



تشدید بیان ژن‌های شبه‌تایونین در گیاه آرابیدوپسیس و مقاومت به نماتد

Heterodera schachtii

Overexpression of thionin-like genes in *Arabidopsis* and resistance to *Heterodera schachtii*

شیراحمد سارانی*

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۴/۳۰ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۸/۲۲

نوع مقاله: پژوهشی

DOI: 10.22092/jsb.2022.355154.1279

ش.۱. سارانی. ۱۴۰۰. تشدید بیان ژن‌های شبه‌تایونین در گیاه آرابیدوپسیس و مقاومت به نماتد *Heterodera schachtii*. چغندرقد، ۳۷(۲): ۲۴۶-۲۳۹

چکیده

تایونین‌ها و شبه‌تایونین، پپتیدهای گیاهی با وزن ملکولی کوچک و غنی از سیستئین با فعالیت ضد میکروبی که نقش مهمی در مقاومت گیاهان در برابر عوامل بیماری‌زا دارند و از چندین گونه گیاهی جدا شده‌اند. هدف از این مطالعه تشدید بیان ژن‌های شبه‌تایونین (*At1g20618* و *At1g12665*) برای ایجاد مقاومت در برابر نماتد *H. schachtii* است. ژن‌های *At1g12665* (*ThiL12*) و *At1g20618* (*ThiL20*) از گیاه آرابیدوپسیس جداسازی شده و گیاهان تراریخته از طریق باکتری اگروباکتریوم با استفاده از پلاسمید pMAA-red و با استفاده از روش آغشته سازی گل آذین تولید شدند. بیان ژن‌های شبه‌تایونین در گیاهان تشدید بیان شده با روش RT-PCR تأیید و میزان تشدید بیان در بذرها قرمز رنگ و هموزیگوت با روش RT-PCR کمی مقایسه گردید. به منظور بررسی مقاومت، ریشه گیاهان ۱۲ روزه آرابیدوپسیس تحت شرایط استریل با ۶۰-۵۰ لارو نماتد به ازای هر بوته در محیط Knop تلقیح شدند. پانزده روز پس از تلقیح، هنگامی که لارو نر و ماده را می‌توان به وضوح تشخیص داد، تعداد لاروها شمارش شدند و نتایج با رقم وحشی (Col-0) مقایسه شد. نتایج نشان داد که مقاومت به *H. schachtii* در لاین‌های تشدید بیان شده در مقایسه با نوع وحشی افزایش یافته است. به هر حال تفاوت معنی‌داری در اندازه نماتد ماده و سلول‌های syncytia بین لاین‌ها به جز یک لاین مربوط به ژن *At1g20618* مشاهده نشد.

واژه‌های کلیدی: پپتیدهای ضد میکروبی گیاهان، تراریخته، چغندرقد، نماتد سیست



مقدمه

مانند همه موجودات زنده، گیاهان نیز می‌توانند پپتیدهای ضد میکروبی تولید نمایند و این پپتیدها بخشی از اولین خط دفاعی سیستم ایمنی میزبان در برابر تنش‌های مختلف زیستی و غیرزیستی هستند (Bohlmann 1994; Van Loon *et al.* 2000; Norouzi *et al.* 2021). این پپتیدهای ضد میکروبی، مولکول‌های کوچکی بوده (کمتر از ۱۰۰ اسید آمینه) و ۳ تا ۱۰ کیلو دالتون وزن دارند و عمدتاً غنی از اسید آمینه سیستئین و معمولاً خاصیت بازی دارند. آنها طیف ضد میکروبی گسترده‌ای در برابر قارچ‌ها، باکتری‌ها، ویروس‌ها، نماتدها و حشرات دارند و از موجودات زنده مختلف استخراج شده‌اند و فعالیت‌های ضد میکروبی آنها در شرایط آزمایشگاهی به اثبات رسیده است (Hancock *et al.* 1995; Jurgenssen *et al.* 2001).

این پپتیدهای گیاهی به چندین خانواده مانند تایونین‌ها، دینسین‌ها، پروتئین‌های انتقال چربی، سیکلوتیدها، اسکنین‌ها، هیوئین، کنوتین‌ها و ... طبقه‌بندی شده‌اند، سیزده هزار ژن گیاهی که به خانواده‌های مختلف پپتیدهای ضد میکروبی از جمله تایونین‌ها، دینسین‌ها، پروتئین‌های انتقال چربی و سایر گروه‌ها تعلق دارند شناسایی شده‌اند (Garcia-Olmedo *et al.* 1998). شصت و هفت ژن گیاه آراییدوپسیس، پپتیدهایی را رمزگذاری می‌کنند که شبه‌تایونین نامیده می‌شوند (Silverstein *et al.* 2007). المغربی (Almaghrabi 2012) هم‌ترازی توالی چندگانه ۱۴ ژن را با ساخت درخت فیلوژنتیک، پیش‌بینی پپتید سیگنال و پیش‌بینی ساختار سه‌بعدی نشان داد. این ژن‌ها دارای تعداد بالایی از باقی‌مانده‌های سیستئین و الگوهای مشابه تشکیل پیوندهای دی‌سولفیدی به پپتیدهای تایونین‌ها هستند. نماتد *Heterodera schachtii* از عوامل مهم بیماری‌زای گیاهی است که به بسیاری از گونه‌های گیاهی حمله می‌کند و سالانه خسارت قابل ملاحظه‌ای را به محصولات کشاورزی و

صنعتی وارد می‌کند (Muller 1999). هدف از این مطالعه بررسی مقاومت لاین‌های تشدید بیان شده گیاه آراییدوپسیس با ژن شبه‌تایونین در برابر نماتد *H. schachtii* بود.

مواد و روش‌ها

جداسازی DNA و RNA از گیاه آراییدوپسیس و تعیین

توالی آنها

جداسازی DNA از برگ‌های آراییدوپسیس بر اساس روش ادواردز و همکاران (Edwards *et al.* 1991) انجام شد. جداسازی و خالص‌سازی DNA و RNA از کیت‌های QIAGEN RNeasy Plant Mini Kit (Germany) و Plant RNA Isolation Mini Kit (Agilent, Austria) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد. توالی‌یابی نمونه‌ها با استفاده از روش توالی‌یابی سریع سانگر و همکاران (Sanger *et al.* 1977) توسط شرکت LGC Genomics در برلین آلمان انجام شد.

انتقال پلاسمید به باکتری اشرشیاکلی و آگروباکتریوم

پلاسمیدها با استفاده از پروتکل کیت:

GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific) استخراج شدند. از سویه *E. coli* DH10B در این مطالعه استفاده شد و پلاسمیدها با روش انجماد-ذوب به باکتری آگروباکتریوم *A. tumefaciens* سویه GV3101 منتقل شدند (Holsters *et al.* 1978).

انتقال پلاسمید به گیاهان آراییدوپسیس با واسطه

آگروباکتریوم

ابتدا ناقل پلاسمید pMAA-red به سویه GV3101 آگروباکتریوم انتقال یافته و سپس به گیاه آراییدوپسیس با استفاده

Thermo Maxima H Minus First Strand از شرکت Fisher طبق دستورالعمل شرکت سازنده، استفاده شد. غلظت cDNA با دستگاه اسپکتروفتومتر نانودراپ اندازه‌گیری شد. ۱۲ تا ۲۷ لاین تراریخته با ناقل pMAA-red انتقال یافته برای آزمایش RT-PCR آزمون شدند.

طبق دستورالعمل کیت cDNA Maxima H Minus (Thermo Fisher) برای سنتز cDNA استفاده شد. برای تجزیه و تحلیل نتایج qRT-PCR، از کیت KAPA SYBR FAST qPCR (sigma-aldrich) و سپس از روش $\Delta\Delta Ct$ استفاده شد (Livak and Schmittgen 2001). CT نشان‌دهنده تعداد چرخه‌هایی می‌باشد که برای رسیدن به خط آستانه لازم است بنابراین، ΔCt تفاوت بین دو نمونه را نشان می‌دهد.

شرایط رشد گیاه آراییدوپسیس در خاک

از رقم وحشی *A. thaliana* (col) برای همه آزمایش‌ها (انتقال پلاسمید به گیاه و در سنجش آلودگی گیاه) استفاده شد. گیاهان تحت شرایط روز بلند (دوره نوری ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریک) در دمای ۲۳-۲۱ درجه سانتی‌گراد در یک اتاقک رشد نگاه‌داری شدند. انتخاب و غربالگری گیاهان آراییدوپسیس تراریخته و تولید بذور هموزیگوت نیز در شرایط مشابه صورت گرفت.

آماده‌سازی *H. schachtii* برای سنجش بیماری‌زایی و

آزمون مقاومت گیاهان به نماتد

سیست‌های *H. schachtii* از کشت‌های *in vitro* تکثیرشده روی ریشه‌های گیاه خردل (*Sinapis alba* cv. Albatros) که روی محیط کشت Knop رشد می‌کردند،

از روش آغشته‌سازی گل‌آذین طبق روش کلو و بنت (Clough and Bent 1988) و لوگمن و همکاران (Logemann *et al.* 2006) انتقال یافت. گیاهان آراییدوپسیس در اتاقک رشد (شرایط روز بلند) تا زمانی که بذرها برداشت شوند، نگاه‌داری شدند. بذرهای اصلاح شده با استفاده از نشانگر انتخابی در زیر میکروسکوپ معکوس مجهز به فیلتر فلورسانس DsRed (Axiovert 200M) ساخت شرکت Zeiss AG آلمان جداسازی و بذر تراریخته در خاک برای تولید نسل بعدی کشت شدند.

تولید لاین‌های تراریخته آراییدوپسیس با استفاده از ناقل pMAA-red

ناقل pMAA دارای نشانگر قرمز رنگ نه تنها دارای نشانگر Dsred بود، بلکه دارای ژن گزارشگر GUS نیز بود که می‌تواند

به‌عنوان نشانگرهای انتخاب چشمی برای تشخیص گیاهان آراییدوپسیس تراریخته استفاده شود. نشانگر قرمز رنگ Pdf2.1: DsRed در دانه‌های گیاه آراییدوپسیس تراریخته و مجتمع تغذیه‌ای ناشی از نماتد چغندر (Syncytia) بیان می‌شود. دانه‌های تراریخته در زیر میکروسکوپ فلورسانس دارای رنگ قرمز و میزان رنگ قرمز زیر میکروسکوپ فلورسانس نشان‌دهنده سطح بیان ژن تراریخته بود (Ali *et al.* 2012).

آزمایش RT-PCR و qRT-PCR

از RT-PCR برای اثبات کلون کردن ژن بیان‌شده و برای تشخیص و آنالیز RNA از کیت RT-PCR شرکت Thermo Scientific Verso™ 1-step Reddy Mix Kit استفاده شد. برای سنتز cDNA، از کیت سنتز cDNA

داده‌های مربوط به تعداد نماتدها، میانگین اندازه syncytia و همچنین اندازه نماتدهای ماده با استفاده از آزمون (LSD) و آنالیز واریانس تک عاملی ($P < 0.05$) ANOVA مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

نتایج

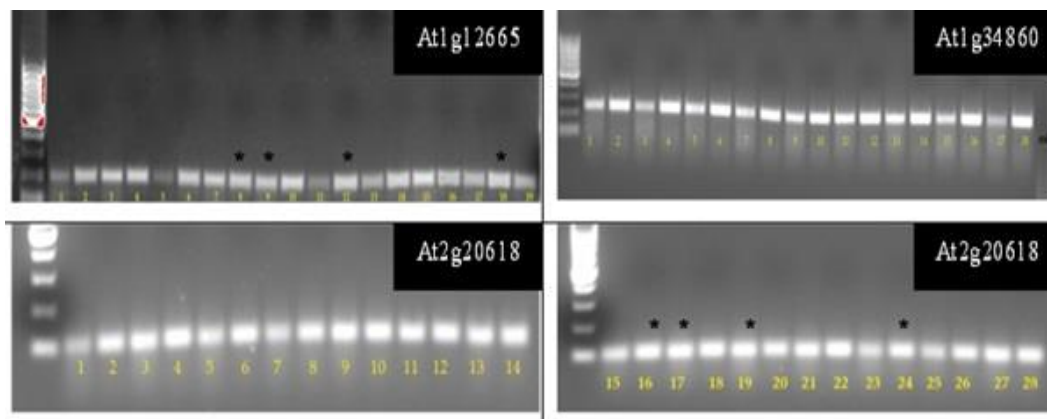
بذرهای تشدید بیان شده با استفاده از نشانگر انتخابی در زیر میکروسکوپ معکوس فلورسانس انتخاب شدند و بذرهای قرمز رنگ روی محیط کشت MS کشت شدند. تشدید بیان ژن‌های شبه تایونین و خصوصیات این ژن‌ها، پس از یکسان‌سازی تعداد نمونه‌ها مورد آزمایش قرار گرفت و نتایج-RT-PCR در شکل ۱ نشان داده شده است.

نتایج آزمایش RT-PCR نشان‌دهنده بیان بالاتر سه ژن شبه‌تایونین تشدید بیان شده در گیاهان تراریخت آرابیدوپسیس در مقایسه با رقم وحشی آرابیدوپسیس می‌باشد. چهار لاین از ژن‌های تشدید بیان شده با سطح بیان بالای شبه‌تایونین بر اساس آزمایش RT-PCR برای تولید لاین‌های هموزیگوت و آزمایش qRT-PCR انتخاب شدند (شکل ۱).

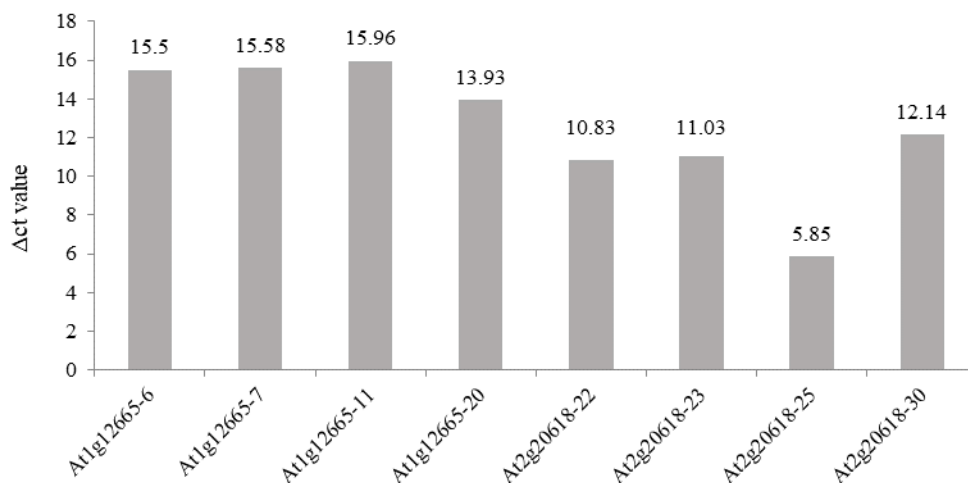
تجزیه و تحلیل بیان ژن با استفاده از qRT-PCR

نتایج qRT-PCR برای چهار لاین تشدید بیان شده انتخابی از ژن‌های شبه‌تایونین در شکل ۲ نشان داده شده است. در مقایسه با گیاهان رقم وحشی سطح بیان Atlg12665 (ThiL12) نسبتاً بیشتر از سایرین بود. در نهایت دو لاین گیاهان تراریخت با بالاترین سطح بیان ژن برای تست مقاومت به نماتد انتخاب شدند (شکل ۲).

برداشت شدند و طبق روش سیجمونز و همکاران (Sijmons *et al.* 1991) انجام گرفت. خروج لاروهای J2 از سیست‌ها با خیساندن در محلول ۳ میلی‌مولار $ZnCl_2$ استریل به مدت ۴-۵ روز تحریک شدند. لاروهای سن دوم نماتد با ۰/۰۵ درصد $HgCl_2$ به مدت ۳ دقیقه استریل شد و بلافاصله ۳-۴ بار در آب مقطر دوبار تقطیر، شسته شد. لاروهای سن دوم نماتد در ژل ۰/۵ درصد (وزنی/حجمی) که از شرکت (Duchefa, Haarlem, Netherlands) تهیه گردیده بود، مجدداً حل گردید. قبل از تلقیح، طول ریشه بر اساس روش جورگنسن (Jurgensen 2001)، طبقه‌بندی و تعیین گردید. بذرها به صورت سطحی استریل شدند و سپس ۱۰ بذر گیاه آرابیدوپسیس در پتری‌دیش (قطر ۹۴ میلی‌متر) در محیط Knop کاشته و به مدت یک تا دو روز در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس گیاهان در شرایط روز طولانی (۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی) در دمای ۲۱-۲۳ درجه سانتی‌گراد رشد کردند. ریشه‌های گیاهچه‌های آرابیدوپسیس ۱۲ روزه در شرایط استریل با حدود ۵۰ تا ۶۰ لارو سن دوم نماتد به ازای هر بوته بر اساس روش و سیجمونز و همکاران (Sijmons *et al.* 1991) تلقیح شدند. پلیت‌های تلقیح شده به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی نگاه‌داری شدند و سپس گیاهان در شرایط مشابه (۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی) در دمای ۲۱-۲۳ درجه سانتی‌گراد به اتاقک رشد منتقل شدند. تمام آزمایش‌ها به‌طور مستقل سه بار با ۳-۵ ظرف پتری تکرار شدند. تعداد کل نماتدهای نر و ماده در هر سانتی‌متر طول ریشه، اندازه syncytia ماده و اندازه ماده طبق روش سدیک و همکاران (Siddique *et al.* 2009) با استفاده از میکروسکوپ معکوس (Axiovert 200M و Axiovision Kontour tool Zeiss AG, Germany) در ۱۵ روز پس از تلقیح اندازه‌گیری شدند.



شکل ۱ نتایج RT-PCR برای تمام لاین‌های انتخابی تشدید بیان شده ژن‌های شبه‌تایونین در محیط MS. (اعداد زیر تصاویر ژل الکتروفورز به تعداد لاین‌ها مورد آزمایش اشاره دارد.)



شکل ۲ نتایج qRT-PCR برای چهار لاین بیان شده انتخابی از ژن‌های شبه‌تایونین بر اساس مقدار Δct . (میله‌های با اعداد تیره بیشترین میزان بیان ژن‌های مختلف هستند.)

گیاهان رقم وحشی نشان دادند (شکل ۳). با این حال، نتایج سایر آزمایشات نشان می‌دهد که تفاوت معنی‌داری در مقاومت در برابر *H. schachtii* در اندازه syncytia و اندازه نماتدهای ماده روی ریشه‌های آرابیدوپسیس به استثنای لاین At1g20618 وجود ندارد (شکل ۴).

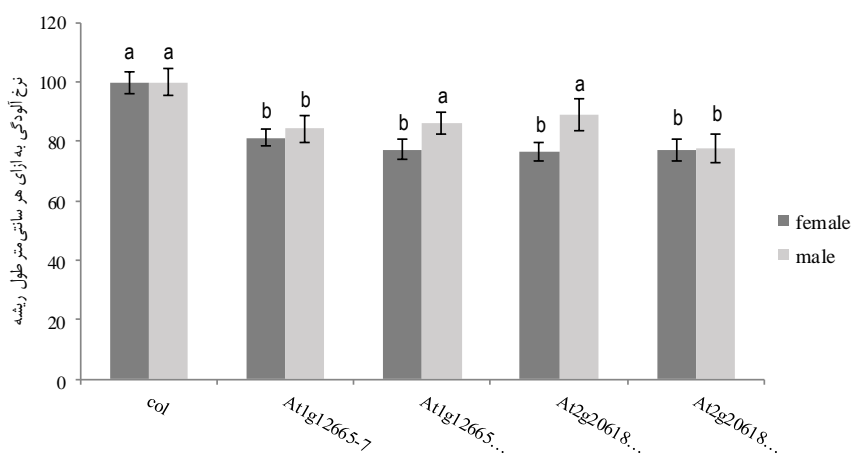
آزمون مقاومت به *H. schachtii*

پانزده روز پس از تلقیح، زمانی که ماده‌ها و نرها به وضوح قابل تشخیص بودند، تعداد نرها و ماده‌ها شمارش شد و نتایج با رقم وحشی آرابیدوپسیس مقایسه شدند. تعداد کل نماتدهای نر و ماده در هر سانتی‌متر طول ریشه و اندازه syncytia ماده و اندازه نماتد ماده اندازه‌گیری شد. نتایج کاهش قابل توجهی در نرخ آلودگی در طول ریشه برای لاین تشدید بیان شده در مقایسه با

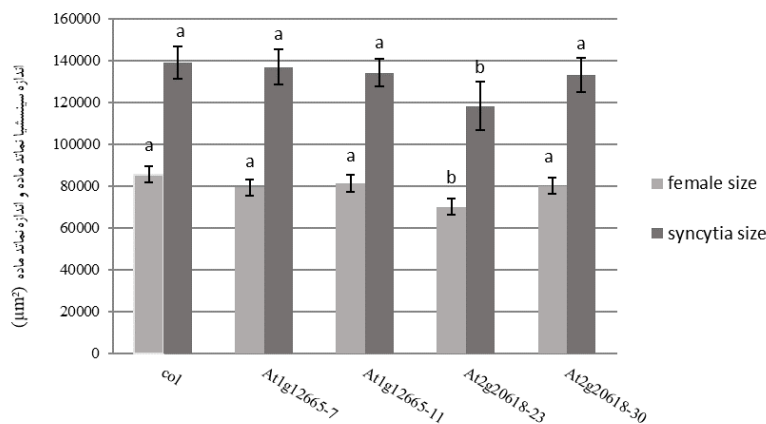
بحث

نشان‌دهنده افزایش مقاومت در برابر نماتد می‌باشد. پپتیدهای ضد میکروبی نقش مهمی در سیستم ایمنی ذاتی گیاه دارند، آنها به‌عنوان اولین خط دفاعی گیاه در برابر تنش‌های مختلف عمل می‌کنند (Van Loon *et al.* 2006; Egorov and Odintsova 2012). ژنوم گیاه آرابیدوپسیس شامل ۶۷ ژن است که پپتیدهای کوچک غنی از سیستمین و ژن‌های به اصطلاح شبه‌تایونین (ThiL) را کد می‌کنند (Silverstein *et al.* 2007).

هدف اصلی این مطالعه بررسی نقش پپتیدهای ضد میکروبی منتخب شبه‌تایونین در ایجاد مقاومت به نماتد *H. schachtii* بود. لاین‌های تشدید بیان شده شبه‌تایونین (ThiL20 و ThiL12) باعث ایجاد مقاومت در برابر نماتد شدند. گیاهان آرابیدوپسیس تشدید بیان شده ژن شبه‌تایونین کاهش قابل توجهی در تعداد نماتدهای نر و ماده برای ژن‌های *At2g20618* و *At1g12665* نشان دادند و این یافته‌ها



شکل ۳ نرخ آلودگی به ازای هر سانتی‌متر طول ریشه در ۱۵ روز پس از آلودگی برای نماتدهای نر و ماده نماتد *H. schachtii* (ستون‌هایی با حروف مختلف تفاوت معنی‌دار را نشان می‌دهند).



شکل ۴ اندازه سینسشیا نماتد ماده و اندازه نماتد ماده در ۱۵ روز پس از آلودگی برای نماتدهای نر و ماده نماتد *H. schachtii* (ستون‌هایی با حروف مختلف تفاوت معنی‌دار را نشان می‌دهند).

بازدارندگی نشان دادند (Taveira et al. 2014; Mao et al., 2011). یک پپتید متشکل از ۶۶ اسیدآمینه با وزن ۷/۰۳ کیلودالتون و دارای شش پل دی‌سولفیدی و مربوط به پپتید ضد میکروبی ژن CaSn می‌تواند در دفاع از گیاهان در برابر نماتدها نقش داشته باشد (Chan et al. 2010).

لاین‌های تشدید بیان‌شده ژن‌های شبه‌تایونین گیاه آرابیدوپسیس، افزایش مقاومت نسبت به نماتد سیست در مقایسه با رقم وحشی گیاه آرابیدوپسیس را نشان داد و شاید در آینده به‌توان از این ژن‌ها برای مقاومت به نماتد سیستی در چغندرقد بهره برد.

تنها یک لاین تشدید بیان‌شده با ژن شبه‌تایونین ThiL20، کاهش در اندازه syncytia و اندازه نماتد ماده را نشان داد. گیاهان تشدید بیان‌شده ژن شبه‌تایونین CaThi از میوه فلفل *Capsicum annuum* باعث مهار صد در صد *Candida parapsilosis* و اثر قابل توجهی بر روی سایر گونه‌های مخمر جنس کاندیدا دارد (Taveira et al. 2016). همچنین دو پپتید شبه‌تایونین جداسازی شده از میوه‌های فلفل دلمه‌ای فعالیت مهاری شدیدی را نشان دادند و باعث کاهش رشد باکتری‌های پاتوژن *E. coli* و *Pseudomonas aeruginosa* شدند و بر روی سلول‌های مخمرهای ساکارومایسس و کاندیدا فعالیت

References:

منابع مورد استفاده:

- Ali MA, Shah KH, Bohlmann H. pMAA-Red: a new pPZP-derived vector for fast visual screening of transgenic Arabidopsis plants at the seed stage. BMC Biotechnology. 2012; 12; DOI: 10.1186/1472.6750.12.37
- Almaghrabi B. Characterization of thionin-like genes from *Arabidopsis thaliana* (PhD thesis). Austria, Vienna: University of Natural Resources and Life Sciences; 2012.
- Bohlmann H. The role of thionins in plant-protection. Critical Reviews in Plant Sciences. 1994; 13:1-16.
- Clough SJ, Bent AF. Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. Plant Journal. 1998; 16: 735-743.
- Chan YL, Yang AH, Chen JT, Yeh KW, Chan MT. Heterologous expression of *taro cystatin* protects transgenic tomato against *Meloidogyne incognita* infection by means of interfering sex determination and suppressing gall formation. Plant Cell Reports. 2010; 29: 231-238.
- Egorov TS, Odintsova T. Defense peptides of plant immunity. Russian Journal of Bioorganic Chemistry. 2012; 38: 7-17.
- Garcia-Olmedo F, Molina A, Alamillo J, Rodriguez-Palenzuela P. Plant defense peptides. Biopolymers. 1998; 47: 479-491
- Hancock REW, Falla TJ, Brown M. Cationic antimicrobial peptides. Advances in Microbial Physiology. 1995; 37: 136-175.
- Holsters M, Dewaele D, Depicker A, Messens E, Vanmontagu M, Schell J. Transfection and transformation of *Agrobacterium tumefaciens*. Molecular Genetics and Genomics. 1978; 163: 181-187.
- Jürgensen K. Untersuchungen zum Assimilat- und Wassertransfer in der Interaktion zwischen *Arabidopsis thaliana* und *Heterodera schachtii* (PhD thesis). Kiel, Germany: Christian-Albrechts Universität; 2001.

- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method. *Methods*. 2001; 25: 402–408.
- Logemann E, Birkenbihl RP, Ulker B, Somssich IE. An improved method for preparing *Agrobacterium* cells that simplifies the *Arabidopsis* transformation protocol. *Plant Methods*. 2006; 16: 1-5.
- Mao Z, Zheng J, Wang Y, Chen G, Yang Y, Feng D, Xie B. The new CaSn gene belonging to the snakin family induces resistance against root-knot nematode infection in pepper. *Phytoparasitica*. 2011; 39: 151–164.
- Muller J. The economic importance of *Heterodera schachtii* in Europe. *Helminthologia*. 1999; 36: 205-213.
- Norouzi P, Mahmoudi SB, Taleghani D, Rajabi A, Sadeghzadeh Hemayati S, Aghaiezhadeh M, Soltani Idliki J, Darabi S, Babaei B, Fasahat P, Vahedi S. Development and phenotypic and molecular evaluation of sugar beet hybrids for resistance to rhizomania and root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.). *Journal of Sugar Beet*. 2021; 36(2) 117- 128. (in Persian with English abstract)
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1977; 74: 5463-5467.
- Siddique S, Endres S, Atkins JM, Szakasits D, Wiczorek K, Hofmann J, Blaukopf C, Urwin PE, Tenhaken R, Grundler FM, Kreil DP, Bohlmann H. Myo-inositol oxygenase genes are involved in the development of syncytia induced by *Heterodera schachtii* in *Arabidopsis* roots. *New Phytologist*. 2009; 184: 457-472
- Sijmons PC, Grundler FMW, Vonmende N, Burrows PR, Wyss U. *Arabidopsis thaliana* as a new model host for plant parasitic nematodes. *Plant Journal*. 1991; 1: 245-254.
- Silverstein KA, Moskal WA, Wu HC, Underwood BA, Graham MA, Town CD, Vanden Bosch KA. Small cysteine-rich peptides resembling antimicrobial peptides have been under - predicted in plants. *Plant Journal*. 2007; 51: 262-280.
- Taveira GB, Mathias LS, da Motta OV, Machado OLT, Rodrigues R, Carvalho AO, Teixeira-Ferreira A, Perales J, Vasconcelos IM, Gomes VM. Thionin-like peptides from *Capsicum annuum* fruits with high activity against human pathogenic bacteria and yeasts. *Peptide Science*. 2014; 102: 30-39.
- Taveira GB, Carvalho AO, Rodrigues R, Trindade FG, Da Cunha M, Gomes VM. Thionin-like peptide from *Capsicum annuum* fruits: mechanism of action and synergism with fluconazole against *Candida* species. *BMC Microbiology*. 2016; 16: 1-13.
- Van Loon LC. Systemic induced resistance. In AJ Slusarenko, RSS Fraser, LC Van Loon, eds, *Mechanisms of resistance to plant diseases*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 2000; pp. 521-574.
- Van Loon LC, Rep M, Pieterse CMJ. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology*. 2006; 44: 135-162.