ژنتیک نوین
دوره یازدهم، شماره ٤، زمستان ١٣٩٥
صفحه ٦٠٣ - ٥٩١

کلون‌سازی و بیان ژن *LTP2* گندم فلات در گیاه لوبیا و بررسی اثرات ضد میکروبی آن

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

پریا آرین‌پور[١]، ندا میرآخورلی*[١]، فریبا رفیعی[١]

١- به‌ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، استادیاران، دانشگاه شهرکرد

Arianpur P[1], Mirakhorli N[*1], Rafiei F[1]

1- MSc Student, Assistant Professors, University of Shahrekord

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

(تاریخ دریافت: ٩٣/١٢/١٠ - تاریخ پذیرش: ٩٥/١٠/٢٦)

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-05-03]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1395.11.4.12.1]

چکیده

پروتئین‌های انتقال دهنده لیپید، پپتیدهای کوچک و غنی از سیستئین بوده و بر اساس وزن مولکولی به دو گروه *LTP1* و *LTP2* تقسیم می‌شوند. این پروتئین‌ها دارای فعالیت بیولوژیکی مختلف بوده و همچنین در مکانیسم دفاعی گیاهان نیز نقش دارند. با بررسی داده‌های میکرواری حاصل از آزمایش‌های مختلف مشخص شده که ژن‌های *LTP* در برابر تنش‌های زیستی و غیر زیستی افزایش یا کاهش بیان داشته‌اند. در این تحقیق به‌منظور بررسی و مشخص کردن میزان بروز و تأثیر ژن *LTP* در مقاومت گندم نان و جو نسبت به بیماری *Fusarium graminearum*، *Puccinia*، *Ustilago* چهار کتابخانه میکرواری با ایزولاین مقاوم و حساس از پایگاه داده NCBI گرفته شده و نمودار الگوی بیانی ژن‌های *LTP* رسم شد. رسم نمودار نشان داد که ژن‌های مختلف *LTP* در ارقام مقاوم و حساس نسبت به این بیماری‌ها اختلاف بیان نشان داده‌اند. در نتیجه ژن *LTP* را می‌توان به‌عنوان 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 مکانیسم‌های 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 ترنسفرم شده و لایگیشن انجام شد. پلاسمید نوترکیب در باکتری *E.coli* سویه DH5α کلون شد. برای بررسی کارایی سیستم بیانی ساخته شده ابتدا پلاسمید نوترکیب استخراج و به اگروباکتریوم سویه LBA4404 منتقل و سپس با استفاده از روش اگروانفیلتریشن به گیاه لوبیا 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 نوترکیب بیان و عملکرد پروتئین تأیید شده و پروتئین شیمری خاصیت ضد باکتریای بر روی *Staphylococcus aureus* را نیز نشان داد.

واژه‌های کلیدی

سیستم تظاهر
میکرواری
LTP

مقدمه

دفاع گیاه در برابر پاتوژن در نتیجه خصوصیات ساختاری و بیان ژن‌های درگیر در مقاومت می‌باشد. در پاسخ‌های دفاعی معمولا چندین ژن در مکانیسم مقاومت نقش دارند. واکنش اولیه گیاه به آلودگی توسط عوامل بیماری‌زا به‌وسیله تغییرات متابولیکی مقاومت هم‌چون مقاومت اکتسابی، مقاومت سیستمیک (SAR)[1] و مقاومت سیستمیک القایی[2] بروز داده می‌شود. فعالیت و حضور پروتئین‌های مرتبط با SAR ارتباط مستقیمی با سطح مقاومت و حساسیت گیاه دارد (Ryals et al. 1996). پروتئین‌های درگیر در مقاومت دسته‌ای از پروتئین‌ها محسوب می‌شوند که در اثر حمله پاتوژن‌ها و یا مواد مرتبط با بیمارگر همچون الیسیتورها در گیاه تولید می‌شوند (Van Loon 1999). بیان این پروتئین‌ها در گیاه به‌صورت اختصاصی انجام می‌شود. پپتیدهای ضد میکروبی، مولکول‌های کوچکی هستند که از نظر اندازه بین ۱۰ تا ۱۰۰ اسیدآمینه متفاوتند. توالی اسیدآمینه‌ای در آن‌ها به شدت حفظ شده‌است و میزبان را نسبت به مجموعه‌ای از میکروب‌های اطرافش محافظت می‌کند. این پپتیدها در همه موجودات وجود دارند (Broekaert et al. 1997; Hammami et al. 2009). آن‌ها بر اساس ساختار اولیه به هفت خانواده تقسیم می‌شوند که شامل تیونین‌ها، دفنزین‌ها، پروتئین‌های انتقال دهنده لیپید، شبه پروتئین‌های سنگین، کنوتین‌ها، اسناکین‌ها وسیسلوتیدها می‌باشند (Broekaert et al. 1997).

پروتئین‌های انتقال دهنده‌ی لیپید با نام اختصاری LTP[3]، پپتیدهای کوچک و غنی از سیستئین و کاتیونی می‌باشند. این پروتئین‌ها در حدود ۱۰-۷ کیلو دالتون وزن دارند و براساس وزن مولکولی به دو گروه LTP1 و LTP2 تقسیم می‌شوند که وزن مولکولی آن‌ها به ترتیب ۹ و ۷ کیلو دالتون می‌باشد (Lee et al. 1998). نقطه ایزوالکتریک آن‌ها در حدود ۱۰-۸/۸ با توجه به نوع گیاه متفاوت است (Kader 1996; Sels et al. 2008). این پپتیدها به‌دلیل توانایی که در انتقال فسفولیپیدها از محل سنتز به غشای سلولی دارند به این نام خوانده می‌شوند. توالی آمینواسیدی این پپتیدها در گیاهان مختلف متفاوت می‌باشد، ولی در همه آن‌ها هشت سیستئین به‌صورت ثابت وجود دارد که تشکیل چهار پل دی سولفیدی را می‌دهند. ساختار سه بعدی این پروتئین‌ها نشان می‌دهد که دارای چهار مارپیچ α و یک ناحیه‌ی انتهایی c می‌باشند که توسط باندهای دی سولفیدی به‌صورت محکم به هم متصل می‌شوند (Kader et al. 1997). مهم‌ترین خصوصیت LTPها حضور یک حفره‌ی هیدرفوب در مرکز مولکول می‌باشد که محل اتصال مولکول‌های آبگریز و اسیدهای چرب است و آن‌ها را در شرایط *in vitro* جابه‌جا می‌کند (Zachowski et al. 1998; Hamilton 2004). عملکرد این پروتئین‌ها چندان اختصاصی نیست، به همین دلیل به آن‌ها non-specific LTP هم می‌گویند (Carvalho et el. 2007). LTPها توسط خانواده‌های کوچک چند ژنی کد می‌شوند و الگوی بیان ژن LTP در گیاه تحت تأثیر عوامل مختلفی مانند مرحله‌ی رشد گیاه، آناتومی و تنش‌های زنده و غیر زنده قرار می‌گیرد (Arnodel et al. 2000). این پروتئین‌ها دارای فعالیت‌های بیولوژیک مختلف می‌باشند (Hamilton 2004).

مشخص شده که LTPها در تجمع کوتین و استحکام دیواره نقش دارند. LTPها در طی پروسه جنین‌زایی سوماتیکی ترشح می‌شوند و نقش آن‌ها شکل دادن لایه محافظتی اطراف جنین جوان می‌باشد. هم‌چنین در گذاشتن مواد لیپوفیلیک در اندام گل نیز نقش دارند. در سلول‌های جنینی و ایجاد مونومرهای کوتین مورد نیاز بوده، در طویل شدن لوله گرده، جنین‌زایی و نیز پاسخ به تنش‌های زنده و غیر زنده از قبیل شوری، عناصر سنگین، گرما، سرما و کمبود آب مؤثر هستند. مشخص شده‌است که در ساقه گوجه فرنگی تیمار شده با مانیتول یا ABA ژن‌های LTP بیان می‌شوند (Kader et al. 1997).

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

[1] systemic acquired resistance
[2] induced systemic resistance
[3] lipid transfer protein

[DOR: 20.1001.1.20084439.1395.11.4.12.1]
[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-05-03]

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

اطلاعات در مورد فعالیت‌های فیزیولوژیکی و مولکولی در تنظیم بیان ژن‌های گیاهان بیمار در دسترس نیست. بنابراین تجزیه و تحلیل بیان ژن در پاسخ به پاتوژن‌ها در رقم‌های حساس و مقاوم مهم است. هم‌چنین برای شناخت نقش‌های مختلف مکانیسم مولکولی در مقاومت حائز اهمیت است. در این مطالعه با استفاده از داده‌های میکرواری به بررسی الگوی بیان ژن *LTP* گندم و جو در برابر آلودگی به بیماری‌های قارچی فوزاریوم و زنگ پرداخته شده است. هم‌چنین ژن *LTP2* تحت کنترل سیستم بیانی گیاهی کلون شد و کارایی این سیستم با انتقال آن به گیاه لوبیا تایید وخاصیت ضد میکروبی پروتئین نوترکیب بررسی شد.

مواد و روش‌ها

چهار کتابخانه‌ی داده‌های میکرواری مربوط به بررسی مقاومت گندم نان و جو نسبت به بیماری‌های *Fusarium graminearum*، *Puccinia* و *Ustilago* از پایگاه داده NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) با پسوند CELL دریافت شد که به‌ترتیب عبارتند از: کتابخانه‌ی اول مربوط به بررسی مقاومت گندم نان نسبت به بیماری *Fusarium graminearum* با (GEO accession: GSE43706)، این آزمایش در سه تیمار زمانی ۸، ۲٤ 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 شده‌است. کتابخانه دوم مربوط به بررسی مقاومت گندم نسبت به بیماری فوزاریوم با (GEO accession: GSE28973) که در سه تیمار زمانی ۳، ۸ و ۲٤ 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 و رقم حساس yr5 گندم (GEO accession: GSE31753) در آلودگی با بیماری *Puccinia* در چهار تیمار زمانی ٦، ١٢، ٢٤ و ٤٨ ساعت پس از آلودگی در سه تکرار به‌همراه نمونه شاهد بود. کتابخانه چهارم مربوط به بررسی مقاومت گیاه جو نسبت به بیماری فوزاریومی FHB (GEO accession: GSE33398) در دو رقم حساس Wild و رقم مقاوم Mutant در سه تیمار زمانی و در سه تکرار دانلود شد. کتابخانه‌های حاصل از پایگاه داده در تیمارهای زمانی مختلف و به‌همراه نمونه‌های شاهد بررسی شدند. داده‌های خام میکرواری با استفاده از نرم‌افزار Expression Console روش RMA نرمال سازی شدند. جهت تجزیه‌ی آماری داده‌ها میکرواری نرمال شده از نرم‌افزار Flexarray استفاده شد و داده‌ها با آزمون t-test و p-value کوچکتر از ۰/۰۵ بررسی شدند. سپس پروب‌ست های LTP با چیپ‌های میکرواری گندم و جو در میان ژن‌هایی که تغییرات بیانی نسبت به شاهد نشان دادند انتخاب و الگوی بیانی آن‌ها رسم شد.

در این مطالعه از گیاه لوبیا و از باکتری‌های *E.coli* سویه DH5α و باکتری *Agrobacterium tumefaciens* سویه LBA4404 به‌عنوان میزبان‌های حد واسط استفاده شد. ویژگی‌های پلاسمید مورد استفاده در شکل ۱ ارائه شده‌است.

پلاسمید pBISN1-IN با اندازه ۱۳/۱ کیلو جفت باز دارای ژن مقاومت به کانامایسین و پروموتر CaMV35s می‌باشد. 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-۱،۳-۱،٤- glucanase) باکتری گرمادوست *Clostridium thermocellum* به‌دست آمده است که پیوندهای مجاور ۱،۳ - β و ۱،٤ – β را در پلی‌گلوکان‌ها (لیکینان) تجزیه می‌نماید.

LB	pnos	*nptII*	Nos	P35s	LeB4	*Hind*III	*LicBM2*	KDEL	PA	RB

شکل ۱- شکل شماتیک ناحیه T-DNA در ترکیب پلاسمید pBISN1-IN. P35s: پروموتر35s ویروس موزاییک گل کلم (35sCaMV)؛ LeB4: پپتید رهبر ژن لگومین B گیاه لوبیا که باعث تجمع پروتئین در شبکه آندوپلاسمی می‌شود؛ KDEL: توالی چهار پپتیدی هدایتگر پروتئین به شبکه آندوپلاسمی؛ PA: سیگنال پلی‌آدنیلاسیون؛ Pnos: پروموتر ژن nos؛ *nptII*: ژن مقاومت به کانامایسین؛ nos: خاتمه‌دهنده مربوط به ژن *nos*؛ ترکیب پلاسمیدی: باعث تجمع پروتئین در شبکه آندوپلاسمی می‌شود.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-05-03]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1395.11.4.12.1]

LB	pnos	*nptII*	Nos	P35s	LeB4	*Hind*III	*LTP2*	*LicBM2*	KDEL	PA	RB

شکل ۲- ساختار پلاسمید نوترکیب

در اثر تجزیه مواد پلی‌ساکاریدی مثل لیکینان، قندهای ساده احیا شونده آزاد می‌شوند که میزان آن‌ها را می‌توان به‌طور کمی و کیفی به کمک مواد رنگی اندازه‌گیری و مشخص نمود. ژن *licBM2* می‌تواند به‌عنوان یک ژن گزارشگر و مارکر انتخاب‌گر با حساسیت و دقت بالا در زیست‌شناسی مولکولی برای انتخاب سلول‌های تراریخته و بررسی میزان بیان ترانسژن استفاده شود. در ضمن این ژن گزارشگر از نظر ایمنی زیستی، جهت تولید گیاهان تراریخته امن می‌باشد (Komakhin et al. 2005). ژن *LTP2* مربوط به گندم نان (*Triticum aestivum*) رقم فلات است که توالی این ژن در پایگاه داده NCBI با (JQ621901) Accession number: ثبت شده‌است (Habibi 2011).

به‌منظور ساخت سیستم بیانی pBISN1-IN-LTP2 ابتدا برای تکثیر ژن *LTP2* گندم کلون شده در پلاسمید pJET1.2 پرایمرهای اختصاصی پیشرو و پسرو به‌ترتیب با توالی‌های LTP2 F: 5′ -CGCGAAGCTTATGGCTCGAGTTTCA - 3′ و LTP2 R: 5′ - CGCGAAGCTTTCAGTGGATCTTAGAGC - 3′ با استفاده از توالی ژن طراحی شد و به‌منظور همسانه سازی ژن *LTP2* در پلاسمید pBISN1-IN توالی آنزیم برشی *Hind*III در دو پرایمر رفت و برگشت اضافه شد. همچنین از این جفت پرایمر برای تأیید گیاهان تراریخته استفاده شد.

به‌منظور تکثیر ژن *LTP2* موجود در پلاسمید pJET1.2 با پرایمر طراحی شده برای ژن *LTP2* واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (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.

به‌منظور هضم آنزیمی، چهار میکرولیتر از هرکدام 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 سانتی‌گراد قرار گرفت. در این مرحله نمونه‌ها به‌وسیله الکتروفورز بررسی شدند و سپس ژن و پلاسمید با آنزیم آلکالین فسفاتاز (CIAP) تیمار شد. سپس ژن *LTP2* به پلاسمید pBISN1-IN انتقال داده شد. ساختار پلاسمید نوترکیب در شکل ۲ نشان داده شده است، در این ساختار ژن *LTP2* باید قبل از ژن گزارشگر قرار گیرد.

انتقال پلاسمید نوترکیب به سلول‌های مستعد باکتری *E.coli* سویه DH5α به منظور تکثیر پلازمید، با استفاده از شوک حرارتی انجام گرفت (Sambrook et al. 1989). سلول‌های تراریخته حاوی پلاسمیدهای نوترکیب در محیط LB مایع رشد داده شد و سپس بر روی محیط انتخابی حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین کشت داده شدند. پس از تشکیل کلونی، حضور ژن *LTP2* در پلاسمید pBISNI-IN ابتدا با PCR کلونی و سپس به وسیله هضم آنزیمی با آنزیم *Hind*III 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 *Agrobactrium tumefaciense* سویه ٤٤٠٤ انتقال داده شد. پس از انجام ترانسفورماسیون، باکتری‌ها روی محیط کشت LB آگار حاوی آنتی بیوتیک کانامایسین و ریف آمپیسین کشت داده شدند. محیط‌های کشت به مدت ۳-۲ روز در درون انکوباتور در دمای ۲۸ درجه قرار گرفت تا کلونی‌های تراریخته تشکیل شوند. تأیید کلونی‌های نوترکیب به‌روش PCR کلونی با پرایمرهای ژن *LTP2* انجام شد. برای انجام اگروانفیلتریشن سوسپانسیونی از اگروباکتریوم تهیه و از روزنه‌های پشت برگ توسط سرنگ بدون سوزن به درون برگ تزریق شد (Wroblewski et al. 2005). برای تهیه سوسپانسیون اگروانفیلتریشن رسوب کشت شبانه اگروباکتریوم در محلول Infiltration medium (Lee et al. 2008) حاوی ۱۰۰ میکرومولار استوسیرینگون و آنتی‌بیوتیک کانامایسین (۵۰mg/L) و ریفامپیسین (۱۰۰ mg/L) حل شد و به مدت ٦-۵ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد مجددا کشت شد و سپس رسوب حاصل در محلول Induction medium (Lee et al. 2008) حاوی ۲۰۰ میکرومولار

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-05-03]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1395.11.4.12.1]

استوسیرینگون حل شد تا OD_{600}=۰/٤ به‌دست آید و در نهایت این سوسپانسیون به برگ‌های لوبیا تزریق شد.

بذر گیاه لوبیا در داخل گلدان و در گلخانه کشت شد. ٤-۳ 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 اگروباکتریوم تراریخته تزریق به برگ‌های لوبیا با روش اگروانیفیلتریشن با سرنگ بدون سوزن انجام شد و گلدان‌ها به‌منظور ارزیابی بیان موقت با استخراج RNA به مدت ٢٤ ساعت و برای بررسی میزان پروتئین فعال به مدت سه روز در گلخانه قرار گرفتند (Lee et al. 2008).

برگ‌های تزریق شده پس از ٢٤ 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 به‌روش Tric Hcl 150 mM انجام شد (Fido et al. 2008).

برای ارزیابی کمیت پروتئین کل محلول از روش (Bradford 1976) استفاده شد و به‌منظور 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 نوترکیب تولید شده بر روی باکتری *Staphylococcus aureus* مورد بررسی قرار گرفت. به‌منظور بررسی اثر ضد باکتریایی پروتئین نوترکیب 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 استفاده شد. هرکدام از دیسک‌ها به‌منظور کنترل گیاهی (کنترل منفی)، آنتی‌بیوتیک اریترومایسین ۰/۵ درصد (کنترل مثبت) و پروتئین نوترکیب شیمر، مورد استفاده قرار گرفت. پس از اینکه ۲۰ میکرولیتر از هر کدام از نمونه‌های کنترل و پروتئین نوترکیب (غلظت ۱۲ میکروگرم در میکرولیتر) بر دیسک‌های جداگانه ریخته شد، هاله تشکیل شده در اطراف دیسک در زمان‌های ٦، ۱۲ و ۱٦ ساعت بعد با استفاده از کولیس اندازه‌گیری شد. تجزیه و تحلیل داده‌های مربوط به قطر هاله‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS در یک آزمایش فاکتوریل به‌صورت کاملا تصادفی انجام شد. مقایسات میانگین داده‌ها، با استفاده از روش دانکن انجام گرفت.

نتایج و بحث

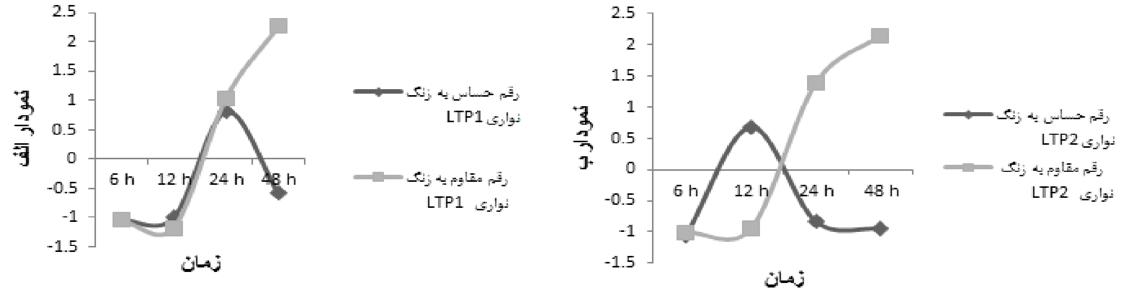
فناوری ریزآرایه امکان مطالعه هزاران ژن را به‌طور هم‌زمان در یک آزمایش فراهم می‌کند. یکی از کاربردهای مهم این فناوری اندازه‌گیری سطح بیان ژن‌ها در شرایط مختلف است. در این بخش با استفاده از فناوری ریزآرایه به بررسی نقش LTPها در تنش‌های زنده و غیر زنده پرداخته شد.

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 میکرواری 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 ٦، ۱۲، ٢٤ و ٤٨ 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 ٤٨ 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، ٤٨ و ۹٦ ساعت پس از آلودگی دو ژن *LTP* و

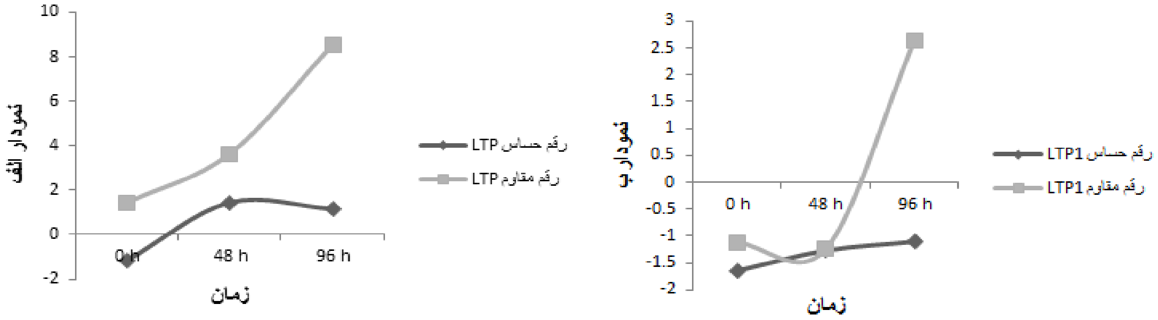
[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-05-03]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1395.11.4.12.1]

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 ۹٦ 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 ۹٦ ساعت افزایش بیان دارد (شکل ٤). 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 ۲٤ 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 ۲٤ ساعت بیش‌ترین بیان را نشان می‌دهد. *LTP3* در رقم مقاوم با افزایش زمان و در ۲٤ ساعت پس از آلودگی بیش‌ترین بیان را دارد ولی در رقم حساس در زمان ۲٤ ساعت کاهش بیان را نشان می‌دهد (شکل ٥). با بررسی رقم مقاوم Nil1 و رقم حساس Nil4 گیاه گندم در آلودگی با *Fusarium graminearum* دو ژن *LTP3* و *LTP7* در سه تیمار زمانی ۸، ۲٤ 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 ۲٤ 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 ٦). در پایان این بررسی‌ها مشخص شد که ژن‌های *LTP* در بازه‌های زمانی طولانی بیان بیش‌تری دارند.

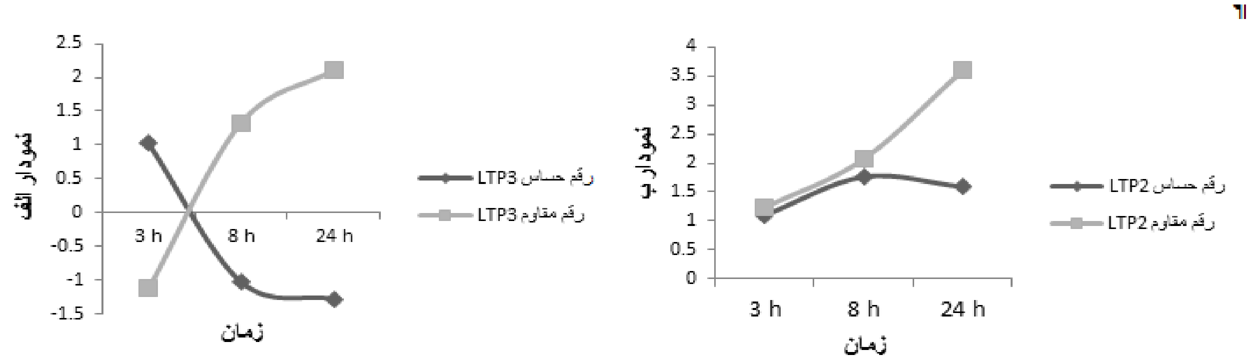


شکل ۳- الگوی بیان ژن *LTP* در رقم مقاوم Yr5 و رقم حساس yr5 گندم در چهار تیمار زمانی ٦، ۱۲، ۲٤ و ٤۸ ساعت پس از آلودگی با بیماری Puccinia. نمودار (الف) الگوی بیان ژن *LTP1* را در دو رقم حساس yr5 و رقم مقاوم YR5 پس از آلودگی با بیماری زنگ نواری نشان می‌دهد. نمودار (ب) الگوی بیان ژن *LTP2* را در دو رقم حساس yr5 و مقاوم YR5 پس از آلودگی با بیماری زنگ را نشان می‌دهد.

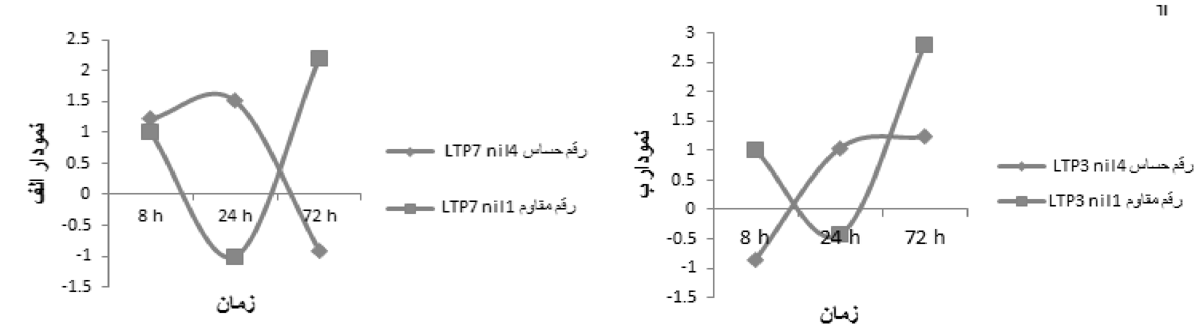


شکل ٤- الگوی بیان ژن *LTP* در دو رقم حساس Wild و مقاوم Mutant جو در سه تیمار زمانی صفر، ٤۸ و ۹٦ ساعت پس از آلودگی با بیماری فوزاریومی. نمودار (الف) الگوی بیان ژن *LTP* را در دو رقم حساس Wild و رقم مقاوم Mutant پس از آلودگی با بیماری فوزاریومی نشان می‌دهد. نمودار (ب) الگوی بیان ژن *LTP1* در دو رقم حساس Wild و رقم مقاوم Mutant پس از آلودگی با بیماری فوزاریومی را نشان می‌دهد.

[DOR: 20.1001.1.20084439.1395.11.4.12.1]
[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-05-03]



شکل ٥- الگوی بیان ژن *LTP* در دو رقم حساس Superb و مقاوم GS-1-EM0040 گندم در سه تیمار زمانی ۳، ۸ و ۲٤ 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 تشان می‌دهد.



شکل ٦- الگوی بیان ژن *LTP* در دو رقم حساس Nil4 و مقاوم Nil1 گندم در سه تیمار زمانی ۸، ۲٤ 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.

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 *Clavibacter michiganesis*، *Rhalstonia 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*) در اثر آلودگی با ویروس موزاییک تنباکو افزایش می‌یابد و این میزان بیان در حالت ناسازگار در ٤۸ 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. Kirubacaran 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

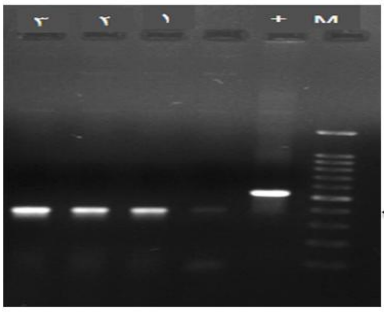
[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-05-03]
[DOI: 20.1001.1.20084439.1395.11.4.12.1]

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.

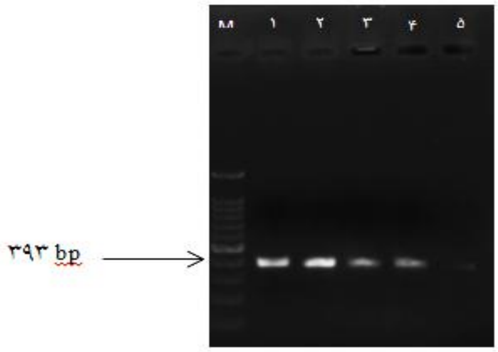
آزمایشات مختلف نشان می‌دهد که پروتئین‌های LTP نقش مهمی در دفاع گیاه در برابر عوامل بیماری زای ویروسی، باکتریایی و قارچی بازی می‌کنند. مطالعات قبلی نشان می‌دهد که بیان بالای ژن *LTP* در صنوبر موجب افزایش مقاومت در برابر قارچ آلترناریا و آنتراکنوز مرکبات می‌شود (Jia et al. 2010). در مطالعه‌ای با انتقال 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 LTPها با افزایش نفوذپذیری غشا، مانع رشد و گسترش میسیلیوم و نیز مهار جوانه زنی اسپور قارچ‌ها می‌شوند. در همه‌ی پپتیدهای ضد میکروبی اسیدآمینه‌های 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 بی ثباتی 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.

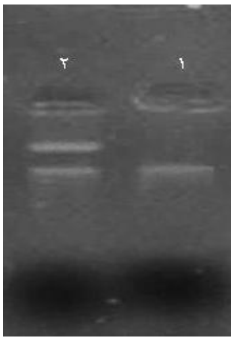
محصول PCR بر روی ژل آگارز یک درصد در شکل زیر نشان داده شده است (شکل ۷). ژن *LTP2* تکثیر یافته با استفاده از کیت استخراج از ژل خارج و برای تأیید قطعه حاصل از استخراج بر روی ژل آگارز ۰/۸ درصد بارگذاری شد (شکل ۸). هم‌چنین برای تأیید پلاسمید برش خورده الکتروفورز انجام شد (شکل ۹). باکتری‌های نوترکیب به صورت 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 رنگ‌آمیزی 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 جفت بازی، ۱، ۲، ۳، ٤ و ۵ ژن *LTP2*

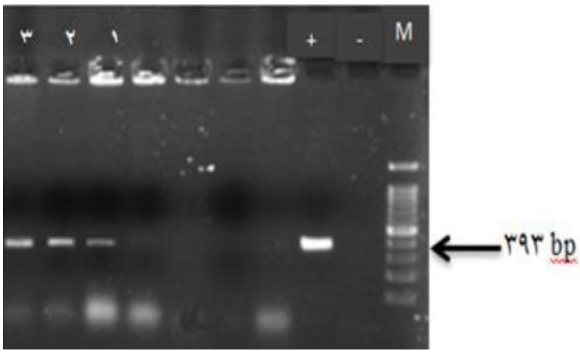


شکل ۹- تأیید برش پلاسمید pBISN1-IN با آنزیم *Hind*III: ۱- پلاسمید برش خورده، ۲- پلاسمید برش نخورده

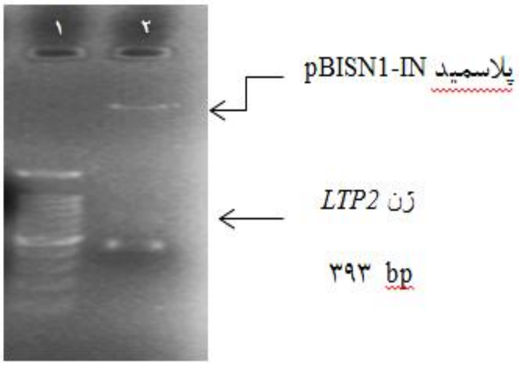
[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-05-03]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1395.11.4.12.1]

به‌علت 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-Pgem (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 نوترکیب 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.

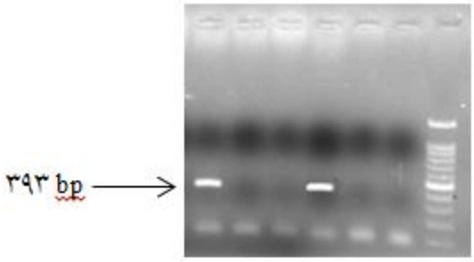
در این بررسی برای تأیید کلونی‌های نوترکیب اگروباکتریوم PCR کلونی انجام شد (شکل ۱۲). به منظور تأیید رونویسی از ژن *LTP2*، PCR انجام شد. وجود باند ۳۹۳ جفت بازی تأیید کننده رونویسی از ژن LTP2 (شکل ۱۳) در سطح RNA است. پروتئین کل محلول در گیاه از انتقال پلاسمید نوترکیب به سلول‌های گیاهی به‌دست آمده و به‌صورت جداگانه مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۱). در این پژوهش با استفاده از نمونه‌های پروتئینی به‌دست 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 پروموتر CaMV35S برای تولید گیاهان تراریخته مانند ارکیده استفاده شد (Da Silva et al. 2011).



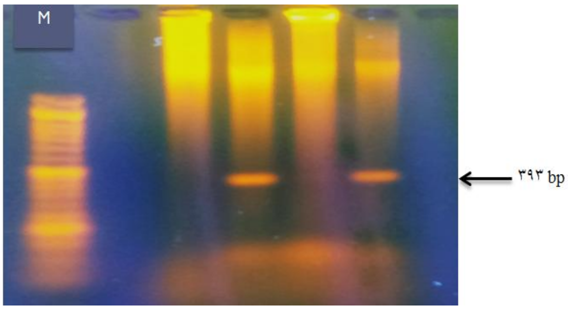
شکل ۱۰- تأیید کلونی‌های نوترکیب در باکتری *E.coli*، مارکر ۱۰۰ جفت-بازی، ۱، ۲ و ۳ ژن مورد بررسی *LTP2*



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



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



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

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-05-03]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1395.11.4.12.1]

جدول۱- آزمون t پروتئین محلول در برگ لوبیا (میکروگرم در میکرولیتر)

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

** معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد

جدول۲- آزمون t میزان پروتئین فعال در برگ لوبیا (میکروگرم در میکرولیتر)

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

** معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد

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

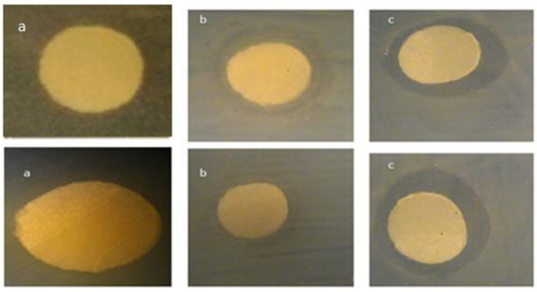
در یک بررسی اگرواینفیلتریشن با استفاده از اگروباکتریوم سویه EHA105 و AGL1 و پلاسمید pCAMBIA1304 در گلبرگ و کاسبرگ گل ارکیده انجام شد. در این بررسی، بهترین غلظت سوسپانسیون باکتری یعنی OD_{600} بین ۰/۵ تا ۲ و بهترین زمان برای بررسی بیان موقت در گلبرگ و کاسبرگ ارکیده سه روز پس از اینفیلتریشن به‌دست آمد (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 برگ‌های جوان قبل از گسترش و نیز برگ‌های پیر دارای بیان ضعیف می‌باشد. زنده بودن سلول برای بیان موقت ضروری است. هنگامی‌که سلول‌های گیاهی بافت مورد استفاده از لحاظ فیزیولوژیکی در مرحله فعال‌تری باشند، میزان بیان ژن افزایش می‌یابد (Jung Kim et al. 2009).

اثر ضد باکتریایی پروتئین حاوی LTP2 و LicBM2 با هاله تشکیل شده در اطراف دیسک در زمان‌های ۶، ۱۲ و ۱۶ مشخص شده است (شکل ۱۴). میانگین اندازه قطر هاله‌ها در زمان‌های مختلف برای دیسک پروتئین نوترکیب و دیسک‌های کنترل منفی و مثبت (شکل ۱۵) ارائه شده‌است. به دلیل اینکه آنتی‌بیوتیک 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 داده‌های مربوط به قطر هاله ایجاد شده در اطراف دیسک آنتی‌بیوتیک در آنالیزها مورد استفاده قرار نگرفت. همان‌طور که در جدول تجزیه واریانس مشاهده می‌شود اثر تیمار (پروتئین نوترکیب شیمر) در سطح یک درصد معنی‌دار می‌باشد (جدول ۳).

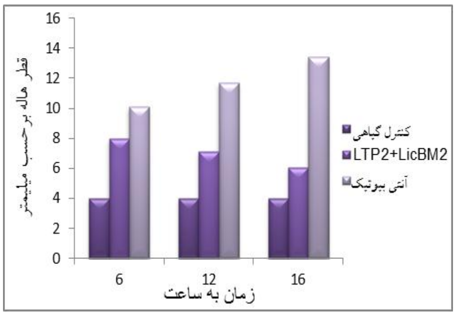
جدول۳- جدول تجزیه واریانس اندازه قطر هاله در زمان‌های مختلف (میلی‌متر)

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

** معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد



شکل ۱۴- قطر هاله‌های تشکیل شده دراطراف نواحی رشد باکتری. ردیف اول پس از زمان شش ساعت و ردیف دوم پس از زمان ۱۲ ساعت. به‌ترتیب:a، کنترل منفی (نمونه کنترل گیاهی برگ تزریق شده با محلول اینفیلتریشن فاقد پلاسمید)، b: پروتئین نوترکیب شیمر (غلظت ۱۲ میکروگرم در میکرولیتر)، c: کنترل مثبت (آنتی‌بیوتیک اریترومایسین ۰/۵ درصد). هر دیسک حاوی ۲۰ میکرولیتر است.



شکل ۱۵- میانگین قطر هاله تشکیل شده در اطراف دیسک‌های پروتئین نوترکیب، کنترل مثبت (آنتی‌بیوتیک اریترومایسین) و کنترل منفی (عصاره پروتئینی گیاه بدون LTP2 و لیکیناز)

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-05-03]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1395.11.4.12.1]

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 ٤/٠١٤ 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 استافیلوکوکوس به‌عنوان یک باکتری گرم مثبت بی هوازی 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 آرابیدوپسیس و زانتوموناس در فلفل افزایش بیان نشان داد. خاصیت ضد میکروبی LTP و بیان بالای آن در تنباکوی تراریخته و آرابیدوپسیس با *LTP* جدا شده از جو و مقاومت آن‌ها به باکتری *P.syringae* به اثبات رسیده است (Wang et al. 2004).

همانطورکه 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 ١٢ و ١٦ 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 نوترکیب 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 آنتی‌بیوتیک 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.

منابع

Abdeev RM, Goldenkova IV, Musiychuk KA and Piruzian E S (2003) Expression of a thermostable bacterial cellulase in transgenic tobacco plants, Russian Journal of Genetics. 39:300-305.

Arnodel 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 Biophyscal 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.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-05-03]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1395.11.4.12.1]

Garcèa-Garrido J, Menossi M, Puigdomeènech P, Martènez-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) Fattt 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 Researchearch 37: D963-968.

Heidari Reyhani A (2014) Optimization of transient expression by Agroinfiltration in almonds, Thesis Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Sharekord Kord. (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, Garcýa JM, Garcýa 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).

Kirubacaran 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 1.6A° 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 agroinfiltration of leaves, Methods in molecular biology. 323:215-223.

Liu D (2012) Transformation of Lipid Trenafer Protrin-Like Antimicrobial Protein LTP Gene from Leonurus Japonicus Houtt into Wheat. Agricultural Science Paper.

Miller GL (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of rediucing sugar, Analatical 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) Agroinfiltration 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 Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

Ryals J, Uknes S and Ward E (1996) Systemic Acquired Resistance. Plant Physiology 1994. 104: peptidies 1109-11 12.

Sels J, Mathys J, Coninck BMA, Cammue BP and Bolle A (2008) Plant Pathogenesis –related protein (PR) Protein: A Focus on PR Peptid, 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, Peptids 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 Pr

Wroblewski T, Tomczak A, and Michelmore R (2005) Optimization of Agrobacterium-mediated transient assays

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-05-03]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1395.11.4.12.1]

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 sativaindica and japonica subspecies, Plant Molecular Biology. 65:403-415.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-05-03]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1395.11.4.12.1]