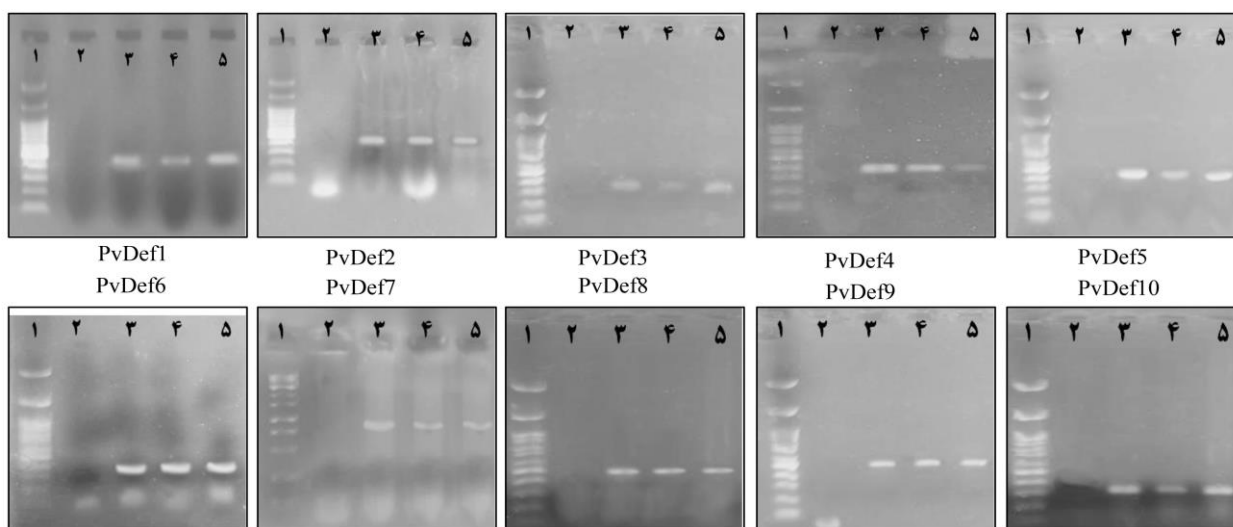
نتایج توالی‌یابی ژن‌های PvDef1 تا PvDef10 نشان داد که توالی ناحیه کدکننده این ژن‌ها در هر سه رقم لوبیای قرمز، چیتی و سفید کاملاً یکسان بوده و هیچ‌گونه اختلاف نوکلئوتیدی، حذف، اضافه یا چندشکلی بین آن‌ها مشاهده نشد. این یافته بیانگر حفاظت بالای توالی ژن‌های دیفنسین در ارقام مورد بررسی است و نشان می‌دهد که این ژن‌ها از نظر ساختار توالی در این سه رقم از ثبات ژنتیکی بالایی برخوردار هستند. بررسی ویژگی‌های ساختاری ژن‌ها نیز نشان داد که تمامی ژن‌های مورد مطالعه دارای کدون آغاز ATG بوده و کدون‌های خاتمه از سه نوع TAG، TAA و TGA تشکیل شده‌اند. طول ORF در ژن‌های مختلف بین ۲۲۲ تا ۲۳۷ جفت‌باز متغیر بود، در حالی که طول ایترون‌ها از ۷۸ تا ۲۲۸ جفت‌باز تغییر می‌کرد (جدول ۲). همچنین، تمامی ژن‌ها دارای یک ایترون از نوع GT-AG بودند که در نزدیکی انتهای ۵ ژن قرار داشت (جدول ۲). این نتایج نشان می‌دهد که علاوه‌بر حفظ کامل توالی نوکلئوتیدی در بین

جدول ۲- اطلاعات ژنی اعضای خانواده دیفنسین شناسایی شده در ژنوم لوبیا

نام ژن	کروموزوم	طول ژن (جفت‌باز)	نوع اینترون	طول اینترون (جفت‌باز)	کدون پایان	کدون شروع	طول ORF (جفت‌باز)
Gene name	Chromosome	Gene length (bp)	Intron type	Intron length (bp)	Start codon	Stop codon	ORF length (bp)
PvDef1	Chr 9	313	GT-AG	91	TAG	ATG	222
PvDef2	Chr 2	312	GT-AG	78	TAA	ATG	234
PvDef3	Chr 3	328	GT-AG	91	TAA	ATG	237
PvDef4	Chr 9	337	GT-AG	115	TGA	ATG	222
PvDef5	Chr 5	344	GT-AG	116	TAA	ATG	228
PvDef6	Chr 2	306	GT-AG	84	TGA	ATG	222
PvDef7	Chr 2	306	GT-AG	81	TGA	ATG	225
PvDef8	Chr 5	456	GT-AG	228	TAA	ATG	228
PvDef9	Chr 2	315	GT-AG	90	TGA	ATG	225
PvDef10	Chr 3	354 bp	GT-AG	117	TAG	ATG	237

جدول ۳- ویژگی‌های ساختاری، پپتید سیگنال و محل تجمع دیفنسین‌های گیاه لوبیا

نام پپتید	طول پپتید (اسید آمینه)	دامین	طول دامین (اسید آمینه)	طول سیگنال پپتید (اسید آمینه)	نوع سیگنال پپتید	محل تجمع سلولی
Peptide name	Peptide length (AA)	Domain	Domain length (AA)	Signal peptide length (AA)	Signal peptide type	Subcellular localization
PvDef1	73	Knot1	44	26	Sec/SPI	Extracellular
PvDef2	77	Knot1	44	28	Sec/SPI	Extracellular
PvDef3	78	Knot1	44	31	Sec/SPI	Extracellular
PvDef4	73	Knot1	44	26	Sec/SPI	Extracellular
PvDef5	75	Knot1	44	28	Sec/SPI	Extracellular
PvDef6	73	Knot1	36	27	Sec/SPI	Extracellular
PvDef7	74	Knot1	43	27	Sec/SPI	Extracellular
PvDef8	75	Knot1	44	28	Sec/SPI	Extracellular
PvDef9	74	Knot1	45	24	Sec/SPI	Extracellular
PvDef10	78	Knot1	42	31	Sec/SPI	Extracellular



شکل ۱- الکتروفورز محصولات PCR ژن‌های دیفنسین در ارقام مختلف گیاه لوبیا. چاهک ۱- نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰ جفت‌بازی؛ چاهک ۲- واکنش کنترل منفی (استفاده از آب مقطر استریل به عنوان الگوی واکنش)؛ چاهک‌های ۳ تا ۵- قطعه تکثیر شده در ارقام مختلف قرمز، چیتی و سفید گیاه لوبیا

Figure 1. Agarose gel electrophoresis of PCR-amplified defensin genes from different cultivars of common bean. Lane 1: 100 bp DNA ladder; Lane 2: negative control (water); Lanes 3-5: PCR product obtained from the red, pinto, and white bean cultivars

ترشحی و مکان‌یابی زیرسلولی این پروتئین‌ها نشان می‌دهد که اعضای خانواده دیفنسین لوبیا علاوه بر حفظ ساختار تکاملی، احتمالاً از سازوکارهای عملکردی مشابهی در

این نتیجه احتمالاً با نقش شناخته‌شده دیفنسین‌های گیاهی در دفاع اولیه گیاه و برهم‌کنش مستقیم با عوامل بیماری‌زا مطابقت دارد؛ بنابراین، شباهت بالای ویژگی‌های ساختاری،

دارای خاصیت ضد میکروبی احتمالی بالایی بودند (جدول ۴). بر اساس معیار پیش‌بینی این مطالعه، مقادیر بین ۰/۵ تا ۱ (۵۰ تا ۱۰۰ درصد احتمال) نشان‌دهنده احتمال برخورداری از فعالیت ضد میکروبی هستند. در مدل SVM، تمامی توالی‌ها امتیازی بین ۰/۸۲۶ تا ۰/۹۸۲ کسب کردند که بیانگر احتمال بسیار زیاد فعالیت ضد میکروبی در این پروتئین‌ها است. همچنین، مدل DA نیز نتایج مشابهی ارائه داد و برای اکثر دیفنسین‌ها مقادیر بالاتر از ۰/۷۵ و در برخی موارد تا ۰/۹۹۴ را گزارش کرد که دقت بالای این پیش‌بینی را تأیید می‌کند. در مدل RF نیز اگرچه مقادیر محافظه‌کارانه‌تر بودند، اما هفت توالی دارای امتیاز بالاتر از آستانه ۰/۵ بودند و بیشترین مقدار مربوط به PvDef6 بود که نشان‌دهنده پتانسیل ضد میکروبی احتمالی بالایی برای این پروتئین است. علاوه بر این، شبکه عصبی مصنوعی تمامی توالی‌ها به جز PvDef1 را به‌عنوان پپتید ضد میکروبی (دارای خاصیت ضد میکروبی) طبقه‌بندی کرد که بیانگر همگرایی نتایج مدل‌های مختلف در تأیید ماهیت ضد میکروبی این دیفنسین‌ها است (جدول ۴).

نمودار احتمال فعالیت ضد میکروبی در طول توالی نیز نشان می‌دهد که این ویژگی به‌صورت یکنواخت در سراسر پروتئین توزیع نشده است (شکل ۳). در انتهای N، مقادیر احتمال عمدتاً کمتر از ۰/۵ بوده که احتمالاً به‌دلیل وجود سیگنال‌پپتید و نقش آن در هدایت پروتئین به مسیر ترشحی اتفاق افتاده است. با ورود به ناحیه اصلی پروتئین، مقدار احتمال به تدریج افزایش یافته و از حدود اسید آمینه ۲۸ تا ۳۰ از آستانه ۰/۵ عبور می‌کند. اگرچه در بخش میانی نوسانات جزئی مشاهده می‌شود، اما از حدود اسید آمینه ۴۶ به بعد، احتمال فعالیت ضد میکروبی به‌طور پیوسته افزایش یافته و در انتهای C به مقادیر نزدیک ۰/۹ می‌رسد (شکل ۳). این ناحیه با بخش غنی از اسیدهای آمینه کاتیونی، سیستم‌های محافظت‌شده و موتیف γ -core هم‌پوشانی دارد که در دیفنسین‌های گیاهی به‌عنوان مهم‌ترین ناحیه مسئول برهم‌کنش با غشای سلول‌های میکروبی و اعمال فعالیت ضد میکروبی شناخته می‌شود. بنابراین، هم‌خوانی نتایج حاصل از الگوریتم‌های مختلف پیش‌بینی و افزایش قابل توجه احتمال فعالیت ضد میکروبی در انتهای C، نقش دفاعی دیفنسین‌های شناسایی‌شده در لوبیا را مورد تأیید قرار می‌دهد.

پاسخ به تنش‌های زیستی و مقاومت گیاه در برابر عوامل بیماری‌زا برخوردار هستند (Azmi and Hussain, 2021). هم‌ردیفی چندگانه دیفنسین‌های گیاه لوبیا نشان داد که با وجود تنوع در جایگاه‌ها، اسیدهای آمینه سیستمین در تمامی توالی‌ها به‌خوبی حفاظت شده‌اند که این ویژگی از مشخصه‌های اصلی خانواده دیفنسین‌های گیاهی است. در این هم‌ردیفی، هشت سیستمین حفاظت‌شده با خطوط رنگی به یکدیگر متصل شده‌اند و الگوی کلاسیک چهار پیوند دی‌سولفیدی شامل C1-C8، C2-C5، C3-C6 و C4-C7 را نمایش می‌دهند (شکل ۲). این پیوندهای دی‌سولفیدی موجب تثبیت چارچوب ساختاری دیفنسین‌ها شده و با اتصال مارپیچ α به رشته‌های β ، پایداری فضایی پروتئین را در برابر تغییرات دما، pH و فعالیت آنزیم‌های پروتئولیتیک افزایش می‌دهند (Parisi et al., 2020). حفاظت کامل جایگاه‌های سیستمین در تمامی توالی‌ها بیانگر اهمیت احتمالی این اسیدهای آمینه در حفظ عملکرد زیستی دیفنسین‌ها است، در حالی که تغییرات مشاهده‌شده در نواحی بین سیستمین‌ها احتمالاً در تعیین اختصاصیت عملکردی هر پروتئین نقش دارند. همچنین، در انتهای کربوکسیل توالی‌ها، موتیف γ -core که از مهم‌ترین نواحی عملکردی دیفنسین‌های گیاهی محسوب می‌شود، به‌خوبی قابل مشاهده است (شکل ۲). این ناحیه که معمولاً دارای الگوی GXC(X3-9)C است، نقش اساسی در برهم‌کنش با غشای سلول‌های میکروبی، نفوذ به سلول هدف و ایجاد فعالیت ضدقارچی و ضدباکتریایی ایفا می‌کند (Lacerda et al., 2014). قرارگیری γ -core در مجاورت پیوندهای دی‌سولفیدی سبب حفظ آرایش سه‌بعدی این ناحیه و افزایش کارایی زیستی آن می‌شود (Lacerda et al., 2014). بنابراین، حفاظت هم‌زمان الگوی پیوندهای دی‌سولفیدی و موتیف γ -core در تمامی توالی‌های مورد بررسی، بیانگر حفظ ویژگی‌های ساختاری و عملکردی این دیفنسین‌ها و تأیید تعلق آن‌ها به خانواده دیفنسین‌های گیاهی است (Kovaleva et al., 2020; Slezina et al., 2022).

نتایج پیش‌بینی خاصیت ضد میکروبی دیفنسین‌های شناسایی‌شده در لوبیا با استفاده از چهار الگوریتم یادگیری ماشین شامل ماشین بردار پشتیبان (SVM)، جنگل تصادفی (RF)، شبکه عصبی مصنوعی (ANN) و آنالیز تشخیص (DA) نشان‌دهنده آن است که تقریباً تمامی توالی‌های مورد بررسی

دهنده این باشد که این گروه از دیفنسین‌های لوبیا احتمالاً از نظر ساختار و عملکرد به دیفنسین‌های غلات نزدیک‌تر هستند و ممکن است برخی ویژگی‌های عملکردی مشترک را حفظ کرده باشند (شکل ۴).

نتایج تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی اعضای خانواده دیفنسین گیاه لوبیا را در گروه‌های مختلفی دسته‌بندی کرد. اعضای PvDef3، PvDef4 و PvDef10 در کنار چندین دیفنسین برنج و یک دیفنسین آرابیدوپسیس قرار گرفتند. این موضوع می‌تواند نشان

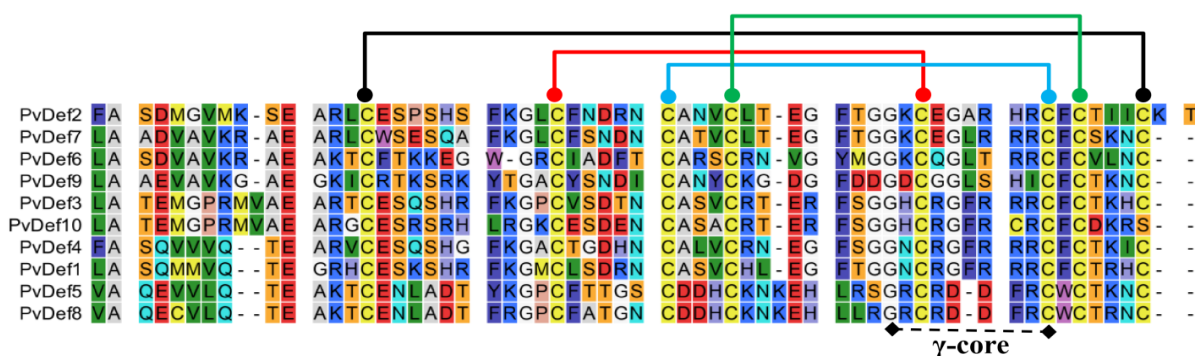
جدول ۴- پیش بینی خاصیت ضد میکروبی دیفنسین‌های لوبیا

Table 4. Prediction of antimicrobial properties of common bean defensins

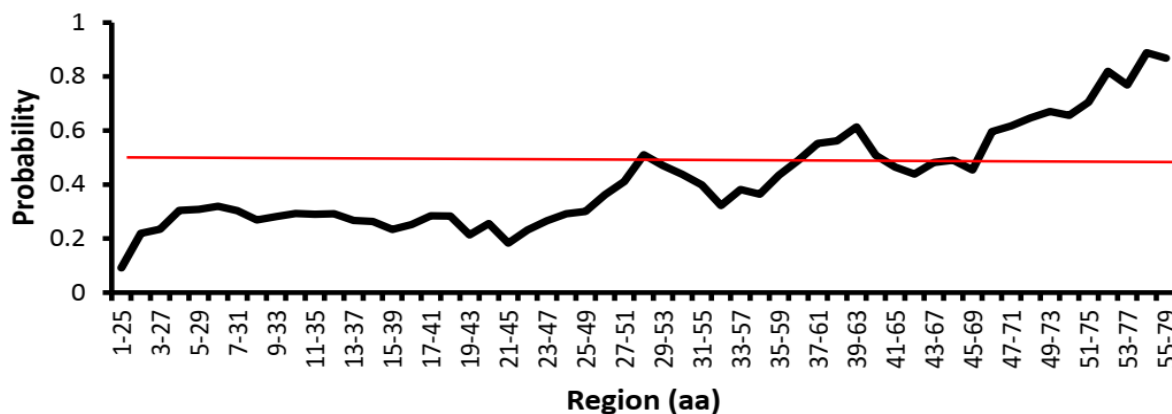
نام پپتید	الگوریتم (SVM)	الگوریتم (RF)	الگوریتم (ANN)	الگوریتم (DA)
Peptide name	SVM algorithm	RF algorithm	ANN algorithm	DA algorithm
PvDef1	0.826	0.465	NAMP	0.758
PvDef2	0.92	0.4545	AMP	0.937
PvDef3	0.954	0.761	AMP	0.994
PvDef4	0.958	0.771	AMP	0.901
PvDef5	0.87	0.587	AMP	0.639
PvDef6	0.967	0.8925	AMP	0.906
PvDef7	0.906	0.6025	AMP	0.88
PvDef8	0.929	0.428	AMP	0.945
PvDef9	0.982	0.6715	AMP	0.961
PvDef10	0.977	0.782	AMP	0.989

AMP: پپتید ضد میکروبی؛ NAMP: پپتید ضد میکروبی نیست

AMP: Antimicrobial peptide; NAMP: Non-antimicrobial peptide

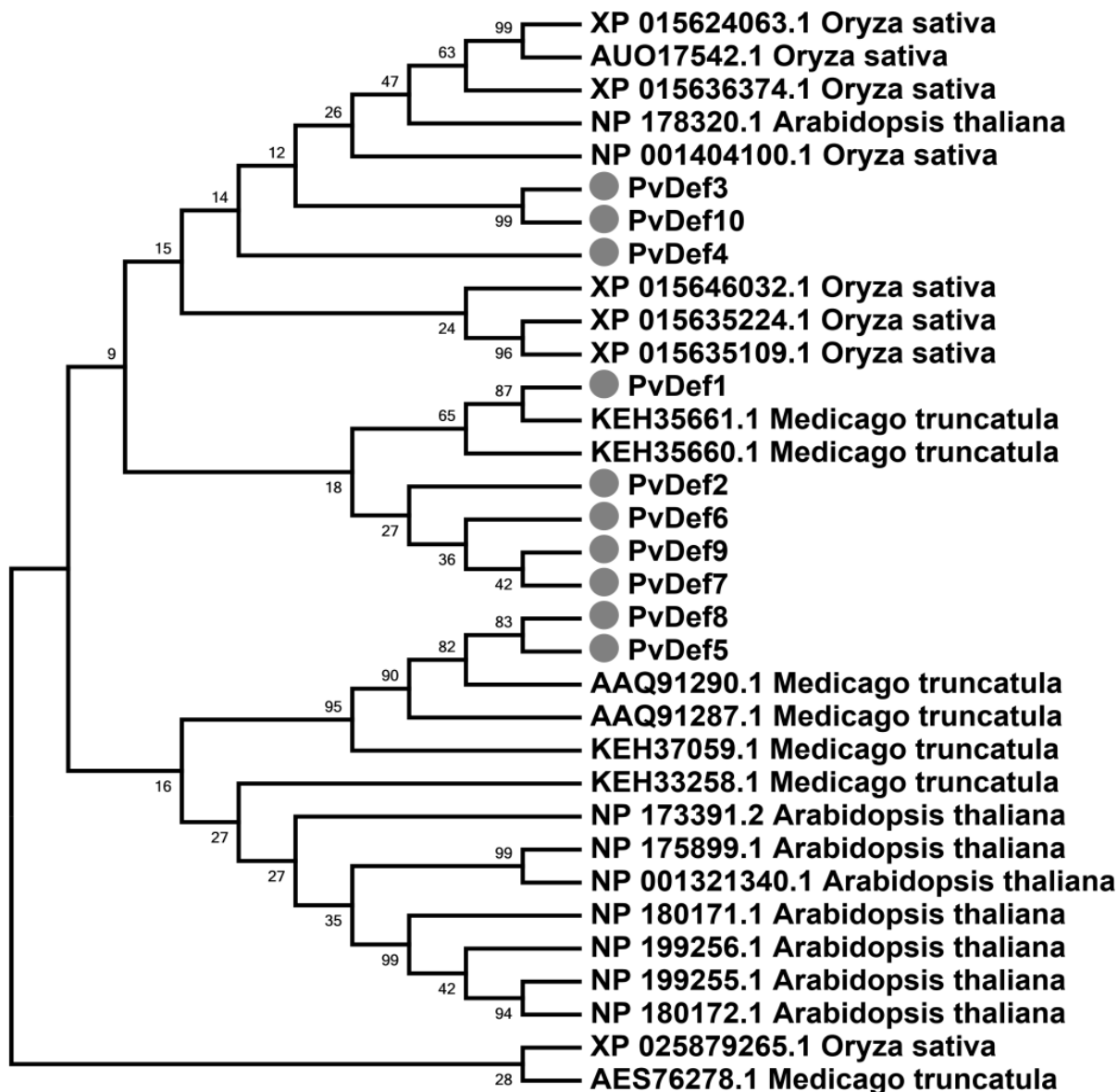


شکل ۲- هم‌ردیفی چندگانه دیفنسین‌های لوبیا که در آن پیوندهای دی سولفیدی محافظت شده و موتیف γ -core مشخص شده‌اند.

Figure 2. Multiple sequence alignment of common bean defensins showing the conserved disulfide bond pattern and the γ -core motif.

شکل ۳- نواحی با بیشترین خاصیت ضد میکروبی در ساختار دیفنسین‌های لوبیا

Figure 3. The regions with the highest antimicrobial activity in the common bean defensins.



شکل ۴- درخت فیلوژنتیکی خانواده ژنی دیفنسین لوبیا

Figure 4. Phylogenetic tree of bean defensin gene family

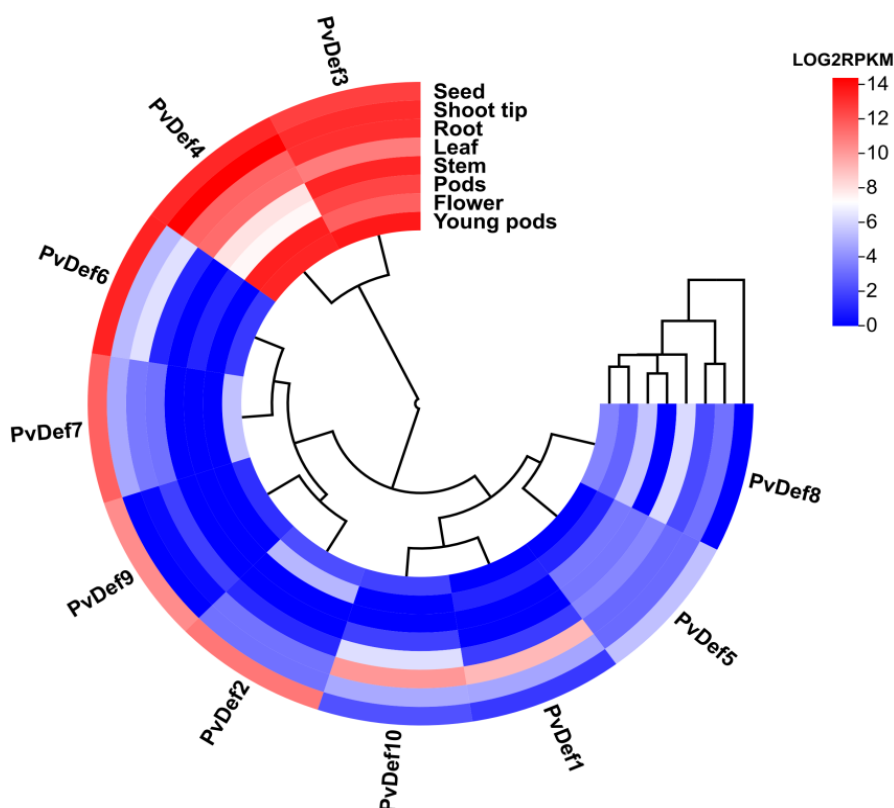
تخصص‌یافتگی عملکردی پس از تکثیر ژنی است. این امر در مورد PvDef5 و PvDef8 نیز صادق بوده و نشان‌دهنده حفظ توالی‌های دیفنسین در میان خانواده‌های گیاهی دولپه‌ای است (شکل ۴). به‌طور کلی، نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی نشان داد که روند مشابهی در گروه‌بندی اعضای خانواده دیفنسین لوبیا وجود داشته و این خانواده از چند زیرخانواده تکاملی تشکیل شده است. خوشه‌بندی پایدار برخی اعضا، به‌ویژه زوج‌های PvDef3/PvDef10 و PvDef5/PvDef8، احتمال وقوع تکثیر ژنی نسبتاً جدید را تقویت می‌کند، در حالی که قرارگیری اعضای مختلف در کنار

از سوی دیگر PvDef1، PvDef2، PvDef6، PvDef7 و PvDef9 نیز عمدتاً در خوشه‌هایی قرار گرفتند که نزدیک‌ترین همولوگ‌های آن‌ها از گونه یونجه یک‌ساله بودند. این نتیجه از دیدگاه تکاملی قابل انتظار بوده و نشان‌دهنده حفظ توالی‌های دیفنسین در میان اعضای این خانواده گیاهی است. این الگوی خوشه‌بندی همچنین می‌تواند بیانگر آن باشد که بخش عمده خانواده دیفنسین لوبیا از مسیر تکاملی مشترکی با سایر لگوم‌ها منشأ گرفته است، در حالی که تنها تعداد محدودی از اعضا شباهت بیشتری به دیفنسین‌های برنج نشان می‌دهند. این تفاوت احتمالاً نتیجه واگرایی ژنی، انتخاب طبیعی و

ساقه، گل و غلاف‌ها نشان می‌دهد که احتمالاً این دیفنسین‌ها علاوه بر نقش کلاسیک خود در دفاع علیه عوامل بیماری‌زا، در فرآیندهای عمومی رشد و نمو گیاه نیز مشارکت دارند. بیان نسبتاً یکنواخت و بالای این ژن‌ها در اکثر اندام‌ها می‌تواند بیانگر نقش احتمالی آن‌ها به عنوان دیفنسین‌های پایه باشد که همواره در گیاه حضور دارند تا در برابر تنش‌های زیستی پاسخ سریع ایجاد کنند (شکل ۵). در مقابل ژن‌های PvDef5 و PvDef8 پایین‌ترین میزان بیان را در تقریباً تمامی بافت‌ها نشان دادند و به همراه ژن‌های PvDef1 و PvDef10 در یک گروه قرار گرفتند. این الگوی بیان ضعیف احتمال می‌دهد که این ژن‌ها در شرایط طبیعی فعالیت محدودی داشته باشند و بیان آن‌ها در پاسخ به تنش‌های خاص نظیر آلودگی قارچی، حمله حشرات یا تنش‌های غیرزیستی مانند شوری، خشکی و تنش اکسیداتیو القا شود. چنین رفتاری پیش‌تر برای بسیاری از دیفنسین‌های گیاهی گزارش شده است که تنها در شرایط تنش به شدت بیان می‌شوند (Liu et al., 2021; Stotz et al., 2009b). ژن‌های PvDef2, PvDef6, PvDef7 و PvDef9 نیز در یک گروه مجزا قرار گرفتند و دارای الگوی بیان نسبتاً مشابهی بودند (شکل ۵).

همولوگ‌های برنج، یونجه و آرابیدوپسیس نشان‌دهنده حفظ نسبی ساختار این پروتئین‌ها در گیاهان مختلف و در عین حال وقوع واگرایی عملکردی طی تکامل است. این نتایج بیان می‌کند که اگرچه تمامی اعضای خانواده دیفنسین دارای منشأ مشترک هستند، اما احتمالاً هر یک در پاسخ به عوامل بیماری‌زا، تنش‌های محیطی یا فرآیندهای رشدی نقش‌های تخصصی متفاوتی ایفا می‌کنند که بررسی الگوی بیان ژن و مطالعات عملکردی می‌تواند این فرضیه را تأیید کند.

تحلیل *in silico* الگوی بیان نشان داد که اعضای خانواده دیفنسین لوبیا احتمالاً از نظر میزان و الگوی بیان یکنواخت نبوده و هر یک دارای الگوی اختصاصی بیان در بافت‌های مختلف هستند (شکل ۵). این موضوع ممکن است بیانگر آن باشد که اگرچه این ژن‌ها از یک خانواده ژنی منشأ گرفته‌اند، اما پس از وقوع رویدادهای تکثیر ژنی و واگرایی تکاملی، احتمالاً عملکردهای متفاوتی را در اندام‌های مختلف گیاه بر عهده گرفته‌اند. بر اساس نقشه حرارتی، ژن‌های PvDef3 و PvDef4 بالاترین سطح بیان را در اغلب بافت‌های مورد بررسی نشان دادند. بیان زیاد این دو ژن در بذر، مریستم انتهایی، ریشه، برگ،



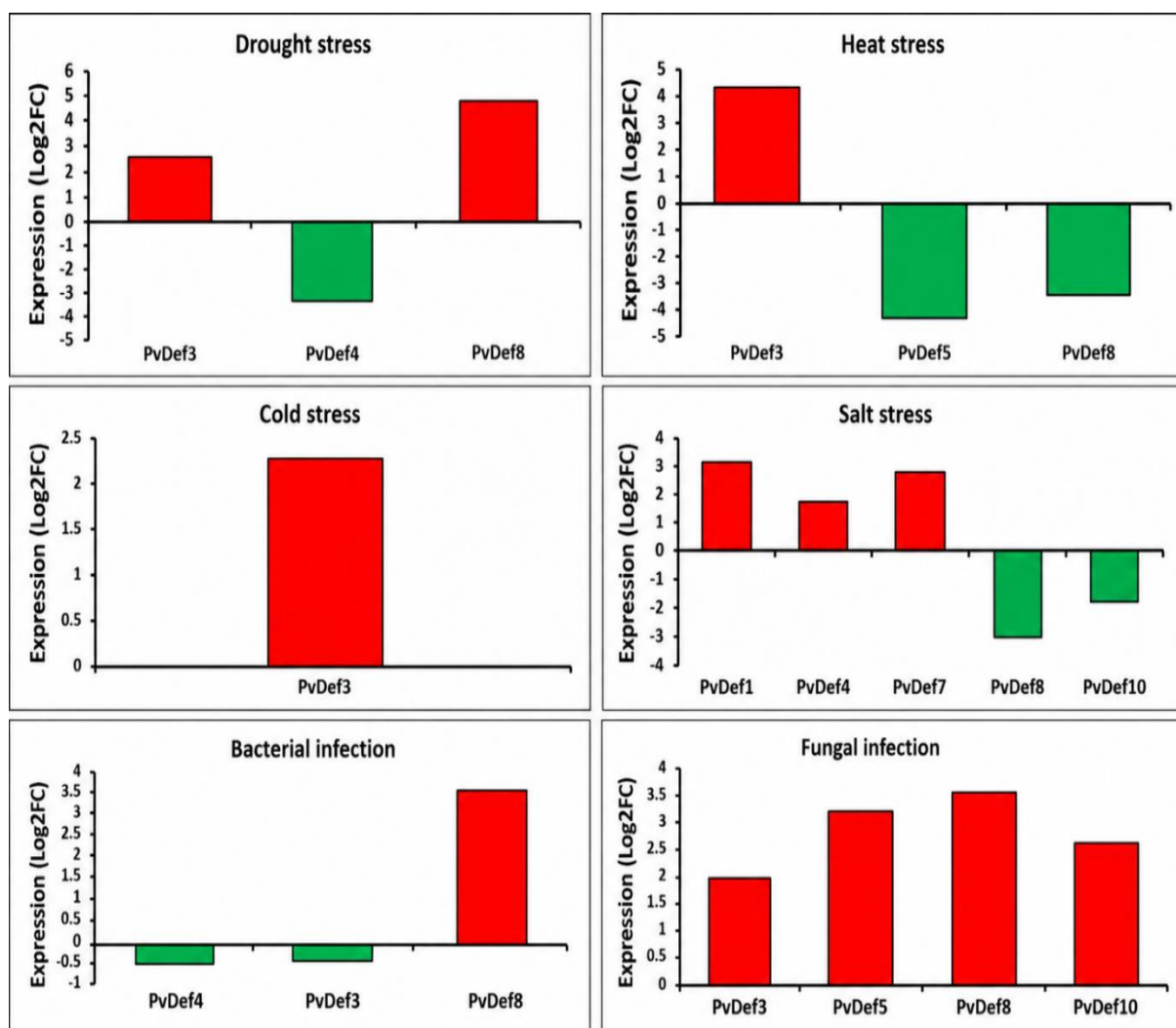
شکل ۵- نمودار حرارتی بیان ژن‌های دیفنسین در بافت‌های مختلف لوبیا

Figure 5. Heatmap of defensin gene expression in different bean tissues

نقش دفاعی، در رشد گل، زنده‌مانی گرده و تولید بذر نیز مشارکت دارد (Stotz *et al.*, 2009a). در ذرت نیز دیفنسین ZmES4 در فرآیند رشد و تولید گرده نقش دارد (Amien *et al.*, 2010). بنابراین، الگوی بیان متفاوت دیفنسین‌ها احتمالاً نشان‌دهنده تخصصی‌شدن عملکرد اعضای این خانواده در دفاع، رشد و فرآیندهای تولیدمثلی است؛ هرچند تأیید این نقش‌ها به مطالعات عملکردی نیاز دارد.

نتایج بررسی *in silico* الگوی بیان ژن‌های خانواده دیفنسین لوبیا تحت تنش‌های زیستی و غیرزیستی نشان داد که پاسخ احتمالی اعضای این خانواده ژنی به شرایط مختلف تنش کاملاً اختصاصی بوده و احتمالاً همه ژن‌ها الگوی بیان مشابهی از خود نشان نمی‌دهند (شکل ۶). در تنش خشکی، ژن PvDef8 بیشترین افزایش بیان را نشان داد، در حالی که ژن PvDef3 نیز افزایش بیان متوسطی داشت. در مقابل، ژن PvDef4 کاهش بیان نشان داد. این نتایج نشان می‌دهد که احتمالاً PvDef8 و PvDef3 در پاسخ دفاعی یا سازگاری با کمبود آب نقش مؤثرتری دارند، در حالی که PvDef4 ممکن است بیشتر در مسیرهای زیستی دیگری مشارکت داشته باشد یا تحت شرایط خشکی به منظور صرفه‌جویی در انرژی دچار کاهش فعالیت شود. در شرایط تنش گرمایی نیز الگوی مشابهی مشاهده شد. ژن PvDef3 افزایش بیان نشان داد، در حالی که ژن‌های PvDef5 و PvDef8 کاهش بیان قابل‌توجهی داشتند. این تفاوت بیانگر آن است که حتی اعضای نزدیک یک خانواده ژنی نیز می‌توانند مسیرهای تنظیمی متفاوتی داشته باشند و هر یک توسط شبکه‌های رونویسی متفاوتی کنترل شوند (Mondragón-Palomino *et al.*, 2017; Silverstein *et al.*, 2005). افزایش بیان PvDef3 احتمالاً نشان‌دهنده نقش این ژن در حفاظت از سلول در برابر آسیب‌های ناشی از دمای بالا است، در حالی که کاهش بیان PvDef5 و PvDef8 ممکن است ناشی از تغییر اولویت‌های متابولیکی گیاه در شرایط تنش گرمایی باشد (Sewelam *et al.*, 2021). در تنش سرما تنها ژن PvDef3 افزایش بیان معنی‌داری نشان داد و سایر اعضای خانواده تغییر محسوسی نداشتند. این موضوع بیانگر آن است که پاسخ به سرما در خانواده دیفنسین محدود بوده و تنها برخی اعضا در سازگاری با دمای پایین نقش دارند (Nikoloudakis *et al.*, 2020).

اگرچه میزان بیان آن‌ها نسبت به PvDef3 و PvDef4 کمتر بود، اما در برخی بافت‌ها مانند ریشه و اندام‌های زایشی افزایش نسبی بیان مشاهده شد. این موضوع نقش احتمالی این ژن‌ها در حفاظت اختصاصی اندام‌های خاص یا مشارکت در پاسخ‌های دفاعی موضعی را نشان می‌دهد. از سوی دیگر، PvDef1، PvDef2 و PvDef10 دارای الگوی بیان حدواسط بودند و میزان رونویسی آن‌ها بسته به نوع بافت تغییر می‌کرد (شکل ۵). به‌ویژه افزایش نسبی بیان PvDef10 در برخی اندام‌های زایشی نشان می‌دهد که این ژن ممکن است علاوه بر دفاع، در فرآیندهای مرتبط با تشکیل بذر، نمو گل یا رشد غلاف نیز نقش داشته باشد. مطالعات انجام‌شده در گونه‌های مختلف نشان داده‌اند که برخی دیفنسین‌ها علاوه بر فعالیت ضد میکروبی، در رشد دانه گرده، لقاح، تشکیل جنین، انتقال یون‌ها و تنظیم مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی نیز مشارکت می‌کنند (Amien *et al.*, 2010; Parisi *et al.*, 2019)؛ بنابراین مشاهده الگوهای بیان اختصاصی در بافت‌های مختلف با عملکردهای چندگانه این خانواده ژنی مطابقت دارد. نتایج گروه‌بندی بیان ژن‌ها نیز تا حد زیادی با نتایج تحلیل فیلوژنتیکی هم‌خوانی دارد. برای مثال، ژن‌های PvDef5 و PvDef8 که در درخت فیلوژنتیکی نیز در یک شاخه مشترک قرار گرفته بودند، در تحلیل بیان نیز الگوی مشابهی از خود نشان دادند. همچنین PvDef3 و PvDef4 که از نظر تکاملی به یکدیگر نزدیک هستند، دارای الگوی بیان نسبتاً مشابه و سطح بیان بالایی بودند. این هم‌خوانی نشان می‌دهد که ژن‌هایی که از یک رویداد تکثیر ژنی منشأ گرفته‌اند، ممکن است بخشی از الگوی تنظیمی خود را نیز حفظ کرده باشند. با این حال، تفاوت در میزان بیان برخی اعضای نزدیک از نظر فیلوژنتیکی، مانند PvDef3 و PvDef10 بیانگر آن است که احتمالاً پس از تکثیر ژنی، تغییر در عناصر تنظیم‌کننده پیش‌بر و مسیرهای تنظیم رونویسی ممکن است موجب واگرایی عملکردی این ژن‌ها شده باشد. الگوی بیان متفاوت ژن‌های دیفنسین گیاه لوبیا با مطالعات انجام‌شده در سایر گیاهان مطابقت دارد؛ به‌طوری‌که در آراییدوپسیس و یونجه، اعضای خانواده دیفنسین الگوهای بیان اختصاصی در ریشه، بذر و اندام‌های زایشی نشان داده‌اند که بیانگر تنوع عملکردی این ژن‌هاست (Tesfaye *et al.*, 2013). همچنین، در گوجه‌فرنگی مشخص شده است که دیفنسین DEF2 علاوه بر



شکل ۶- بیان ژن‌های دیفنسین گیاه لوبیا تحت تنش‌های زیستی و غیرزیستی. رنگ‌های قرمز و سبز به ترتیب افزایش و کاهش بیان ژن‌ها را نشان می‌دهند.

Figure 6- Expression of bean defensin genes under biotic and abiotic stresses. Red and green colors indicate up- and down-regulation, respectively.

نشان‌دهنده نقش اختصاصی PvDef8 در دفاع علیه عوامل بیماری‌زای باکتریایی باشد. در مقابل، در آلودگی قارچی چهار ژن PvDef3، PvDef5، PvDef8، PvDef10 و همگی افزایش بیان داشتند که بیشترین مقدار مربوط به PvDef8 و سپس PvDef5 بود. از آنجا که دیفنسین‌های گیاهی عمدتاً به‌عنوان پپتیدهای ضدقارچی شناخته می‌شوند، افزایش هم‌زمان چندین عضو این خانواده در برابر قارچ‌ها با عملکرد شناخته‌شده این پروتئین‌ها مطابقت دارد (De Coninck *et al.*, 2013). به‌طور کلی، مقایسه همه تنش‌ها نشان می‌دهد که ژن‌های PvDef3 و PvDef8 مهم‌ترین اعضای پاسخ‌دهنده این خانواده هستند. ژن PvDef3 در سه تنش غیرزیستی (خشکی، گرما و سرما) و همچنین در پاسخ به قارچ افزایش بیان نشان داد که بیانگر نقش

الگوی بیان در شرایط شوری پیچیده‌تر بود. ژن‌های PvDef1، PvDef4 و PvDef7 افزایش بیان نشان دادند، در حالی که ژن‌های PvDef8 و PvDef10 کاهش بیان داشتند. این اختلاف بیان نشان می‌دهد که اعضای مختلف خانواده دیفنسین احتمالاً در مسیرهای متفاوت پاسخ به تنش شوری مشارکت دارند و افزایش یا کاهش بیان آن‌ها متناسب با نقش اختصاصی هر ژن در تنظیم تعادل یونی، حفظ پایداری غشا یا کاهش آسیب اکسیداتیو است (Guo *et al.*, 2025; Yao *et al.*, 2019). در بررسی تنش‌های زیستی نیز تفاوت آشکاری میان پاسخ به باکتری و قارچ مشاهده شد. در حضور باکتری، تنها PvDef8 افزایش بیان قابل‌توجهی داشت، در حالی که PvDef3 و PvDef4 اندکی کاهش بیان نشان دادند. این موضوع می‌تواند

دیفنسین لوبیا، یکی از محدودیت‌های مطالعه حاضر، نبود اعتبارسنجی آزمایشگاهی الگوهای بیان مشاهده‌شده است. نتایج این بخش عمدتاً بر اساس داده‌های بیان ژن و تحلیل‌های محاسباتی به‌دست آمده‌اند؛ بنابراین، برای تأیید قطعی الگوهای بیان اختصاصی اعضای خانواده دیفنسین در بافت‌های مختلف و همچنین پاسخ آن‌ها به تنش‌های زیستی و غیرزیستی، انجام مطالعات آزمایشگاهی، به‌ویژه با استفاده از روش‌هایی مانند qRT-PCR، ضروری است.

نتایج این پژوهش نشان داد که خانواده ژنی دیفنسین در ژنوم لوبیا شامل ۱۰ عضو است که به‌صورت نامتوازن بر روی چهار کروموزوم توزیع شده‌اند و احتمالاً طی فرایندهای تکاملی مانند تکثیر ژنی گسترش یافته‌اند. تمامی ژن‌های شناسایی شده در سه رقم لوبیای قرمز، چیتی و سفید از نظر توالی ناحیه کدکننده کاملاً یکسان بودند که بیانگر حفاظت ژنتیکی بالای این خانواده در ارقام مورد بررسی است. بررسی‌های ساختاری نیز نشان داد که همه پروتئین‌ها دارای دامنه اختصاصی Knot1، سیگنال‌پپتید ترشحی، محل تجمع خارج سلولی، هشت باقی‌مانده سیستمین حفاظت‌شده و موتیف γ -core هستند که ویژگی‌های شاخص دیفنسین‌های گیاهی به‌شمار می‌روند. پیش‌بینی‌های زیست‌اطلاعاتی نیز پتانسیل بالای فعالیت ضد میکروبی تمامی اعضای این خانواده را تأیید کرد. نتایج تحلیل فیلوژنتیکی بیانگر منشأ تکاملی مشترک این ژن‌ها و در عین حال شکل‌گیری چند زیرخانواده مجزا در طی تکامل بود. همچنین، بررسی الگوی بیان نشان داد که اعضای این خانواده دارای بیان بافتی و پاسخ‌های اختصاصی به تنش‌های زیستی و غیرزیستی هستند که بیانگر وقوع واگرایی عملکردی پس از تکثیر ژنی است. در میان ژن‌های شناسایی‌شده، ژن‌های PvDef3 و PvDef8 بیشترین پاسخ را به تنش‌های مختلف نشان دادند و می‌توانند پس از تأیید عملکردی و آزمایشگاهی بیشتر، به‌عنوان نامزدهای احتمالی این خانواده برای مطالعات عملکردی و برنامه‌های اصلاحی معرفی شوند. به‌طور کلی، نتایج این پژوهش ضمن گسترش شناخت از خانواده ژنی دیفنسین در لوبیا، زمینه را برای استفاده از این ژن‌ها در اصلاح ارقام مقاوم به بیماری‌ها، توسعه گیاهان تراریخت مقاوم و تولید پپتیدهای ضد میکروبی با کاربردهای کشاورزی و زیست‌فناورانه فراهم می‌کند.

گسترده آن در پاسخ به انواع تنش‌ها است. از سوی دیگر، ژن PvDef8 اگرچه در شرایط خشکی، آلودگی باکتریایی و قارچی به‌شدت القا شد، اما در تنش گرما و شوری کاهش بیان داشت. چنین الگویی نشان می‌دهد که این ژن احتمالاً تحت کنترل مسیرهای پیام‌رسانی متفاوتی قرار دارد و نقش آن وابسته به نوع تنش است. در مقابل، ژن‌های PvDef5 و PvDef10 پاسخ تخصصی‌تری نشان دادند. ژن PvDef5 در برابر آلودگی قارچی افزایش بیان قابل‌توجهی داشت اما در تنش گرما سرکوب شد، در حالی که ژن PvDef10 تنها در پاسخ به آلودگی قارچی افزایش بیان و در شرایط شوری کاهش بیان نشان داد. این الگو می‌تواند نشان‌دهنده تخصص عملکردی این ژن‌ها در دفاع زیستی باشد.

به‌طور کلی، نتایج این مطالعه از فرضیه واگرایی عملکردی اعضای خانواده ژنی دیفنسین حمایت می‌کند. اگرچه این ژن‌ها از یک نیای مشترک منشأ گرفته‌اند و شباهت توالی قابل‌توجهی دارند، اما پس از رویدادهای تکثیر ژنی، الگوهای بیان متفاوتی کسب کرده‌اند. این تفاوت احتمالاً ناشی از تغییر در عناصر تنظیمی پیشبر، تفاوت در پاسخ به هورمون‌های گیاهی مانند سالیسیلیک اسید، جاسمونات و اتیلن و نیز فشارهای انتخابی متفاوت طی فرایند تکامل است. در نتیجه، هر عضو این خانواده نقش اختصاصی‌تری در پاسخ به تنش‌های زیستی یا غیرزیستی بر عهده گرفته است. الگوی اختصاصی پاسخ ژن‌های دیفنسین گیاه لوبیا به تنش‌های مختلف با مطالعات انجام‌شده در سایر حبوبات و گیاهان مدل مطابقت دارد. در نخود، ژن دیفنسین Ca-AFP تحت تنش کم‌آبی به‌طور معنی‌داری القا شد و افزایش بیان آن در آرابیدوپسیس با افزایش تحمل به خشکی همراه بود (Kumar et al., 2019). همچنین، در یونجه، بیشتر اعضای خانواده دیفنسین در پاسخ به خشکی، شوری و سرما افزایش بیان نشان دادند، اما شدت و الگوی پاسخ بین اعضای خانواده متفاوت بود (Guo et al., 2025). مطالعات آرابیدوپسیس نیز نشان داده‌اند که ژن‌های دیفنسین می‌توانند به‌صورت متفاوت تحت تأثیر تنش‌های خشکی و گرما قرار گیرند و تنظیم آن‌ها با مسیرهای هورمونی، به‌ویژه جاسمونات و اتیلن، ارتباط دارد (Domingo et al., 2024). با وجود اهمیت نتایج حاصل از تحلیل *in silico* الگوی بیان ژن‌های خانواده

References

- Amien, S., Kliwer, I., Márton, M.L., Debener, T., Geiger, D., Becker, D. and Dresselhaus, T. (2010). Defensin-like ZmES4 mediates pollen tube burst in maize via opening of the potassium channel KZM1. *PLoS Biology*, 8: e1000388.
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000388>
- Azmi, S. and Hussain, M.K. (2021). Analysis of structures, functions, and transgenicity of phytopeptides defensin and thionin: a review. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 10: 5.
<https://doi.org/10.1186/s43088-020-00093-5>
- Babicki, S., Arndt, D., Marcu, A., Liang, Y., Grant, J.R., Maciejewski, A. and Wishart, D.S. (2016). Heatmapper: web-enabled heat mapping for all. *Nucleic Acids Research*, 44: W147-W153.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkw419>
- Bahramnejad, N., Sohrabi, S.M. and Mohammadi, M. (2025). Molecular identification and characterization of some knottin antimicrobial peptides from white mustard (*Sinapis alba* L.) Plant. *Plant Genetic Research*, 12: 101-116 (In Persian).
<https://doi.org/10.22034/pgr.2025.2082488.1028>
- Bakare, O.O., Gokul, A., Fadaka, A.O., Wu, R., Niekerk, L.-A., Barker, A.M., Keyster, M. and Klein, A. (2022). Plant antimicrobial peptides (PAMPs): features, applications, production, expression, and challenges. *Molecules*, 27: 3703.
<https://doi.org/10.3390/molecules27123703>
- Bolser, D., Staines, D.M., Pritchard, E. and Kersey, P. (2016) Ensembl plants: integrating tools for visualizing, mining, and analyzing plant genomics data in Plant bioinformatics: Methods and protocols pp. 115-140, Springer.
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3167-5_6
- De Coninck, B., Cammue, B.P. and Thevissen, K. (2013). Modes of antifungal action and in planta functions of plant defensins and defensin-like peptides. *Fungal Biology Reviews*, 26: 109-120.
<https://doi.org/10.1016/j.fbr.2012.10.002>
- Dellaporta, S.L., Wood, J. and Hicks, J.B. (1983). A plant DNA miniprep: version II. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1: 19-21.
<https://doi.org/10.1007/BF02712670>
- Domingo, G., Locato, V., Cimini, S., Ciceri, L., Marsoni, M., De Gara, L., Bracale, M. and Vannini, C. (2024). A comprehensive characterization and expression profiling of defensin family peptides in *Arabidopsis thaliana* with a focus on their abiotic stress-specific transcriptional modulation. *Current Plant Biology*, 39: 100376.
<https://doi.org/10.1016/j.cpb.2024.100376>
- Doyle, J. (1991) DNA protocols for plants in *Molecular Techniques in Taxonomy* pp, 283-293. Springer.
https://doi.org/10.1007/978-3-642-83962-7_18
- Drikvand, R.M., Sohrabi, S.M. and Samiei, K. (2019). Molecular cloning and characterization of six defensin genes from lentil plant (*Lens culinaris* L.). *3 Biotech*, 9: 104.
<https://doi.org/10.1007/s13205-019-1617-8>
- Edgar, R., Domrachev, M. and Lash, A.E. (2002). Gene expression omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic Acids Research*, 30: 207-210.
<https://doi.org/10.1093/nar/30.1.207>
- Emamifar, S., Abolmaali, S., Sohrabi, S.M., Mohammadi, M. and Shahmohammadi, M. (2021). Molecular characterization and evaluation of the antibacterial activity of a plant defensin peptide derived from a gene of oat (*Avena sativa* L.). *Phytochemistry*, 181: 112586.
<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2020.112586>
- Ferrè, F. and Clote, P. (2006). DiANNA 1.1: an extension of the DiANNA web server for ternary cysteine classification. *Nucleic Acids Research*, 34: W182-W185.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkl189>
- Finn, R.D., Coghill, P., Eberhardt, R.Y., Eddy, S.R., Mistry, J., Mitchell, A.L., Potter, S.C., Punta, M., Qureshi, M. and Sangrador-Vegas, A. (2016). The Pfam protein families database: towards a more sustainable future. *Nucleic Acids Research*, 44: D279-D285.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkv1344>
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S.e., Wilkins, M.R., Appel, R.D. and Bairoch, A. (2005). Protein identification and analysis tools on the ExPASy Server, Springer.
<https://doi.org/10.1385/1-59259-890-0:571>
- Goodstein, D.M., Shu, S., Howson, R., Neupane, R., Hayes, R.D., Fazo, J., Mitros, T., Dirks, W., Hellsten, U. and Putnam, N. (2012). Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. *Nucleic Acids Research*, 40: D1178-D1186.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkr944>
- Graham, M.A., Silverstein, K.A. and VandenBosch, K.A. (2008). Defensin-like genes: genomic perspectives on a diverse superfamily in plants. *Crop Science*, 48: S-3-S-11.
<https://doi.org/10.2135/cropsci2007.04.0236tpg>
- Guo, M., Chen, X., Li, S., Tian, J., Huang, W. and Shu, Y. (2025). Identification of the plant defensin (MsPDF) gene family in *Medicago sativa* and analysis of expression patterns under abiotic stress. *Plants*, 14: 1312.
<https://doi.org/10.3390/plants14091312>

- Ha-Tran, D.M. and Huang, C.C. (2025). Peptides from plants and microorganisms: a defense strategy for biotic and abiotic stresses. *Frontiers in Plant Science*, 16: 1649512.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2025.1649512>
- Iralu, N., Wani, S., Mehraj, I., Ullah, P., Saleem, S. and Hamid, A. (2024). Antimicrobial peptides from plants and microorganisms for plant disease management. *Plant Pathology*, 73: 1691-1707.
<https://doi.org/10.1111/ppa.13932>
- Johnson, M., Zaretskaya, I., Raytselis, Y., Merezukh, Y., McGinnis, S. and Madden, T.L. (2008). NCBI BLAST: a better web interface. *Nucleic Acids Research*, 36: W5-W9.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkn201>
- Jones, P., Binns, D., Chang, H.-Y., Fraser, M., Li, W., McAnulla, C., McWilliam, H., Maslen, J., Mitchell, A. and Nuka, G. (2014). InterProScan 5: genome-scale protein function classification. *Bioinformatics*, 30: 1236-1240.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu031>
- Kovaleva, V., Bukhteeva, I., Kit, O.Y. and Nesmelova, I.V. (2020). Plant defensins from a structural perspective. *International Journal of Molecular Sciences*, 21: 5307.
<https://doi.org/10.3390/ijms21155307>
- Kumar, M., Yusuf, M.A., Yadav, P., Narayan, S. and Kumar, M. (2019). Overexpression of chickpea defensin gene confers tolerance to water-deficit stress in *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in Plant Science*, 10: 290.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00290>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. and Tamura, K. (2018). MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35: 1547.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Lacerda, A.F., Vasconcelos, É.A., Pelegrini, P.B. and Grossi de Sa, M.F. (2014). Antifungal defensins and their role in plant defense. *Frontiers in Microbiology*, 5: 116.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00116>
- Liu, Y., Hua, Y.P., Chen, H., Zhou, T., Yue, C.P. and Huang, J.Y. (2021). Genome-scale identification of plant defensin (PDF) family genes and molecular characterization of their responses to diverse nutrient stresses in allotetraploid rapeseed. *PeerJ*, 9: e12007.
<https://doi.org/10.7717/peerj.12007>
- Marchler-Bauer, A., Derbyshire, M.K., Gonzales, N.R., Lu, S., Chitsaz, F., Geer, L.Y., Geer, R.C., He, J., Gwadz, M. and Hurwitz, D.I. (2014). CDD: NCBI's conserved domain database. *Nucleic Acids Research*, 43: D222-D226.
<https://doi.org/10.1093/nar/gku1221>
- Marchler-Bauer, A., Derbyshire, M.K., Gonzales, N.R., Lu, S., Chitsaz, F., Geer, L.Y., Geer, R.C., He, J., Gwadz, M. and Hurwitz, D.I. (2015). CDD: NCBI's conserved domain database. *Nucleic Acids Research*, 43: D222-D226.
<https://doi.org/10.1093/nar/gku1221>
- McLaughlin, M.S., Roy, M., Abbasi, P.A., Carisse, O., Yurgel, S.N. and Ali, S. (2023). Why do we need alternative methods for fungal disease management in plants? *Plants*, 12: 3822.
<https://doi.org/10.3390/plants12223822>
- Mondragón-Palomino, M., Stam, R., John-Arputharaj, A. and Dresselhaus, T. (2017). Diversification of defensins and NLRs in *Arabidopsis* species by different evolutionary mechanisms. *BMC Evolutionary Biology*, 17: 255.
<https://doi.org/10.1186/s12862-017-1099-4>
- Montesinos, E. (2023). Functional peptides for plant disease control. *Annual Review of Phytopathology*, 61: 301-324.
<https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-021722-034312>
- Mulla, J.A., Palod, P.S., Bhagwat, S.A., Sonawane, A.P., Acharya, S.K., Kulkarni, A.P. and Tamhane, V.A. (2025). Genomic and functional insights into the diversity of *Capsicum annuum* defensin gene family. *3 Biotech*, 15: 99.
<https://doi.org/10.1007/s13205-025-04256-y>
- Nazarov, P.A., Baleev, D.N., Ivanova, M.I., Sokolova, L.M. and Karakozova, M.V. (2020). Infectious plant diseases: etiology, current status, problems and prospects in plant protection. *Acta Naturae*, 12: 46.
<https://doi.org/10.32607/actanaturae.11026>
- Nikoloudakis, N., Pappi, P., Markakis, E.A., Charova, S.N., Fanourakis, D., Paschalidis, K., Delis, C., Tzortzakakis, E.A. and Tsaniklidis, G. (2020). Structural diversity and highly specific host-pathogen transcriptional regulation of defensin genes is revealed in tomato. *International Journal of Molecular Sciences*, 21: 9380.
<https://doi.org/10.3390/ijms21249380>
- O'Rourke, J.A., Iniguez, L.P., Fu, F., Bucciarelli, B., Miller, S.S., Jackson, S.A., McClean, P.E., Li, J., Dai, X. and Zhao, P.X. (2014). An RNA-Seq based gene expression atlas of the common bean. *BMC Genomics*, 15: 866.
<https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-866>
- Parisi, K., Poon, S., Renda, R.F., Sahota, G., English, J., Yalpani, N., Bleackley, M.R., Anderson, M.A. and van Der Weerden, N.L. (2020). Improving the digestibility of plant defensins to meet regulatory requirements for transgene products in crop protection. *Frontiers in Plant Science*, 11: 1227.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01227>
- Parisi, K., Shafee, T.M., Quimbar, P., van der Weerden, N.L., Bleackley, M.R. and Anderson, M.A. (2019). The evolution, function and mechanisms of action for plant defensins. *Cell & Developmental Biology*, 88:107-118.
<https://doi.org/10.1016/j.semedb.2018.02.004>

- Saffar, Z., Sohrabi, S.M., Motamedi, M. and Panji, A. (2024). Identification and sequencing of defensin genes in barley (*Hordeum vulgare* L.): bioinformatics analysis and expression changes in response to biotic and abiotic stresses. *Plant Genetic Research*, 11(2): 47-64 (In Persian).
<https://doi.org/10.22034/pgr.2024.11.2.4>
- Salamov, A.A. and Solovyev, V.V. (2000). Ab initio gene finding in Drosophila genomic DNA. *Genome Research*, 10: 516-522.
<https://doi.org/10.1101/gr.10.4.516>
- Sewelam, N., El-Shetehy, M., Mauch, F. and Maurino, V.G. (2021). Combined abiotic stresses repress defense and cell wall metabolic genes and render plants more susceptible to pathogen infection. *Plants*, 10: 1946.
<https://doi.org/10.3390/plants10091946>
- Shahmiri, M., Bleackley, M.R., Dawson, C.S., van der Weerden, N.L., Anderson, M.A. and Mechler, A. (2023). Membrane binding properties of plant defensins. *Phytochemistry*, 209: 113618.
<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2023.113618>
- Sher Khan, R., Iqbal, A., Malak, R., Shehryar, K., Attia, S., Ahmed, T., Ali Khan, M., Arif, M. and Mii, M. (2019). Plant defensins: types, mechanism of action and prospects of genetic engineering for enhanced disease resistance in plants. *3 Biotech*, 9: 192.
<https://doi.org/10.1007/s13205-019-1725-5>
- Silverstein, K.A., Graham, M.A., Paape, T.D. and VandenBosch, K.A. (2005). Genome organization of more than 300 defensin-like genes in Arabidopsis. *Plant physiology*, 138: 600-610.
<https://doi.org/10.1104/pp.105.060079>
- Slezina, M.P., Istomina, E.A., Korostyleva, T.V. and Odintsova, T.I. (2022). The γ -core motif peptides of plant AMPs as novel antimicrobials for medicine and agriculture. *International Journal of Molecular Sciences*, 24: 483.
<https://doi.org/10.3390/ijms24010483>
- Sohrabi, S.M., Shahmohammadi, M., Mohammadi, M., Abdi, Z., Shams, M.H., Khanizadeh, S. and Kheirandish, F. (2024). Identification and functional characterization a cysteine-rich peptide from the garlic (*Allium sativum* L.). *South African Journal of Botany*, 166: 690-697.
<https://doi.org/10.1016/j.sajb.2024.02.009>
- Stotz, H.U., Spence, B. and Wang, Y. (2009a). A defensin from tomato with dual function in defense and development. *Plant Molecular Biology*, 71: 131-143.
<https://doi.org/10.1007/s11103-009-9512-z>
- Stotz, H.U., Thomson, J. and Wang, Y. (2009b). Plant defensins: defense, development and application. *Plant Signaling & Behavior*, 4: 1010-1012.
<https://doi.org/10.4161/psb.4.11.9755>
- Strange, R.N. and Scott, P.R. (2005). Plant disease: a threat to global food security. *Annual Review of Phytopathology*, 43: 83-116.
<https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.113004.133839>
- Tesfaye, M., Silverstein, K.A., Nallu, S., Wang, L., Botanga, C.J., Gomez, S.K., Costa, L.M., Harrison, M.J., Samac, D.A. and Glazebrook, J. (2013). Spatio-temporal expression patterns of Arabidopsis thaliana and Medicago truncatula defensin-like genes. *PLoS One*, 8: e58992.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058992>
- Teufel, F., Almagro Armenteros, J.J., Johansen, A.R., Gislason, M.H., Pihl, S.I., Tsirigos, K.D., Winther, O., Brunak, S., von Heijne, G. and Nielsen, H. (2022). SignalP 6.0 predicts all five types of signal peptides using protein language models. *Nature Biotechnology*, 40: 1023-1025.
<https://doi.org/10.1038/s41587-021-01156-3>
- Thomma, B.P., Cammue, B.P. and Thevissen, K. (2002). Plant defensins. *Planta*, 216: 193-202.
<https://doi.org/10.1007/s00425-002-0902-6>
- Vriens, K., Cammue, B.P. and Thevissen, K. (2014). Antifungal plant defensins: mechanisms of action and production. *Molecules*, 19: 12280-12303.
<https://doi.org/10.3390/molecules190812280>
- Waghu, F.H., Gopi, L., Barai, R.S., Ramteke, P., Nizami, B. and Idicula-Thomas, S. (2014). CAMP: collection of sequences and structures of antimicrobial peptides. *Nucleic Acids Research*, 42: D1154-D1158.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkt1157>
- Yao, J., Luo, J.-S., Xiao, Y. and Zhang, Z. (2019). The plant defensin gene AtPDF2.1 mediates ammonium metabolism by regulating glutamine synthetase activity in Arabidopsis thaliana. *BMC Plant Biology*, 19: 557.
<https://doi.org/10.1186/s12870-019-2183-2>
- Yu, C.S., Cheng, C.W., Su, W.C., Chang, K.C., Huang, S.W., Hwang, J.K. and Lu, C.H. (2014). CELLO2GO: a web server for protein subCELLular LOcalization prediction with functional gene ontology annotation. *PLoS One*, 9: e99368.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099368>
- Yuan, R., Zhang, C., Gao, T., Liu, X., Wang, X., Zhang, F., Zhao, K., Xia, X., Lamlo, S.F. and Ren, H. (2026). Genome-wide identification, characterization, and expression analysis of the plant defensin (PDF) gene family in soybean. *BMC Plant Biology*, 26: 1445.
<https://doi.org/10.1186/s12870-026-09177-3>