

بررسی بیان و فعالیت ضد میکروبی پپتیدهای نو ترکیب در ماسپتین B1 در گیاهان تراریخت توتون

میترا خادمی^۱ و فرهاد نظریان فیروزآبادی^{۲*}

۱- دانش آموخته دکتری، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد

۲- استاد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۱/۲۶ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۴/۳۰)

چکیده

اخیراً، روش‌های جدید به‌نژادی مولکولی و مهندسی ژنتیک برای غلبه بر محدودیت‌های به‌نژادی سنتی در ایجاد گیاهان مقاوم به بیماری به‌وجود آمده‌اند. استفاده از پپتیدهای ضد میکروبی در تولید گیاهان تراریخت مقاوم به طیف گسترده‌ای از بیمارگرهای گیاهی با موفقیت‌های فراوانی همراه بوده است. در میان تعداد زیادی از پپتیدهای ضد میکروبی، در ماسپتین B1 یک پپتید ضد میکروبی کاتیونی به طول ۳۱ اسید آمینه با خاصیت ضد میکروبی علیه طیف وسیعی از بیمارگرهای بیماری‌زا می‌باشد. با هدف افزایش کارایی ضد میکروبی این پپتید، توالی کدکننده‌ی پپتید ضد میکروبی DrsB1 یک بار به انتهای N و بار دیگر به انتهای C توالی کدکننده‌ی دمین اتصال به کیتین ژن Avr4 قارچ کلادوسپوریوم فلاوم (*Cladosporium fulvum*) متصل و سامانه‌های ژنی (CBD-DrsB1 and DrsB1-CBD) به کمک روش آگروباکتري به ریزنمونه‌های برگ گیاه توتون منتقل گردیدند. با استفاده از واکنش‌های PCR، RT-PCR و SDS-PAGE به ترتیب حضور ترانسژن‌ها و بیان آن‌ها در گیاهان تراریخت توتون تأیید شد. فعالیت ضد میکروبی پپتیدهای نو ترکیب استخراج شده علیه تعدادی از بیمارگرهای گیاهی و انسانی مورد بررسی قرار گرفت. دو پپتید نو ترکیب دارای اثرات بازدارندگی معنی‌داری ($P \leq 0.01$) روی رشد و نمو قارچ‌های بیماری‌زا بودند. همچنین نتایج حاصل از آزمایش CFU نشان داد که پپتیدهای نو ترکیب تولیدی گیاهان تراریخت، اثر ممانعت‌کننده نسبتاً بالای روی این بیمارگرها داشتند. پپتید نو ترکیب CBD-DrsB1 دارای بیشترین اثر ضدباکتریایی، در حالی‌که پروتئین نو ترکیب DrsB1-CBD از توانایی ضدقارچی بالاتری برخوردار بود. علاوه بر این، بیان پپتید نو ترکیب DrsB1-CBD سبب افزایش مقاومت معنی‌داری علیه قارچ *R. solani* در مقایسه با قارچ *Pythium sp.* گردید. جالب توجه آن‌که، قارچ‌هایی با مقدار بیشتری از کیتین در دیواره سلولی نسبت به پپتیدهای نو ترکیب آسیب‌پذیرتر بودند که این مسئله نشان می‌دهد پپتیدهای نو ترکیب دارای تمایل بیشتری به کیتین دیواره سلولی هستند. به دلیل فعالیت ضد میکروبی بالا و جدید بودن پپتیدهای نو ترکیب، می‌توان از این راهکار برای اولین بار، برای تولید ارقام مقاوم تراریخت محصولات زراعی علیه بیمارگرها استفاده نمود.

واژگان کلیدی: بیان ژن، بیمارگرها، پپتید ضد میکروبی، دمین اتصال به کیتین، مهندسی ژنتیک

* نویسنده مسئول، آدرس پست الکترونیکی: nazarian.f@lu.ac.ir

مقدمه

مقاومت قارچ‌ها و باکتری‌ها به قارچکش‌ها و آنتی‌بیوتیک‌ها و ظهور سویه‌های مقاوم جدید به چالشی مهم در حوزه پزشکی و کشاورزی تبدیل شده است (Hunter *et al.*, 1995; Vidaver, 2002). روش‌های مرسوم و سنتی به‌نژادی برای ایجاد واریته‌های زراعی مقاوم به بیمارگرهای گیاهی دارای کارایی خوبی هستند، اما تولید چنین ارقامی زمان‌بر است و مقاومت آن‌ها در مدت کوتاهی در مقابله با طیف وسیعی از بیمارگرها شکسته می‌شود و یا کاهش می‌یابد (Zasloff, 2002; Nazarian-Firouzabadi, 2014; Hajiahmadi *et al.*, 2017). ویژگی‌های منحصربه‌فرد پپتیدهای ضد میکروبی (Antimicrobial peptides: AMPs) باعث شده تا این پپتیدها به‌عنوان جایگزین مناسب برای سموم کشاورزی و آنتی‌بیوتیک‌ها مورد توجه قرار گیرند. پپتیدهای ضد میکروبی توسط طیف وسیعی از جانداران بیان می‌شوند و به‌عنوان یک سیستم دفاعی مورد استفاده قرار می‌گیرند (Zasloff, 2002, 2006). کاهش عملکرد محصولات از لحاظ کیفیت و کمیت ناشی از بیمارگرهای گیاهی را می‌تواند به کمک استفاده از پپتیدهای ضد میکروبی بر طرف نمود (Holaskova *et al.*, 2015). بنابراین جستجو برای پپتیدهای با فعالیت ضد میکروبی متنوع‌تر و با ساختار و مکانیسم عمل متفاوت، می‌تواند به مقاومت گیاهان به طیف وسیعی از بیمارگرها کمک کند. تاکنون بیش از ۳۱۸۰ پپتید (۲۰۱۹) در موجودات مختلف شناسایی شده‌اند (<http://aps.unmc.edu/AP>)، که در این میان، پپتیدهای مترشحه از پوست دوزیستان از جایگاه ویژه‌ای برخوردار هستند. در پوست دوزیستان غددی وجود دارد که منبعی پیوسته در تولید پپتیدهای ضد میکروبی محسوب می‌شوند (Barra and Simmaco, 1995; Conlon *et al.*, 2004). سطح پوست بدن مرطوب قورباغه‌ها، محل مناسبی برای رشد قارچ‌ها و باکتری‌ها است، ولی مواد و پپتیدهای مترشحه از پوست آن‌ها تا حد زیادی از رشد چنین بیمارگرهای جلوگیری می‌کنند (Barra and Simmaco, 1995; Conlon *et al.*, 2004). پپتیدهای کاتیونیک خانواده‌ی درماسپتین B1 (DrsB1) که

توسط غدد پوستی برخی از خانواده‌های قورباغه (*Phyllomedusa bicolor*) تولید و ترشح می‌شوند، دارای ۲۴ تا ۳۴ اسید آمینه هستند و در غشای سلولی میکروب هدف حالت α -هلیکسی به‌خود می‌گیرند و از این‌رو سبب ایجاد ناپایداری در غشا می‌شوند.

تحقیقات نشان می‌دهند که هر چه تراکم مولکولی پپتید در سطح غشا بیمارگر افزایش پیدا کند، به‌همان نسبت میزان مرگ و میر بیمارگرها افزایش می‌یابد (Cancado Viana *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2011). بنابراین در صورتی که بتوان میزان تمایل پپتیدها را برای نزدیک شدن به غشا بیمارگر افزایش داد، این موضوع می‌تواند به افزایش دُز پپتید روی سطح غشا و به بالا رفتن کارایی ضد میکروبی آن‌ها کمک کند.

دیواره سلولی قارچ نقش مهمی در عملکرد دینامیکی و اثر متقابل قارچ با محیط اطرافشان بازی می‌کند. در پاتوژن‌های قارچی، دیواره سلولی اولین ساختاری است که در ارتباط فیزیکی با دیواره میزبان (گیاه) قرار دارد. کیتین عمده پلیمر ساختاری دیواره‌ی سلولی بسیاری از قارچ‌های بیماری‌زا است که به‌عنوان یک الیستور شناخته شده‌ی مهم در عکس‌العمل ذاتی با گیاهان نقش دارد. آنزیم‌های هیدرولیز کننده‌ی کیتین گیاهی با عمل هیدرولیتیکی خود روی دیواره‌ی کیتینی سلول‌های قارچی، منجر به تجزیه دیواره و به‌دنبال آن مرگ سلولی می‌شوند (Latgé and Beauvais, 2014; Latgé, 2010; Thomma *et al.*, 2011). پاتوژن‌های قارچی از راهکارهای مختلفی از جمله تغییر در ترکیبات دیواره سلولی، تغییر در زنجیره کربوهیدرات و ترشح افکتورها برای حفاظت از دیواره‌ی سلول خود به‌کار می‌گیرند (Fujikawa *et al.*, 2012; Latgé and Beauvais, 2014).

برای مثال؛ در بیماری کپک برگ که توسط قارچ کلادوسپوریوم فلاوم ایجاد می‌شود، این قارچ با ترشح افکتورهای *Avr4* در زمان آلودگی باعث حفاظت دیواره سلولی در برابر آنزیم‌های هیدرولیتیکی گیاه می‌شود. افکتور *Avr4* دارای یک دمین متصل به کیتین است که با اتصال به کیتین موجود در دیواره سلولی قارچ باعث

هم‌کشتی به مدت ۲ تا ۳ روز در شرایط تاریکی در دمای $24 \pm 2^\circ\text{C}$ انجام شد. پس از کشت توام، ریزنمونه‌ها به محیط انتخابی حاوی MS با ترکیبات هورمونی BA (2 mg/l) و NAA (0.1 mg/l) و کاناماسین با غلظت $50 \mu\text{g/ml}$ و سفوتاکسیم با غلظت $200 \mu\text{g/ml}$ در شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در دمای 25°C نگهداری کرده تا جوانه‌ها از کناره‌های برگ پدیدار شدند. پس از ظاهر شدن جوانه‌های ۴ تا ۶ برگی از حاشیه ریزنمونه‌ها، این جوانه‌ها به آرامی از ریزنمونه پایه جدا شده و بر روی محیط انتخابی انتقال داده شدند تا نوساقه‌های تراریخت به آرامی با غلظت‌های بالاتر کاناماسین سازگار شوند و نوساقه‌های غیرتراریخت در غلظت نهایی کاناماسین سفید شوند. پس از گذشت ۲۵ تا ۳۵ روز، گیاهچه‌های جوان به محیط ریشه‌دهی منتقل شد تا بتوانند تولید ریشه کرده و جهت انتقال به خاک آماده شوند. نهایتاً گیاهچه‌های ریشه‌دار جهت سازگاری به محیط طبیعی گلدان با شرایط رطوبت بالا به مدت ۲ تا ۴ هفته انتقال یافتند.

آنالیز گیاهان تراریخت به‌وسیله روش PCR: به‌منظور تأیید تراریختی گیاهچه‌های احتمالی، DNA ژنومی از گیاهچه‌ها به روش CTAB استخراج شد. تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراج شده از طریق اسپکتروفتومتر و الکتروفورز ژل آگارز انجام شد و سپس آنالیز PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن‌های پپتید DrsB1 (DrsB1 F: GCTAAGGCTATGTGGAAGGATG) و DrsB1 R: ATTGAGAAATAGTATCAGCAACA (GC روی DNA ژنومی به‌عنوان الگو انجام گردید. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با یک چرخه واسرشت‌سازی اولیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه شامل، واسرشت‌سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۱ دقیقه، مرحله اتصال آغازگر در دمای ۵۹ درجه سانتی‌گراد و برای ۳۰ ثانیه، تکثیر DNA الگو در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد بر حسب طول قطعه از ۳۰ ثانیه تا یک دقیقه و یک چرخه تکثیر نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه صورت گرفت.

کاهش دسترسی آنزیم‌های هیدرولیتیکی میزبان به کیتین دیواره قارچ می‌شود و از هیدرولیز دیواره سلولی قارچ جلوگیری می‌کند (Van den Burg et al., 2006).

یکی از اهداف مهم این مطالعه افزایش غلظت پپتیدهای ضد میکروبی روی سطح غشا بیمارگرهای قارچی و باکتریایی است. بنابراین هم‌جوشی یک پپتید ضد میکروبی به بخشی از پروتئین متصل شونده به کیتین *Avr4* می‌تواند گزینه مناسبی برای دستیابی به این هدف باشد، ضمن اینکه اتصال به کیتین و پپتیدگلیکان دسترسی پپتید به غشا پلاسمایی بیمارگرها را نیز تسهیل می‌نماید. در این مطالعه با هدف افزایش تراکم پپتید ضد میکروبی DrsB1 به دمین متصل شونده به کیتین (CBD) مربوط به پروتئین قارچی متصل گردید. سپس سامانه ژنی در گیاه توتون، بیان و فعالیت ضد میکروبی آن علیه بیمارگرهای باکتریایی و قارچی در شرایط آزمایشگاه مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و تراریخت ژنتیکی توتون با A. tumefaciens بذور توتون رقم Xanthi به مدت ۱۰ دقیقه در محلول شوینده (۳۰۰ میکرولیتر هیپوکلریت سدیم ۵٪، ۶ میکرولیتر تریتون و ۷۰۰ میکرولیتر آب مقطر) غوطه‌ور شده تا ضد عفونی شوند و سپس سه مرتبه با آب مقطر شستشو شدند. بذور به‌صورت فاصله‌دار بر روی محیط MS قرار داده و در شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در دمای $24 \pm 2^\circ\text{C}$ در اتاق کشت نگهداری شدند. نمونه برگی سترون از گیاهان سه هفته‌ای رشد یافته از این بذور تهیه شد. برگ‌ها در عرض به فواصل یک سانتی‌متری برش داده شدند، سپس به درون مایع تلقیح حاوی آگروباکتریوم سویه GV3101 حاوی سازه‌های طراحی شده که قبلاً توسط خادمی و همکاران (۲۰۱۹) تهیه شده‌اند (Khademi et al., 2019a; Khademi et al., 2019b) منتقل و به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه تکان داده شدند. برگ‌های آلوده بر روی کاغذ صافی استریل قرار داده شدند تا خشک شوند، سپس روی محیط کشت توام MS با ترکیبات هورمونی‌های BA (2 mg/l) و NAA (0.1 mg/l) و بدون آنتی‌بیوتیک قرار داده شدند.

و *Escherichia coli* (PTCC 1330) کشت شب مانده تهیه شد. از کشت شب مانده کشت جدیدی تهیه و وقتی چگالی نوری آن در ۶۰۰ نانومتر به ۰/۴ رسید. مقدار $60 \mu\text{g/ml}$ از پروتئین استخراج شده گیاه غیرتراریخت (کنترل منفی) و گیاه تراریخت به یک میلی لیتر از کشت اضافه و به مدت ۲ ساعت در دور ۲۵۰ شیک شد تا چگالی نوری کنترل منفی در ۶۰۰ نانومتر به ۰/۸ تا ۱ برسد. سپس از هر دو نمونه سریال رقت تهیه و روی محیط نوترینت آگار پخش شد و روز بعد میزان CFU طبق رابطه زیر برای هر پروتئین نو ترکیب و گیاه شاهد محاسبه و مقایسه شد.

$$\text{In}(\%) = \frac{\text{CFU/ml (Ut)} - \text{CFU/ml (T)}}{\text{CFU/ml (Ut)}} \times 100$$

In: درصد بازدارندگی، Ut تعداد کلونی پروتئین غیرتراریخت و T تعداد کلونی پروتئین نو ترکیب (تیمار) است.

حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) با استفاده از روش رقت سازی در لوله تعیین گردید. تهیه سریال رقت با استفاده از پلیت ۹۶ خانه انجام شد. بدین منظور، ۵ سطح شامل غلظت های ۶/۲۵، ۱۲/۲۵، ۲۵، ۵۰ و $100 \mu\text{g/ml}$ از پروتئین های نو ترکیب خالص شده از گیاهان تراریخت و شاهد علیه بیمارگرهای باکتریایی در حجم نهایی $200 \mu\text{l}$ ، در مقابل باکتری قرار داده و رشد باکتری های مورد بررسی قرار گرفت. یک چاهک به عنوان کنترل منفی (حاوی ترکیب محیط کشت) و پروتئین نو ترکیب و یک چاهک به عنوان کنترل مثبت (حاوی سوسپانسیون میکروب به علاوه محیط کشت) در نظر گرفته شد. سپس به همه چاهک ها مقدار $10 \mu\text{l}$ از سوسپانسیون باکتری با غلظت نیم مک فارلند ($10^8 \times 1/5$ سلول) اضافه و به مدت ۲۴ ساعت در دمای 37°C قرار داده شدند. سپس چاهک ها از نظر کدورت ناشی از رشد باکتری تلقیح شده بررسی گردیدند. با مشاهده ایجاد کدورت در هر چاهک، چاهک قبلی به عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی در نظر گرفته شد. در مورد چاهک کنترل مثبت، کدورت نشان دهنده رشد کافی باکتری می باشد. چاهک کنترل منفی باید بدون رشد و شفاف

استخراج RNA و سنتز cDNA: به منظور تأیید بیان سامانه های نو ترکیب، استخراج RNA مطابق روش لیتیم کلراید انجام و با استفاده از آنزیم DNase آلودگی ژنومی حذف شد، و سپس با استفاده از کیت سنتز cDNA (شرکت Thermo Fisher) و پرایمر oligodT ساخت cDNA صورت گرفت. واکنش RT-PCR بر روی cDNA های سنتز شده، توسط آغازگرهای اختصاصی کنترل داخلی Elongation Factor ($\alpha\text{-elf}$) و F:TGAACCATCCAGGACAGATTG و R:elf-a (TCTTAACCATACCAGCATCACC) و پپتید DrsB1 انجام شد.

استخراج پروتئین: در ابتدا ۱ گرم بافت برگ و ریشه های موین تراریخت هر کدام به صورت جداگانه در هاون و با استفاده از ازت مایع پودر و هموژنیزه شد (Stone and Gifford, 1997). سپس به مقدار مساوی به آن بافر فسفات (حاوی PMSF) اضافه و بعد از سانتریفیوژ (۱۳۰۰۰ rpm) به مدت ۱۵ دقیقه در 4°C فاز بالایی جدا شد. مایع رویی حاصل از سانتریفیوژ که حاوی پروتئین های محلول بود، جهت تخلیص پروتئین به ستون کروماتوگرافی حاوی رزین نیکل (PrepEase Ni-IDA) منتقل شد. ستون به ترتیب با محلول شستشو حاوی 5mM NaCl-300mM NaH_2O_4 شستشو داده شد. جهت جداسازی پروتئین نو ترکیب از ستون، محلول شستشو حاوی ۲۵۰mM ایمیدازول مورد استفاده قرار گرفت. غلظت پروتئین استخراج شده به روش برادفور و همکاران (۱۹۹۷) اندازه گیری شد (Bradford, 1976). پروتئین های خروجی از ستون بر روی ژل ۱۴ درصد بارگذاری و با استفاده از دستگاه الکتروفورز عمودی با ولتاژ ثابت ۱۵۰ ولت از یکدیگر جدا شدند.

بررسی فعالیت ضد میکروبی پروتئین های نو ترکیب علیه بیمارگرهای باکتریایی: به منظور سنجش فعالیت ضد میکروبی پروتئین های نو ترکیب از روش های شمارش واحدهای تشکیل کلونی (CFU) استفاده شد. در روش CFU از بیمارگرهای باکتریایی *Enterococcus faecalis* (PTCC1393) و *Enterococcus faecium* (KX185054)

بین تیمارها از روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطوح معنی‌دار مربوط برای مقایسه میانگین استفاده شد.

نتایج و بحث

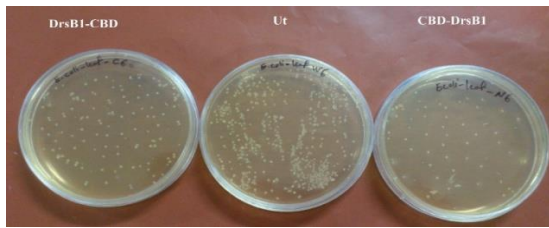
از مجموع کل ریزنمونه‌های مورد استفاده برای تراریزش، تعداد ۲۰۰ گیاهچه در محیط گزینشی حاوی کاناماسین باززایی شدند که برای سهولت بررسی نتایج، گیاهچه‌های به ظاهر تراریخت حاصل بر حسب نوع پیتید نوترکیب بیانی به اسامی CBD-DrsB1-XX و DrsB1-CBD-XX نام‌گذاری شدند که XX نماینده شماره لاین تراریخت است. تعدادی از گیاهان به ظاهر تراریخت و شاهد، DNA ژنومی به روش CTAB استخراج گردید. سپس با آزمون PCR، حضور سامانه‌های ژنی تأیید گردید. در گیاهچه‌های تراریخت بانندی به اندازه ۱۰۰ bp هم اندازه باند تکثیر شده‌ی در ناقل بیانی حاوی سامانه‌های ژنی به‌عنوان شاهد مثبت تکثیر مشاهده شد، در حالی که در گیاه غیرتراریخت هیچ قطعه‌ای با آغازگرهای اختصاصی پیتیدهای نوترکیب تکثیر نشد (داده‌ها نشان داده نشده است). بیان هر دو پیتید نوترکیب این مطالعه در گیاهان تراریخت با روش RT-PCR نیمه‌کمی با استفاده از آغازگرهای اختصاصی پیتید نوترکیب DrsB1 و با مقایسه میزان بیان یکنواخت ژن خانه‌دار *elf* انجام شد. همان‌طوری که مشاهده می‌شود قطعه‌ای به طول تقریبی ۱۰۰ bp در لاین‌های تراریخت مشاهده گردید که نشان داد ژن‌های مورد نظر به‌خوبی در لاین‌های تراریخت نسخه‌برداری می‌شوند. همچنین با توجه به یکسانی باند ژن کنترل داخلی، شدت باند ژن پیتیدهای نوترکیب در تعدادی از لاین‌ها نسبت به لاین‌های دیگر بیشتر بود. لاین‌های تراریخت انتخابی بر اساس میزان نسخه‌های ژنی به دو گروه کم بیان (L) و بیان بالا (H) تقسیم‌بندی شدند. بر این اساس از مجموع نمونه‌های مورد آزمایش، بیشترین بیان در لاین‌های تراریخت DrsB1-CBD-21، DrsB1-CBD-43 و DrsB1-CBD-30 مشاهده شد (شکل ۱A). همچنین به‌منظور بررسی و اطمینان از بیان و تولید پیتیدهای نوترکیب در لاین‌های گیاهان تراریخت، آزمایش SDS-PAGE صورت گرفت. از پیتیدهای نوترکیب

باشد (Vlietinck, 1991). برای هر باکتری این آزمایش به‌صورت جداگانه در سه تکرار طراحی و اجرا شد.

بررسی فعالیت ضد میکروبی پروتئین‌های نوترکیب بر روی رشد هیف قارچ‌ها: داخل یک پتری حاوی محیط PDA یک قطعه از قارچ‌های *Pythium* sp. و *Rhizoctonia solani* به شکل دایره برش زده و وسط پتری قرار داده شد. وقتی که رشد میسلیم‌های قارچی به اندازه ۳۵-۴۰ mm رسید، به فاصله مساوی از لبه میسلیم، دیسک‌های حاوی ۵۰ µl/ml از پروتئین نوترکیب و شاهد در تماس با قارچ قرار داده شدند و بعد از ۱۸ تا ۴۸ ساعت رشد قارچ در نزدیک دیسک‌ها بررسی شد.

حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) با استفاده از روش رقت‌سازی میکروداپلوشن تعیین شد. در این آزمایش برای تهیه سوسپانسیون قارچی نیاز به کشت تازه از هرگونه قارچ می‌باشد. قارچ‌های مورد مطالعه روی محیط PDA استریل کشت شدند. چهار روز بعد از کشت، اسپورهای تولید شده با استفاده از اسکالپل از سطح محیط جدا و به‌طور جداگانه داخل ویال‌های حاوی آب مقطر استریل ریخته شدند. برای به‌دست آوردن غلظت مناسبی از اسپورها (1×10^8 CFU/ml)، تعداد اسپور موجود در یک قطره از هر کدام جداگانه داخل ویال‌های حاوی هموسایتومتر زیر میکروسکوپ شمارش شد. به‌میزان 1×10^1 µl از غلظت‌های مختلف پروتئین‌های نوترکیب (۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۵ و ۴۰ µg/ml) هر کدام به‌صورت جداگانه داخل ویال حاوی اسپور با حجم نهایی ۲۰۰ µl ریخته و سپس با دور ۱۲۰ rpm به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد. جوانه‌زنی اسپورها با استفاده از میکروسکوپ نوری و میزان کدورت ناشی از رشد قارچ‌های تلقیح شده بررسی گردید.

آنالیز آماری داده‌ها: آنالیز آماری تیمارها (میکروب‌ها و پروتئین‌های نوترکیب) در یک آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در ۳ تکرار با استفاده از نرم افزار MSTATC انجام شد. در صورت وجود اختلاف معنی‌دار



شکل ۲- اثر ممانعت کننده پپتیدهای نو ترکیب استخراج شده در محیط *in vitro*

Figure 2. *In vitro* inhibitory effect of recombinant peptides extracted from transgenic lines

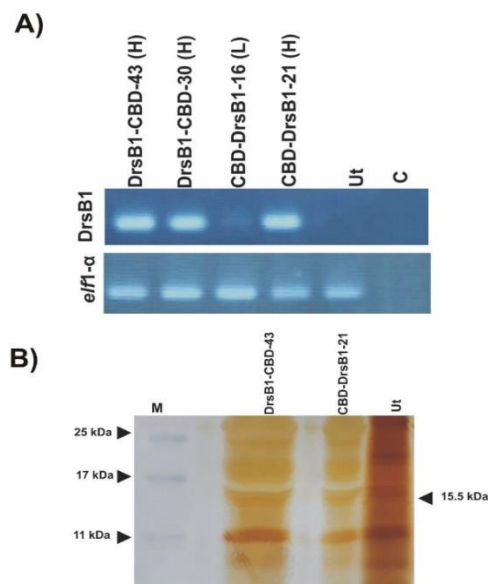
همچنین پروتئین کل از گیاه غیر تراریخت به عنوان شاهد مورد استفاده قرار گرفت. نتایج آزمایش CFU نشان دهنده کنترل نسبتاً بالای عوامل بیماری زای *Enterococcus* توسط پروتئین های نو ترکیب گیاهان تراریخت بود (جدول ۱). همچنین از نظر میزان فعالیت بازدارندگی علیه بیمارگرهای باکتریایی از بین دو پپتید نو ترکیب، پپتید نو ترکیب حاصل از CBD-DrsB1-21 قدرت مهارکنندگی بیشتری نسبت به پپتید نو ترکیب DrsB1-CBD-43 از خود نشان داد.

نتایج حاصل از حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) فعالیت ضد میکروبی پپتیدهای نو ترکیب علیه بیمارگرهای باکتریایی نشان داد که باکتری ها مختلف به غلظت های استفاده شده در این آزمایش واکنش متفاوتی نشان می دهند. به طور کلی، برای کنترل رشد باکتری *E. coli* (۱۰۰ µg/ml) به غلظت بیشتری از هر دو پپتید نو ترکیب نیاز بود. همچنین صرف نظر از نوع پپتیدهای نو ترکیب، حداقل غلظت بازدارندگی برای باکتری *E. faecalis* برابر با ۵۰ µg/ml بود. این در حالی بود باکتری *E. faecium* در برابر پپتید نو ترکیب DrsB1-CBD مقاوم تر و دارای حداقل غلظت بازدارندگی به میزان (۱۰۰ µg/ml) بود.

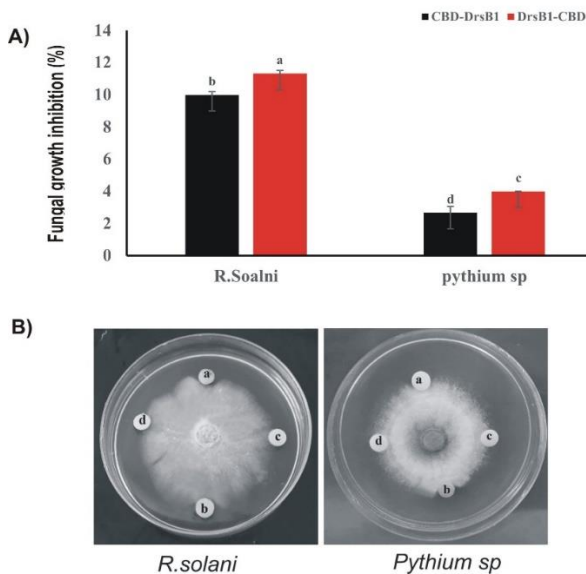
آزمایش فعالیت ضد قارچی پپتیدهای نو ترکیب استخراج شده از لاین های گیاهان تراریخت: نتایج بررسی اثر بازدارندگی پروتئین های نو ترکیب استخراج شده از گیاهان تراریخت علیه دو بیمارگر قارچی بر اساس روش انتشار روی دیسک ارائه شده است. نتایج حاصل از این مطالعه نشان می دهند که جدایه های قارچی و پپتیدهای نو ترکیب اثر معنی داری ($P < 0.01$) روی میزان بازدارندگی بیمارگرها داشتند (جدول ۲).

خالص سازی شده با استفاده از ستون های کروماتوگرافی حاوی رزین نیکل برای خالص سازی دو پپتید نو ترکیب استفاده شد. نتایج حاصل از SDS-PAGE برای لاین های تراریخت به خوبی نشان داد که در لاین های گیاهان تراریخت پپتیدهای نو ترکیب تولید می شوند. همان طوری که مشاهده می شود، یک باند با اندازه ی مورد انتظار مربوط به هر دو پپتید نو ترکیب به کمک SDS-PAGE دیده می شود. هیچ باندهای متناظر با پپتیدهای نو ترکیب در لاین های غیر تراریخت مشاهده نشد (شکل ۱B).

آزمایش فعالیت ضد باکتریایی پروتئین های استخراج شده از گیاهان تراریخت به روش CFU: پروتئین های نو ترکیب استخراج شده از گیاهان تراریخت در شرایط آزمایشگاهی دارای اثر ممانعت کنندگی بر رشد و تشکیل کلونی توسط بیمارگرهای *E. faecalis*، *E. faecium* و *E. coli* بودند (شکل ۲).



شکل ۱- A: آنالیز RT-PCR نیمه کمی روی گیاه تراریخت (DrsB1-CBD و CBD-DrsB1) و شاهد با استفاده از آغازگرهای اختصاصی پپتید DrsB1; B: آنالیز بیان پپتیدهای نو ترکیب تخلیص شده و شاهد غیر تراریخت با استفاده از روش SDS-PAGE Ut: گیاه غیر تراریخت، c: کنترل منفی (بدون الگو DNA)
Figure 1. A: Semi-quantitative RT-PCR analysis of transgenic and control plants; B: Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (of Ni-IDA purified recombinant peptides in selected transgenic and control plants Ut: non-transgenic control line and c: negative control



شکل ۳- A: مقایسه میانگین اثر ضدقارچی پروتئین‌های نوترکیب علیه بیمارگرهای قارچی؛ B: رشد هیف‌های قارچی تحت تأثیر پپتیدهای نوترکیب حاصل از لاین‌های تراریخت

(a) پپتید نوترکیب CBD-DrsB1-21، (b) پپتید نوترکیب DrsB1-CBD-43، (c) پروتئین شاهد غیرتراریخت، (d) بافر فسفات

Figure 3. A: Means comparison of antifungal activity of recombinant proteins on fungal growth; B: Growth of fungal hyphae treated with recombinant peptides extracted from selected transgenic lines

a) CBD-DrsB1-21, b) DrsB1-CBD-43, c) non-transgenic control plant, d) Phosphate buffer

همچنین پپتید استخراج شده از لاین DrsB1-CBD-43 بیشترین تأثیر بازدارندگی را بر قارچ‌های بیماری‌زای مورد بررسی نشان داد. قطرهای بازدارندگی این پپتید نوترکیب روی قارچ *R. solani* در حدود ۱۱ mm بود. همچنین هر دو نوع پروتئین نوترکیب قدرت مهارکنندگی کمتری علیه قارچ پیتیوم داشتند.

نتایج حاصل از تزریق پپتیدهای نوترکیب روی دیسک به‌خوبی با نتایج حاصل از MIC همخوانی داشت. بیشترین اثر ضد میکروبی پپتیدهای نوترکیب بر روی قارچ‌های *R. solani* مشاهده گردید، به‌طوری‌که میزان MIC مربوط به پپتیدهای DrsB1-CBD و CBD-DrsB1 به‌میزان ۱۵ و ۲۵ $\mu\text{g/ml}$ بود. این در حالی بود که گونه‌های قارچی بدون کیتین مانند *Pythium sp.* در برابر

جدول ۱- آنالیز ضد میکروبی پپتیدهای نوترکیب علیه بیمارگرهای مختلف

Table 1. Antimicrobial analysis of recombinant peptides against different pathogens

بیمارگر Pathogens	درصد کاهش رشد CFU (%)	
	CBD-DrsB1	DrsB1-CBD
<i>Enterococcus faecium</i>	82.99±2.1	46.36±0.87
<i>Enterococcus faecalis</i>	81.5±1.7	55.76±2.1
<i>Escherichia coli</i>	57.83±1.87	37.27±1.3

جدول ۲- تجزیه واریانس اثر بازدارندگی پپتیدهای

نوترکیب جداسازی شده از لاین‌های گیاهان تراریخت روی میزان بازدارندگی دو جدایه قارچ

Table 2. ANOVA analysis of the inhibitory effects of recombinant peptides on growth of two fungal species

منبع تغییرات Source of variation	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean squares
قارچ‌ها Fungi	1	165.021**
پپتیدها Peptides	1	4.68**
پپتیدها × قارچ‌ها Fungi × Peptide	1	0.021 ^{ns}
خطا Error	8	0.125
ضریب تغییرات (%) Coefficient of variation (%)		5.02

^{ns} و **: به ترتیب غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد
^{ns} and **: No significant and significant at 1% probability levels, respectively

نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل دو جانبه با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۱ درصد در شکل ۳A نشان داده شده است. همان‌طوری‌که ملاحظه می‌شود هر دو پپتید نوترکیب از رشد قارچ‌های بیماری‌زا به‌خوبی جلوگیری نمودند (شکل ۳A)، این در حالی بود که پروتئین استخراج شده از گیاه غیرتراریخت تأثیر کمی بر رشد میسلیمی قارچ‌های مورد مطالعه داشت (شکل ۳B).

این پپتیدهای نو ترکیب مقاوم تر و دارای حداقل غلظت بازدارندگی به میزان $20-30 \mu\text{g/ml}$ به ترتیب در لاین های DrsB1-CBD و CBD-DrsB1 بود.

در طی چند دهه گذشته، از رویکردهای مختلفی در ژنتیک گیاهی و زیست شناسی مولکولی برای بهبود و افزایش مقاومت گیاهان برای مقابله با طیف وسیعی از بیمارگرهای گیاهی استفاده شده است (Cao *et al.*, 1998). بررسی مطالعات گذشته نشان دهنده فعالیت ضد میکروبی پپتیدهای نو ترکیب DrsB1 در گیاه توتون علیه طیف وسیعی از باکتری ها و قارچ های بیماری زا گیاهی بود (Osusky *et al.*, 2004). در همین راستا، به منظور افزایش تعداد و تراکم پپتید DrsB1 روی غشای بیمارگرهای گیاهی مهاجم، پپتید DrsB1 توسط یک لینکر به دمین متصل شونده به کیتین از ژن *Avr4* قارچ کلادوسپوریوم فلاوم متصل شد تا پروتئین نو ترکیب بتواند به کیتین دیواره سلولی قارچ و همچنین پپتید گلیکان دیواره سلولی باکتری ها متصل شود. اگرچه پپتید DrsB1 در شرایط درون آزمایشگاهی فعالیت ضد میکروبی بالایی علیه باکتری ها، قارچ ها، پروتوزوآها و مخمرها از خود نشان داد، با این حال برای افزایش فعالیت آن علی بخشی و همکاران (2018) با تغییر ناحیه N ترمینال پپتید DrsB1 تمایل پپتید را برای اتصال به لیپیدهایی با بار منفی افزایش دادند. بیان این پپتید تغییر یافته در گیاه توتون منجر به تولید لاین های تراریختی با مقاومت قوی علیه برخی بیمارگرها گیاهی شد (Alibakhshi *et al.*, 2018).

نتایج حاصل از مقایسه بین پروتئین های نو ترکیب در این بررسی نشان داد که پروتئین نو ترکیب CBD-DrsB1 نسبت به پروتئین نو ترکیب دیگر، کارایی بیشتری در برابر باکتری ها دارد به طوری که با غلظت کمتر از رشد عوامل بیماری زا به خوبی جلوگیری می کند. به علاوه، نتایج این قسمت از مطالعه با یافته های خادمی و همکاران (Khademi *et al.*, 2019a) در رابطه با اثرات متفاوت فعالیت ضد باکتریایی دو پپتید نو ترکیب مورد نظر مطابقت داشت.

بررسی مطالعات انجام شده بر روی پپتیدهای ضد میکروبی نشان داده است که اثرات ضد باکتریایی این پپتیدها علیه باکتری بیماری زا بسیار مهم مورد توجه است. برای مثال، بررسی اثر پپتید ضد میکروبی *Buwchitin* نیز علیه باکتری های *E. coli*، *S. aureus* و *Enterococcus* اثبات شده است (Oyama *et al.*, 2017). در مطالعه حاضر، کارایی و فعالیت پپتیدهای طراحی شده به صورت *In silico* به کمک الگوریتم های پایگاه CAMP بررسی شد. نتایج این بخش از مطالعه نشان داد که به دلیل اضافه نمودن دمین اتصال به کیتین و همچنین وجود His-tag، میزان بار مثبت این پپتیدهای نو ترکیب نسبت به پپتید DrsB1 بدون دمین و آنالوگ آن افزایش یافت (Osusky *et al.*, 2004). افزایش بار مثبت پپتیدهای نو ترکیب باعث اتصال آن ها به دیواره سلولی باکتری و در نتیجه سبب اختلال در غشا و لیز شدن باکتری می شود و همین امر باعث افزایش میزان بازدارندگی این پپتیدها نسبت به شاهد (گیاه غیر تراریخت) گردید. همان گونه که در جدول ۱ مشاهده می شود، میزان حساسیت باکتری ها نسبت به پپتید با هم متفاوت بود. به نظر می رسد این مسئله به نحوه عملکرد پپتید ضد میکروبی و اثر متقابل پپتید کاتیونی با بار منفی گروه های فسفولیپیدها و اسید لیپوتیکوئیک غشای میکروبی باکتری برمی گردد (Phoenix *et al.*, 2015; Sohlenkamp and Geiger, 2016; Teixeira *et al.*, 2012). همچنین اضافه کردن دمین اتصال به کیتین از ژن *Avr4* نیز به دلیل مشابه بودن ساختار بین کیتین و پپتیدوگلیکان (Wohlkönig *et al.*, 2010) و همچنین اثر

به مراتب کمتر است (Yan *et al.*, 2008). نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که یکی از راهکارهای مهم در کنترل بیماری‌گرهای گیاهی، هدف قرار دادن کیتین در ساختار اصلی دیواره سلولی قارچ‌ها می‌باشد.

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که پروتئین نوترکیب CBD-DrsB1 دارای بیشترین اثر ضدباکتریایی بود، در حالی که پروتئین نوترکیب DrsB1-CBD از توانایی ضدقارچی بالاتری برخوردار بود. اگرچه ما برای این تفاوت در فعالیت نمی‌توانیم توجیه علمی مناسبی پیدا کنیم، اما به نظر می‌رسد که این اثرات متفاوت در گیاهان تراریخت به گونه و توانایی بیماری‌زای قارچ‌ها، نوع پپتید نوترکیب، میزان بیان پروتئین در گیاه مورد مطالعه بستگی دارد.

پپتیدهای ضد میکروبی ترکیبات طبیعی و ذاتی سیستم ایمنی در واقع همه موجودات هستند و بیان آن‌ها در محصولات تجاری می‌تواند استفاده از سموم شیمیایی و خطرات زیست محیطی مرتبط با آن را کاهش دهد. امروزه پروتئین‌های نوترکیب کاربردهای فراوانی در صنعت، پزشکی و کشاورزی دارند و بهینه کردن روش‌های تولید این ترکیبات مهم، در تولید محصول ضرورت دارد. در این مطالعه، ضمن تأیید صحت کارایی بیان پپتید^۶‌های نوترکیب DrsB1 طی فرآیند دستورزی و مهندسی ژنتیک در گیاه توتون، اطلاعات با ارزشی برای آزمایشات هدفمند در صنعت داروسازی و مقابله با باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها فراهم گردید. همچنین به نظر می‌رسد که استفاده از پپتیدهای نوترکیب این مطالعه به دلیل عدم سابقه‌ی تماس با بیماری‌گرهای انسانی در جریان تکامل، می‌تواند جایگزین مناسبی برای پپتیدهای انسانی در امر مقابله با میکروب‌های بیماری‌زا باشد. استفاده از این پپتیدهای نوترکیب ضد میکروبی در برابر بیماری‌گرهای گیاهی امیدوارکننده است به طوری که می‌توان به طرز چشم‌گیری استفاده از سموم شیمیایی را در کشاورزی کاهش دهد. اگر چه هنوز مرحله بعدی تحقیق شامل ارزیابی گلخانه‌ای و مزرعه‌ای گیاهان تراریخت

متقابل *Avr4* با N-استیل گلوکز آمین از پپتیدوگلیکان باعث افزایش فعالیت این پپتیدهای نوترکیب علیه بیماری‌گرهای باکتریایی می‌شود (Van den Burg *et al.*, 2004).

بین قابلیت اتصال به کیتین و فعالیت ضد میکروبی پپتید *Cy-AMP* علیه باکتری‌های گرم مثبت (*L.lactis*، *S.mutans*، *C.michiganensis*)، گرم منفی (*E.carotovora* و *E.cloacae*) و قارچی (*G.candidum* و *F.oxysporum*) رابطه وجود دارد. با ایجاد جهش در دمین اتصال به کیتین پپتید *Cy-AMP*، اتصال به کیتین و در نتیجه فعالیت ضدقارچی کاهش پیدا کرد، در حالی که خاصیت ضدباکتریایی علیه باکتری‌های گرم مثبت و منفی در مقایسه با پپتید تیپ وحشی تغییر نکرد (Yokoyama *et al.*, 2009). تاکنون به منظور مبارزه با بیماری‌گرها، کیتینازهای گیاهی و قارچی متعددی در گیاهان مختلف بیان شده‌اند و در بیشتر موارد مقاومت بالاتری در لاین‌های تراریخت نسبت شاهد علیه بیماری‌گرهای حاوی کیتین حاصل شده است. مطالعات متعددی جهت شناخت عملکرد دمین اتصال به کیتین صورت گرفته است. از جمله این مطالعات، می‌توان به مطالعه نقش دمین اتصال به کیتین قارچ کلادوسپوریوم فلاوم *Avr4* اشاره نمود. این قارچ دارای افکتوری به نام *Avr4* است که حاوی دمین اتصال به کیتین می‌باشد که دیواره سلولی قارچ را در برابر کیتینازهای گیاهی محافظت می‌کند (Van den Burg *et al.*, 2006).

بنابراین با توجه به مطالب بالا و افزایش فعالیت ضدقارچی پپتیدهای نوترکیب نسبت به پپتید *DrsB1*، می‌توان نتیجه گرفت که توانایی اتصال به کیتین نقش مهمی در فعالیت ضدقارچی پپتیدهای نوترکیب بازی می‌کند. در این راستا، اثر عصاره پروتئینی گیاهان تراریخت حاوی پروتئین‌های نوترکیب اثر مهارکنندگی بیشتری روی *R.solani* نسبت به قارچ *Pythium sp.* داشتند. این امر می‌تواند به این خاطر باشد که میزان کیتین در دیواره سلولی قارچ پیتیوم نسبت به قارچ دیگر

صورت نگرفته است، اما امیدوار هستیم که گیاهان
تراریخت همانند شرایط درون آزمایشگاهی به عوامل
بیماری‌زا در شرایط گلخانه‌ای و مزرعه‌ای نیز مقاوم باشند.

References

- Alibakhshi, A., Nazarian Firouzabadi, F. and Ismaili, A.** (2018). Expression and antimicrobial activity analysis of a Dermaseptin B1 antibacterial peptide in tobacco hairy roots. *Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture)*, **41(3)**: 87-96 (In persian).
- Barra, D. and Simmaco, M.** (1995). Amphibian skin: a promising resource for antimicrobial peptides. *Trends in Biotechnology*, **13**: 205-209.
- 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**: 248-254.
- Cao, H., Li, X. and Dong, X.** (1998). Generation of broad-spectrum disease resistance by overexpression of an essential regulatory gene in systemic acquired resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **95**: 6531-6536.
- Conlon, J.M., Kolodziejek, J. and Nowotny, N.** (2004). Antimicrobial peptides from ranid frogs: taxonomic and phylogenetic markers and a potential source of new therapeutic agents. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, **1696**: 1-14.
- Flavia Cancado Viana, J., Campos Dias, S., Luiz Franco, O. and Lacorte, C.** (2013). Heterologous production of peptides in plants: fusion proteins and beyond. *Current Protein and Peptide Science*, **14**: 568-579.
- Fujikawa, T., Sakaguchi, A., Nishizawa, Y., Kouzai, Y., Minami, E., Yano, S., Koga, H., Meshi, T. and Nishimura, M.** (2012). Surface α -1, 3-glucan facilitates fungal stealth infection by interfering with innate immunity in plants. *PLoS Pathogens*, **8**: e1002882.
- Hajiahmadi, Z., Shirzadian-Khorramabad, R., Kazemzad, M. and Sohani, M.M.** (2017). Expression of *cryIAb* Driven by a Wound Inducible Promoter (MPI) in Tomato to Enhance Resistance to *Tuta absoluta*. *Plant Genetic Researches*, **4(2)**: 1-16 (In Persian).
- Holaskova, E., Galuszka, P., Frebort, I. and Oz, M.T.** (2015). Antimicrobial peptide production and plant-based expression systems for medical and agricultural biotechnology. *Biotechnology Advances*, **33**: 1005-1023.
- Hunter, P.A., Darby, G., Russell, N.J. and Russell, A.D.** (1995). *Fifty Years of Antimicrobials: Past Perspectives and Future trends*. The Press Syndicate of the University Cambridge; New York, USA.
- Khademi, M., Nazarian-Firouzabadi, F. and Ismaili, A.** (2019a). Cloning and expression of two new recombinant antimicrobial dermaseptin b1 peptides in tobacco to control the growth of human bacterial pathogens. *Journal Mazandaran University*, **29(176)**: 47-60 (In persian).
- Khademi, M., Nazarian-Firouzabadi, F., Ismaili, A. and shirzadian-khorramabad, R.** (2019b). Targeting microbial pathogens by expression of new recombinant dermaseptin peptides in tobacco *Microbiologyopen* online, **Special issue**: 1-11.
- Latgé, J.P. and Beauvais, A.** (2014). Functional duality of the cell wall. *Current Opinion in Microbiology*, **20**: 111-117.
- Latgé, J.P.** (2010). Tasting the fungal cell wall. *Cellular Microbiology*, **12**: 863-872.
- Li, Z., Zhou, M., Zhang, Z., Ren, L., Du, L., Zhang, B., Xu, H. and Xin, Z.** (2011). Expression of a radish defensin in transgenic wheat confers increased resistance to *Fusarium graminearum* and *Rhizoctonia cerealis*. *Functional & Integrative Genomics*, **11**: 63-70.
- Osusky, M., Osuska, L., Hancock, R.E., Kay, W.W. and Misra, S.** (2004). Transgenic potatoes expressing a novel cationic peptide are resistant to late blight and pink rot. *Transgenic Research*, **13**: 181-190.
- Oyama, L.B., Crochet, J.A., Edwards, J.E., Girdwood, S.E., Cookson, A.R., Fernandez-Fuentes, N., Hilpert, K., Golyshin, P.N., Golyshina, O.V. and Privé, F.** (2017). Buwchitin: A Ruminal Peptide with antimicrobial potential against *Enterococcus faecalis*. *Frontiers in Chemistry*, **5**: 51.
- Phoenix, D.A., Harris, F., Mura, M. and Dennison, S.R.** (2015). The increasing role of phosphatidylethanolamine as a lipid receptor in the action of host defence peptides. *Progress in Lipid Research*, **59**: 26-37.

- Nazarian-Firouzabadi, F.** (2014). Manipulation of starch biosynthesis and *in planta* biopolymer production. *Plant Genetic Researches*, **4(2)**: 1-14 (In Persian).
- Sohlenkamp, C. and Geiger, O.** (2016). Bacterial membrane lipids: diversity in structures and pathways. *FEMS Microbiology Letters*, **40**: 133-159.
- 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.
- Teixeira, V., Feio, M.J. and Bastos, M.** (2012). Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes. *Progress in Lipid Research*, **51**: 149-177.
- Thomma, B.P., Nürnberger, T. and Joosten, M.H.** (2011). Of PAMPs and effectors: the blurred PTI-ETI dichotomy. *The Plant Cell Online*, **23**: 4-15.
- Van den Burg, H.A., Harrison, S.J., Joosten, M.H., Vervoort, J. and de Wit, P.J.** (2006). *Cladosporium fulvum* Avr4 protects fungal cell walls against hydrolysis by plant chitinases accumulating during infection. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **19**: 1420-1430.
- Van den Burg, H.A., Spronk, C.A., Boeren, S., Kennedy, M.A., Vissers, J.P., Vuister, G.W., de Wit, P.J. and Vervoort, J.** (2004). Binding of the Avr4 elicitor of *Cladosporium fulvum* to chitotriose units is facilitated by positive allosteric protein-protein interactions. *Journal of Biological Chemistry*, **249**: 16786-16796.
- Vidaver, A.K.** (2002). Uses of antimicrobials in plant agriculture. *Clinical Infectious Diseases*, **34**: S107-S110.
- Vlietinck, A.** (1991). Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. *Methods in Plant Biochemistry*, **6**: 47-69.
- Wohlkönig, A., Huet, J., Looze, Y. and Wintjens, R.** (2010). Structural relationships in the lysozyme Superfamily: significant evidence for glycoside hydrolase signature motifs. *PLoS One*, **5**: e15388.
- Yan, R., Hou, J., Ding, D., Guan, W., Wang, C., Wu, Z. and Li, M.** (2008). In vitro antifungal activity and mechanism of action of chitinase against four plant pathogenic fungi. *Journal of Basic Microbiology*, **48**: 293-301.
- Yokoyama, S., Iida, Y., Kawasaki, Y., Minami, Y., Watanabe, K. and Yagi, F.** (2009). The chitin-binding capability of Cy-AMP1 from cycad is essential to antifungal activity. *Journal of Peptide Science*, **15**: 492-497.
- Zasloff, M.** (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, **415**: 389-395.
- Zasloff, M.** (2006). Defending the epithelium. *Nature Medicine*, **12**: 607-608.

Expression and Antimicrobial Activity Analysis of Dermaseptin B1 Recombinant Peptides in Tobacco Transgenic Plants

Mitra Khademi¹ and Farhad Nazarian-Firouzabadi^{2,*}

1- Ph.D., Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran

2- Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran

(Received: April 15, 2019 – Accepted: July 21, 2019)

Abstract

Recently, new molecular breeding and genetic engineering approaches have emerged to overcome the limitations of conventional breeding methods in generating disease-resistance transgenic plants. The use of antimicrobial peptides (AMPs) to produce transgenic plants resistant to a wide range of plant pathogens has achieved great success. Among huge number of AMPs, Dermaseptin B1 (DrsB1), an antimicrobial cationic 31 amino acids peptide, exhibits significant antimicrobial activities towards a wide range of pathogens. In order to increase the antimicrobial efficacy of DrsB1, the DrsB1 encoding DNA sequence was either fused to the N- or C-terminus of the sequence encoding chitin-binding domain (CBD) of *Avr4* gene from *Cladosporium fulvum* and constructs (CBD-DrsB1 and DrsB1-CBD) were used for tobacco leaf disk *Agrobacterium*-mediated transformation. Polymerase chain reaction (PCR), semi-quantitative RT-PCR and SDS-PAGE analysis indicated the integration of transgenes in tobacco genome and expression of the recombinant genes in transgenic plants, respectively. The antimicrobial activity of extracted recombinant peptides were assessed against a number of plant and human pathogens. Both recombinant peptides had statistically significant ($P < 0.01$) inhibitory effects on the growth and development of fungi pathogens. Also, CFU test result showed that extracted recombinant peptides from transgenic plants, had a relatively high inhibitory effect on plant pathogens. The CBD-DrsB1 recombinant peptide demonstrated a higher antibacterial activity, whereas the DrsB1-CBD recombinant peptide performed a greater antifungal activity. In addition, the expression of DrsB1-CBD recombinant peptide significantly inhibited *R.solani* fungal infection in comparison with *Pythium* sp. interestingly, fungi with a higher amount of cell wall chitin were more vulnerable to recombinant peptides, suggesting recombinant peptides present a higher affinity for cell wall chitin. Owing to the high antimicrobial activity and novelty of recombinant peptides, this strategy for the first time, could be used to generate transgenic crop plants resistant to devastating plant pathogens.

Keywords: Gene expression, Pathogens, Antimicrobial peptide, Chitin-binding domain, Genetic engineering

* Corresponding Author, E-mail: nazarian.f@lu.ac.ir