

کلون سازی و بیان ژن *LTP2* گندم فلات در گیاه لویا و بررسی اثرات ضد میکروبی آن

Cloning and *LTP2* gene expression Fallat wheat in bean plant and study its antimicrobial effect

پریا آرین پور^۱، ندا میرآخورلی^{۱*}، فریبا رفیعی^۱

۱- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، استادیاران، دانشگاه شهرکرد

Arianpur P¹, Mirakhorli N^{*1}, Rafiei F¹

1- MSc Student, Assistant Professors, University of Shahrekord

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

(تاریخ دریافت: ۹۳/۱۲/۱۰ - تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۰/۲۶)

چکیده

پروتئین های انتقال دهنده لیپید، پپتیدهای کوچک و غنی از سیستمین بوده و بر اساس وزن مولکولی به دو گروه *LTP1* و *LTP2* تقسیم می شوند. این پروتئین ها دارای فعالیت بیولوژیکی مختلف بوده و همچنین در مکانیسم دفاعی گیاهان نیز نقش دارند. با بررسی داده های میکروآرای حاصل از آزمایش های مختلف مشخص شده که ژن های *LTP* در برابر تنش های زیستی و غیر زیستی افزایش یا کاهش بیان داشته اند. در این تحقیق به منظور بررسی و مشخص کردن میزان بروز و تأثیر ژن *LTP* در مقاومت گندم نان و جو نسبت به بیماری *Ustilago Puccinia Fusarium graminearum* چهار کتابخانه میکروآرای با ایزولاین مقاوم و حساس از پایگاه داده NCBI گرفته شده و نمودار الگوی بیانی ژن های *LTP* رسم شد. رسم نمودار نشان داد که ژن های مختلف *LTP* در ارقام مقاوم و حساس نسبت به این بیماری ها اختلاف بیان نشان داده اند. در نتیجه ژن *LTP* را می توان به عنوان یکی از عوامل مؤثر در مقاومت معرفی و عنوان نمود که تفاوت در الگوی بیان این ژن در ارقام مقاوم و حساس پس از آلودگی با بیماری ممکن است نقش اصلی را در مکانیسم های مقاومت به بیماری در گندم و جو داشته باشد. برای ساخت سیستم تظاهر ژن *LTP2*، ژن *LTP2* جدا شده از گندم فلات به پلاسمید pBISN1-IN ترانسفرم شده و لایگیشن انجام شد. پلاسمید نو ترکیب در باکتری *E.coli* سویه DH5 α کلون شد. برای بررسی کارایی سیستم بیانی ساخته شده ابتدا پلاسمید نو ترکیب استخراج و به اگروباکتريوم سویه LBA4404 منتقل و سپس با استفاده از روش اگرواینفیلتریشن به گیاه لویا انتقال داده شد. بیان این سیستم در سطح RNA بررسی شد و همچنین با بررسی میزان پروتئین فعال و محلول در برگ تزریق شده با پلاسمید نو ترکیب بیان و عملکرد پروتئین تأیید شده و پروتئین شیمیری خاصیت ضد باکتریایی بر روی *Staphylococcus aureus* را نیز نشان داد.

واژه های کلیدی

سیستم تظاهر
میکروآرای
LTP

مقدمه

دفاع گیاه در برابر پاتوژن در نتیجه خصوصیات ساختاری و بیان ژن های درگیر در مقاومت می باشد. در پاسخ های دفاعی معمولاً چندین ژن در مکانیسم مقاومت نقش دارند. واکنش اولیه گیاه به آلودگی توسط عوامل بیماری زا به وسیله تغییرات متابولیکی مقاومت هم چون مقاومت اکتسابی، مقاومت سیستمیک^۱ (SAR) و مقاومت سیستمیک القا^۲ بروز داده می شود. فعالیت و حضور پروتئین های مرتبط با SAR ارتباط مستقیمی با سطح مقاومت و حساسیت گیاه دارد (Ryals et al. 1996). پروتئین های درگیر در مقاومت دسته ای از پروتئین ها محسوب می شوند که در اثر حمله پاتوژن ها و یا مواد مرتبط با بیمارگر همچون الیستورها در گیاه تولید می شوند (Van Loon 1999). بیان این پروتئین ها در گیاه به صورت اختصاصی انجام می شود. پپتیدهای ضد میکروبی، مولکول های کوچکی هستند که از نظر اندازه بین ۱۰ تا ۱۰۰ اسید آمینه متفاوتند. توالی اسید آمینه ای در آن ها به شدت حفظ شده است و میزبان را نسبت به مجموعه ای از میکروب های اطرافش محافظت می کند. این پپتیدها در همه موجودات وجود دارند (Broekaert et al. 1997; Hammami et al. 2009). آن ها بر اساس ساختار اولیه به هفت خانواده تقسیم می شوند که شامل تیونین ها، دفنیزین ها، پروتئین های انتقال دهنده لیپید، شبه پروتئین های سنگین، کنوتین ها، اسناکین ها و سیسلوتیدها می باشند (Broekaert et al. 1997).

پروتئین های انتقال دهنده لیپید با نام اختصاری *LTP*^۳، پپتیدهای کوچک و غنی از سیستئین و کاتیونی می باشند. این پروتئین ها در حدود ۷-۱۰ کیلو دالتون وزن دارند و براساس وزن مولکولی به دو گروه *LTP1* و *LTP2* تقسیم می شوند که وزن مولکولی آن ها به ترتیب ۹ و ۷ کیلو دالتون می باشد (Lee et al. 1998). نقطه ایزوالکتریک آن ها در حدود ۸-۸/۸ با توجه به نوع گیاه متفاوت است (Kader 1996; Sels et al. 2008). این پپتیدها به دلیل توانایی که در انتقال فسفولیپیدها از محل سنتز به غشای سلولی دارند به این نام خوانده می شوند. توالی آمینواسیدی این پپتیدها در گیاهان مختلف متفاوت می باشد، ولی در همه آن ها هشت

سیستئین به صورت ثابت وجود دارد که تشکیل چهار پل دی سولفیدی را می دهند. ساختار سه بعدی این پروتئین ها نشان می دهد که دارای چهار مارپیچ α و یک ناحیه ی انتهایی c می باشند که توسط باندهای دی سولفیدی به صورت محکم به هم متصل می شوند (Kader et al. 1997). مهم ترین خصوصیت *LTP* ها حضور یک حفره ی هیدروفوب در مرکز مولکول می باشد که محل اتصال مولکول های آبریز و اسیدهای چرب است و آن ها را در شرایط *in vitro* جابه جا می کند (Zachowski et al. 1998; Hamilton 2004). عملکرد این پروتئین ها چندان اختصاصی نیست، به همین دلیل به آن ها *non-specific LTP* هم می گویند (Carvalho et al. 2007). *LTP* ها توسط خانواده های کوچک چند ژنی کد می شوند و الگوی بیان ژن *LTP* در گیاه تحت تأثیر عوامل مختلفی مانند مرحله ی رشد گیاه، آناتومی و تنش های زنده و غیر زنده قرار می گیرد (Arnodel et al. 2000). این پروتئین ها دارای فعالیت های بیولوژیک مختلف می باشند (Hamilton 2004).

مشخص شده که *LTP* ها در تجمع کوتین و استحکام دیواره نقش دارند. *LTP* ها در طی پروسه جنین زایی سوماتیکی ترشح می شوند و نقش آن ها شکل دادن لایه محافظتی اطراف جنین جوان می باشد. هم چنین در گذاشتن مواد لیپوفیلیک در اندام گل نیز نقش دارند. در سلول های جنینی و ایجاد مونومرهای کوتین مورد نیاز بوده، در طویل شدن لوله گرده، جنین زایی و نیز پاسخ به تنش های زنده و غیر زنده از قبیل شوری، عناصر سنگین، گرما، سرما و کمبود آب مؤثر هستند. مشخص شده است که در ساقه گوجه فرنگی تیمار شده با مانتیول یا ABA ژن های *LTP* بیان می شوند (Kader et al. 1997).

LTP ها همچنین دارای فعالیت ضد میکروبی، ضد قارچی و ضد ویروسی می باشد. فعالیت ضد قارچی *LTP* ها در برابر انواع بیماری های قارچی از قبیل *Puccinia graminis*, *Tilletia tritici*, *Fusarium graminearum*, *Sclerotinia sclerotiorum* در گیاهانی مانند گندم، برنج، آفتابگردان، سیب زمینی، توتون و غیره مشخص شده است. ژن انتقال دهنده لیپید (*LTP*) مانند پروتئین های ضد میکروبی، در شرایط آزمایشگاهی پروتئینی با خاصیت ضد میکروبی گسترده تولید و بیان بالای آن در بهبود

¹ systemic acquired resistance² induced systemic resistance³ lipid transfer protein

و رقم حساس yr5 گندم (GEO accession: GSE31753) در آلودگی با بیماری *Puccinia* در چهار تیمار زمانی ۶، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از آلودگی در سه تکرار به همراه نمونه شاهد بود. کتابخانه چهارم مربوط به بررسی مقاومت گیاه جو نسبت به بیماری فوزاریومی (GEO accession: GSE33398) FHB در دو رقم حساس Wild و رقم مقاوم Mutant در سه تیمار زمانی و در سه تکرار دانلود شد. کتابخانه های حاصل از پایگاه داده در تیمارهای زمانی مختلف و به همراه نمونه های شاهد بررسی شدند. داده های خام میکرواری با استفاده از نرم افزار Expression Console روش RMA نرمال سازی شدند. جهت تجزیه آماری داده ها میکرواری نرمال شده از نرم افزار Flexarray استفاده شد و داده ها با آزمون t-test و p-value کوچکتر از ۰/۰۵ بررسی شدند. سپس پروبست های LTP با چیپ های میکرواری گندم و جو در میان ژن هایی که تغییرات بیانی نسبت به شاهد نشان دادند انتخاب و الگوی بیانی آن ها رسم شد.

در این مطالعه از گیاه لوبیا و از باکتری های *E.coli* سویه DH5α و باکتری *Agrobacterium tumefaciens* سویه LBA4404 به عنوان میزبان های حد واسط استفاده شد. ویژگی های پلاسمید مورد استفاده در شکل ۱ ارائه شده است.

پلاسمید pBISN1-IN با اندازه ۱۳/۱ کیلو جفت باز دارای ژن مقاومت به کانامایسین و پروموتور CaMV35s می باشد. در این مطالعه نسل جدیدی از گزارشگرها استفاده شده که مزایای زیادی نسبت به گزارشگرهای قبلی دارد.

این گزارشگر جدید بر اساس آنزیم متحمل به حرارت لیکیناز (β -glucanase -۱،۴-۱،۳) باکتری گرمادوست *Clostridium thermocellum* به دست آمده است که پیوندهای مجاور β -۱،۴ را در پلی گلوکان ها (لیکینان) تجزیه می نماید.

مقاومت در برابر بیماری های گیاهی بسیار مؤثر است (Liu 2012).

اطلاعات در مورد فعالیت های فیزیولوژیکی و مولکولی در تنظیم بیان ژن های گیاهان بیمار در دسترس نیست. بنابراین تجزیه و تحلیل بیان ژن در پاسخ به پاتوژن ها در رقم های حساس و مقاوم مهم است. هم چنین برای شناخت نقش های مختلف مکانیسم مولکولی در مقاومت حائز اهمیت است. در این مطالعه با استفاده از داده های میکرواری به بررسی الگوی بیان ژن *LTP* گندم و جو در برابر آلودگی به بیماری های قارچی فوزاریوم و زنگ پرداخته شده است. هم چنین ژن *LTP2* تحت کنترل سیستم بیانی گیاهی کلون شد و کارایی این سیستم با انتقال آن به گیاه لوبیا تایید و خاصیت ضد میکروبی پروتئین نو ترکیب بررسی شد.

مواد و روش ها

چهار کتابخانه ی داده های میکرواری مربوط به بررسی مقاومت گندم نان و جو نسبت به بیماری های *Fusarium graminearum*، *Puccinia* و *Ustilago* از پایگاه داده NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) با پسوند CELL دریافت شد که به ترتیب عبارتند از: کتابخانه ی اول مربوط به بررسی مقاومت گندم نان نسبت به بیماری *Fusarium graminearum* با (GEO accession: GSE43706)، این آزمایش در سه تیمار زمانی ۸، ۲۴ و ۷۲ ساعت پس از آلودگی گندم مقاوم رقم NIL1 و گندم حساس رقم NIL4 با قارچ *Fusarium* سویه IFA-65 در سه تکرار به همراه نمونه شاهد در هر تیمار زمانی انجام شده است. کتابخانه دوم مربوط به بررسی مقاومت گندم نسبت به بیماری فوزاریوم با (GEO accession: GSE28973) که در سه تیمار زمانی ۳، ۸ و ۲۴ ساعت پس از آلودگی در رقم حساس Superb و رقم مقاوم GS-1-EM0040 در سه تکرار به همراه نمونه شاهد انجام شده است. کتابخانه سوم مربوط به بررسی رقم مقاوم Yr5

LB	pnos	nptII	Nos	P35s	LeB4	HindIII	LicBM2	KDEL	PA	RB
----	------	-------	-----	------	------	---------	--------	------	----	----

شکل ۱- شکل شماتیک ناحیه T-DNA در ترکیب پلاسمید pBISN1-IN P35s پروموتور 35s و ویروس موزایک گل کلم (35sCaMV): LeB4. پپتید رهبر ژن لگومین B گیاه لوبیا که باعث تجمع پروتئین در شبکه آندوپلاسمی می شود؛ KDEL: توالی چهار پپتیدی هدایتگر پروتئین به شبکه آندوپلاسمی؛ PA: سیگنال پلی آدنیلایسون؛ Pnos: پروموتور ژن nptII ژن مقاومت به کانامایسین؛ nos: خاتمه دهنده مربوط به ژن nos؛ ترکیب پلاسمیدی: باعث تجمع پروتئین در شبکه آندوپلاسمی می شود.

LB	pnos	nptII	Nos	P35s	LeB4	HindIII	LTP2	LicBM2	KDEL	PA	RB
----	------	-------	-----	------	------	---------	------	--------	------	----	----

شکل ۲- ساختار پلاسمید نو ترکیب

pBISN1-IN انتقال داده شد. ساختار پلاسمید نو ترکیب در شکل ۲ نشان داده شده است، در این ساختار ژن *LTP2* باید قبل از ژن گزارشگر قرار گیرد.

انتقال پلاسمید نو ترکیب به سلول های مستعد باکتری *E.coli* سویه DH5α به منظور تکثیر پلازمید، با استفاده از شوک حرارتی انجام گرفت (Sambrook et al. 1989). سلول های تراریخته حاوی پلاسمید های نو ترکیب در محیط LB مایع رشد داده شد و سپس بر روی محیط انتخابی حاوی آنتی بیوتیک کانامایسین کشت داده شدند. پس از تشکیل کلونی، حضور ژن *LTP2* در پلاسمید pBISN1-IN ابتدا با PCR کلونی و سپس به وسیله هضم آنزیمی با آنزیم *HindIII* تأیید شد.

استخراج پلاسمید با استفاده از کیت استخراج پلاسمید شرکت Vivantis انجام شد. پس از تأیید نهایی، سیستم بیانی ساخته شده به اگروباکتریوم انتقال داده شد. ترکیب پلاسمیدی جهت تهیه سوسپانسیون اگروباکتریوم به روش الکتروپوریشن (Weigel et al. 2002) با کمی تغییر به باکتری *Agrobacterium tumefaciense* سویه ۴۴۰۴ انتقال داده شد. پس از انجام ترانسفورماسیون، باکتری ها روی محیط کشت LB آگار حاوی آنتی بیوتیک کانامایسین و ریف آمپیسین کشت داده شدند. محیط های کشت به مدت ۲-۳ روز در درون انکوباتور در دمای ۲۸ درجه قرار گرفت تا کلونی های تراریخته تشکیل شوند. تأیید کلونی های نو ترکیب به روش PCR کلونی با پرایمر های ژن *LTP2* انجام شد. برای انجام اگرواینفیلتریشن سوسپانسیونی از اگروباکتریوم تهیه و از روزنه های پشت برگ توسط سرنگ بدون سوزن به درون برگ تزریق شد (Wroblewski et al. 2005). برای تهیه سوسپانسیون اگرواینفیلتریشن رسوب کشت شبانه اگروباکتریوم در محلول Infiltration medium (Lee et al. 2008) حاوی ۱۰۰ میکرومولار استوسیرینگون و آنتی بیوتیک کانامایسین (۵۰ mg/L) و ریفامپیسین (۱۰۰ mg/L) حل شد و به مدت ۶-۵ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد مجدداً کشت شد و سپس رسوب حاصل در محلول Induction medium (Lee et al. 2008) حاوی ۲۰۰ میکرومولار

در اثر تجزیه مواد پلی ساکاریدی مثل لیکینان، قندهای ساده احیا شونده آزاد می شوند که میزان آن ها را می توان به طور کمی و کیفی به کمک مواد رنگی اندازه گیری و مشخص نمود. ژن *licBM2* می تواند به عنوان یک ژن گزارشگر و مارکر انتخاب گر با حساسیت و دقت بالا در زیست شناسی مولکولی برای انتخاب سلول های تراریخته و بررسی میزان بیان ترانسژن استفاده شود. در ضمن این ژن گزارشگر از نظر ایمنی زیستی، جهت تولید گیاهان تراریخته امن می باشد (Komakhin et al. 2005). ژن *LTP2* مربوط به گندم نان (*Triticum aestivum*) رقم فلات است که توالی این ژن در پایگاه داده NCBI با (Accession JQ621901) number ثبت شده است (Habibi 2011).

به منظور ساخت سیستم بیانی pBISN1-IN-LTP2 ابتدا برای تکثیر ژن *LTP2* گندم کلون شده در پلاسمید pJET1.2 پرایمر های اختصاصی پیشرو و پسرو به ترتیب با توالی های 5' -CGCGAAGCTTATGGCTCGAGTTTCA - 3' LTP2 F و 5' -CGCGAAGCTTTTCAGTGGATCTTAGAGC - 3' LTP2 R با استفاده از توالی ژن طراحی شد و به منظور همسانه سازی ژن *LTP2* در پلاسمید pBISN1-IN توالی آنزیم برشی *HindIII* در دو پرایمر رفت و برگشت اضافه شد. همچنین از این جفت پرایمر برای تأیید گیاهان تراریخته استفاده شد.

به منظور تکثیر ژن *LTP2* موجود در پلاسمید pJET1.2 با پرایمر طراحی شده برای ژن *LTP2* واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) در حجم ۲۰ میکرولیتر انجام شد. و محصول PCR روی ژل آگارز ۰/۸ درصد بارگذاری و الکتروفورز انجام شد. ژن تکثیر شده از ژل آگارز جدا و سپس با کیت استخراج شرکت Viogene خالص سازی شد.

به منظور هضم آنزیمی، چهار میکرولیتر از هر کدام از ژن و پلاسمید با ۱۳ میکرولیتر آب و دو میکرولیتر بافر آنزیم و یک میکرولیتر آنزیم مخلوط شد و به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفت. در این مرحله نمونه ها به وسیله الکتروفورز بررسی شدند و سپس ژن و پلاسمید با آنزیم آلکالین فسفاتاز (CIAP) تیمار شد. سپس ژن *LTP2* به پلاسمید

استفاده شد. هر کدام از دیسک‌ها به منظور کنترل گیاهی (کنترل منفی)، آنتی بیوتیک اریترومايسين ۰/۵ درصد (کنترل مثبت) و پروتئین نو ترکیب شیمر، مورد استفاده قرار گرفت. پس از اینکه ۲۰ میکرولیتر از هر کدام از نمونه‌های کنترل و پروتئین نو ترکیب (غلظت ۱۲ میکروگرم در میکرولیتر) بر دیسک‌های جداگانه ریخته شد، هاله تشکیل شده در اطراف دیسک در زمان‌های ۶، ۱۲ و ۱۶ ساعت بعد با استفاده از کولیس اندازه‌گیری شد. تجزیه و تحلیل داده‌های مربوط به قطر هاله‌ها با استفاده از نرم افزار SAS در یک آزمایش فاکتوریل به صورت کاملاً تصادفی انجام شد. مقایسات میانگین داده‌ها، با استفاده از روش دانکن انجام گرفت.

نتایج و بحث

فناوری ریزآرایه امکان مطالعه هزاران ژن را به طور هم‌زمان در یک آزمایش فراهم می‌کند. یکی از کاربردهای مهم این فناوری اندازه‌گیری سطح بیان ژن‌ها در شرایط مختلف است. در این بخش با استفاده از فناوری ریزآرایه به بررسی نقش *LTP*‌ها در تنش‌های زنده و غیر زنده پرداخته شد.

هدف از انجام این بخش در این پژوهش بررسی بیوانفورماتیکی تغییرات الگوی بیانی و تأثیر ژن‌های *LTP* در طی پاسخ دفاعی گیاه گندم و جو نسبت به بیماری‌های قارچی فوزاریوم و زنگ با استفاده از داده‌های میکروآرای موجود در بانک اطلاعاتی بود. در این تحقیق مشخص شد که ژن‌های *LTP* دارای تغییر الگوی بیان هستند با بررسی رقم مقاوم Yr5 گندم و رقم حساس yr5 در آلودگی با بیماری زنگ نواری (*Puccinia striiformis*) در چهار تیمار زمانی ۶، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت دو ژن *LTP1* و *LTP2* در رقم مقاوم در مقایسه با رقم حساس افزایش بیان نشان دادند، این دو ژن جزء خانواده *LTP*‌ها هستند. در این آزمایش مشخص شد که ژن‌های *LTP1* و *LTP2* در ارقام مقاوم با افزایش بازه زمانی و در زمان ۴۸ ساعت بیان بیش‌تری دارند در حالی‌که این ژن‌ها در رقم حساس با افزایش زمان پس از آلودگی کاهش بیان داشتند بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که این ژن‌ها در افزایش مقاومت گیاه نقش دارند (شکل ۳). با بررسی دو رقم مقاوم Mutant و حساس Wild گیاه جو در آلودگی با بیماری فوزاریومی در سه تیمار زمانی صفر، ۴۸ و ۹۶ ساعت پس از آلودگی دو ژن *LTP* و

استوسیرینگون حل شد تا $OD_{600}=0.4$ به دست آید و در نهایت این سوسپانسیون به برگ‌های لوبیا تزریق شد.

بذر گیاه لوبیا در داخل گلدان و در گلخانه کشت شد. ۴-۳ هفته پس از کاشت، برگ‌های مورد نظر طوری انتخاب شد که از نظر اندازه و سن و مکان قرار گرفتن در گیاه مشابه باشند. از کشت شبانه اگر وباکتریوم تراریخته تزریق به برگ‌های لوبیا با روش اگرواینفیلتریشن با سرنگ بدون سوزن انجام شد و گلدان‌ها به منظور ارزیابی بیان موقت با استخراج RNA به مدت ۲۴ ساعت و برای بررسی میزان پروتئین فعال به مدت سه روز در گلخانه قرار گرفتند (Lee et al. 2008).

برگ‌های تزریق شده پس از ۲۴ ساعت از گیاه جدا و استخراج RNA با روش Mangroves انجام شد (Rubio-Piña and Zapata-Pérez. 2011) و سپس واکنش PCR برای تأیید ژن و پلاسمید با پرایمر طراحی شده برای ژن *LTP2*، انجام شد. آلودگی ژنومی با استفاده از آنزیم DNase I بر طرف و سپس سنتز cDNA با استفاده از کیت انجام شد.

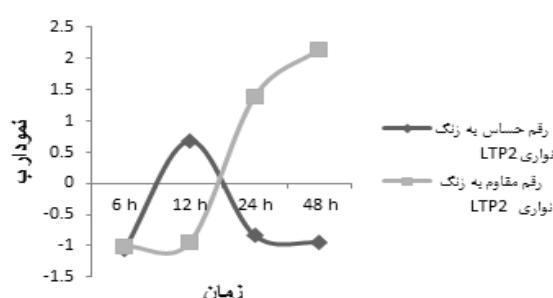
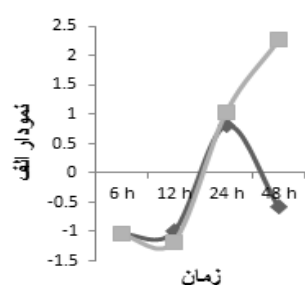
به منظور استخراج پروتئین، برگ‌های تزریق شده پس از سه روز از گیاه جدا و ناحیه تزریق شده برای استخراج مورد استفاده قرار گرفت. استخراج پروتئین به روش Tris Hcl 150 mM انجام شد (Fido et al. 2008).

برای ارزیابی کمیت پروتئین کل محلول از روش (Bradford 1976) استفاده شد و به منظور بررسی میزان دقیق بیان پروتئین ژن *LTP2* میزان پروتئین فعال به روش کاهش گلوکز (Miller 1959) اندازه‌گیری شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS و با آزمون t انجام شد.

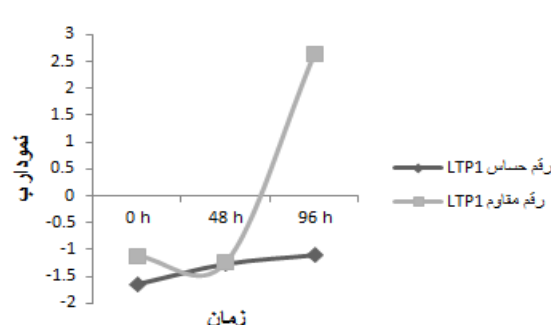
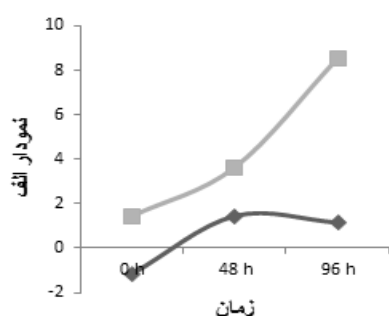
اثر ضد پاتوژنی پروتئین نو ترکیب تولید شده بر روی باکتری *Staphylococcus aureus* مورد بررسی قرار گرفت. به منظور بررسی اثر ضد باکتریایی پروتئین نو ترکیب تولید شده از روش انتشار دیسک (Bauer et al. 1996) استفاده شد. ابتدا از باکتری کشت شبانه در محیط NB (نوترینت براث) و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گذاشته شد، سپس از کشت شبانه با استفاده از سوآپ استریل بر روی محیط کشت NB آگار کشت داده شد. برای بررسی اثر ضد باکتریایی پروتئین حاوی *LTP2* و LicBM2 سه پتری‌دیش، هر کدام حاوی سه دیسک با قطر شش میلی‌متر

ساعت پس از آلودگی بیشترین بیان را دارد ولی در رقم حساس در زمان ۲۴ ساعت کاهش بیان را نشان می‌دهد (شکل ۵). با بررسی رقم مقاوم Nil1 و رقم حساس Nil4 گیاه گندم در آلودگی با *Fusarium graminearum* دو ژن *LTP7* و *LTP3* در سه تیمار زمانی ۸، ۲۴ و ۷۲ ساعت پس از آلودگی دارای الگوی تغییرات بیانی هستند ژن *LTP7* که در گندم از خانواده *LTP1* محسوب می‌شود در رقم حساس با افزایش مدت زمان پس از آلودگی کاهش بیان نشان می‌دهد و رقم مقاوم در زمان ۲۴ ساعت ابتدا کاهش بیان و سپس در ۷۲ ساعت افزایش بیان نشان می‌دهد. ژن *LTP3* در رقم مقاوم با افزایش زمان و در زمان ۷۲ ساعت پس از آلودگی افزایش بیان را نشان می‌دهد رقم حساس در بازه زمانی طولانی کاهش بیان نشان می‌دهد (شکل ۶). در پایان این بررسی‌ها مشخص شد که ژن‌های *LTP* در بازه‌های زمانی طولانی بیان بیش‌تری دارند.

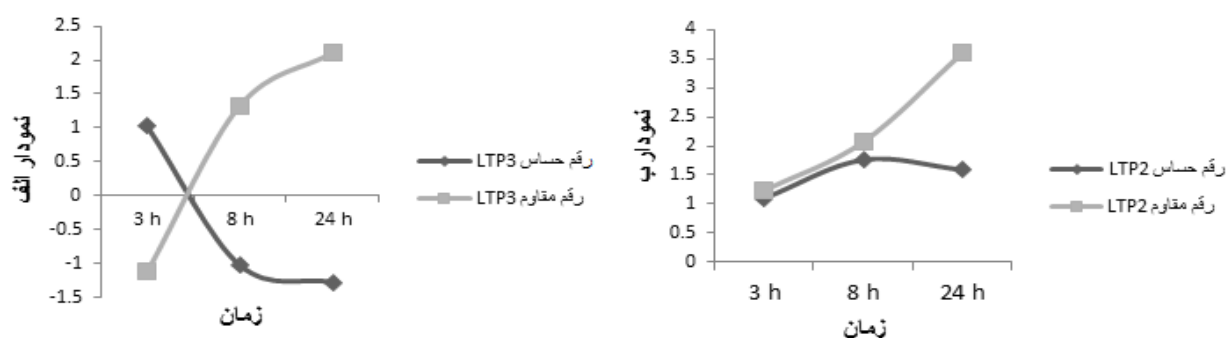
LTP1 افزایش بیان نشان می‌دهند. ژن *LTP* که از خانواده *LTP1* است در رقم مقاوم Mutant با افزایش زمان پس از آلودگی و در زمان ۹۶ ساعت بیان بیش‌تری را نسبت به ساعات اولیه آلودگی نسبت به رقم حساس دارد. ژن *LTP1* در جو از خانواده *LTP2* در رقم حساس کاهش بیان و در رقم مقاوم با افزایش مدت زمان پس از آلودگی و در ۹۶ ساعت افزایش بیان دارد (شکل ۴). با بررسی رقم مقاوم GS-1-EM0040 و رقم حساس Superb گیاه گندم در آلودگی با بیماری فوزاریومی در سه تیمار زمانی ۳، ۸ و ۲۴ ساعت پس از آلودگی دو نوع ژن *LTP2* و *LTP3* الگوی تغییر بیان نشان دادند و این ژن‌ها در گیاه گندم از خانواده *LTP1* هستند. ژن *LTP2* در رقم حساس با افزایش مدت زمان پس از آلودگی کاهش بیان دارد اما در رقم مقاوم با افزایش زمان و در ۲۴ ساعت بیش‌ترین بیان را نشان می‌دهد. *LTP3* در رقم مقاوم با افزایش زمان و در ۲۴



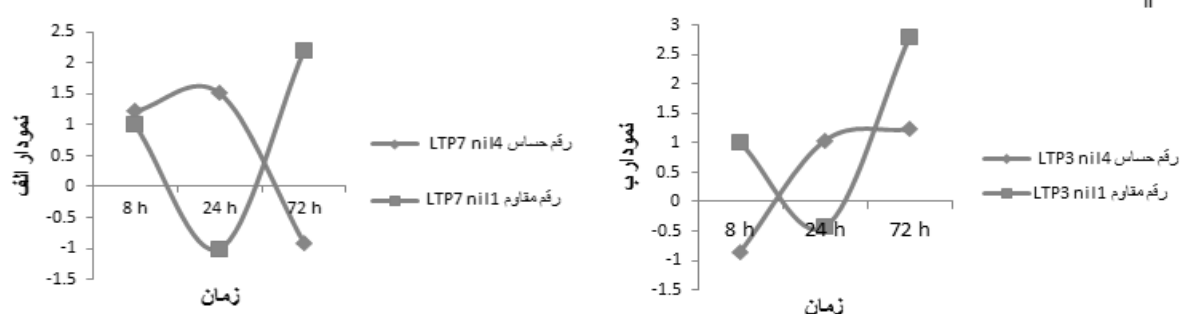
شکل ۳- الگوی بیان ژن *LTP* در رقم مقاوم Yr5 و رقم حساس yt5 گندم در چهار تیمار زمانی ۶، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از آلودگی با بیماری Puccinia. نمودار (الف) الگوی بیان ژن *LTP1* را در دو رقم حساس yt5 و رقم مقاوم YR5 پس از آلودگی با بیماری زنگ نواری نشان می‌دهد. نمودار (ب) الگوی بیان ژن *LTP2* را در دو رقم حساس yt5 و مقاوم YR5 پس از آلودگی با بیماری زنگ نواری نشان می‌دهد.



شکل ۴- الگوی بیان ژن *LTP* در دو رقم حساس Wild و مقاوم Mutant جو در سه تیمار زمانی صفر، ۴۸ و ۹۶ ساعت پس از آلودگی با بیماری فوزاریومی. نمودار (الف) الگوی بیان ژن *LTP* را در دو رقم حساس Wild و رقم مقاوم Mutant پس از آلودگی با بیماری فوزاریومی نشان می‌دهد. نمودار (ب) الگوی بیان ژن *LTP1* در دو رقم حساس Wild و مقاوم Mutant پس از آلودگی با بیماری فوزاریومی را نشان می‌دهد.



شکل ۵- الگوی بیان ژن *LTP* در دو رقم حساس Superb و مقاوم GS-1-EM0040 گندم در سه تیمار زمانی ۳، ۸ و ۲۴ ساعت پس از آلودگی با بیماری فوزاریومی. نمودار (الف) الگوی بیان ژن *LTP3* در دو رقم حساس و مقاوم را نشان می‌دهد. نمودار (ب) الگوی بیان *LTP2* در دو رقم حساس و مقاوم را نشان می‌دهد.



شکل ۶- الگوی بیان ژن *LTP* در دو رقم حساس Nil4 و مقاوم Nil1 گندم در سه تیمار زمانی ۸، ۲۴ و ۷۲ ساعت پس از آلودگی با بیماری *Fusarium graminearum*. نمودار (الف) الگوی بیان ژن *LTP7* در دو رقم حساس و مقاوم را نشان می‌دهد. نمودار (ب) الگوی بیان ژن *LTP3* در دو رقم حساس و مقاوم را نشان می‌دهد.

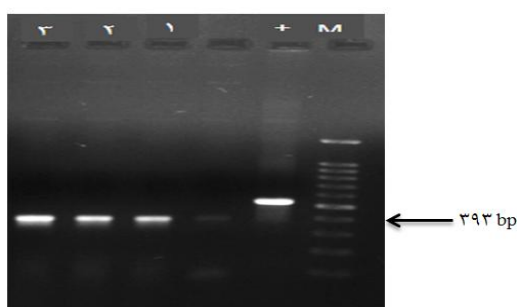
در اثر آلودگی با ویروس موزاییک تنباکو افزایش می‌یابد و این میزان بیان در حالت ناسازگار در ۴۸ ساعت پس از آلودگی حداکثر میزان بیان را دارد ولی در حالت سازگار میزان بیان قابل توجهی ندارد. (Wang et al. 2004) نیز نشان دادند که پروتئین‌های جدا شده از گیاه لوبیا دارای فعالیت ضد میکروبی علیه قارچ‌هایی از قبیل *Fusarium oxysporum* و *Phythium aphaniderum* و باکتری گرم مثبت *Staphylococcus aureus* می‌باشد. (Kirubakaran et al. 2008) یک ژن *LTP* به نام *Ltp3F1* را از گندم استخراج کردند که دارای فعالیت ضد قارچی علیه قارچ *Blumeria graminis f.sp triticy* می‌باشد.

در مطالعه‌ای دیگر به بررسی نقش ژن *LTP* گندم در برابر مقاومت به سفیدک پودری پرداخته شد. در پیک‌های بدست آمده پس از آلودگی مشخص شد که *LTP1* در سه ساعت پس از آلودگی و *LTP2* پس از ۱۰ ساعت بیان می‌شوند. بیان *LTP1* بعد از نفوذ هیف‌های قارچ در رقم حساس کاهش نشان می‌دهد. در

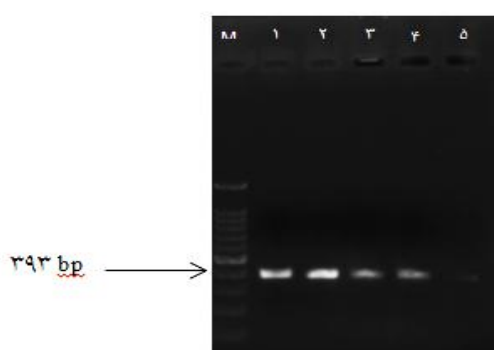
تفاوت در الگوی بیان ژن‌های *LTP* مرتبط با مقاومت در رقم حساس و مقاوم پس از آلودگی با قارچ می‌تواند نقش اصلی را در مکانیسم‌های مرتبط با مقاومت در گندم و جو را داشته باشد و این به دلیل تفاوت در زمان بیان ژن‌های مؤثر در مقاومت در رقم‌های حساس و مقاوم می‌باشد. پروتئین‌های انتقال دهنده چربی در مقادیر زیاد (چهار درصد پروتئین‌های محلول) در گیاهان عالی یافت می‌شوند. در بررسی‌های مختلف مشخص شده است که این پروتئین‌ها در پاسخ‌های دفاعی گیاهان و در افزایش مقاومت به همراه سایر ژن‌ها نقش دارند. (Molina et al. 1993) چهار نوع پروتئین *LTP* را از برگ‌های جو و یک نوع پروتئین *LTP* را از برگ ذرت جدا سازی کردند و نشان دادند که این پروتئین دارای فعالیت علیه پاتوژن‌های *Rhizoctonia*, *Clavibacter michiganensis*, *sonanacearum* و *Fusarium solani* می‌باشد.

(Park et al. 2002) با استفاده از روش نورتن بلات نشان دادند که میزان بیان ژن *CaLTP1* در گیاه فلفل (*Capsicum annuum*)

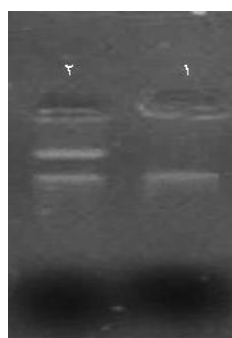
روی ژل آگارز ۰/۸ درصد بارگذاری شد (شکل ۸). همچنین برای تأیید پلاسمید برش خورده الکتروفورز انجام شد (شکل ۹). باکتری‌های نوترکیب به صورت کلونی‌های سفید بر روی محیط حاوی آنتی بیوتیک رشد کردند. پس از تشکیل کلونی‌ها برای تأیید کلونی‌های حاصل PCR کلونی انجام شد (شکل ۱۰). سپس برای تأیید سیستم بیانی *LTP2* هضم آنزیمی انجام شد (شکل ۱۱).



شکل ۷- تأیید تکثیر ژن *LTP2* با تکنیک PCR و الکتروفورز روی ژل یک درصد آگارز و رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید، M: مارکر ۱۰۰ جفت‌بازی، پلاسمید pJET1.2، ۱، ۲ و ۳ ژن مورد بررسی *LTP2*



شکل ۸- تأیید اندازه ژن استخراج شده از ژل با الکتروفورز روی ژل ۰/۸ درصد آگارز، M: مارکر ۱۰۰ جفت‌بازی، ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ ژن *LTP2*



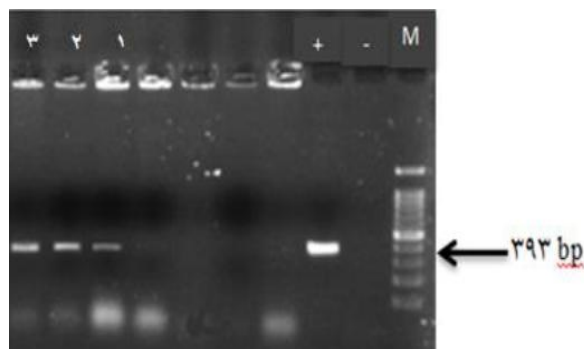
شکل ۹- تأیید برش پلاسمید pBISN1-IN با آنزیم *HindIII*: ۱- پلاسمید برش خورده، ۲- پلاسمید برش نخورده

این بررسی مشخص شد که *LTP1* بیان بیش‌تری در پاسخ به سفیدک پودری نشان می‌دهد و بیان آن در مقایسه با *LTP2* سریع‌تر اتفاق می‌افتد.

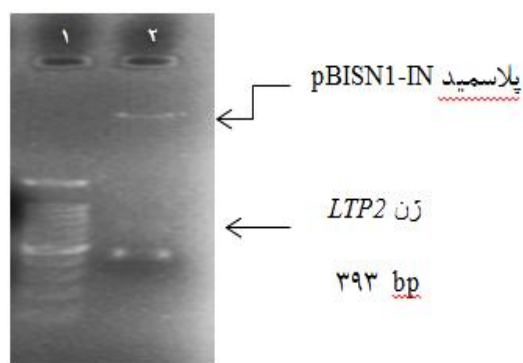
آزمایشات مختلف نشان می‌دهد که پروتئین‌های *LTP* نقش مهمی در دفاع گیاه در برابر عوامل بیماری‌زای ویروسی، باکتریایی و قارچی بازی می‌کنند. مطالعات قبلی نشان می‌دهد که بیان بالای ژن *LTP* در صنوبر موجب افزایش مقاومت در برابر قارچ آلترناریا و آنترائکوز مرکبات می‌شود (Jia et al. 2010). در مطالعه‌ای با انتقال ژن *LTP* به گوجه فرنگی و توتون مقاومت به بیماری نقطه قهوه‌ای و پژمردگی باکتریایی در توتون و پژمردگی ورتیسیلیومی و سوختگی اولیه گوجه فرنگی در گیاهان تراریخته افزایش یافت (Liu 2012).

پروتئین‌های *LTP* دارای فعالیت ضد قارچی نیز هستند. مشخص شده‌است که *LTP*‌ها با افزایش نفوذپذیری غشا، مانع رشد و گسترش میسلیوم و نیز مهار جوانه زنی اسپور قارچ‌ها می‌شوند. در همه‌ی پپتیدهای ضد میکروبی اسیدآمین‌های هیدروفوب و کاتیونی به صورت خوشه‌ای و مستقل از مولکول سازمان یافته‌اند. این ویژگی یک سطح با بار مثبت ایجاد می‌کند که موجب اتصال به دومین‌هایی با بار منفی و یا گیرنده‌های منفی سطح غشا قارچ می‌شود، در نتیجه موجب تغییر و بی‌ثباتی غشا و مرگ سلول‌های قارچی خواهد شد (Hamilton 2004). در بررسی *LTP1* آفتابگردان مشخص شد که فعالیت این ژن رشد اسپورهای قارچ را مهار می‌کند (Regente et al. 2005). می‌توان نتیجه گرفت که گروه‌های ژنی *LTP* در انواع تنش‌های زنده از جمله بیماری‌های قارچی در افزایش تحمل گیاهان نسبت به بیماری نقش مؤثری دارند و نیز به عنوان یک ژن کمکی در کنار سایر ژن‌های درگیر در افزایش مقاومت گیاهان در تنش‌ها مؤثر می‌باشند. بنابراین نه تنها بیان بالای ژن در رقم مقاوم بلکه القای بیان ژن هم می‌تواند در ایجاد مقاومت نقش مؤثری داشته باشد و همچنین تجزیه الگوی بیان این ژن‌ها می‌تواند روشی صحیح و سریع برای تفکیک ارقام مقاوم از حساس باشد.

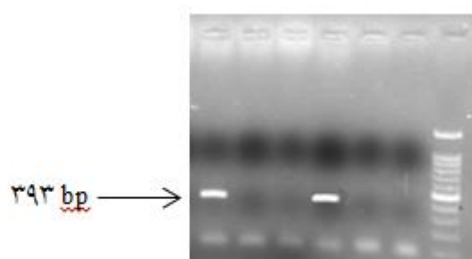
محصول PCR بر روی ژل آگارز یک درصد در شکل زیر نشان داده شده است (شکل ۷). ژن *LTP2* تکثیر یافته با استفاده از کیت استخراج از ژل خارج و برای تأیید قطعه حاصل از استخراج بر



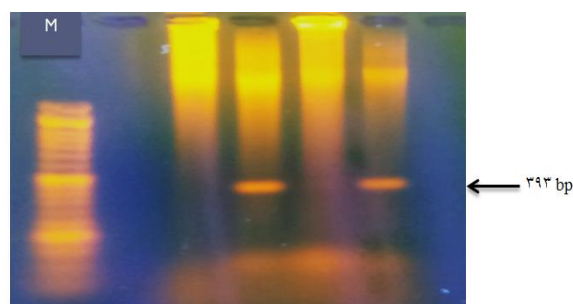
شکل ۱۰- تأیید کلونی‌های نو ترکیب در باکتری *E. coli* مارکر ۱۰۰ جفت-بازی، ۱، ۲ و ۳ ژن مورد بررسی *LTP2*



شکل ۱۱- هضم آنزیمی پلاسمید pBISN1-IN نو ترکیب؛ ۱- مارکر ۱۰۰ bp؛ ۲- پلاسمید برش خورده



شکل ۱۲- تایید کلونی‌های نو ترکیب باکتری *Agrobacterium tumefactions* سویه M.LBA4404: مارکر ۱۰۰ جفت بازی؛ ژن مورد بررسی: *LTP2*



شکل ۱۳- الکتروفورز محصولات RT-PCR روی ژل ۳ درصد و رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید؛ M: مارکر ۵۰ جفت بازی و محصول PCR ژن *LTP2*

به علت کاربرد بسیار زیاد ژن *LTP* در مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی محققان پژوهش‌های زیادی بر روی این پروتئین انجام داده‌اند. کلون کردن *LTP2* برنج تاکنون در وکتور 7zf-Pgем (Garcèa-Garrido et al. 1998) و در وکتور pBluescript SK (Xiaohui et al. 2007) انجام شده و در دیگر بررسی‌ها *LTP* گندم در وکتور Petdp (Elmorjani et al. 2004) و *LTP* لوبیا در وکتور Pcr2.1-TOPO کلون شده است (Monnet et al. 2001; Carvalho et al. 2006). اعتقاد بر این است که *LTP* کاندید مناسبی برای ساخت حسگرهای زیستی و کاربرد در رها سازی دارو می‌باشد. (Karimian et al. 2013) ژن *LTP2* برنج را جدا و خالص سازی نمودند. در این بررسی *LTP2* را به درون پلاسمید Pgex-6p-2 کلون کردند. آن‌ها معتقدند که کاربرد انواع نو ترکیب و جهش یافته *LTP2* می‌تواند راه را برای ساخت حسگرهای زیستی و رها سازی دارو، هموار سازد. در این پژوهش ژن *LTP2* رقم گندم فلات در وکتور pBISN1-IN کلون شد. از این پلاسمید می‌توان در مطالعات بعدی مانند بررسی اثر ضد میکروبی آن بر پاتوژن‌های گیاهی و دامی و نیز بررسی تنش‌های غیر زنده استفاده نمود.

در این بررسی برای تأیید کلونی‌های نو ترکیب اگر باکتریوم PCR کلونی انجام شد (شکل ۱۲). به منظور تأیید رونویسی از ژن *LTP2*، PCR انجام شد. وجود باند ۳۹۳ جفت بازی تأیید کننده رونویسی از ژن *LTP2* (شکل ۱۳) در سطح RNA است. پروتئین کل محلول در گیاه از انتقال پلاسمید نو ترکیب به سلول‌های گیاهی به دست آمده و به صورت جداگانه مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۱). در این پژوهش با استفاده از نمونه‌های پروتئینی به دست آمده، آزمون کاهش گلوکز نیز انجام گرفت و از آنجایی که در طی مراحل آزمایش اثر گلوکز گیاه صفر شده بود لذا گلوکز تولیدی در اثر فعالیت ژن گزارشگر *LicBM2* ایجاد شد ولی در تیمارهای شاهد هیچ گلوکزی تولید نشد و در تجزیه حذف شد (جدول ۲). آزمایشات بر پایه بیان موقت در گل‌ها نشان داده است که بیان ژن گزارشگر در تمام لایه‌های سلولی رخ می‌دهد (Shang et al. 2007). در یک بررسی از ژن گزارشگر *GUS* و پروموتور CaMV35S برای تولید گیاهان تراریخته مانند اریکده استفاده شد (Da Silva et al. 2011).

جدول ۱- آزمون *t* پروتئین محلول در برگ لوبیا (میکروگرم در میکرولیتر)

تیمار	t	درجه آزادی
برگ تزریق شده با پلاسמיד	۶/۲۸۷**	۱۴
برگ تزریق شده بدون پلاسמיד		

** معنی دار در سطح احتمال یک درصد

جدول ۲- آزمون *t* میزان پروتئین فعال در برگ لوبیا (میکروگرم در میکرولیتر)

تیمار	t	درجه آزادی
برگ تزریق شده با پلاسמיד	۵/۲۷۱**	۱۴
برگ تزریق شده بدون پلاسמיד		

** معنی دار در سطح احتمال یک درصد

در یک تحقیق به بررسی اگرواینفیلتریشن بر روی برگ و گلبرگ گیاه بادام با استفاده از سویه اگروباکتریوم LBA4404 پرداخته شد و مشخص شد که بیان موقت در گلبرگ های بادام بیش تر از برگ بادام بود (Heidari Reyhani et al. 2014).

در یک بررسی اگرواینفیلتریشن با استفاده از اگروباکتریوم سویه EHA105 و AGL1 و پلاسמיד pCambia1304 در گلبرگ و کاسبرگ گل ارکیده انجام شد. در این بررسی، بهترین غلظت سوسپانسیون باکتری یعنی OD₆₀₀ بین ۰/۵ تا ۲ و بهترین زمان برای بررسی بیان موقت در گلبرگ و کاسبرگ ارکیده سه روز پس از اینفیلتریشن به دست آمد (Pinthong et al. 2014). در یک بررسی (Wroblewski et al. 2005) نشان داده شد که سطح بیان در مراحل مختلف نمو و سنین مختلف در گیاهان متفاوت است و تزریق سوسپانسیون به برگ های جوان قبل از گسترش و نیز برگ های پیر دارای بیان ضعیف می باشد. زنده بودن سلول برای بیان موقت ضروری است. هنگامی که سلول های گیاهی بافت مورد استفاده از لحاظ فیزیولوژیکی در مرحله فعال تری باشند، میزان بیان ژن افزایش می یابد (Jung Kim et al. 2009).

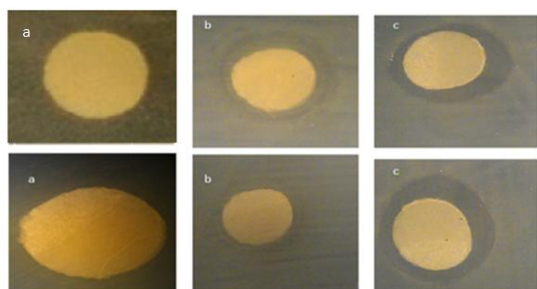
اثر ضد باکتریایی پروتئین حاوی *LTP2* و *LicBM2* با هاله تشکیل شده در اطراف دیسک در زمان های ۶، ۱۲ و ۱۶ مشخص شده است (شکل ۱۴). میانگین اندازه قطر هاله ها در زمان های مختلف برای دیسک پروتئین نو ترکیب و دیسک های کنترل منفی و مثبت (شکل ۱۵) ارائه شده است. به دلیل اینکه آنتی بیوتیک اثر کشندگی بر باکتری داشت و قطر هاله با گذر زمان افزایش زیادی

داشت، فقط برای مقایسه با نمونه پروتئین گیاهی از آن استفاده شد و داده های مربوط به قطر هاله ایجاد شده در اطراف دیسک آنتی بیوتیک در آنالیزها مورد استفاده قرار نگرفت. همان طور که در جدول تجزیه واریانس مشاهده می شود اثر تیمار (پروتئین نو ترکیب شیمر) در سطح یک درصد معنی دار می باشد (جدول ۳).

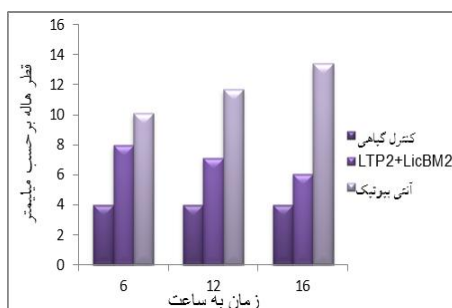
جدول ۳- جدول تجزیه واریانس اندازه قطر هاله در زمان های مختلف (میلی-متر)

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات (MS)
تیمار	۱	۴۱/۹۲**
زمان	۲	۱/۴۲**
تیمار × زمان	۲	۱/۳۷**
خطا	۱۲	۰/۰۰۲

** معنی دار در سطح احتمال یک درصد



شکل ۱۴- قطر هاله های تشکیل شده در اطراف نواحی رشد باکتری. ردیف اول پس از زمان شش ساعت و ردیف دوم پس از زمان ۱۲ ساعت. به ترتیب: a، کنترل منفی (نمونه کنترل گیاهی برگ تزریق شده با محلول اینفیلتریشن فاقد پلاسמיד)، b: پروتئین نو ترکیب شیمر (غلظت ۱۲ میکروگرم در میکرولیتر)، c: کنترل مثبت (آنتی بیوتیک اریترومايسين ۰/۵ درصد). هر دیسک حاوی ۲۰ میکرولیتر است.



شکل ۱۵- میانگین قطر هاله تشکیل شده در اطراف دیسک های پروتئین نو ترکیب، کنترل مثبت (آنتی بیوتیک اریترومايسين) و کنترل منفی (عصاره پروتئینی گیاه بدون *LTP2* و لیکناز)

LTP و بیان بالای آن در تنباکوی تراریخته و آراییدوپسیس با *LTP* جدا شده از جو و مقاومت آن‌ها به باکتری *P.syringae* به اثبات رسیده است (Wang et al, 2004).

همانطور که مشاهده می‌شود اثر زمان نیز در جدول تجزیه واریانس در سطح یک درصد معنی‌دار شد. با گذشت زمان و اندازه‌گیری هاله پس از شش ساعت اندازه هاله کوچک‌تر شد. برای اندازه‌گیری قطر هاله در زمان‌های ۱۲ و ۱۶ ساعت نیز اقدام شد اما پس از گذشت این زمان اندازه کوچک‌تر شد و باکتری روی دیسک را کاملاً پوشانید. این امر نشان می‌دهد که پروتئین نو ترکیب فقط اثر بازدارندگی بر باکتری داشته و همانند آنتی-بیوتیک اثر کشندگی ایجاد نمی‌کند و با مرور زمان اثر بازدارندگی آن نیز کاهش پیدا می‌کند. این در حالی است که آنتی-بیوتیک همچنان خاصیت ضد باکتریایی خود را حفظ می‌کند. همچنین اثر متقابل تیمار در زمان نیز در سطح یک درصد معنی‌دار شده است. یک هدف مهم بهبود گیاهان از طریق مهندسی ژنتیک، استفاده از ژن‌های جدید برای توسعه گیاهان زراعی مقاوم در برابر بیماری است. بنابراین می‌توان گفت که گیاهان تراریخته دارای ژن *LTP* می‌توانند در برابر تنش‌های زنده و غیر زنده مقاوم باشند.

نتایج نشان می‌دهد که میانگین قطر هاله تشکیل شده در اطراف دیسک پروتئین *LTP2* و لیکیناز ۷/۰۶۶ میلی‌متر است که نسبت به میانگین اطراف هاله در عصاره گیاهی (کنترل منفی) با ۴/۰۱۴ میلی‌متر، بیش‌تر می‌باشد. که این امر را می‌توان به اثر ضد پاتوژنی *LTP2* (Kader 1996) و لیکیناز (Sotchenkov et al, 2005) نسبت داد.

دیواره سلولی باکتری‌ها ساختمان بسیار پیچیده‌ای دارد. باکتری استفیلوکوکوس به‌عنوان یک باکتری گرم مثبت بی‌هوازی است دیواره سلولی این باکتری شامل پپتید و گلیکان، فسفولیپید، پروتئین و گلیکولیپید می‌باشد. وجود بتاگلوکان‌ها در دیواره سلولی باکتری‌ها به اثبات رسیده است و پیوندهای بتا یک و چهار گلوکان در دیواره بسیاری از باکتری‌ها وجود دارد (Taj bakhsh, 2010).

پروتئین‌های *LTP* در سطح بالایی القا و به پاتوژن‌های مختلف گیاهی پاسخ می‌دهند. ژن *LTP* در آلودگی با قارچ *Rhynchosporium secalis* در ارقام حساس افزایش بیان زیادی نشان می‌دهد و همچنین در آلودگی با باکتری *P.syringae* و نیز در آلودگی با ویروس موزائیک گل کلم در آراییدوپسیس و زانتوموناس در فلفل افزایش بیان نشان داد. خاصیت ضد میکروبی

منابع

- Abdeev RM, Goldenkova IV, Musiyshuk KA and Piruzian E S (2003) Expression of a thermostable bacterial cellulase in transgenic tobacco plants, Russian Journal of Genetics. 39:300-305.
- Arndel VV, Vergnolle C, Cantrel C and Kader JC (2000) Lipid transfer protein are encoded by a small multigene family in *Arabidopsis thaliana*, Plant Science. 157:1-12.
- Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC and Turck M (1996) Antibiotic susceptibility testing by standardized single disc method, Journal Clinical Pathology. 44:493-496.
- 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.
- Broekaert WF, Cammue BPA, Debolle MFC, Thevissen K, Desamblanx G and Osborn RW (1997) Antimicrobial peptides from plants, Critical Reviews in Plant Sciences. 16: 297-323.
- Carvalho A, Filho G, Ferreira B, Branco AT, Araújo IS, Fernandes KV, Retamal CA and Gomes VM (2006)

- Cloning and characterization of a cowpea seed lipid transfer protein cDNA: expression analysis during seed development and under fungal and cold stresses in seedlings' tissues, Journal plant physiology biochemistry. 44:732-742.
- Carvalho A and Gomes V (2007) Role of plant lipid transfer proteins in plant cell physiology, Journal Peptide. 28:1144-1153.
- Da Silva JA, Chin DP, Van PT and Mii M (2011) Transgenic orchids, science horticulture journal. 130:673-680.
- Elmorjani KH, Lurquin V, Lelion A, Rogniaux H and Marion D (2004) A bacterial expression system revisited for the recombinant production of cystine-rich plant lipid transfer proteins, Biochemical Biophysical Research Community. 316:1202-1209.
- Fido RJ, Mills ENC, Rigby NM and Shewry PR 2004. Protein extraction from plant tissues. Methods In Molecular Biology-Clifton Then Totowa 244:21-28.

- García-Garrido J, Menossi M, Puigdomènech P, Martínez-Izquierdo J and Delseny M (1998) Characterization of a gene encoding an abscisic acid-inducible type-2 lipid transfer protein from rice, FEBS Letters. 428:193-199.
- Habibi M (2012) This pattern of expression of candidate genes for disease resistance Septoriose leaf in wheat (*Triticum aestivum*). Department of Agriculture University of Shahrekord, Iran. (In Farsi).
- Hamilton JA (2004) Fatty acid interaction with proteins: what X-ray crystal and NMR solution structures tell us, Progress in Lipid Research. 43:177-199.
- Hammami R, Ben Hamida J, Vergoten G and Fliss I (2009) PhytAMP: a database dedicated to antimicrobial plant peptides, Nucleic Acids Research 37: D963-968.
- Heidari Reyhani A (2014) Optimization of transient expression by Agrobacterium infiltration in almonds, Thesis Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Shahrekord. (In Farsi).
- Jia YD, Russell CT, Khurana KK, Ma YJ, Kurth W and Gombosi TI (2010) Interaction of Saturn's magnetosphere and its moons: 3. Time variation of the Enceladus plume, Journal of Geophysical Research. 115:1-13.
- Jung Kim AE, Konbaek AE and Chung-Mo P (2009) Optimization of conditions for transient Agrobacterium-mediated gene expression assays in Arabidopsis, Plant Cell Reports. 28:1159-1167.
- Kader JC, (1996) Lipid transfer proteins in plants, Plant Molecular Biology. 47:627-654.
- Kader C, Vignols F, Wigger M, García JM, García F, Grellet J and Delseny M (1997) Rice lipid transfer protein (LTP) genes belong to a complex multigene family and are differentially regulated, Gene. 195:177-186.
- Karimiyan M, Miroliaei M, Ghaedi K, Ehsanpour AS, Zahra'i G (2012) Cloning and expression of transporter proteins, lipids. Iranian rice. Genetics 3 1719-1729. (In Farsi).
- Kirubakaran I, Begum SMS, Ulaganathan K and Sakthivel N (2008) Characterization of a new antifungal lipid transfer protein from wheat. Plant Physiology and Biochemistry, 46: 918-927.
- Komakhin RA, Abdeeva IA, Salehi Dzhuzani GR, Goldenkova IV and Zhuchenko AA (2005) Thermostable lichenase as a translational reporter, Russian Journal of Genetics. 41:23-31.
- Lee JY, Min K, Cha H, Hwang DH, and Suh SW (1998) Rice nonspecific lipid transfer protein: the 1.6 Å crystal structure in the unliganded state reveals a small hydrophobic cavity, Journal Molecular Biology. 276:437-48.
- Lee MW and Yang Y (2008) Transient expression assay by Agrobacterium infiltration of leaves, Methods in molecular biology. 323:215-223.
- Liu D (2012) Transformation of Lipid Transfer Protein-Like Antimicrobial Protein LTP Gene from *Leonurus japonicus* into Wheat. Agricultural Science Paper.
- Miller GL (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, Analytical Chemistry. 31:420-428.
- Molina A, Segura A and Garcia-Olmedo F (1993) Lipid transfer proteins (nsLTPs) from barley and maize leaves are potent inhibitors of bacterial and fungal plant pathogens, FEBS Letter. 316:119-122.
- Monnet F, Dieryck W, Boutrot F, Joudrier P and Gautier M (2001) Purification, characterisation and cDNA cloning of a type 2 (7 kDa) lipid transfer protein from *Triticum durum*, Journal Plant Science. 161:747-755.
- Park CJ, Shin R, Park JM, Lee GJ, You J and Paek KH (2002) Induction of pepper cDNA encoding a lipid transfer protein during the resistance response to tobacco mosaic virus, Plant Molecular Biology. 48: 243-254.
- Pinthong R, Sujipuli K and Ratanasut K (2014) Agrobacterium infiltration for transient gene expression in floral tissues of *Dendrobium Sonia* Earsakul, Journal of Agricultural Technology. 10:459 -465.
- Regente MC, Giudici AM, Villalain JL and de la Canal L (2005) The cytotoxic properties of a plant lipid transfer protein involve membrane permeabilization of target cells, Letter Applied Microbiol. 40:183-189.
- Rubio-Piña JA, and Zapata-Pérez O (2011) Isolation of total RNA from tissues rich in polyphenols and polysaccharides of mangrove plants, Electronic Journal of Biotechnology. 1-8.
- Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T (1989) Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Ryals J, Uknes S and Ward E (1996) Systemic Acquired Resistance. Plant Physiology 1994. 104: peptides 1109-1112.
- Sels J, Mathys J, Coninck BMA, Cammue BP and Bolle A (2008) Plant Pathogenesis-related protein (PR) Protein: A Focus on PR Peptide, Plant Physiology and Biochemistry. 46: 941-950.
- Wang SY, Wu JH, Ng TB, Ye XY and Rao PF (2004) A non specific lipid transfer protein with antifungal and antibacterial activities from mung bean, Peptides 25: 1235-1242.
- Shang YE, Schwinn EK, Bennett JM, Hunter AD, Waugh LT, Pathirana NN, Brummell AD, Jameson EP and Davies MK (2007) Methods for transient assay of gene function in floral tissues, Plant Methods. 3:1-12.
- Sotchenkov DV, Goldenkova IV, Mirakhorli N and Volkova LV (2005) Modification of the sunflower defensin SD2 gene sequence and its expression in bacterial and yeast cells, Russian Journal of Genetics 41:1194-1201.
- Tajbakhsh H (2010) General Bacteriology, Publications Institute of Tehran University, Tehran University.
- van Loon L and van Strien E (1999) The families of pathogenesis related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins, Physiological and Molecular Plant Pathology. 55:85-97.
- Weigel D and Glazebrook J (2002) Arabidopsis: a laboratory manual Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Wroblewski T, Tomczak A, and Michelsmore R (2005) Optimization of Agrobacterium-mediated transient assays

of gene expression in lettuce, tomato, and Arabidopsis. Plant Biotechnol Journal. 3:259-273.

Xiaohui L, Tingting L and Shuliang Y (2007) A collection of 10,096 indica rice full-length cDNAs reveals highly

expressed sequence divergence between *Oryza sativa* indica and japonica subspecies, Plant Molecular Biology. 65:403-415.