

فرایان پتید نو ترکیب لاکتوفریسین شتر در ریشه‌های موین توتون و بررسی فعالیت ضد میکروبی آن*

نگین اصلاحی^۱، علی‌نیزی^{۱*}، فرزانه آرام^۱، علیرضا افشاریفر^۱ و سید محسن تقوی^۱

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۴/۱؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۹/۲۸)

چکیده

فناوری DNA نو ترکیب منجر به تولید پروتئین‌ها و پتیدهای درمانی متنوعی شده است. لاکتوفریسین یک پتید کاتیونی قوی در ناحیه N-ترمینال پروتئین لاکتوفریسین است. این تحقیق با هدف تولید لاکتوفریسین شتر در ریشه‌های موین توتون و بررسی خاصیت ضد باکتریایی آن انجام شده است. بدین منظور توالی ژن کدکننده پتید لاکتوفریسین شتر از بانک ژن استخراج و با توجه به ترجیح کدونی توتون بهینه‌سازی شده و در حامل بیانی pBI121 همسانه سازی گردید. حامل نو ترکیب pBI121 به باکتری *Agrobacterium rhizogenes* سویه AR15834 منتقل و برای تلفیح ریز نمونه‌های برگ توتون با هدف تولید ریشه‌های موین مورد استفاده قرار گرفت. ریشه‌های موین ترانسژن با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن کدکننده پتید لاکتوفریسین مورد بررسی و تایید قرار گرفت. استخراج پتید نو ترکیب لاکتوفریسین از ریشه‌های موین توتون انجام و علیه بیمارگرهای گیاهی شامل *Pseudomonas syringae* pv. *Pseudomonas fluorescens*، *Pseudomonas syringae*، *Erwinia amylovora*، *Xanthomonas citri* و *Pectobacterium carotovorum* مورد ارزیابی قرار گرفت. آنالیز آماری داده‌ها با نرم افزار MINITAB نشان داد که پتید نو ترکیب لاکتوفریسین در ریشه‌های موین بیان شده و خاصیت ضد باکتریایی قابل توجهی دارد...

کلیدواژه: لاکتوفریسین، پتید نو ترکیب، ریشه‌های موین، آگروباکتری، خاصیت ضد باکتریایی

* بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول، ارائه شده به دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز

** مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: Niazi@shirazu.ac.ir

۱. به ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، استاد و کارشناس ارشد پژوهشکده بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، دانشیار و استاد بخش گیاه‌پزشکی دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز.

Overexpression of Camel lactoferricin recombinant peptide in tobacco hairy roots and study of its antimicrobial activity*

N. Eslahi¹, A. Niazi^{1**}, F. Aram¹, A. Afsharifar¹ and S.M. Taghavi¹

(Received: 22.6.2014; Accepted: 19.12.2015)

Abstract

The application of recombinant DNA leads to production of a large number of therapeutic proteins and peptides. Lactoferricin, a strong cationic peptide N-terminal region of lactoferrin, is produced by a protein-digesting enzyme pepsin. So, this project was done to produce lactoferricin of camel in hairy roots of tobacco and investigate its antibacterial effect. For this reason camel lactoferricin peptide gene sequence was extracted from gene bank and after optimization of codon usage synthesized artificially. The mentioned sequence was subcloned into pBI121 expression vector. The recombinant pBI121 vector was transferred to *Agrobacterium rhizogenes* bacterium and then was used to produce hairy roots. Hairy roots was evaluated and proved by specific primers of gene which coded lactoferricin peptide. Recombinant peptide of lactoferricin was extracted from hairy roots and evaluated against plant pathogenic bacteria including *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Erwinia amylovora*, *Xanthomonas citri*, *Pectobacterium carotovorum* by disk diffusion method. The results showed that this peptide was expressed in hairy roots and has significant antibacterial effect.

Keywords: Recombinant peptide, Hairy roots, *Agrobacterium*, Antibacterial effect

* Part of M.Sc. Thesis of The First Author Submitted to College of Agric., Shiraz Univ., Shiraz, Iran.

** Corresponding author's E-mail: Niazi@shirazu.ac.ir

1. Former M.Sc. Student, Prof. and scientific laboratory technician of Institute of Biotechnology, Shiraz University. Associate Prof. and Prof. of Plant Pathol., College of Agric., Shiraz Univ., Shiraz, Iran.

مقدمه

های دیگری مانند گیاهان روی آوردند. با ظهور تکنولوژی DNA نو ترکیب در اواخر دهه ۸۰ میلادی، سیستم‌های بیان گیاهی ابداع شدند که قادر به تولید پروتئین‌های ارزشمند بودند (Schillberg *et al.* 2002). از مهم‌ترین مزایای تولید پروتئین‌های نو ترکیب در سیستم‌های بیان گیاهی می‌توان به اقتصادی بودن تولید آن‌ها نسبت به سیستم‌های صنعتی، تولید فراورده‌های زیستی فعال و مشابه شکل طبیعی، تولید بالای پروتئین نو ترکیب و پایداری بیشتر و همچنین عدم وجود خطرات ناشی از آلودگی اشاره کرد (Daniel *et al.* 2001). یکی از سیستم‌های بیان گیاهی مناسب، انتقال ژن‌های خاص به سلول‌های گیاهی و ایجاد ریشه موین با استفاده از روش‌های کشت بافت است. ریشه موین نوعی بیماری گیاهی است که توسط یک باکتری گرم منفی خاکزی به نام آگروباکتریوم رایزوزنز ایجاد می‌شود. ریشه‌های موین تولید شده به وسیله این باکتری رشد و ثبات ژنتیکی بالایی دارند (Hu & Du 2006). انتقال ژن به ریشه می‌تواند باعث پایداری و گسترش تولید متابولیت‌های ثانویه شود (Rhodes *et al.* 1990; Merkliet *et al.* 1997; Kittipongpatana *et al.* 1998). این سیستم با تولید سه شکل فعال پپتید نو ترکیب شامل زایلاناز باکتریایی^۳، پروتئین فلورسنت سبز^۴ و آلکالین فسفاتاز انسانی^۵ از ریشه موین گیاهان توتون و تنباکو معتبر شناخته شد (Gaume *et al.* 2003). بنابراین می‌توان ریشه‌های موین را به عنوان سیستمی کارآمد برای تولید پپتیدهای نو ترکیب به شمار آورد.

در دهه‌های گذشته بسیاری از پپتیدهای ضد میکروبی با تلاش محققان در مبارزه با عوامل بیماری‌زا کشف

سالانه بخش عمده‌ای از محصولات کشاورزی بر اثر بیماری‌های باکتریایی گیاهی از بین می‌روند. باکتری‌های بیمارگر گیاهی اغلب باعث ایجاد لکه برگ و سوختگی برگ، پوسیدگی‌های نرم میوه، ریشه و اندام‌های ذخیره‌ای، پژمردگی‌ها، رشد غیرعادی، لکه سیاه، شانکر و غیره در گیاهان می‌شوند (Bradbury 1986). با توجه به گسترش نگران‌کننده مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها، ایجاد روش‌های مقابله جدید در برابر میکروب‌های بیمارگر گیاهان زراعی ضروری است (Krystyna *et al.* 2011). به کارگیری راهکارهای مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری مدرن امکان جدیدی رادراختیار محققان قرار داده است تا بتوانند موجبات ارتقای کمی و کیفی محصولات کشاورزی و بهبود ویژگی‌های زراعی آن‌ها را از طریق تولید پروتئین‌ها و پپتیدهای ضد میکروبی نو ترکیب فراهم آورند (Krystyna *et al.* 2011). می‌توان ژن‌های مختلفی رادر سیستم‌های گوناگونی بیان کرد، بنابراین تعیین سیستمی با بیشترین بازده تولید پروتئین‌های نو ترکیب امری ضروری است. یک سیستم بیان‌کننده پروتئین نو ترکیب باید بتواند مواد زیستی را با بیشترین فعالیت بیولوژیکی و ایمنی^۱ و کمترین هزینه تولید کند (Demain & Vaishnav 2009). قارچ‌های رشته‌ای از جمله سیستم‌های قوی برای تولید پروتئین‌های نو ترکیب هستند، که شامل اسپرژیلوس، تریکودرما، ریزوپوس و همچنین گونه‌های مختلف پنی سیلیوم می‌شوند. ولی از آنجایی که قارچ‌ها پاتوژن پستانداران و گیاهان می‌باشند، از آن‌ها نمی‌توان به عنوان سیستم مناسب برای تولید پروتئین‌های نو ترکیب استفاده نمود (Schillberg *et al.* 2002). بنابراین پژوهشگران به سیستم-

² *Agrobacterium rhizogenes*² Bacterial xylanase⁴ GFP⁵ SEAP¹ Safety

ناحیه N ترمینال پروتئین لاکتوفریسین قرار دارد (Bellamy et al. 1993). لاکتوفریسین شباهت زیادی به گروه پپتیدهای کاتیونی از جمله *cecropins* و *magainin* دارد که پس از هضم توسط آنزیم پپسین موجود در معده پستانداران از لاکتوفریسین به دست می‌آید و خواص ضد میکروبی قوی تری نسبت به لاکتوفریسین دارد (Chong et al. 2000) و به عنوان جزئی از سیستم ایمنی ذاتی مطرح هست و اولین سد دفاعی در برابر حملات میکروبی است. لاکتوفریسین دامنه وسیعی از فعالیت‌های زیستی مانند فعالیت‌های ضد قارچی، ضد باکتریایی، ضد ویروسی، ضد سرطانی، آنتی‌اکسیدانی، ضد التهابی، ضد درد، تنظیم سیستم ایمنی، تنظیم بیان ژن و تعدیل رشد سلول را دارا است (Gifford et al. 2005). شواهد قابل توجهی مبنی بر اثرات ضد میکروبی لاکتوفریسین در یافته‌های آزمایشگاهی به دست آمده است. این پپتید در برابر طیف وسیعی از باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت مقاومت نشان می‌دهد (Eliassen et al. 2002; Ueta et al. 2001; Vorland et al. 1999). مطالعات صورت گرفته در مورد کاربرد لاکتوفریسین در انسان و جانوران نشان داده است که این پپتید اثرات مفیدی بر حفظ سلامت و پیشگیری و درمان بیماری‌های مختلف و همچنین اثرات مفید رشدی و تغذیه‌ای داشته است (Adlerova et al. 2008; González-Chávez et al. 1995). تاکنون بیشتر بررسی‌ها با استفاده از لاکتوفریسین گاو انجام شده است، ولی با توجه به اثبات فعالیت قوی ضد میکروبی لاکتوفریسین شتر در بررسی‌های مختلف (Liao et al. 2012; Rel-Redwan & Tabll 2007; Sayed et al. 1992) تاکنون تلاشی جهت جداسازی، تولید و بررسی فعالیت ضد میکروبی لاکتوفریسین شتر انجام نشده است. هدف از این تحقیق انتقال ژن کدکننده پپتید لاکتوفریسین شتر به گیاه توتون

شده‌اند. این پپتیدها در طبیعت یافت می‌شوند و از طیف وسیعی از موجودات زنده به دست می‌آیند، پپتیدهای ضد میکروبی معمولاً متشکل از ۱۲ تا ۵۰ اسید آمینه می‌باشند که توسط میکروارگانیسم‌ها و موجودات پرسلولی به عنوان بخشی از مکانیسم‌های دفاعی میزبان سنتز می‌شوند. این پپتیدها بدون هیچ‌گونه صدمه‌ای به میزبان عمل خود را انجام می‌دهند که در واقع تفاوت ساختاری بین سلول میزبان و غشاء سلول هدف باعث ایجاد چنین روندی می‌شود و یک نقش اساسی در فعالیت‌های گزینشی این پپتیدها به شمار می‌آید (González-Chávez et al. 2009). این پپتیدها به دو طریق غیر ریپوزومی و ریپوزومی ساخته می‌شوند. گروه اول عمدتاً توسط باکتری‌ها تولید می‌شوند و دیگری توسط تمام موجودات زنده تولید می‌شوند (González-Chávez et al. 2009). به طوری که تولید پپتیدهای ضد میکروبی در پوست قورباغه و بدن حشرات به اثبات رسیده است (Wang et al. 2008; Zasloff 1987; Cherry & Silverman 2006; Lemaitre & Hoffmann 2007). همچنین ۳۸ پپتید ضد میکروب با توالی و ساختار متفاوت در گاو و همچنین در انسان (HBD1-3, HNP1, LL37) کشف شده است (Hancock & Diamond 2003; Tollin et al. 2000). علاوه بر این، آنالوگ‌ها و مشتقات مصنوعی پپتیدهای ضد میکروبی بر اساس الگوی پپتیدهای طبیعی با موفقیت تولید شده‌اند. لاکتوفریسین یکی از مهم‌ترین ترکیبات ضد میکروبی و یک گلیکوپروتئین متصل شونده به آهن از خانواده ترانسفرین با وزن مولکولی ۸۰ کیلو دالتون می‌باشد که اولین بار از شیر گاو جداسازی شد (Sorensen & Sorensen 1939) و در غده‌های ترشحی، اشک، بزاق و مخاط نیز وجود دارد (Gonzalez-Chavez et al. 2009; Levay et al. 1995; Adlerova et al. 2008). قسمتی از پروتئین لاکتوفریسین، لاکتوفریسین نام دارد که یک پپتید ضد میکروبی قوی کاتیونی است که در

جدول ۱- آغازگرهای اختصاصی Lac

Table 1. Lacspecific primers

Primer name	Annealing temperature Ta (°c)	Primer length	Primer sequence (5'3')
F-Lac	45	18bp	CATTAGGTCTCTGTCTTG
R-Lac	45	18bp	CTCTCACTTTCTTCATCC

انتقال ناقل بیان به باکتری و شناسایی کلون‌های نو ترکیب

از سلول‌های مستعد باکتری *E. coli* سویه *DH5α* برای ترانسفورماسیون^۶ به روش الکتروپوراسیون^۷ با دستگاه GenePulserTM Xcell استفاده شد و سپس باکتری‌های ترانسفورم شده روی محیط انتخابی LB^۸ جامد حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین با غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر قرار داده شد. به منظور تأیید وجود توالی لاکتوفریسین در آن‌ها، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی لاکتوفریسین (جدول ۱) انجام شد.

استخراج پلاسمید و هضم آنزیمی

کشت مایع LB از باکتری‌هایی که PCR آن‌ها مثبت بود به مدت یک شبانه‌روز انجام شد و سپس با استفاده از روش لیزقلیایی (Kotchoni et al. 2003) پلاسمید استخراج شد و هضم آنزیمی در دو مرحله با دو آنزیم *BamHI* و *SacI* به مدت دو ساعت و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام شد و در نهایت محصول هضم آنزیمی روی ژل آگارز ۲٪ الکتروفوروز^۸ برده و با دستگاه Gel Documentation مدل Gene Flash شرکت Aran Tjhez از ژل عکس‌برداری شد.

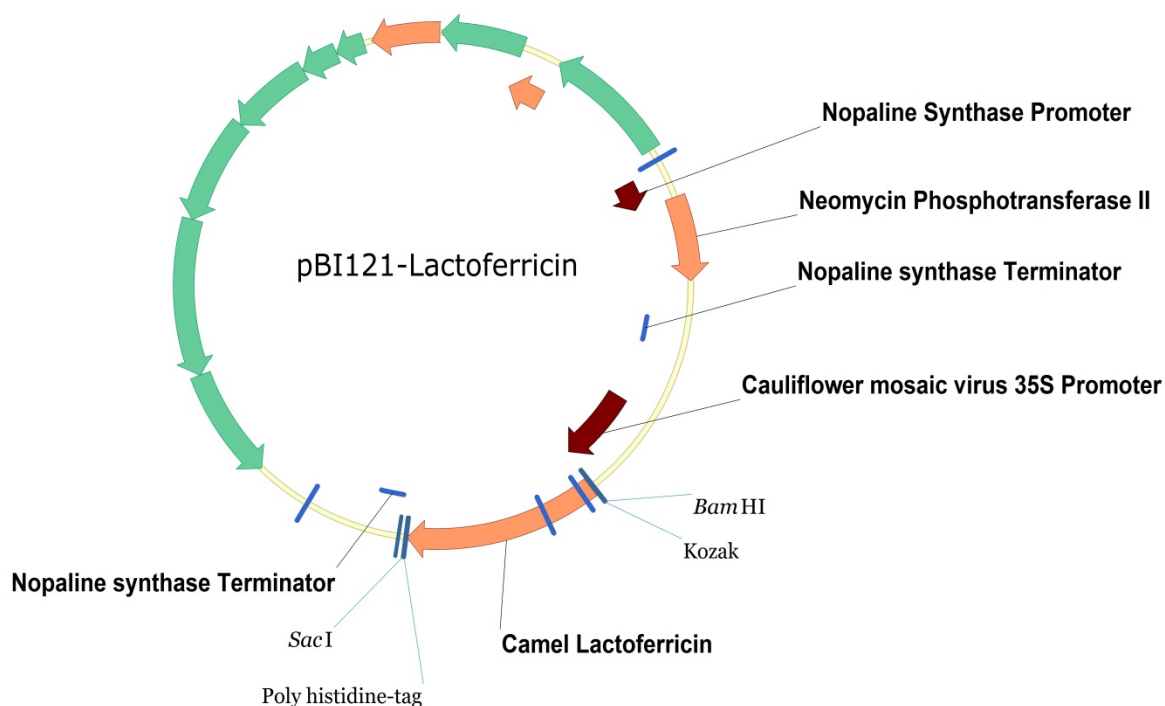
باهدف ایجاد ریشه موئین و تولید پپتید نو ترکیب به منظور بررسی فعالیت ضد باکتریایی آن علیه بیمارگرهای گیاهی است.

روش بررسی

همساز سازی ژن لاکتوفریسین

توالی متناظر با لاکتوفریسین شتر بر اساس توالی لاکتوفریسین شتر (AJ131674) از بانک ژن استخراج گردید و خاصیت ضد میکروبی توالی شناسایی شده متناظر با لاکتوفریسین شتر در سایت CAMP (<http://www.camp.bicnirrh.res.in>) پیش‌بینی شد. سپس بهینه‌سازی کدون‌ها بر اساس ترجیح کدون‌ی گیاه توتون (*Nicotiana tabacum* L.) با استفاده از سایت Genscript (http://www.genscript.com/codon_opt.html) صورت پذیرفت. علاوه بر توالی لاکتوفریسین، توالی لازم برای ایجاد محل برش آنزیم‌های برشی *BamHI* و *SacI* در ابتدا و انتهای توالی طراحی شده، قرار داده شدند. همچنین توالی کزاک (Kozak1987)، در ابتدای توالی لاکتوفریسین به منظور افزایش بیان قرار گرفت (شکل ۱) و توالی مورد نظر به صورت مصنوعی توسط شرکت Biomatik کانادا ساخته شد و در ناقل بیان pBI121 (Clontech) همساز سازی گردید و تحت عنوان pBI121-LfcinC ارسال گردید.

⁶Transformation⁷ Electroporation⁸Lauria and Bertani



شکل ۱- نقشه ژنتیکی وکتور pBI121-LfcinC

Fig.1. The genetic map of pBI121-LfcinC vector

مواد گیاهی

باکتری بر روی کاغذ صافی سترون قرار داده شدند تا خشک شوند، سپس روی محیط هم کشتی MS بدون هورمون و آنتی بیوتیک قرار داده شدند به طوری که سطح فوقانی برگ بر روی محیط کشت قرار گرفت. هم کشتی به مدت ۲ تا ۳ روز در شرایط تاریکی در دمای ۲۲ تا ۲۶ درجه سانتی گراد انجام شد و سپس ریزنمونه ها به محیط انتخابی حاوی کانامایسین با غلظت ۵۰ میلی گرم بر لیتر و سفوتاکسیم با غلظت ۳۰۰ میلی گرم بر لیتر برای القا ریشه های موین منتقل شدند. تا زمان تشکیل ریشه ها، نمونه ها به طور مرتب در محیط انتخابی جدید به منظور کنترل آگروباکتریوم واکشت شدند (Tempe & Casse-Delbart, 2012).

استخراج DNA ژنومی و تائید تراژنی

به منظور تائید وجود ژن پپتید لاکتوفریسین، استخراج

بذرهای توتون (*L. Nicotiana tabacum*) رقم Xanthi به مدت ۱۰ دقیقه در محلول شوینده (۳۰۰ μL هیپوکلریت سدیم ۰.۵٪، ۶ μL تریتون X100⁹ و ۷۰۰ μL آب مقطر) غوطه ور شده تا ضد عفونی شوند و سپس پنج بار با آب مقطر شسته شدند. بذرها به صورت فاصله دار بر روی محیط MS (Murashige & Skoog 1962) قرار داده و در شرایط نوری ۱۰۰۰ لوکس و در دمای ۲۵ الی ۲۸ درجه سانتی گراد در اتاق کشت نگهداری شدند. نمونه برگه سترون از گیاهان رشد یافته از این بذور تهیه شد. برگها در عرض به فواصل یک سانتی متری برش داده شدند، سپس به درون مایع تلقیح باکتری آگروباکتریوم ریزوژنز سویه AR15834 نو ترکیب حاوی ژن پپتید لاکتوفریسین منتقل و ۵ تا ۱۰ دقیقه تکان داده شدند. برگهای آلوده به

⁹Triton X-100

سانتی‌گراد قرار داده شد.

استخراج پروتئین

استخراج پروتئین با استفاده از روش استون و همکاران (Stone & Gifford., 1997) انجام گردید. غلظت پروتئین استخراج شده به روش Bradford و همکاران (Bradford et al. 1976) اندازه‌گیری و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

آزمایش فعالیت ضد میکروبی

فعالیت ضد باکتریایی لاکتوفریسین نو ترکیب تولید شده با استفاده از بررسی فعالیت پروتئین کل از ریشه‌های موین تراریخت علیه میکروارگانیسم‌های گیاهی (نام میکروارگانیسم‌های مورد آزمایش در نمودار آورده شده است) با روش انتشار دیسکی (Bayer et al. 1966) اندازه‌گیری شد. بدین منظور میکروارگانیسم‌های مورد نظر تا $OD_{600nm} = 0.4$ در محیط LB مایع رشد داده شدند و به میزان ۵۰ میکرولیتر به ۵۰ میلی‌لیتر از محیط کشت LB جامد که دمای آن پایین آمده بود اضافه شدند و در ۳ پتری دیش ریخته شدند. بعد از بستن محیط، دیسک‌ها روی آن قرار داده شده و به میزان ۲۰، ۴۰، ۶۰ و ۸۰ میکرولیتر از پروتئین استخراج شده با غلظت ۰/۵۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به آن‌ها افزوده شد. پتری دیش‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه برای تثبیت پروتئین در دیسک و سپس به مدت ۱۵ ساعت در دمای ۳۷ درجه برای رشد میکروارگانیسم‌ها نگهداری شدند. میزان فعالیت ضد میکروبی پروتئین با اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد ایجاد شده در اطراف دیسک‌ها بررسی گردید. این میکروارگانیسم‌ها از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های

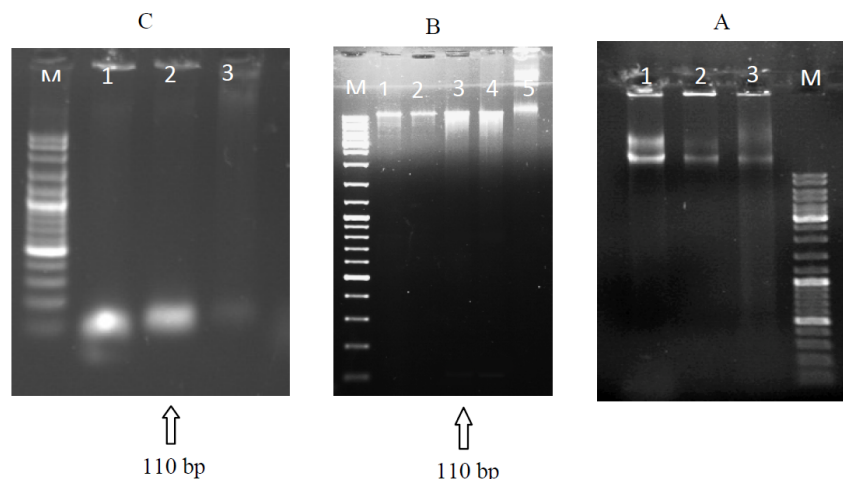
DNA از ریشه‌های موین به روش CTAB انجام شد (Gawel & Jarret., 1991). سپس قطعه مورد نظر با آغازگرهای اختصاصی ژن پپتید لاکتوفریسین (جدول ۱) از روی DNA ژنومی انجام و سپس محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز روی ژل آگارز ۱٪ بار گذاری شد.

استخراج RNA و سنتز cDNA

به منظور تأیید بیان ژن پپتید لاکتوفریسین، استخراج RNA مطابق با روش کیت دنایست (Column RNA Isolation kit I) انجام و با استفاده از آنزیم DNaseI (شرکت ThermoScientific) آلودگی ژنومی حذف شد؛ و سپس با استفاده از کیت cDNA synthetase (شرکت ThermoScientific) و پرایمر OligodT ساخت cDNA صورت پذیرفت.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از cDNA

برای تأیید حضور و بیان ژن پپتید لاکتوفریسین در ریشه‌های تراژن تولید شده در این پژوهش، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل ۱ میکرولیتر (از استوک با غلظت ۱۰ پیکو مول) از هر آغازگر اختصاصی ژن پپتید لاکتوفریسین، ۰/۵ میکرولیتر dNTPs (10mM)، ۲ میکرولیتر 10X PCR Buffer، ۰/۷۵ میکرولیتر $MgCl_2$ (2.5Mm)، ۱ میکرولیتر cDNA، ۰/۲۵ میکرولیتر آنزیم Taq DNA polymerase (5u/ μ l) و ۱۳/۵ میکرولیتر آب انجام شد. حجم کل به منظور تکثیر در ۱ سیکل دمایی ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، ۴۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه و نهایتاً ۱ سیکل ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه



شکل ۲- نقوش الکتروفورزی استخراج پلاسمید، هضم آنزیمی پلاسمید استخراج شده و PCR کلونی های نو ترکیب-الف: نقوش الکتروفورزی استخراج پلاسمید از باکتری *A. rhizogenes* از چپ به راست: ۱- ۲- ۳- پلاسمیدهای استخراج شده، چاهک M نشانگر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی شرکت Thermoscientific. ب: نقوش الکتروفورزی واکنش حاصل از هضم آنزیمی از چپ به راست: چاهک M نشانگر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی شرکت Thermoscientific، چاهک ۱ و ۲- کلنی های منفی، چاهک ۳ و ۴ کلنی های مثبت با قطعه آزاد شده ناشی از هضم آنزیمی، چاهک ۵- پلاسمید هضم نشده به عنوان کنترل. ج: نقوش الکتروفورزی محصول PCR کلونی های نو ترکیب *A. rhizogene* دارای سازه pBI121-Lfcin از چپ به راست: چاهک M نشانگر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی شرکت Thermoscientific، چاهک ۱- باند ۱۱۰ جفت بازی آغازگر اختصاصی لاکتوفریسین، چاهک ۲- کنترل مثبت (باکتری حاوی ژن پپتید لاکتوفریسین)، چاهک ۳- کنترل منفی (آب)

Fig2-electrophoresis patterns of extracted plasmid, enzyme digestion reaction and PCR product from recombinant colonies. a: electrophoresis patterns of extracted plasmid from *A. rhizogenes* from left to right. 1, 2, 3- extracted plasmid, M- 100bp ladder (Thermoscientific). b: electrophoresis patterns of enzyme digestion reaction from left to right. M- 100bp ladder (Thermoscientific), 1 and 2- negative colonies, 3 and 4 positive colonies or fragment caused by enzyme digestion, 5- Undigested plasmid as control. c: electrophoresis pattern of PCR product from recombinant colonies of *A. rhizogenes* containing pBI121-Lfcin construct from left to right. M- 100bp ladder (Thermoscientific), 1- 110 bp bound of lactoferricin specific primer, 2- positive control (Bacteria containing lactoferricin), 3 - negative control (water).

شده با غلظت ۰/۵۵ میلی گرم بر میلی لیتر) در ۳ تکرار و رسم نمودارها با نرم افزار اکسل انجام شد.

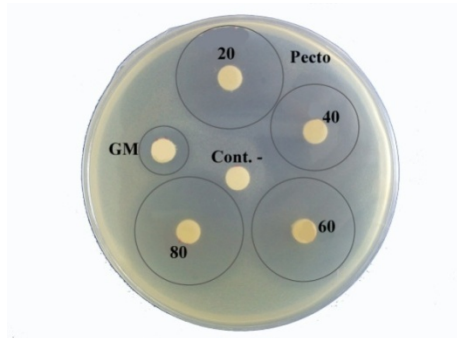
نتایج و بحث

صحت همسانه سازی سازه طراحی شده با استفاده از استخراج پلاسمید و هضم آنزیمی آن توسط آنزیم های *Bam HI* و *Sac I* و انجام واکنش زنجیره ای پلیمرز با آغازگرهای اختصاصی ژن پپتید لاکتوفریسین با مشاهده قطعه ۱۱۰ جفت بازی مورد نظر روی ژل آگارز به اثبات رسید (شکل ۲- الف، ب، ج).

صنعتی ایران و آزمایشگاه باکتری شناسی بخش گیاه پزشکی دانشگاه شیراز تهیه شدند (نمودار ۱). لازم به ذکر است در این پژوهش دیسک جنتامایسین به عنوان کنترل مثبت و پروتئین استخراج شده از ریشه غیر تراژن به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شدند.

آنالیز آماری داده ها

آنالیز آماری داده ها با نرم افزار MINITAB، مقایسه میانگین ها با طرح کاملاً تصادفی در قالب فاکتوریل با ۴ تیمار (۲۰، ۴۰، ۶۰ و ۸۰ میکرو لیتر پروتئین نو ترکیب تولید



شکل ۵- آزمایش ضد میکروبی لاکتوفریسین شتر بر علیه باکتری

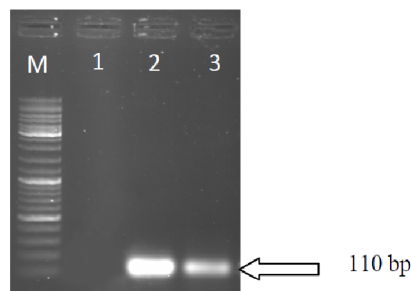
P. carotovorum

Fig 5. Antimicrobial test of Camel lactoferricin against *P. carotovorum*

همچنین واکنش زنجیره‌ای پلیمرز بر روی DNA استخراج شده از ریشه‌های موین تراژن با آغازگرهای اختصاصی لاکتوفریسین و الکتروفورز محصول به دست آمده وجود قطعه ۱۱۰ جفت بازی مورد نظر را مورد تأیید قرار داد (شکل ۳).

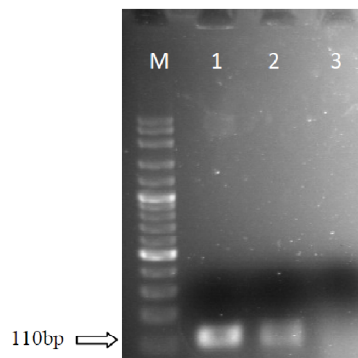
در فرآیند انتقال ژن جهت تولید پروتئین‌های نوترکیب، ترجیح کدونی بین گونه‌های مختلف از اهمیت بالایی برخوردار است و موفقیت یا شکست بیان و تولید پروتئین‌های نوترکیب تا حدود زیادی به این مورد وابسته است (Kang et al. 2004). در پژوهش انجام شده توالی متناظر با لاکتوفریسین شتر بر اساس ترجیح کدونی گیاه توتون (*Nicotiana tabacum* L.) بهینه‌سازی شد؛ و بیان سازه مورد نظر در ریشه‌های موین تراژن با روش RT-PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن پپتید لاکتوفریسین و همچنین بررسی فعالیت ضد میکروبی پپتید تولید شده، به اثبات رسید (شکل ۴).

نتایج حاصل از ارزیابی فعالیت ضد میکروبی پروتئین استخراج شده از ریشه‌های تراژن نشان دهنده اثر ضد میکروبی بالای لاکتوفریسین نسبت به نمونه کنترل منفی (پروتئین استخراج شده از ریشه غیر تراژن) و نیز آنتی‌بیوتیک جنتامایسین به عنوان کنترل مثبت بود (شکل ۵).



شکل ۳- نقوش الکتروفورزی محصول PCR از DNA استخراج شده از ریشه موین تراژن از چپ به راست: M: نشانگر مولکولی ۱۰۰ جفت از شرکت Thermoscientific، چاهک ۱- نمونه ریشه غیر تراژن (کنترل منفی)، چاهک ۲- باکتری حاوی ژن پپتید لاکتوفریسین (کنترل مثبت)، چاهک ۳- نمونه ریشه تراژن حاوی باند ۱۱۰ جفت بازی لاکتوفریسین.

Fig3. Electrophoresis patterns of PCR product from extracted DNA of transgenic hairy root from left to right: M- 100bp ladder (Thermoscientific), 1- non transgenic hairy root (negative control), 2- transgenic hairy root containing lactoferricin. 3- Bacteria containing lactoferricin (Positive control).



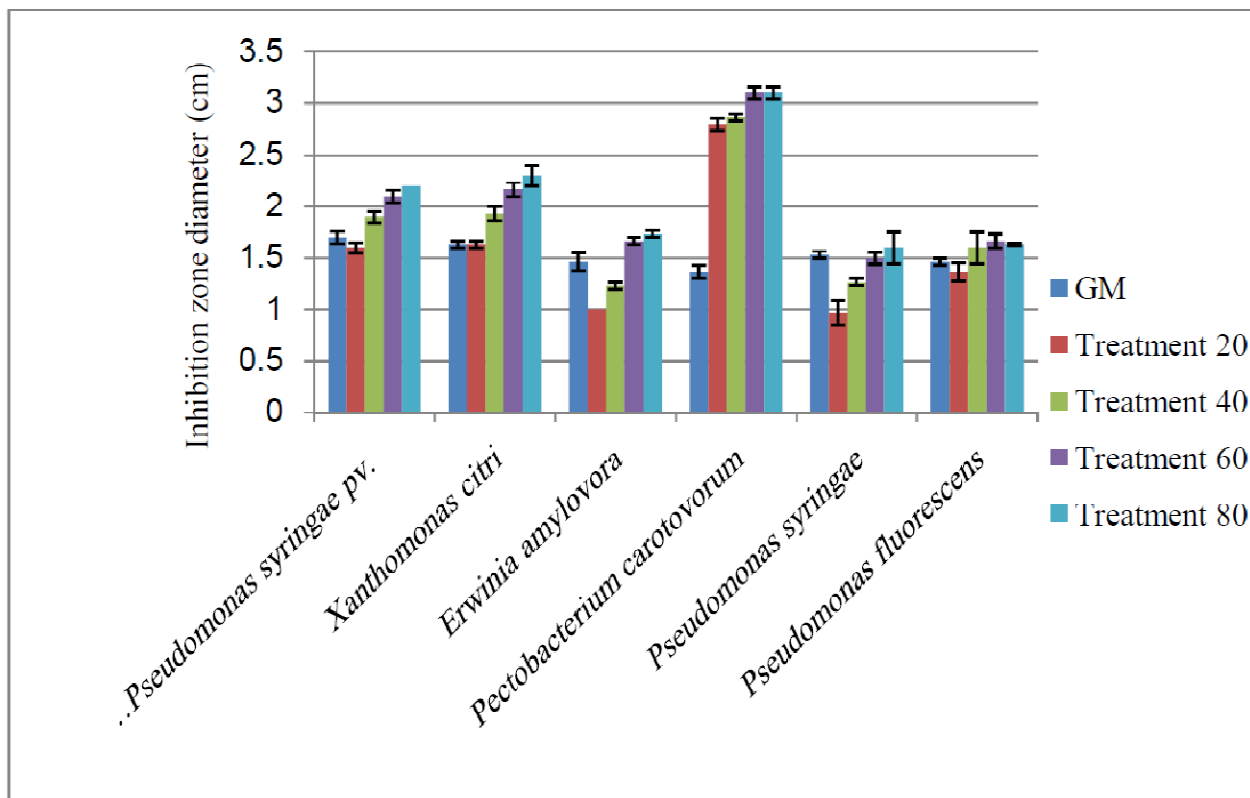
شکل ۴- نقوش الکتروفورزی PCR با پرایمرهای اختصاصی پپتید لاکتوفریسین جهت اطمینان از صحت cDNA از چپ به راست: M نشانگر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی شرکت Thermoscientific، چاهک ۱- باکتری حاوی ژن پپتید لاکتوفریسین (کنترل مثبت) چاهک ۲- باند ۱۱۰ جفت بازی حاصل از آغازگر اختصاصی لاکتوفریسین، چاهک ۳- کنترل منفی (نمونه ریشه غیر تراژن)

Fig4. electrophoresis patterns of PCR product by lactoferricin specific primers for confidence of cDNA correctness from left to right: M- 100bp ladder (Thermoscientific), 1- Bacteria containing lactoferricin (Positive control), 2- Band of 110 bp specific primers Lactoferricin, 3- non transgenic hairy root (negative control)

بلافاصله به وضعیت اولیه خود باز می‌گردد، این حالت در مورد ترکیباتی مانند نیسین، لیزوزیم و لاکتوفریسین مشاهده می‌گردد (Hauben et al. 1996). نوع دیگر حساسیت مداوم و ماندگار است که در پاسخ به لاکتوفریسین دیده می‌شود، (Garcia-Graelles et al. 1998-2000). همانگونه که عنوان گردید لاکتوفریسین از گروه پپتیدهای ضد میکروبی قوی کاتیونی می‌باشد (Tomita et al. 2009) که اثر ضد میکروبی خود را با تاثیر بر غشای سیتوپلاسمی از طریق ایجاد خلل و فرج در غشاء، بی‌ثباتی لایه‌های غشایی و نیز دپلمیریزاسیون غشاء باکتری اعمال می‌نماید (Ulratne et al. 2001). بررسی فعالیت ضد میکروبی لاکتوفریسین بر علیه باکتری‌های بیمارگر گیاهی تاکنون تنها در مورد اثر ضد باکتریایی لاکتوفریسین گاو بر علیه باکتری‌های *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* و *Ralstonia solanacearum* و *Pseudomonas syringae* انجام شده است به طوری که اثر ضد میکروبی لاکتوفریسین گاو به اثبات رسیده است (Fukuta et al. 2012). در این پژوهش نیز همانگونه که ملاحظه گردید لاکتوفریسین نو ترکیب تولید شده در ریشه‌های مویین توتون اثر ضد میکروبی بالایی را در مهار بیمارگرهای گیاهی به نمایش در آورد که تأییدی دیگر بر صحت یافته‌های گذشته در مورد اثر ضد میکروبی این پپتید می‌باشد. از سوی دیگر طی مطالعات گوناگون فعالیت ضد میکروبی لاکتوفریسین در مقایسه با لاکتوفریسین و نیسین بر روی باکتری *Pseudomonas fluorescens* (Masschalck et al. 2001) و نیز پپتید ضد میکروبی مصنوعی Shiva-1 (Zhang et al. 1998) مورد بررسی قرار گرفته است و اثر قوی تر آن به اثبات رسیده است.

آنالیز تجزیه واریانس داده‌های مربوط به اثر ضد میکروبی پروتئین نو ترکیب لاکتوفریسین (جدول نشان داده نشده است) نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح ۱/ میان تیمارهای مختلف پروتئین نو ترکیب تولید شده با سویه‌های باکتری مورد آزمایش می‌باشد. در مورد باکتری‌های *P. syringae*، *E. amylovora*، *P. floescens* و *P. syringae* pv. *syringae* تیمار ۲۰ میکرولیتر پروتئین نو ترکیب با غلظت ۰/۵۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اثر بازدارندگی کمتری نسبت به کنترل مثبت نشان داد و در مورد باکتری *X. citri* تیمار ۲۰ میکرولیتر و کنترل مثبت اثر بازدارندگی یکسانی نشان دادند، همچنین در مورد باکتری *P. carotovorum* تیمار ۲۰ میکرولیتر اختلاف معنی داری نسبت به کنترل مثبت نشان داد (نمودار ۱). در تیمار ۴۰ میکرولیتر پروتئین نو ترکیب با غلظت ۰/۵۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، همه باکتری‌های مورد آزمایش به غیر از *P. syringae* و *E. amylovora* اختلاف معنی داری نسبت به کنترل مثبت نشان دادند (نمودار ۱). در تیمارهای ۶۰ و ۸۰ میکرولیتر پروتئین نو ترکیب لاکتوفریسین با غلظت ۰/۵۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، اختلاف معنی داری نسبت به کنترل مثبت در مورد تمامی بیمارگرهای گیاهی مورد آزمایش مشاهده شد. همانگونه که از نمودار ۱ استنباط می‌شود باکتری‌های جنس سودوموناس و باکتری *P. carotovorum* به ترتیب کمترین و بیشترین حساسیت را در مواجهه با اثر ضد میکروبی پروتئین نو ترکیب لاکتوفریسین نشان دادند.

به طور کلی در مواجهه با ترکیبات ضد میکروبی دو نوع واکنش حساسیت در باکتری‌ها دیده می‌شود، یک نوع حساسیت موقتی بوده که پس از برداشتن تیمار، باکتری



نمودار ۱- مقایسه اثر کنترل مثبت و تیمار ۲۰، ۴۰، ۶۰ و ۸۰ میکرولیتر پروتئین نو ترکیب لاکتوفریسین بر باکتری‌های بیمارگر گیاهی. به ترتیب هر ستون از سمت چپ کنترل مثبت (جتامایسین)، تیمار ۲۰، تیمار ۴۰، تیمار ۶۰، تیمار ۸۰ میکرولیتر پروتئین نو ترکیب با غلظت ۰/۵۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر.

Diagram 1. Comparison of positive control effect and different levels of lactoferricin protein treatment (20, 40, 60 and 80 micro liter) on plant pathogenic bacteria. The left column of the positive control (gentamicin), treated with 20, 40 treatment, 60 treated, treated with 80 ml recombinant peptide concentration of 0/55 mg/ml

نتیجه گیری کلی

نمود و توانست کارایی بالای این سیستم را به عنوان یک سیستم ایده آل در دستورزی ژنتیکی تأیید نماید، به طوری که لاکتوفریسین نو ترکیب تولید شده در این پژوهش نسبت به لاکتوفریسین نو ترکیبی که در مخمر *Pichia pastoris* تولید شد (Chahardooli 2012) کارایی بالاتری را در مهار بیمارگرهای گیاهی مشابه در آزمایشات یکسان نشان داد، بنابراین توسعه سیستم ریشه مویین به منظور تولید پروتئین‌های نو ترکیب کارا در گیاهان به منظور روشی کارآمد توصیه می‌شود. از سوی دیگر انتقال ژن پیتید لاکتوفریسین به گیاهان به منظور توسعه مقاومت گیاه به

تحقیق‌های مختلف فعالیت ضد میکروبی لاکتوفریسین در شرایط آزمایشگاهی را به اثبات رسانیده است (Bellamy et al. 1993; Wakabayashi et al. 2002; Shin et al. 1998; Zhang et al. 1998; Fukuta et al. 2012). در پژوهش حاضر برای اولین بار لاکتوفریسین شتر در ریشه‌های مویین گیاه توتون تولید و اثر آن بر علیه بیمارگرهای گیاهی مختلف بررسی شد و همانطور که ملاحظه گردید لاکتوفریسین نو ترکیب تولید شده در ریشه‌های مویین گیاه توتون به خوبی رشد باکتری‌های مورد آزمایش را مهار

های مختلف از قبیل تولید داروهای ضد میکروبی، تولید آنتی بیوتیک‌های دام و طیور و کاربرد آن به عنوان ترکیبات نگهدارنده در صنایع غذایی به نحو مطلوبی استفاده کرد. باکتری‌های بیمارگر روشی سودمند در جهت بهبود وضعیت زراعی گیاهان می باشد. علاوه بر این، از آنجاییکه لاکتوفریسین برای سلول های گیاهی و جانوری سمی نمی باشد (Munoz & Marcos 2006) از آن می توان در زمینه-

منابع

- Adlerova, L., Bartoskova, A., Bartoskova, M. 2008. Lactoferrin: a review. *Veterinari Medicina* 9: 457-468.
- Bayer, A. W., Kirby, M. D. K., Sherris, J. C., Turck, M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by standard single disc diffusion method. *American Journal of Clinical Pathology* 493-496.
- Bellamy W., Wakabayashi, H., Takase, M., Kawase, K., Shimamura, S., Tomita, M. 1993. Killing of *Candida albicans* by lactoferricin B, a potent antimicrobial peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin. *Medical microbiology and immunology* 182: 97-105.
- Bradbury, J. F. 1986. Guide to plant pathogenic bacteria (CAB international Mycological Institute). Oxford University Press. 332p.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72: 248-54.
- Chahardooli, M. 2012. Isolation and cloning of Camel lactoferrin and expression in *Pichia pastoris* yeast. Master's theses in the field of agricultural biotechnology. Biotech Center Shiraz University.
- Cherry, S. and Silverman, N. 2006. Host-pathogen interactions in *Drosophila*: new tricks.
- Chong, D. and Langridge, H. 2000. Expression of full-length bioactive antimicrobial human lactoferrin in potato plants. *Transgenic Research* 9: 71-78.
- Daniell, H., Streatfield, S. J., Wycoff, K. 2001. Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. *Trends in plant science* 6: 219-226.
- Demain, A. L. and Vaishnav, P. 2009. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology advances* 27: 297-306.
- Eliassen, L., Berge, G., Sveinbjørnsson, B., Svendsen, J. S., Vorland, L. H., Rekdal, Ø. 2002. Evidence for a direct antitumor mechanism of action of bovine lactoferricin. *Anticancer Research* 22: 2703-2710.
- Fukuta, S., Kawamoto, K. I., Mizukami, Y., Yoshimura, Y., Ueda, J. I., Kanbe, M. 2012. Transgenic tobacco plants expressing antimicrobial peptide bovine lactoferricin show enhanced resistance to phytopathogens. *Plant Biotechnology* 29: 383-389.
- García-Graells, C., Hauben, K., Michiels, C.W., 1998. High pressure inactivation and sublethal injury of pressure-resistant *Escherichia coli* mutants in fruit juices. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 1566-1568.
- García-Graells, C., Valckx, C., Michiels, C. W. 2000. Inactivation of *Escherichia coli* and *Listeria innocua* in Milk by Combined Treatment with High Hydrostatic Pressure and the Lactoperoxidase System. *Applied and environmental microbiology* 66: 4173-4179.
- Gaume, S., Komarnytsky, N., Borisjuk, I. 2003. Rhizosecretion of recombinant proteins from plant hairy roots. *Plant Cell Reports* 21: 1188-1193.
- Gawel, N. J. and Jarret, R. L. 1991. A modified CTAB DNA extraction protocol for *Musa* and *Ipomea*. *Plant Molecular Biology Reporter* 9: 250-254.
- Gifforda, J. L., Huntera, H. N., Vogela, H. J. 2005. Lactoferricin: a lactoferrin-derived peptide with antimicrobial, antiviral, antitumor and immunological properties. *Cellular and Molecular Life Sciences* 62: 2588-2598.
- González-Chávez, S. A., Arévalo-Gallegos, S., Rascón-Cruz, Q. 2009. Lactoferrin: structure, function and applications. *International Journal of Antimicrobial Agents* 33: 301.e1-301.e8.
- Hancock, R.E. W. and Diamond G. 2000. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Trends in Microbiology* 8: 402-410.

- Hauben, K., Wuytack, E., Soontjens, C., Michiels, C. 1996. High pressure transient sensitization of *Escherichia coli* to lysozyme and nisin by disruption of outer-membrane permeability. *Journal of Food Protection* 59: 350-355.
- Hu, Z. B. and Du, M. 2006. Hairy root and its application in plant genetic engineering. *Journal of integrative plant biology* 48: 121-127.
- Kang, T. J., Han, S. C., Jang, M. O., Kang, K. H., Jang, Y. S., Yang, M. S. 2004. Enhanced expression of B-subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin in tobacco by optimization of coding sequence. *Applied biochemistry and biotechnology* 117: 175-187.
- Kittipongpatana, N., Hock, R. S., Porter, J. R. 1998. Production of solasodine by hairy root, callus, and cell suspension cultures of *Solanum aviculare* Forst. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 52: 133-143.
- Kotchoni, S. O., Gachomo, E. W., Betiku, E., Shonukan, O. O. 2003. A home made kit for plasmid DNA mini-preparation. *African Journal of Biotechnology* 2: 4
- Kozak, M. 1987. At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells. *Journal of molecular biology* 196: 947-950.
- Kreig, A., Matson, S., Waldschmidt, T., Bishop, G. A., Teasdale, R. 1995. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 374: 546-549.
- Krystyna, I., Katarzyna, G., Anna, K. 2011. Synergy Between Novel Antimicrobials and Conventional Antibiotics or Bacteriocins. *Polish Journal of Microbiology* 61:95-104.
- Lemaitre, B. and Hoffmann, J. 2007. The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annual Review Immunology* 25: 697-743.
- Levay, P. F. and Viljoen, M. 1995. Lactoferrin: a general review. *Haematologica* 80: 252-267.
- Liao, Y., El-Fakkarany, E., Lönnerdal, B. E. M., Redwan E. M. 2012. Inhibitory effects of native and recombinant full-length camel lactoferrin and its N and C lobes on hepatitis C virus infection of Huh7.5 cells. *Journal of Medical Microbiology* 61: 375-383.
- Masschalck, B., Van Houdt, R., Michiels, C. W. 2001. High pressure increases bactericidal activity and spectrum of lactoferrin, lactoferricin and nisin. *International journal of food microbiology* 64: 325-332.
- Merkli, A., Christen, P., Kapetanidis, I. 1997. Production of diosgenin by hairy root cultures of *Trigonella foenum-graecum* L. *Plant Cell Reports* 16: 632-636.
- Munoz, A., and Marcos, J. F. 2006. Activity and mode of action against fungal phytopathogens of bovine lactoferricin derived peptides. *Journal of applied microbiology* 101: 1199-1207.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Rel-Redwan, R.M. and Tabll, A. 2007. Camel lactoferrin markedly inhibits hepatitis C virus genotype 4 infection of human peripheral blood leukocytes. *Journal of Immuno assay and Immuno chemistry* 28: 267-277.
- Rhodes, M. J. C., Robins, R. J., Hamill, J. D., Parr, A. J., Hilton, M. H., Walton, N. J. 1990. Properties of transformed root culture. In: Charlwood BV, Rhodes MJC, eds. *Proceedings of the Phytochemical Society of Europe Secondary Product from Plant Tissue Culture* 106: 1195-1204.
- Sayed, I.E., Agamy, E., Ruppner, R., Ismail, A., Champagne, C.P. and Assaf, R. 1992. Antibacterial and antiviral activity of camel milk protective proteins. *Journal of Dairy Research* 59: 169-175.
- Schillberg, S., Emans, N., Fischer, R. 2002. Antibody molecular farming in plants and plant cells. *Phytochemical Reviews* 1: 45-54.
- Shin, K., Yamauchi, K., Teraguchi, S., Hayasawa, H., Tomita, M., Otsuka, Y., Yamazaki, S. 1998. Antibacterial activity of bovine lactoferrin and its peptides against enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7. *Letters in applied microbiology* 26: 407-411.
- Sorensen, M. and Sorensen, S. P. L. 1940. The proteins in whey. *Compte rendu des Travaux du Laboratoire de Carlsberg, Ser. Chim* 23: 55-99.
- Stone, S. L. and Gifford, D. J. 1997. Structural and biochemical changes in loblolly pine (*Pinus taeda* L.) seeds during germination and early seedling growth: I storage protein reserves. *International journal of plant sciences* 158: 727-737.
- Tempe, J., and Casse-Delbart, F. 2012. Plant gene vectors and genetic transformation: *Agrobacterium* Ri plasmids. *Cell culture and somatic cell genetics of plants* 6: 25-49.

- Tollin, M., Bergman, P., Svenberg, T., Jörnvall, H., Gudmundsson, G. H., Agerberth, B. 2003. Antimicrobial peptides in the first line defence of human colon mucosa. *Peptides* 24: 523-530.
- Tomita, M., Wakabayashi, H., Shin, K., Yamauchi, K., Yaeshima, T., Iwatsuki, K. 2009. Twenty-five years of research on bovine lactoferrin applications. *Biochimie* 91: 52-57.
- Ueta, E., Tanida, T., Osaki, T. 2001. A novel bovine lactoferrin peptide, FKCRRWQWRM, suppresses *Candida* cell growth and activates neutrophils. *Journal of Peptide Research* 57: 240-249.
- Ulvatne, H. H. H. O. L. H., Haukland, H. H., Olsvik, Ø., Vorland, L. H. 2001. Lactoferricin B causes depolarization of the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* ATCC 25922 and fusion of negatively charged liposomes. *FEBS letters* 492: 62-65.
- Vorland, L. H., Osbakk, S. A., Perstølen, T., Ulvatne, H., Rekdal, Ø., endsen, J. S. 1999. Interference of the antimicrobial peptide lactoferricin B with the action of various antibiotics against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 31: 173-177.
- Wakabayashi, H., Teraguchi, S., Tamura, Y. 2002. Increased Staphylococcus-killing activity of an antimicrobial peptide, lactoferricin B, with minocycline and monoacylglycerol. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 66: 2161-2167.
- Wang, L., Zhou, M., McClelland, A., Reilly, A., Chen, T., Gagliardo, R., Walker, B., Shaw, C. 2008. Novel dermaseptin, adenoregulin and caerin homologs from the Central American red-eyed leaf frog, *Agalychnis callidryas*, revealed by functional peptidomics of defensive skin secretion. *Biochimie* 90: 1435-1441.
- Zasloff, M. 1987. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin isolation, characterization of 2 active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proceedings of the National Academy of Science* 84: 5449-5453.
- Zhang, Z., Coyne, D. P., Vidaver, A. K., Mitra, A. 1998. Expression of human lactoferrin cDNA confers resistance to *Ralstoniasolana cearum* in transgenic tobacco plants. *Phytopathology* 88: 730-734.