Crop Biotech.
Autumn (2017) 18: 1-13.

مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌فناوری گیاهان زراعی
سال هفتم، شماره نوزدهم، پائیز ۱۳۹۶ (۱-۱۳)

همسانه‌سازی و بیان پپتید ضدمیکروبی امیگانان پنتاهیدروکلراید (MBI226) در توتون (*Nicotiana tabacum*) به منظور ایجاد مقاومت به باکتری‌های بیماری‌زا

اعظم بدرحداد[۱]، فرهاد نظریان فیروزآبادی[۲]*، احمد اسماعیلی[۳]، هدایت باقری[٤]

۱. دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران
۲. استاد گروه زراعت و اصلاح‌نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران
۳. دانشیار گروه زراعت و اصلاح‌نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران
٤. استادیار گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی‌سینا، همدان، ایران
(تاریخ دریافت: ۱۳۹٦/٤/٥ - تاریخ تصویب: ۱۳۹٦/۸/۲۰)

Cloning and expression of an omiganan pentahydrochloride (MBI226) antimicrobial peptide in tobacco (*Nicotiana tabacum*) confers resist to bacterial pathogens

Azam Badrhadad[1], Farhad Nazarian Firouzabadi[2]*, Ahmad Ismaili[3], Hedayat Bagheri[4]
1. Ph.D. Student, Department of Biotechnology, Agricultural Faculty, Lorestan University, Khorramabad, Iran
2. Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran
3. Associate Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran
4. Assistant Professor, Department of Biotechnology Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran
(Received: Jun. 26, 2017 - Accepted: Nov. 12, 2017)

Abstract

Antimicrobial peptides are ancient and conserved molecules which are found in defense mechanisms of almost all living organisms from bacteria to animal and plant species. Identification and introduction of novel antimicrobial peptides, is a cost-effective way to improve crop plants resistance to pathogens by using recombinant DNA technology. Therefore, an expression construct containing omiganan antimicrobial encoding gene from the cytoplasmic granules of bovine neutrophils, was cloned and transferred to the tobacco leaf disk using *Agrobacterium tumefaciens* mediated-transformation. The presence of the antimicrobial peptide encoding gene in the genome of transgenic plants was confirmed by PCR analysis. Six putative transgenic lines and a non-transgenic control plant were selected for further molecular analysis. Total protein was extract from transgenic and non-transgenic control plants and used for antimicrobial activity assay against some human; *E. coli, Salmonella, Staphylococcus, Bacillus,* and plant: *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathogens by disc diffusion method. Results of this experiment showed that total protein extract from transgenic lines, as compared to non-transgenic plant, was significantly (P<0.05) able to inhibit bacteria growth. There was a significant difference (P<0.05) between transgenic lines with respect to anti-bacteria effect. In contrary to gram-negative bacteria, omiganan peptide did not have a significant effect (P>0.05) on gram-positive pathogenic bacteria. Therefore, it is possible to express and purify omiganan peptide from transgenic and used it in pharmacology formulations as an anti-bacterial medicine. Furthermore, this approach may offer an opportunity to generate transgenic crop plants expressing omiganan peptide resistance to some devastating plant bacteria pathogens.

Keywords: Antimicrobial peptides, Agrobacterium tumefaciens, pathogen, Recombinant protein, Tobacco.

چکیده

پپتیدهای ضدمیکروبی، مولکول‌های قدیمی و حفاظت شده هستند که در مکانیسم‌های دفاعی موجودات زنده مانند باکتری‌ها، جانوران و گیاهان دیده می‌شوند. شناسایی و معرفی پپتیدهای ضدمیکروبی جدید، روشی مقرون به صرفه برای مقابله با میکروب‌های بیماری‌زا و همچنین بهبود مقاومت گونه‌های گیاهان زراعی با استفاده از تکنولوژی DNA نوترکیب است. به این منظور یک سازه ژنی حاوی توالی ژن کد کننده پپتید ضدمیکروبی امیگانان (Omiganan) نوتروفیل گاو پس از همسانه‌سازی به کمک *اگروباکتریوم تومفاشینز* به دیسک‌های برگی توتون انتقال داده شد. با روش PCR حضور ژن کد کننده پپتید ضدمیکروبی در ژنوم گیاهان تراریخت اثبات و تعداد ٦ گیاه تراریخت به همراه شاهد انتخاب شدند. پروتئین کل استخراج و از آن برای کنترل رشد برخی باکتری‌های مهم انسانی مثل؛ *E.coli* ، *Staphylococcus aureus* و *Bacillus cereus* و همچنین برخی باکتری‌های گیاهی مانند *Xanthomonas campestris* و *Pseudomonas aeruginosa* به روش دیسک و تشکیل هاله مهار کننده استفاده شد. نتایج نشان داد که پروتئین کل گیاهان تراریخت در مقایسه با گیاه غیرتراریخت، به‌طور معنی‌داری (P<۰/۰۵) مانع رشد بیشتر باکتری‌ها شد. تفاوت معنی‌داری (P<۰/۰۵) بین گیاهان تراریخت از نظر میزان تأثیر روی باکتری‌ها مشاهد شد. بر خلاف باکتری‌های گرم منفی، حضور پپتید امیگانان تأثیر معنی‌داری (P<۰/۰۵) روی باکتری‌های گرم مثبت نداشت، اما تأثیر معنی‌داری (P<۰/۰۵) در کنترل رشد پاتوژن‌های گیاهی داشت. بنابراین با بیان پپتید امیگانان در گیاه و خالص‌سازی آن، می‌توان با استفاده از فرمولاسیون‌های دارویی از آن به عنوان ضد باکتری استفاده کرد. همچنین با بیان این پپتید در گیاهان زراعی، می‌توان گیاهان مقاوم به عوامل بیماری‌زا تولید نمود.

واژه‌های کلیدی: پپتید ضد میکروبی، اگروباکتریوم تومفاشینز، پاتوژن، پروتئین نوترکیب، توتون

* نویسنده مسئول: فرهاد نظریان فیروزآبادی
E-mail: Nazarian.f@lu.ac.ir.com

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

پپتیدهای ضدمیکروبی (AMPs)[1]، مولکول‌های پروتئینی و حفاظت شده تکاملی هستند که در مکانیسم‌های دفاعی طیف گسترده‌ای از موجودات زنده از جمله پروکاریوتها تا انسان علیه طیف وسیعی از عوامل عفونت‌زا مشارکت می‌کنند. اکثر پپتیدها خواص ضدمیکروبی، ضد اندوتوکسین، اثرات آنتی‌بیوتیکی و ضدقارچی دارند (Guaní-Guerra *et al*., 2010). پپتیدهای ضدمیکروبی گیاهان و حیوانات معمولاً کاتیونی (یعنی حاوی اسید آمینه‌های لیزین و آرژنین) هستند و از ۱۲ تا ۴۵ اسید آمینه تشکیل شده‌اند. این پپتیدها ممکن است به‌طور دائم یا فقط بعد از ایجاد عفونت یا آسیب دیدگی تولید شوند. جایگاه اصلی عمل بیشتر پپتیدها غشاء سیتوپلاسمی است. در باکتری‌های گرم منفی، پپتیدها در ابتدا با لیپوپلی ساکاریدها (گلیکولیپیدهای خارج غشاء بسیار آنیونی) درگیر شده و و سپس به طور موضعی غشاء را مختل و به غشاء سیتوپلاسمی دسترسی پیدا می‌کنند. این مکانیسم عمل، قادر به بیان بسیاری از خواص بالینی مطلوب پپتیدهای ضد میکروبی است (Hancock & Lehrer, 1998).

اگرچه تولید این پپتیدهای کوچک و مهم به انسان و سایر پستانداران محدود نمی‌شود، اما تولید و ترشح به موقع آن‌ها در موجودات زنده از اهمیت بالایی برخوردار است. محققان از توانایی پپتیدها در مهار عوامل بیماری‌زا در تولید مواد دارویی استفاده کرده‌اند. برای مثال، تاکنون تعدادی از این پپتیدها در فرمول‌بندی‌هایی که از آزمایش‌های بالینی گذر کرده‌اند، توسط شرکت‌های داروسازی وارد بازار مصرف شده‌اند. پپتیدهایی مانند MBI226 (درمان برخی عفونت‌های خون)، MX-594AN (درمان اکنه)، PG-1 (درمان بیماری‌های حاصل از باکتری‌های *Pseudomonas aeruginosa*، *Staphylococcus aureus*)، Plactacin (با خاصیت ضد میکروبی علیه باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک) و P-113 (دهان‌شویه و مؤثر در درمان پلاک‌های دندانی و ژنژویت از جمله این قبیل پپتیدها هستند (Guaní-Guerra *et al*., 2010).

محصولات کشاورزی به انواع بیماری‌های حاصل از قارچ‌ها و باکتری‌ها و ویروس‌ها حساس هستند زیرا سبب کاهش قابل توجه در عملکرد و کیفیت محصولات می‌گردند (Furman *et al*., 2013). کنترل بیماری‌های گیاهی توسط سموم شیمیایی، جدا از پر هزینه بودن، مشکلات زیست محیطی و بهداشتی را به همراه دارند. روش‌های مرسوم برای ایجاد واریته‌های زراعی مقاوم در برابر بیماری، هر چند کارا هستند، اما تولید چنین ارقامی زمان بر بوده و مقاومت آن‌ها در مدت کوتاهی درمقابله با طیف وسیعی از بیماری‌ها کاهش می‌یابد (Zasloff, 2002). با توجه به ضرورت تولید ارقام گیاهی مقاوم به تنش‌های زیستی و غیر زیستی و نواقص روش‌های سنتی بهنژادی گیاهی، به کارگیری روش‌های مؤثر تنها راه برون‌رفت از این مشکل می‌باشد. در سال‌های اخیر، روش‌های جدیدتر و کاراتری در مهندسی ژنتیک برای چیرگی بر محدودیت‌های به‌نژادی گیاهی سنتی فراهم آمده است.

در سال های اخیر تحقیقات فراوانی در خصوص حل مشکل مقاومت دارویی توسط پپتیدها در حال انجام می باشد. بویژه در مورد بیماری‌های عفونی که مقاومت عامل بیماریزا به آنتی بیوتیک درمان را پرهزینه و با مشکل مواجه می‌سازد. از این‌رو، محقّقان به سمت جایگزین‌هایی روی آورده‌اند که ضمن دارابودن اثرات ضد باکتریایی، فاقد عوارض جانبی ناشی از مصرف داروهای شیمیایی هستند (Burt, 2004). با افزایش مقاومت میکروارگانیسم‌ها به آنتی‌بیوتیک‌هایی که در حال حاضر مورد استفاده قرار می‌گیرند، پپتیدهای ضد

1. Antimicrobial Peptides

Archive of SID

www.SID.ir

میکروبی شاید بتواند با اثر بر طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌های مقاوم، جایگزین مناسبی برای آنها باشند.

گستردگی طیف فعالیت در برابر باکتری، قارچ، ویروس و پروتوزوآ (Niidome et al., 1999) و عمل انتخابی پپتیدهای ضدمیکروبی نسبت به غشاء میکروبی دو ویژگی مهم این پپتیدها است. همچنین حداقل غلظت مهارکنندگی، آسیب سریع به سلول‌های میکروبی و تاثیر مستقیم روی فسفولیپیدها، سبب کاهش سرعت ایجاد مقاومت پاتوژن‌ها به این پپتیدها می‌شود (Oard & Enright, 2006).

پپتید ضدمیکروبی کاتیونی امیگانان پنتاهیدروکلراید (MBI 226)[1] با توالی ILRWPWWPWRRK آنالوگی از ایندولیسیدین[2] است. امیگانان پنتاهیدروکلراید در برابر طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها شامل باکتری‌های گرم مثبت و منفی و قارچ‌ها فعالیت می‌کند. امیگانان پپتید کاتیونی با بار خنثی و pH 5 که در حال حاضر در فاز سوم تحقیقات بالینی قرار دارد و برای استفاده موضعی جهت جلوگیری از عفونت‌های خونی و کاهش ضایعات آکنه طراحی شده است. توالی امیگانان که پپتید ضدمیکروبی سنتز شده در ریبوزوم است را می‌توان از دانه‌های نوتروفیل گاو خالص‌سازی کرد. علاوه بر اهمیت بالینی آن به خصوص در پیشگیری از عفونت‌های بیمارستانی، امیگانان می‌تواند اولین آنتی‌بیوتیک مرتبط با پپتید ضد میکروبی ریبوزومی باشد که تایید بازار را به‌دست آورد (Selsted *et al*., 1992).

هدف از این مطالعه سنتز و همسانه‌سازی ژن کدکننده‌ی پپتید ضد میکروبی امیگانان نوتروفیل گاو و انتقال آن به گیاه مدل توتون بود. با بیان این پپتید، عصاره خام گیاهان تراریخت دارای این پپتید خواهد بود که انتظار می‌رود در صورت مورد حمله قرار گرفتن توسط عوامل بیماری‌زا، گیاه قادر به محدود کردن رشد پاتوژن باشد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق از دو باکتری *E.coli* سویه DH5α و *Agrobacterium tumefaciens* سویه GV3101 جهت همسانه‌سازی ژن استفاده شد. از باکتری *E. coli* به عنوان میزبان برای نگهداری و تکثیر سازه و از باکتری *A. tumefaciens* جهت انتقال ژن هدف به گیاه توتون استفاده شد. در مطالعه حاضر از ناقل pUC19 برای کارهای همسانه‌سازی و از ناقل بیانی pGSA1285 جهت انتقال ژن به روش اگروباکتری استفاده شد.

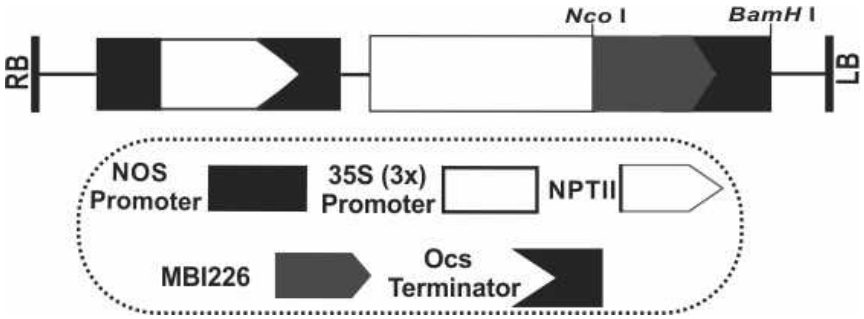
آماده سازی سازه

ژن امیگانان نوتروفیل گاو با توالی
'5GGTGTACCATGGTTATCTTGCGTT
GGCCCTGGTGGCCCTGGCGAAGGA
AGGAAGGATCCCCGGGG3'
و جایگاه برش آنزیم‌های محدودگر *Nco*I و *BamH*I به‌ترتیب در سر '۵ و '۳ با توجه به ترجیح کدونی توتون سنتز شد. سپس قطعه سنتز شده با اندازه ۶۵ bp در ناقل pUC19 در جایگاهای *Nco*I و *BamH*I همسانه‌سازی گردید. در مرحله بعد، قطعه همسانه‌سازی شده در ناقل pUC19، در ناقل بیانی pGSA1285 حاوی پروموتر 35S(3x) ویروس موزائیک گل کلم و خاتمه‌دهنده اکتوپین سنتتاز[3] (Ocs) (شکل۱) همسانه‌سازی شد و ناقل بیانی pGSA1285/MBI226 تولید گردید (شکل ۲). این ناقل توسط روش الکتروپوراسیون[4] به اگروباکتریوم تومفاشینز سویه GV3101 منتقل شد. ناقل بیانی حاوی ژن برای صحت توالی، مورد توالی‌یابی قرار گرفت.

1. Omiganan pentahydrochloride
2. Indolicidin
3. Octopine synthase
4. Electroporation

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱. سازه ژنی حاوی ژن کدکننده MBI226. ژن کد کننده پپتید تحت کنترل پروموتور عمومی ۳۵S ویروس موزائیک گل کلم قرار دارد. همچنین برابی انتخاب گیاهان تراریخت از ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک کانامایسین (NPTII) استفاده شد. اندازه عناصر در شکل با اندازه واقعی آنها مطابقت ندارد.

گیاه و شرایط رشد

جهت تولید گیاهچه‌های درون شیشه‌ای از بذر توتون (*Nicotiana tabacum*) رقم زانتای[1] استفاده شد. ابتدا بذور به مدت ۳۰ ثانیه با اتانول ۷۰٪ و برای ۱۵ دقیقه با هیپوکلریت سدیم ۱/۵ درصد حاوی تریتون و سپس ۳-۵ بار شستشو با آب مقطراستریل، ضدعفونی شدند. بذرها با استفاده از کاغذ صافی استریل خشک و برروی محیط MS (Murashige & Skoog, 1962) حاوی ۲۰ گرم در لیتر ساکارز کشت شدند. پلیت‌ها در دمای ۲۵±۲ درجه سانتی‌گراد قرارداده شدند و پس از جوانه‌زنی به شیشه‌های مربا برای تولید گیاهچه منتقل شدند.

تراریزش و باززایی توتون

ریزنمونه‌های دیسک برگی توتون رقم زانتای به وسیله اگروباکتری تومفاشینز حامل ناقل pGSA1285/ MBI226 تراریزش شدند (Horsch *et al.*, 1989). از باکتری‌های کشت داده شده‌ای با OD600 ۰/۵ برای تلقیح ریزنمونه‌ها استفاده شد. به این ترتیب که ابتدا دیسک‌های ۱ سانتی‌متر مربعی از برگ‌های جوان توتون تهیه گردید و به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه در سوسپانسیون باکتری قرار داده شدند. سپس به محیط هم کشتی MS30 محتوی BA(2mg/l) و NAA (0.1mg/l) برای ۳ روز در تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. پس از گذشت سه روز، ریزنمونه‌ها به محیط تازه هم‌کشتی به همراه کانامایسین (۵۰ میلی‌گرم در لیتر) و سفوتاکسیم (۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر) به منظور باززایی در ۲۵±۲ درجه سانتی‌گراد برای ۲۵-۳۰ روز منتقل شدند. با ظهور جوانه‌های ۲-۳ سانتی‌متری از حاشیه ریزنمونه‌ها، این ریزنمونه‌ها به محیط محرک ریشه‌زایی شامل محیط MS به‌همراه NAA (0.1mg/l)، کانامایسین (۷۵ میلی‌گرم در لیتر) و سفوتاکسیم (۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر) منتقل شدند. پس از ظهور ریشه‌ها، گیاهچه‌ها به محیط فاقد هورمون انتقال یافتند. پس از رشد ریشه‌ها، گیاهان جوان به گلدان حاوی پرلایت به‌علاوه پیت‌ماس انتقال داده شدند. تمامی گلدان‌ها با پوشش پلاستیکی پوشانده شدند و آبیاری آن‌ها با MS مایع نصف غلظت و بدون قند انجام شد.

آنالیز PCR

برای تایید وجود ژن امیگانان در توتون‌های به ظاهر تراریخت مقاوم به کانامایسین، استخراج DNA به روش CTAB از برگ‌های توتون صورت گرفت (Richards *et al.*, 1994). سپس با استفاده از

1. Xanthi

Archive of SID

www.SID.ir

آغازگرهای اختصاصی رفت: MBI226F: 5'-TTTCATTTGGAGAGGACACGCT-3'
آغازگر برگشت: MBI226R: 5'-CACCAGGGCCAACGCAA-3' که در NCBI طراحی شد، ژن امیگانان تکثیر شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با شرایط واسرشتی اولیه (۹۴ درجه سانتی‌گراد ۵ دقیقه) و ۳۵ چرخه واسرشتی (۹۴ درجه سانتی‌گراد ۱ دقیقه)، آنیلینگ (۵۸ درجه سانتی‌گراد ۴۵ ثانیه) و بسط (۷۲ درجه سانتی‌گراد ۲۰ ثانیه) و در نهایت یک مرتبه بسط نهایی (۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۷ دقیقه) صورت گرفت.

استخراج عصاره پروتئین

مقدار یک گرم از بافت تازه گیاهان توتون تراریخت و شاهد در مجاورت ازت مایع در هاون چینی به خوبی پودر و هموژن شد. سپس به میزان هم حجم آن (۱ میلی‌لیتر) بافر فسفات پتاسیم (فسفات‌پتاسیم ۲۵ میلی‌مولار، pH=۷) به آن اضافه و در ۴ درجه سانتی‌گراد با ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس رونشین با احتیاط جمع‌آوری گردید و غلظت آن با روش برادفورد اندازه‌گیری و در دمای ۴ یا ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (Chmara *et al*., 1998; Alan *et al*., 2004).

بررسی اثر ضد باکتریایی

میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه در این تحقیق شامل *E. coli* (ATCC 25922)، *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27883)، *Salmonella typhi* (PTCC 1639) و (PTCC 1473) *Xanthomonas campestris*، *Staphylococcus aureus* (ATCC 1189) و (PTCC 1181) *Bacillus cereus* بودند.

حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC)

حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC)[1] با استفاده از روش رقت‌سازی در لوله[2] تعیین گردید (Vanden & Vlietinck, 1991). در این آزمایش تعداد ۶ لوله برای آزمایش رقت‌های مختلف (۶۰، ۳۰، ۱۵، ۷/۵، ۳/۷۵ و ۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) هر عصاره ، یک لوله حاوی عصاره رقیق شده به‌علاوه محیط کشت به‌عنوان کنترل مثبت و یک لوله حاوی سوسپانسیون میکروبی به‌علاوه محیط کشت به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد. غلظت اولیه عصاره ۶۰ میکرو گرم/میلی‌لیتر بود. به لوله‌ها به جز کنترل مثبت به میزان ۵۰ میکرولیتر سوسپانسیون میکروبی نیم مک‌فارلند دارای $۱/۵\times۱۰^{۸}$ CFU/ml باکتری انتقال داده شد. رقیق‌سازی عصاره‌ها برای هر یک از باکتری‌ها به صورت جداگانه انجام شد. همه لوله‌های آزمایش برای مدت ۲۴ ساعت در ۳۷°C قرار داده شدند. سپس لوله‌ها از نظر کدورت ناشی از رشد باکتری تلقیح شده بررسی گردیدند. با مشاهده ایجاد کدورت در هر لوله، لوله قبلی به عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی در نظر گرفته شد. در مورد لوله کنترل مثبت، کدورت نشان‌دهنده رشد کافی باکتری می‌باشد. لوله کنترل منفی باید بدون رشد و شفاف باشد (Vanden & Vlietinck, 1991; Sindambiwe *et al*., 1999).

انتشار در آگار با استفاده از دیسک

برای سنجش مقاومت به عصاره پروتئینی گیاهان حاوی پپتید ضد میکروبی از روش دیسک دیفیوژن استفاده شد. جهت تهیه دیسک‌های مورد آزمایش، دیسک‌های بلانک با قطر ۶ میلی‌متر توسط عصاره‌های پروتئینی تهیه شده با غلظت ۶۰ µg/ml اشباع گردیدند. در هر سری آزمایش یک دیسک حاوی عصاره پروتئینی گیاه غیرتراریخت با غلظت مذکور به‌عنوان کنترل منفی

1. Minimal Inhibitory Concentration
2. Broth Macro dilution susceptibility assay

Archive of SID

www.SID.ir

به‌کار برده شد. جهت مقایسه هاله‌های عدم رشد از آنتی‌بیوتیک جنتامایسین[1] (غلظت ۱۰ میکروگرم)، سفوتاکسیم[2] (غلظت ۳۰ میکروگرم) به منظور جلوگیری از رشد باکتری‌ها به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. در این آزمایش محیط کشت مولر هینتون آگار تهیه و درون پلیت تقسیم شد سپس ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی نیم مک‌فارلند دارای 10^8 cfu/ml روی محیط کشت ریخته و با سوآب پنبه‌ای استریل از سوسپانسیون باکتری به صورت یکنواخت در سطح محیط مولر-هینتون آگار تلقیح گردید. سپس دیسک‌های تهیه شده از عصاره‌های مختلف با استفاده از پنس استریل در سطح محیط کشت قرار داده شد. و برای مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سپس قطر هاله‌های عدم رشد اندازه‌گیری و میانگین مربوطه گزارش گردید (Bauer, 1966; Mangena & Muyima, 1999).

آنالیز آماری

تمامی داده‌ها با ۳ تکرار بررسی شدند. آنالیز واریانس یک سویه (ANOVA) با استفاده از نرم‌افزار SAS9.1 و مقایسه میانگین به روش دانکن انجام شد.

نتایج و بحث

تأیید تراریختی گیاهان توتون

در جریان کشت بافت، جوانه‌هایی از کناره ریز نمونه‌های برگی پدیدار شدند. این جوانه‌ها برای باززایی و تولید گیاهچه، به محیط ساقه‌زایی و ریشه‌زایی انتقال یافتند (شکل ۲). پس از تولید گیاهچه‌های مقاوم به کانامایسین ۱۰۰ mg/ml، تعداد ۲۳۰ گیاهچه به ظاهر تراریخت انتخاب شدند. از مجموع ۲۳۰ گیاهچه به ظاهر تراریخت تعداد ۱۴ گیاهچه موفق به ریشه‌زایی شدند. میزان کارایی اولیه تراریزش در حدود ۶ درصد بود. گیاهچه‌های این مرحله به اسامی MBI-XX نامیده شدند که در این نام، MBI معرف نام پپتید و XX شماره لاین تراریخت است.

شکل ۲. مراحل تهیه ریزنمونه، تشکیل جوانه و باززایی توتون پس از تراریزش. A: دیسک‌های برگی تلقیح شده با اگروباکتریوم و تولید کالوس در محیط دارای آنتی‌بیوتیک B: ریشه‌زایی گیاهچه‌های توتون C: گیاه کامل در محیط فاقد آنتی‌بیوتیک D: انتقال گیاه تراریخت به گلدان

پس از استخراج DNA ژنومی از برگ‌های ۱۴ گیاهچه توتون به ظاهر تراریخت و یک نمونه گیاهچه غیرتراریخت (کنترل) آزمون PCR با آغازگرهای اختصاصی روی آنها صورت گرفت. آنالیز PCR این گیاهان نشان داد که در تعداد ۶ گیاهچه ژن کدکننده پپتید آمیگانان وارد شده بود و قطعه به طول ۱۲۰bp معادل طول ژن در آنها تکثیر گردید. این حالی بود که در گیاه شاهد هیچ باندی مشاهده نشد (شکل ۳). بنابراین برای ادامه مطالعات گیاهچه‌های MBI-2، MBI-4، MBI-7، MBI-9، MBI-10، MBI-13 و شاهد Ut انتخاب شدند.

1. Gentamycin
2. Cefotaxime

Archive of SID

www.SID.ir

ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی پپتید آمیگانان در توتون‌های تراریخت

حداقل غلظت بازدارندگی (MIC)

حداقل غلظت بازدارندگی، حداقل غلظتی از عصاره است که می‌تواند به میزان ۹۰ درصد رشد باکتری‌ها را مهار کند. روش رقت‌سازی در لوله برای تعیین خواص ضدمیکروبی روشی دقیق و بسیار حساس می باشد و تاکنون برای تعیین ارزیابی خواص ضدمیکروبی عصاره های گیاهی استفاده شده است (Scorzoni *et al*., 2007). نتایج حاصل از حداقل غلظت بازدارندگی عصاره‌های توتون‌های تراریخت در جدول ۱ نشان داده شده است.

شکل ۳. الکتروفورز محصول PCR حاصل از تکثیر DNA ژنومی گیاهان تراریخت و غیرتراریخت. در گیاهان تراریخت یک باند در حدود bp ۱۲۰ تکثیر گردید که با اندازه ژن کدکننده پپتید آمیگانان یکسان بود. M: نشانگر اندازه bp ۱۰۰ را نشان می‌دهد. P: تکثیر ژن پپتید روی پلاسمید pGSA/MBI را به عنوان شاهد مثبت نشان می‌دهد. اعداد شماره های مربوط به گیاهان به ظاهر تراریخت هستند. C: کنترل منفی (استفاده از آب به جای الگو).

جدول ۱. حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) عصاره پروتئینی توتون‌های تراریخت

لاین تراریخت	باکتری بیماری‌زا					
	Bacillus cereus	*Staphylococcus aureus*	*Salmonella typhi*	*Pseudomonas aeruginosa*	*Xanthomonas campestris*	*E.coli*
MBI-2	60>	60	60	30	30	30
MBI-4	60>	60>	60>	60>	30	60>
MBI-7	60>	60>	60>	30	60	60
MBI-9	60>	60>	60>	60	30	30
MBI-10	60>	60>	60>	30	60>	60>
MBI-13	60>	60	60	30	30	30
Ut	-	-	-	-	-	-

Ut: گیاه شاهد غیر تراریخت

نتایج این بخش از مطالعه نشان داد که حداقل غلظتی از عصاره‌ها که موجب جلوگیری از رشد ۹۰ درصد از باکتری‌ها می‌شود در فاصله غلظت‌های ۳۰ و ۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. در حالی که عصاره گیاه

Archive of SID

www.SID.ir

غیرتراریخت مانع رشد هیچ یک از باکتری‌ها نشد (جدول ۱). همانطوری که مشاهد می‌شود، برای کنترل رشد باکتری *Salmonella typhi* به غلظت بیشتری از پپتید نیاز است. صرف‌نظر از نوع گیاه تراریخت، حداقل غلظت بازدارندگی برای باکتری *Salmonella typhi*، ۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر است. در مرحله بعد باکتری *E. coli* قرار دارد که در نیمی از موارد به حداقل ۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره گیاهی برای توقف رشد نیاز دارد. در بین گیاهان تراریخت، دو گیاه MBI-2 و MBI-13 از قدرت مهارکنندگی بیشتر در همه باکتری‌ها برخور دارند (جدول ۱). در باکتری‌های گرم مثبت *Staphylococcus aureus* اثر عصاره پروتئینی گیاهان تراریخت مشابه *Salmonella typhi* بود. اما در *Bacillus cereus* در غلظت اصلی نیز اثر بازدارندگی مشاهده نشد و غلظت‌های بالاتر عصاره مورد بررسی قرار نگرفت. همچنین نتایج جدول ۱ نشان می‌دهد که باکتریهای مختلف به غلظت یکسان یک گیاه تراریخت واکنش متفاوتی نشان می‌دهند.

انتشار در آگار با استفاده از دیسک

نتایج مربوط به قطر هاله عدم رشد در جدول ۲ نشان داده شده است. قطر دیسک‌های مورد استفاده ۵ میلی‌متر بود که از قطر اندازه‌گیری شده هاله کسر گردید. به منظور بررسی اثر ممانعت‌کننده حلال (بافر فسفات) دیسک حاوی حلال نیز مورد بررسی قرار گرفت که بافر فسفات هیچ‌گونه اثر ممانعت‌کننده بر رشد باکتری‌ها نداشت و هاله‌ای تشکیل نگردید. از دیسک حاوی آنتی‌بیوتیک به‌عنوان کنترل مثبت جهت مقایسه قطر هاله ممانعت‌کننده استفاده شد که در مقایسه با تمام تیمارها بیشترین قطر هاله را ایجاد کرد. نتایج حاصل از آزمون انتشار در آگار با استفاده از دیسک نشان داد که در باکتری اشرشیاکلی بیشترین قطر هاله مهار رشد مربوط به عصاره پروتئینی گیاه توتون تراریخت7-MBI و پس از آن دو گیاه MBI-2 و MBI-13، به ترتیب با ایجاد هاله‌های با قطر تقریبی ۱۵ و ۱۴ میلی‌متری بود. در باکتری *Xanthomonas campestris* نیز تمام گیاهان اثر مهارکنندگی نشان دادند که بیشترین قطر هاله مربوط به گیاه MBI-2 و MBI-13 قطر ۱۵ میلی‌متر بود. در باکتری *Pseudomonas aeruginosa* بیشترین قطر هاله در میان تمام تیمارها با اندازه ۲۰ میلی‌متر مربوط به گیاه MBI-13 ایجاد شد و پس از آن در تیمار با گیاه شماره MBI-10، در حالی‌که گیاه MBI-4 هیچ اثر ممانعت‌کنندگی نداشت.

مهارکنندگی گیاه MBI-13 بر روی *Salmonella typhi* با ایجاد هاله مهارکننده به قطر ۱۸ میلی‌متری قابل توجه بود. در صورتی‌که عصاره پروتئینی برخی گیاهان هیچ اثر مهارکنندگی بر *Salmonella typhi* نداشتند. این در حالی است که در تیمار با عصاره پروتئینی گیاه شاهد در هیچ یک از باکتری‌ها هاله مهارکننده تشکیل نشد (شکل۴). در بررسی باکتری‌های گرم مثبت *Staphylococcus aureus* و *Bacillus cereus* کمترین قطر هاله در تیمار تمامی عصاره‌های گیاهی مشاهده شد به‌ویژه در *Bacillus cereus* تقریباً هیچ اثر ممانعت‌کننده‌ای نداشتند.

در مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن، عصاره دو گیاه MBI-2 و MBI-13 با بیشترین اثر مهارکنندگی تفاوت معنی‌داری نسبت به عصاره سایر گیاهان تراریخت و شاهد نشان دادند. همچنین عصاره گیاه تراریخت MBI-4 کمترین اثر مهار کنندگی را در اکثر باکتری‌ها داشت (شکل۴). به‌طور کلی نتایج این بخش از مطالعه نشان می‌دهد که تأثیر عصاره گیاهان تراریخت بر باکتری‌های انسانی کمتر از باکتری‌های گیاهی است و در باکتری‌های گرم منفی در مقایسه با باکتری‌های گرم مثبت دارای اثر ممانعت‌کنندگی بیشتری می‌باشند.

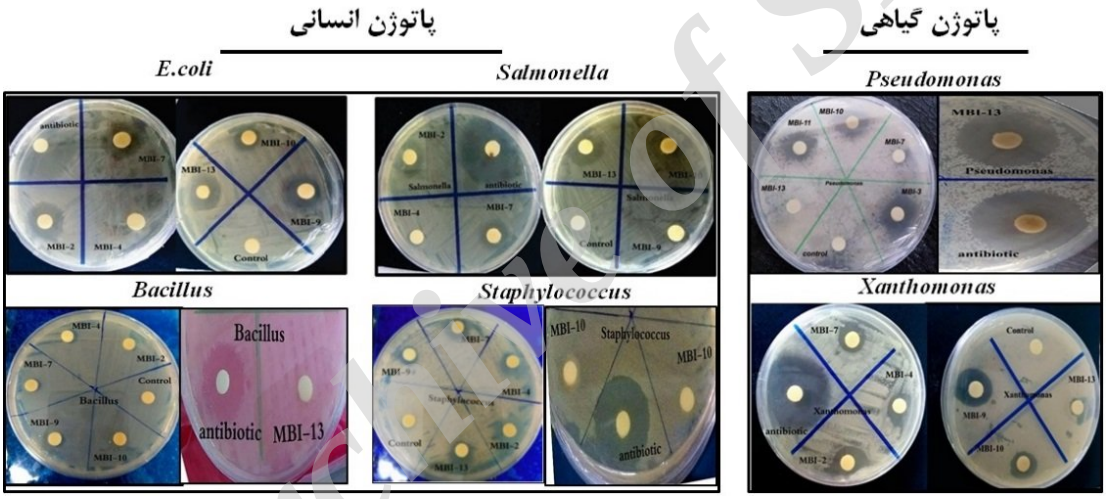
Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۲. میانگین قطر هاله عدم رشد باکتری‌ها در تیمار با عصاره‌های پروتئینی توتون تراریخت و شاهد

میانگین قطر هاله عدم رشد (میلی‌متر)						عصاره
Bacillus cereus	*Staphylococcus aureus*	*Pseudomonas aeruginosa*	*Xanthomonas campestris*	*Salmonella typhi*	*E.coli*	
0.08 ±0.14	0.66 ±0.14	18.66 ±0.52	15.33 ±0.57	9.33 ±0.57	14.66 ±0.57	MBI-2
0.08 ±0.01	0.66 ±1.15	0	11.66 ±0.57	0	0.66 ±0.15	MBI-4
0	0.68 ±1.11	13.66 ±1.52	9.33 ±0.15	5.66 ±0.52	15.33 ±0.57	MBI-7
0	0.50 ±0.00	10.66 ±0.57	11.66 ±0.52	0	9.66 ±0.57	MBI-9
0	0	19 ±1	6.33 ±0.15	0	8.66 ±0.15	MBI-10
0	0.41 ±0.14	20±0	15 ±0.73	18.66 ±0.54	14.33 ±0.15	MBI-13
0	0	0	0	0	0	Ut
–	–	30±0.50	–	–	30±0.28	Gentamicin (10µg)
20±0.00	32±0.00	–	30±0.00	29±0.28	–	Cefotaxime (30µg)
0.02	0.41	11.71	9.90	3.69	9.04	میانگین

Ut: گیاه شاهد غیر تراریخت. نتایج بر اساس میانگین سه تکرار ± خطای معیار ارائه شده است.



شکل ۴. هاله عدم رشد باکتری‌ها در تیمار با عصاره پروتئینی توتون تراریخت و شاهد. دیسک‌ها به مقادیر اشاره شده در مواد و روش‌ها از پروتئین کل، آغشته شده‌اند.

امیگانان پپتید کاتیونی جدیدی است که در شرایط آزمایشگاهی فعالیت قابل توجهی در برابر پاتوژن‌های رایج و مقاوم از خود نشان می‌دهد (Fritsche *et al.*, 2008). مکانسیم اولیه عمل امیگانان در باکتری‌های گرم منفی به توانایی اثر پپتید بر غشاء سیتوپلاسمی و در باکتری‌های گرم مثبت و مخمر به دپولاریزه کردن غشاء و مهار سنتز ماکرومولکول‌ها و در نهایت مرگ سلول مرتبط است (Melo *et al.*, 2006). ساختار منحصر به‌فرد پپتیدهای ضدمیکروبی کاتیونی از جمله امیگانان (یعنی حضور توام بار مثبت و اسید آمینه‌های آبگریز) پایه و اساس توانایی این گروه از پپتیدها برای تعامل با غشاهای باکتریایی از طریق مکانیسم‌هایی بدون واسطه گیرنده است (Melo & Castanho, 2007) مکانیسم فیزیکی (غیرآنزیمی) عمل پپتیدهای کاتیونی در مقایسه با آنتی‌بیوتیک‌های معمول که اهداف خاصی مانند مهار آنزیم دارند، نیار به زمان بیشتری برای ایجاد مقاومت در باکتری‌ها دارد زیرا

Archive of SID

www.SID.ir

جهش‌هایی که منجر به تغییرات عمیق ساختاری و عملکردی غشاء شود برای ایجاد مقاومت مورد نیاز است. این مکانیسم عمل در پپتیدهای ضدمیکروبی منحصر به فرد است (Melo *et al*., 2006; Melo & Castanho, 2007).

Sader و همکاران (۲۰۰۴) فعالیت ضد میکروبی پپتید امیگانان را علیه ۱۴۳۷ باکتری و ۲۱۴ مخمر مورد بررسی قرار دادند. میزان MIC برای باکتری ای‌کولای ۳۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود (Sader *et al*., 2004). نتایج مشابهی نیز از تأثیر این پپتید روی ای‌کولای به‌دست آمد (جدول ۱). با این حال در تعدادی از گیاهان تراریخت میزان MIC بالاتر از ۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. این موضوع نشان می‌دهد که میزان پپتید تولیدی در گیاهان تراریختی مانند MBI-4 و MBI-10 در مقایسه با سایر لاین‌های تراریخت کمتر است. این موضوع از این نظر می‌تواند حائز اهمیت باشد که میزان فعالیت پپتید با میزان دوز مصرفی آن در ارتباط است. در مورد باکتری‌های *Salmonella typhi*، *Staphylococcus aureus* اورئوس و به‌ویژه *Bacillus cereus* میزان MIC آستانه بالاتری را نشان می دهد. برای مثال، Sader *et al*. (2004) با استفاده از پپتید امیگانان میزان MIC را برای باکتری *Staphylococcus aureus* ۱۶ میکروگرم بر لیتر گزارش نمودند که اثر مهارکنندگی قویتری را نسبت به نتایج این مطالعه نشان داد. همچنین برای باکتری *Pseudomonas aeruginosa* میزان MIC را در حدود ۶۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش کردند که اثر مهار کنندگی کمتری را نسبت به آزمایش این مطالعه نشان می‌دهد. هر دو تحقیق وجود اثر ضدمیکروبی پپتید امیگانان را علیه باکتری‌ها نشان داده‌اند. تفاوت در غلظت مهارکنندگی می‌تواند ناشی از شرایط متفاوت انجام آزمون، استفاده از پپتید خالص در بررسی Sader *et al*. (2004) در مقابل استفاده از عصاره در تحقیق حاضر باشد. Subbalakshmi & Sitaram اثر بازدارندگی ایندولیسیدین (نوعی آناگوک امیگانان) را برای *E.coli* بررسی نمودند. نتایج این مطالعه همانند نتایج این تحقیق نشان داد که ایندولیسیدین می‌تواند در غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر سبب مهار ۸۴-۹۰ درصدی باکتری شود (MIC=50µg/ml) که در مقایسه با MIC=30µg/ml این مطالعه میزان فعالیت ایندولیسیدین به وضوح کمتر از امیگانان است (Subbalakshmi & Sitaram, 1998). در مورد باکتری *Bacillus cereus*، مقدار MIC این مطالعه ۶۰<میکروگرم بود که در حدود ۴ برابر کمتر (MIC=16 µg/ml) از میزان تأثیر ایندولیسیدین بر همین باکتری بود (Sader *et al*., 2004). به‌طور کلی، به نظر می‌رسد که پپتید امیگانان بیان شده در توتون‌های تراریخت، تأثیر چندانی در مهار دو باکتری گرم مثبت *Bacillus cereus* و *Staphylococcus aureus* ندارد (جدول‌های ۱ و ۲). این موضوع عجیب به نظر می‌رسد زیرا گزارش‌های در مورد تأثیر یکسان این پپتید روی هر دوگروه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی وجود دارد، با این حال چون پپتید این مطالعه همراه با سایر پروتئین‌های گیاهی جداسازی شده است ممکن است در مقایسه با پپتیدهای مصنوعی، فعالیت متفاوتی در محیط این‌ویترو نشان دهد. تفاوت اثر ضد باکتریایی بر باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت را می‌توان در مکانیسم‌های متفاوت عمل آنها در برابر پپتیدها دانست. بیشتر پپتیدهای ضدمیکروبی با تعامل با سطح سلول‌های باکتریایی کار می‌کنند و سبب اختلال در سلامت سلولی باکتری می‌گردند. در باکتری‌های گرم مثبت مکانیسم‌های مقاومت با محدود کردن تعامل پپتیدهای ضدمیکروبی با سطح سلول باکتریایی عمل می‌کنند. مکانیسم‌های مقاومت شامل به دام انداختن یا جداسازی پپتید، تخریب کامل پپتیدهای ضدمیکروبی با پروتئولیز، حذف پپتیدهای ضدمیکروبی از سلول از طریق انتقال فعال و تغییر ساختار سطح سلول برای جلوگیری از تعامل با

Archive of SID

www.SID.ir

پپتیدهای ضدمیکروبی می‌باشد (Nawrocki *et al*., 2014). تخریب پپتیدهای ضدمیکروبی توسط پروتئاز در *Staphylococcus aureus* مشاهده شده است که در مواجهه با پپتید LL-37 سبب تخریب پپتید می‌گردد (Sabat *et al*., 2000). همچنین تغییر نظم غشاء در *Staphylococcus aureus* از طریق افزایش کاروتنوئید و افزایش اسید چرب در غشاء سبب کاهش حساسیت به پپتیدهای ضدمیکروبی و افزایش سختی دیواره سلول و کاهش ورود پپتیدها به غشا می‌گردد (Subczynski & Wisniewska, 2000). با این حال، در مورد پپتید این مطالعه، به مطالعات بیشتری در این زمینه نیاز است.

القاء بیان پپتید ضدمیکروبی در گیاهان روشی برای ایجاد مقاومت به طیف وسیعی از پاتوژن‌های گیاهی است. مطالعات متعددی بیان پپتیدهای ضدمیکروبی مانند، cecropin و sacrotoxin در توتون و گوجه (Jaynes *et al*., 1993; Jan *et al*., 2010) MsrA3 در سیب‌زمینی (Osusky *et al*., 2004) و پپتید کایمریک cecropin-melittin در سیب‌زمینی (Osusky *et al*., 2000) را گزارش کرده‌اند. در تمام این قبیل مطالعات، گیاهان تراریخت نسبت به گیاهان غیرتراریخت، افزایش مقاومت قابل توجهی نسبت به پاتوژن‌ها نشان داده‌اند. برای مثال، بیان پپتید ضدمیکروبی SP1 در گوجه فرنگی سبب مقاومت به باکتری پاتوژن گیاهی *Xanthomonas campestris* در مقایسه با گیاه شاهد شد (Diaz *et al*., 2016) جالب توجه است که عصاره پروتئینی گیاهان توتون تراریخت مطالعه حاضر نیز با تولید هاله‌ای با میانگین قطر ۹ میلی‌متر در مقایسه با گیاه غیرتراریخت تأثیر عصاره دو گیاه MBI-2 و MBI-13 با بیشترین اثر مهارکنندگی بر باکتری‌های مورد آزمون نسبت به عصاره سایر گیاهان تراریخت و شاهد، تفاوت معنی‌داری نشان دادند. در مجموع بیشترین اثر مهارکنندگی گیاهان تراریخت علیه *Pseudomonas aeruginosa* و سپس *Xanthomonas campestris* بود.

به‌طور کلی نتایج این تحقیق نشان داد که با بیان پپتید امیگانان در گیاه توتون و خالص‌سازی آن، می‌توان مانع از آن برای جلوگیری از رشد باکتری‌های بیماری‌زای انسانی و گیاهی در محیط آزمایشگاهی استفاده کرد. همچنین با بیان آن به کمک روش‌های مهندسی ژنتیک در گیاهان زراعی، می‌توان گیاهان تراریخت مقاوم به عوامل بیماری‌زا تولید نمود که دیگر نیازی به استفاده از سموم شیمیایی برای کنترل آنها نباشد. به علاوه، در صورت تولید کافی این پپتید ضد باکتریایی در عصاره گیاهی، می توان با جداسازی آن (آب‌گیری از گیاه)، عصاره را به‌صورت خام روی موضع آلودگی باکتریایی روی پوست انسان استفاده نمود. در حال حاضر استفاده از این روش برای بررسی کارایی آن در کنترل باکتری عامل بیماری آکنه (Propionibacterium acnes) در انسان در حال انجام است.

REFERENCES

Alan A, Blowers A, Earle E (2004) Expression of a magainin-type antimicrobial peptide gene (MSI-99) in tomato enhances resistance to bacterial speck disease. Plant Cell Reports. 22: 388-396.

Bauer A (1966) Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am. J. Clin. Pathol. 45: 493-496.

Burt S (2004) Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. International Journal of Food Microbiology. 94: 223-253.

Chmara H, Milewski S, Andruszkiewicz R, Mignini F, Borowski E (1998) Antibacterial action of dipeptides containing an inhibitor of glucosamine-6-phosphate isomerase.

Archive of SID

www.SID.ir

Microbiology. 144: 1349-1358.

Diaz AH, Kovacs I, Lindermayr C (2016) Inducible Expression of the De-Novo Designed Antimicrobial Peptide SP1-1 in tomato confers resistance to *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria. PLoS One 11: e0164097.

Fritsche TR, Rhomberg PR, Sader HS, Jones RN (2008) Antimicrobial activity of omiganan pentahydrochloride tested against contemporary bacterial pathogens commonly responsible for catheter-associated infections. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 52(3): 1187-1189.

Furman N, Kobayashi K, Zanek M. C, Calcagno J, Garcia M. L, Mentaberry A (2013) Transgenic sweet orange plants expressing a dermaseptin coding sequence show reduced symptoms of citrus canker disease. Journal of Biotechnology 167(4): 412-419.

Guaní-Guerra E, Santos-Mendoza T, Lugo-Reyes SO, Terán LM (2010) Antimicrobial peptides: general overview and clinical implications in human health and disease. Clinical Immunology 135: 1-11.

Hancock RE, Lehrer R (1998) Cationic peptides: a new source of antibiotics. Trends in Biotechnology. 16: 82-88.

Horsch RB, Fry J, Hoffmann N, Neidermeyer J, Rogers SG, Fraley RT. 1989. Leaf disc transformation. In Plant molecular biology manual, pp. 63-71. Springer.

Jan P-S, Huang H-Y, Chen H-M (2010) Expression of a synthesized gene encoding cationic peptide cecropin B in transgenic tomato plants protects against bacterial diseases. Applied and Environmental Microbiology. 76: 769-775.

Jaynes JM, Nagpala P, Destéfano-Beltrán L, Hong Huang J, Kim J, Denny T, Cetiner S (1993) Expression of a Cecropin B lytic peptide analog in transgenic tobacco confers enhanced resistance to bacterial wilt caused by Pseudomonas solanacearum. Plant Science. 89: 43-53.

Mangena T, Muyima N (1999) Comparative evaluation of the antimicrobial activities of essential oils of Artemisia afra, Pteronia incana and Rosmarinus officinalis on selected bacteria and yeast strains. Letters in Applied Microbiology. 28: 291-296.

Melo MN, Castanho MA (2007) Omiganan interaction with bacterial membranes and cell wall models. Assigning a biological role to saturation. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes 1768: 1277-1290.

Melo MN, Dugourd D, Castanho MA (2006) Omiganan pentahydrochloride in the front line of clinical applications of antimicrobial peptides. Recent patents on anti-infective drug discovery. 1: 201-207.

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum. 15: 473-497.

Nawrocki KL, Crispell EK, McBride SM (2014) Antimicrobial peptide resistance mechanisms of gram-positive bacteria. Antibiotics. 3: 461-492.

Niidome T, Anzai S, Sonoda J, Tokunaga Y, Nakahara M, Hatakeyama T , Aoyagi H (1999) Effect of amino acid substitution in amphiphilic α-helical peptides on peptide–phospholipid membrane interaction. Journal of Peptide Science 5(7): 298-305.

Oard S, Enright F (2006) Expression of the antimicrobial peptides in plants to control phytopathogenic bacteria and fungi. Plant Cell Reports. 25: 561-572.

Osusky M, Osuska L, Hancock RE, Kay WW, Misra S (2004) Transgenic potatoes expressing a novel cationic peptide are resistant to late blight and pink rot. Transgenic Research. 13: 181-190.

Osusky M, Zhou G, Osuska L, Hancock

Archive of SID

www.SID.ir

RE, Kay WW, Misra S (2000) Transgenic plants expressing cationic peptide chimeras exhibit broad-spectrum resistance to phytopathogens. Nature Biotechnology. 18: 1162-1166.

Richards E, Reichardt M, Rogers S (1994) Preparation of genomic DNA from plant tissue. Current Protocols In Molecular Biology. 2.3. 1-2.3. 7.

Sabat A, Kosowska K, Poulsen K, Kasprowicz A, Sekowska A, van den Burg B, Travis J, Potempa J (2000) Two allelic forms of the aureolysin gene (aur) within *Staphylococcus aureus*. Infection and Immunity 68: 973-976.

Sader HS, Fedler KA, Rennie RP, Stevens S, Jones RN (2004) Omiganan pentahydrochloride (MBI 226), a topical 12-amino-acid cationic peptide: spectrum of antimicrobial activity and measurements of bactericidal activity. Antimicrobial Agents And Chemotherapy. 48: 3112-3118.

Scorzoni L, Benaducci T, Almeida A, Silva DHS, Bolzani VdS, Mendes-Giannini MJS (2007) Comparative study of disk diffusion and microdilution methods for evaluation of antifungal activity of natural compounds against medical yeasts Candida spp and Cryptococcus sp. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada 28(1): 25-34.

Selsted ME, Novotny MJ, Morris WL, Tang Y-Q, Smith W, Cullor JS (1992) Indolicidin, a novel bactericidal tridecapeptide amide from neutrophils. Journal of Biological Chemistry. 267: 4292-4295.

Sindambiwe J, Calomme M, Cos P, Totte J, Pieters L, Vlietinck A, Berghe DV (1999) Screening of seven selected Rwandan medicinal plants for antimicrobial and antiviral activities. Journal of Ethnopharmacology. 65: 71-77.

Subbalakshmi C, Sitaram N (1998) Mechanism of antimicrobial action of indolicidin. FEMS microbiology letters. 160: 91-96.

Subczynski WK, Wisniewska A (2000) Physical properties of lipid bilayer membranes: relevance to membrane biological functions. Acta Biochimica Polonica. 47: 613-626.

Vanden B, Vlietinck A (1991) Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. In methods in plant biochemistry ed. Dey PM and Harborne JB. London academic press.

Zasloff M (2002) Antimicrobial peptides of multicellular organisms. Nature 415: 389-395.

Archive of SID

www.SID.ir