

بیان و بررسی فعالیت ضد باکتریایی پپتید ضد میکروبی Dermaseptin B1 در ریشه‌های موئین توتون

عاطفه علی بخشی^۱، فرهاد نظریان فیروزآبادی^{۲*} و احمد اسماعیلی^۳

- ۱ - دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، لرستان، ایران
 ۲ - نویسنده مسوول: استاد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، لرستان، ایران (nazarian.f@lu.ac.ir)
 ۳ - دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، لرستان، ایران

تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۷/۱۵

تاریخ دریافت: ۹۶/۱۱/۲۸

چکیده

بیمارگرهای گیاهی، حشرات و علف‌های هرز سالانه بیش از ۳۰ درصد از محصولات کشاورزی را نابود می‌کنند. برای کنترل باکتری‌های بیمارگر گیاهی، به طور فزاینده‌ای از سموم شیمیایی باکتری کش استفاده شده است که ضمن ایجاد مقاومت در بیمارگرها، باعث مخاطراتی برای سلامت انسان و محیط زیست می‌شوند. از این رو، اصلاح گیاهان مقاوم به باکتری‌های بیماری‌زا، راهکاری ارزشمند و پایدار محسوب می‌شود. پپتیدهای ضد میکروبی (AMP) بخشی از سیستم ایمنی موجودات زنده‌ای مانند گیاهان هستند که برای مقابله با بیمارگرهای بیماری‌زا تولید می‌شوند. تولید پروتئین‌های مختلف مانند پپتیدهای ضد میکروبی در ریشه‌های موئین گیاهان، یک ابزار مناسب برای تولید و ارزیابی فعالیت این قبیل از پروتئین‌ها است. هدف از این مطالعه، تولید پپتید ضد-میکروبی نو ترکیب درماسپتین B1 (DrsB1) در ریشه‌های موئین توتون تراریخت به کمک اگروباکتریوم ریزوژنز (*Agrobacterium rhizogenes*) و بررسی اثرات ضد باکتریایی آن بود. در همین راستا توالی DNA کدکننده پپتید DrsB1 یک نوع قورباغه پس از بهینه‌سازی ترجیح کدونی، سنتز و در ناقل بیانی pGSA1285 تحت کنترل پیش‌بر 35S(3×) همسانه‌سازی گردید. سامانه‌ی ژنی حاوی توالی کدکننده DrsB1 به واسطه‌ی اگروباکتریوم ریزوژنز به ریشه‌های توتون منتقل گردید. ریشه‌های موئین تراریخت به کمک روش‌های مولکولی تایید شدند. بررسی خاصیت ضد میکروبی عصاره پروتئینی ریشه‌های موئین تراریخت نشان داد که پروتئین نو ترکیب قادر است از رشد باکتری‌های بیمارگر گیاهی *Erwinia Pectobacterium carotovorum* و *amylovora* و *Xanthomonas citri* جلوگیری کند. پپتید DrsB1 بیشترین اثرات ضد میکروبی را به ترتیب روی باکتری‌های بیماری‌زای گیاهی *E.amylovora* و *X.citri* و *P.carotovorum* نشان داد. نتایج این مطالعه ممکن است در تولید گیاهان تراریخت حاوی پپتیدهای ضد میکروبی برای تولید گیاهان تراریخت مقاوم به پاتوژن‌های گیاهی امیدوار کننده باشد.

کلید واژه‌ها: باکتری کش، به‌نژادی، پروتئین، مقاومت، مهندسی ژنتیک

مقدمه

بیماری یا عدم بکارگیری راهکارهای کنترل بیماری، می‌تواند منجر به نابودی کامل محصول شود. از آنجایی که توسعه مداوم سطح زیر کشت امکان پذیر نیست، افزایش محصول باید از طریق افزایش عملکرد در واحد سطح جبران شود. بنابراین جهت تضمین تولید پایدار

بیماری‌های گیاهی به تنهایی سالانه به طور متوسط حدود بیش از ۱۵ درصد محصولات کشاورزی را در جهان از بین می‌برند (Schwessinger et al., 2015). در برخی از محصولات، مهیا بودن شرایط پیشرفت

محصولات کشاورزی، لازم است ارقام جدیدی عرضه شود که ضمن سازگاری با شرایط اقلیمی متفاوت، در برابر آفات و بیماری‌های گیاهی و همچنین تنش‌های محیطی مقاوم باشند (Ravichandra, 2013). با توجه به ضرورت تولید ارقام گیاهی مقاوم به تنش‌های زیستی و غیر زیستی و عدم کارایی روش‌های سنتی به‌نژادی، به کارگیری روش‌های مهندسی ژنتیک تنها راه‌هایی از این مشکل می‌باشد.

در سال‌های اخیر، با پیشرفت‌های به دست آمده در زیست‌شناسی مولکولی و روش‌های کشت بافت گیاهی روش‌های جدیدتر و کارآمدتری در مهندسی ژنتیک، برای غلبه بر محدودیت‌های به‌نژادی گیاهی سنتی فراهم آمده است. با استفاده از روش‌های انتقال ژن، گیاهان تراریخت قادرند یک ژن از منبع ژنی متفاوت دریافت نمایند، به طوری که سایر ویژگی‌های مطلوب گیاه تحت تاثیر قرار نگیرد (Demain and Vaishnav, 2009). تولید پروتئین‌های نو ترکیب در سیستم‌های بیان گیاهی نسبت به سیستم‌های صنعتی (۱) اقتصادی است، (۲) تولید پروتئین نو ترکیب بیشتر و پایدارتر است، (۳) خطرات ناشی از آلودگی آن کمتر است و (۴) فرآورده‌های تولیدی از نظر بیولوژیکی فعال و مشابه شکل طبیعی هستند (Daniell et al., 2001).

پپتیدهای ضد میکروبی^۱ (AMP)، پروتئین‌هایی با کمتر از ۱۰۰ اسید آمینه هستند که جزء ترکیبات مهم سیستم ایمنی ذاتی و اکسایبی انسان، میکروارگانیسم‌ها، حیوانات و گیاهان محسوب می‌شوند (Holaskova et al., 2015). پپتیدها معمولاً اولین سد دفاعی در برابر بیمارگرهای باکتریایی، ویروس‌ها، پارازیت‌ها و قارچ‌ها هستند (Cherredy et al., 2014). پپتیدها به دلیل وزن مولکولی پایین، برخورداری از طیف وسیعی از فعالیت سریع، سمیت اندک برای سلول‌های یوکاریوت و روش‌های منحصر به فرد فعالیت، برای کنترل

بیمارگرهای بیماری‌زا بسیار مورد توجه هستند. علاوه بر استفاده در علوم پزشکی، پپتیدهای ضد میکروبی برای ایجاد ارقام جدید و تراریخت جهت حفاظت گیاهان در مقابل بیماریهای گیاهی بکار گرفته می‌شوند. کاهش محصول، کیفیت و ایمنی تولیدات کشاورزی به علت بیمارگرهای گیاهی می‌تواند به کمک استفاده از پپتیدهای ضد میکروبی برطرف شود (Holaskova et al., 2015). پپتیدهای ضد میکروبی با نفوذپذیر کردن غشای سلولی باکتری‌ها، سبب کنترل آن‌ها می‌شوند. با این حال، مکانیسم فعالیت ضد قارچی برای این پپتیدها پیچیده‌تر است و اغلب شامل ورود پپتید به درون سلول است (Van der Weerden et al., 2013).

درماستین‌ها یک خانواده بزرگ از پپتیدهای ضد میکروبی هستند که اغلب در پوست قورباغه‌های خانواده‌های هالیده^۲ و رانیده^۳ ساخته و ترشح می‌شوند. اگرچه این پپتیدها به لحاظ ژنتیکی به هم مرتبط هستند و دارای شباهت‌های قابل توجهی در توالی سیگنال و توالی اسیدهای آمینه مهم خود می‌باشند، اما به طور قابل توجهی از نظر فعالیت با هم متفاوتند و چندین خانواده از پپتیدها را شامل می‌شوند که از لحاظ ساختاری و عملکردی متمایز هستند (Nicolas and El Amri, 2009). برای مثال، پپتید موسوم به Dermaseptin B1 (DrsB1) پیش ماده بزرگی از Dermaseptin B با ۳۱ اسید آمینه است که از ترشحات پوست قورباغه‌های درختی *Phyllomedusa sauvagei* و *Phyllomedusa bicolor* جداسازی شده است (Deazevedo et al., 2011). پپتید DrsB1 یکی از قدرتمندترین پپتیدهای ضد میکروبی در میان همه‌ی درماستین‌ها است و باعث مهار گونه‌های متعددی از باکتری‌ها و قارچ‌ها در شرایط آزمایشگاهی می‌شود و با وجود فعالیت در غشا میکروبی، این پپتید، گلبول‌های قرمز یا سایر سلول‌های پستانداران را لیز نمی‌کند

^۲ Hylidae

^۳ Ranidae

^۱ Antimicrobial peptides

به طول ۹۳ جفت باز، از پایگاه uniprot دریافت شد. سپس به ناحیه ۳' توالی پپتید، تگ شناسایی به توالی RGS(His)₆ و توالی کد کننده فاکتور Xa مربوط به ویروس خراشک توتون به توالی IEGR اضافه شد (شکل ۱). برای سهولت در همسانه‌سازی، جایگاه برش آنزیم‌های *NcoI* و *BamHI* به ترتیب در ناحیه ۵' و ناحیه ۳' طراحی گردید.

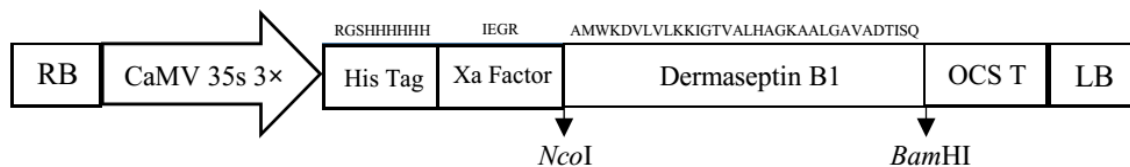
پس از همسانه‌سازی مجازی پپتید و عناصر همراه به کمک نرم افزار Vector NTI خاصیت ضد میکروبی سازه نهایی با استفاده از پایگاه CAMP بررسی و با استفاده از پایگاه Pfam دمین‌های عملکردی آن مشخص شد. خصوصیات پپتید مورد نظر با استفاده از پایگاه ProtParam بررسی شد. برای بهبود بیان پپتید در گیاه، کدون‌های انتخابی طبق ترجیح کدونی گیاه توتون طراحی و بهینه‌سازی شد. سازه طراحی شده در ناقل pUC57 همسانه‌سازی (شرکت Biomatik کانادا) و ناقل pUC57/DrsB1 تولید شد. جهت انتقال سازه مورد نظر به ناقل بیانی، ناقل نو ترکیب pUC57/DrsB1 حاوی ژن درماسپتین و ناقل بیانی pGSA1285 با دو آنزیم *NcoI* و *BamHI* هضم شدند و سپس قطعه *DrsB1* به ناقل خطی pGSA1285 متصل شد تا ناقل بیانی pGSA1285/DrsB1 تولید شود (شکل ۱). سپس ناقل pGSA1285/DrsB1 برای انتقال به گیاه و تراریزش به آگروباکتریوم رایزوزنز منتقل شد.

(Yevtushenko and Misra, 2007). پپتید DrsB1 یک پپتید ضد میکروبی کاتیونی با ساختار آلفا-هلیکسی است که عناصر مولکولی موجود در قسمت آمفی‌پاتیک آلفا-هلیکس N-ترمینال آن، مسئول اصلی فعالیت قوی ضد میکروبی آن محسوب می‌شوند (Mor et al., 1991; Osusky et al., 2000).

امروزه به طور وسیع از آگروباکتریوم رایزوزنز جهت معرفی ژن‌های خاص، ایجاد ریشه‌های موئن تراریخت و تولید پروتئین‌های نو ترکیب در گیاهان استفاده می‌شود. ریشه‌های موئن به دلیل رشد سریع در محیط کشت فاقد هورمون و پایداری بیوشیمیایی، دارای پتانسیل بالقوه برای تولید پروتئین‌های نو ترکیب هستند (Aleinein et al., 2015). به نظر می‌رسد که کشت ریشه‌های موئن به طور قابل توجهی پایداری بلند مدت پروتئین را نسبت به کشت سوسپانسیون سلولی افزایش می‌دهد (Doran, 2006). هدف از این پژوهش، استفاده از ریشه‌های موئن توتون به منظور سنتز پپتید ضد میکروبی درماسپتین B1، جداسازی و بررسی اثرات ضد میکروبی آن بود.

مواد و روش‌ها

شناسایی، طراحی و همسانه‌سازی پپتید درماسپتین B1
توالی نوکلئوتیدی و اسید آمینه‌ی پپتید درماسپتین B1 (DrsB1) مربوط به قورباغه به شماره دسترسی P80282



شکل ۱- شماتیک سازه pGSA1285/DrsB1 که از آن برای تراریزش توتون استفاده شد. ژن نو ترکیب تحت کنترل پروموتور 35S(3x) ویروس موزائیک گل کلم قرار دارد. از ژن *nptII* برای انتخاب گیاهان تراریخت استفاده شد. RB و LB به ترتیب مرزهای راست و چپ ناحیه T-DNA پلاسمید، OCST: ترمیناتور اوکتاپین سنتاز است. اندازه عناصر در شکل، با اندازه واقعی آن‌ها مطابقت ندارد.

Figure 1. The schematic representation of pGSA1285/DrsB1 binary expression vector used for *Nicotiana tabacum* transformation. The recombinant gene was driven by Cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S (3x) promoter. LB and RB represent left and right borders of T-DNA region, respectively. OCST shows the octopine synthase gene terminator. The neomycin phosphotransferase II (*nptII*) gene was used to select *in vitro* transgenic plants. The size of the elements shown in the figure does not match their actual size.

انتقال پپتید DrsB1 به گیاه توتون

بذور توتون (*Nicotiana tabacum*. L) رقم *Xanthi* در محلول اتانل ۷۰ درصد برای مدت ۳۰ ثانیه و سپس در مخلوط هیپوکلریت سدیم ۱/۵ درصد و تریتون X-100 به مدت ۱۵ دقیقه ضد عفونی شدند (Badrhadad et al., 2018). پس از شستشو با آب مقطر استریل، بذرها بر روی محیط کشت پایه MS قرار داده شدند و به یک اتاق کشت با دمای 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. سپس از قطعات برگ گیاهان شش هفته‌ای به عنوان ریز نمونه استفاده گردید. ریز نمونه های تهیه شده به درون مایع تلقیح آگروباکتریوم ریزوژنز سویه ATCC15834 حاوی ژن پپتید DrsB1 منتقل و به مدت ۱۰ دقیقه تکان داده شدند. پس از خشک کردن برگ‌های آلوده به باکتری روی کاغذ صافی سترون و شستشوی آنها با آب مقطر استریل، ریز نمونه‌های برگ بر روی محیط هم‌کشتی MS بدون تنظیم کننده رشد و آنتی بیوتیک برای مدت زمان دو تا سه روز در تاریکی قرار داده شدند. سپس ریز نمونه‌ها به محیط انتخابی حاوی ۵۰ میلی گرم بر لیتر کانامایسین و ۲۵۰ میلی گرم بر لیتر سفوتاکسیم جهت حذف آگروباکتری و القای ریشه‌های موئین منتقل شدند و تا ظهور و رشد ریشه‌های موئین هر دو هفته یک بار در محیط انتخابی واکشت شدند.

آنالیز ریشه‌های موئین تراریخت بوسیله PCR

تأیید تراریختگی ریشه‌های موئین تراریخت، بوسیله واکنش PCR با آغازگرهای اختصاصی (DrsR: 5'- DrsF: CTCCCAAAGCAGCCTTTCCAG-3' 5'-TGGCAAGAGGATCTCATCATC-3'; که برای این آزمایش طراحی شدند به صورت یک بار واکنش در 95°C (۵') و 72°C (۳۰'') + 60°C (۱') + 95°C (۱') برای تکثیر قطعه ای به طول ۱۱۴ bp، با استفاده از DNA ژنومی استخراج شده از ریشه‌های موئین و ریشه‌های گیاه شاهد صورت گرفت. همچنین به منظور تأیید انتقال قطعه T-DNA پلاسمید Ri

در ریشه‌ها، واکنش PCR با آغازگرهای اختصاصی RolCR: 5'-) rolC (Furner et al., 1986) DrsF: CTCCTGACATCAAACCTCGTC -3' TGCTTCGAGTTATGGGTACA-3' (5'-) به صورت یک بار واکنش در 95°C (۵') و 72°C (۴۵'') + 53°C (۳۰'') + 95°C (۱') برای تکثیر قطعه ای به طول ۶۳۰ bp، با استفاده از DNA ژنومی استخراج شده از ریشه‌های موئین و شاهد صورت گرفت.

استخراج RNA و سنتز cDNA

به منظور بررسی بیان پپتید DrsB1 در ریشه‌های تراریخت، از ریشه‌های تراریخت و شاهد، استخراج RNA به روش کلرید لیتیم و با تیمار $(10 \mu\text{gml}^{-1})$ Dnase برای حذف آلودگی DNA صورت گرفت. سنتز cDNA با استفاده از کیت (شرکت فرمتاز) و آغازگرهای OligodT انجام گرفت. برای تأیید بیان ژن پپتید DrsB1 و مقایسه میزان بیان پپتید در ریشه‌های تراریخت، واکنش RT-PCR نیمه کمی با استفاده از آغازگرهای اختصاصی روی cDNA و در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر انجام گرفت.

استخراج پروتئین از ریشه‌های موئین

پروتئین کل از ریشه‌های موئین تراریخت و شاهد با استفاده از بافر فسفات پتاسیم (۵۰ mM) صورت گرفت (Stone and Gifford, 1997). پس از تعیین غلظت پروتئین کل به روش براد فورد (Bradford, 1976) و به منظور استفاده از پپتید در مراحل بعدی، پروتئین در دمای 20°C - درجه سانتی‌گراد ذخیره سازی شد. همچنین تعیین میزان حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) به روش رقت سازی در لوله و بر اساس روش Elisha et al. (2017) صورت گرفت.

آزمایش فعالیت ضد میکروبی

فعالیت ضد باکتریایی DrsB1 با استفاده از بررسی فعالیت پروتئین کل از ریشه‌های موئین تراریخت علیه باکتری‌های بیمارگر گیاهی *Pectobacterium carotovorum* و *Erwinia amylovora* و

نشان داد که سازه طراحی شده دارای خاصیت ضد میکروبی بالایی در مقایسه با پپتیدهای مشتق از آن است. با وجود افزودن RGS(His)₆ و فاکتور Xa به نظر می‌رسد که پارامترهای ضد باکتریایی پپتید مورد مطالعه تغییر کرده‌اند (جدول ۱).

همانطوری که از جدول ۱ مشخص است در صورت عدم برش تگ هیستیدین و فاکتور Xa از پپتید، فعالیت پپتید به دلیل بار کاتیونی بیشتر، در مقایسه با پپتیدهای شماره دو و سه بالاتر است. این در حالی است که پروتئین اصلی شماره دو و پروتئین اصلی علیرغم افزودن یک متیونین (شماره سه) برای افزایش فعالیت (Osusky et al., 2000)، دارای بار کاتیونی کمتری هستند. به علاوه نیمه عمر پپتید شماره یک بیش از ۳۰ ساعت در سلول‌های یوکاریوتی است، اما در صورت برش تگ هیستیدین و فاکتور Xa، این عدد به حدود چهار ساعت می‌رسد. از آنجایی که تراکم و مدت زمان تاثیر از جمله عوامل کارایی یک پپتید هستند، لذا به نظر می‌رسد که پپتید یک که در عصاره پروتئین گیاهان تراریخت تولید خواهد شد، از فعالیت بالاتری برخوردار باشد. یکی از مهمترین چالش‌ها در خصوص استفاده از پپتیدها در سیستم‌های زیستی، موضوع طول عمر کم پپتیدها چه در محیط درون سلول و چه در محیط آزمایشگاه است (Di, 2015). راهکارهای متعددی برای بهبود طول عمر پپتیدها پیشنهاد شده است. یکی از این راه حل‌ها، اضافه نمودن برخی اسیدهای آمینه خاص از جمله اسید آمینه‌های والین (Val)، ترئونین (Thr)، آلانین (Ala)، سرین (Ser)، متیونین (Met) و گلیسین (Gly) در ناحیه N پپتیدهاست (Di, 2015). همانطوری که مشاهده می‌شود، در ناحیه N پپتید شماره یک، دو اسید آمینه Met و Ala قرار داده شده است که سبب افزایش طول عمر آن شده است (جدول ۱). همچنین افزایش طول عمر پپتیدها به کاهش دز مصرف آن‌ها منجر خواهد شد (Schellenberger et al., 2009). این موضوع از این جهت حائز اهمیت است که دستکاری پپتیدها می‌تواند میزان حداقل غلظت بازدارندگی را کاهش دهد و طول عمر پپتید و زمان تاثیر گذاری آن را بالا ببرد.

Xanthomonas citri که از گروه گیاهپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد دریافت شده بودند، با روش انتشار در دیسک صورت گرفت (Jorgensen and Turmidge, 2015). بدین منظور میکروارگانیزم‌های مورد نظر تا غلظت $OD_{600nm} = 0.4$ (مرحله رشد لگاریتمی) بصورت شبانه در محیط LB مایع رشد داده شدند. سپس مقدار ۵۰ میکرولیتر از باکتری‌ها به ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت جامد با دمای کمتر از ۵۰ درجه سانتی‌گراد اضافه شد (تعداد ۳ پتری معادل ۳ تکرار). بعد از بستن محیط، دیسک‌ها روی محیط قرار داده شده و پروتئین استخراج شده (در سه سطح ۴۰، ۸۰ و ۱۲۰ میکرولیتر، معادل غلظت‌های ۲۵، ۵۰ و ۷۵ میکروگرم در میکرولیتر) به دیسک‌ها با اندازه قطر شش میلی‌متر افزوده شد. پتری دیش‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای چهار درجه سانتی‌گراد برای تثبیت پروتئین در دیسک و سپس به مدت یک شبانه روز در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد برای رشد باکتری انکوباسیون شدند. فعالیت ضد میکروبی پروتئین با مشاهده هاله عدم رشد باکتری ایجاد شده در اطراف دیسک‌ها بررسی گردید. این آزمایش به شکل یک آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تیمار غلظتی (سه سطح غلظت) و سه نوع باکتری در سه تکرار انجام گرفت. پس از کسر اندازه قطر دیسک از قطر هاله عدم رشد باکتری، تجزیه واریانس داده‌ها به کمک نرم‌افزار SPSS V.24 صورت گرفت. مقایسه میانگین داده‌ها به روش دانکن در سطح احتمال مربوطه ($\alpha=0.01$) با توجه به جدول تجزیه واریانس صورت گرفت.

نتایج و بحث

شناسایی، طراحی و همسانه سازی توالی پپتید DrsB1

پیش از انجام کارهای آزمایشگاهی، کارایی و فعالیت پپتید طراحی شده به توالی MARGSHHHHHHIEGRAMWKDVLKKI (GTVALHAGKAALGAVADTISQ) به صورت *in silico* به کمک الگوریتم‌های پایگاه CAMP و با سه الگوریتم مختلف بررسی شد. نتایج این بخش از مطالعه

جدول ۱- پیش بینی برخی پارامترهای مهم برای پپتید درماسپتین. پپتید طراحی شده (۱) و DrsB1 (۲) و پپتید DrsB1 با یک متیونین اضافی در ناحیه N (۳).

Table 1. Prediction of some important criteria for Dermaseptin peptide (1), DrsB1 (2) and DrsB1 with a Methionine (M) residue at the N-terminal.

| Peptide No | Peptide Sequence | HI(h) | PI | Charge | MW(D) |
|------------|---|-------|------|--------|---------|
| 1 | MARGSHHHHHHIEGRAMWKDVLKIGTVALH AGKAALGAVADTISQ | >30 | 9.99 | 6.50 | 4946.43 |
| 2 | AMWKDVLKIGTVALHAGKAALGAVADTISQ | >4 | 9.53 | 2.5 | 3165.23 |
| 3 | <u>M</u> AMWKDVLKIGTVALHAGKAALGAVADTISQ | >30 | 9.52 | 2.5 | 3296.44 |

HI: نیمه عمر پپتید، PI: نقطه ایزوالکتریک، MW: وزن مولکولی

غربالگری ریشه‌های تراریخت

به منظور غربالگری ریشه‌های به ظاهر تراریخت، DNA ژنومی از این ریشه‌ها و ریشه‌های شاهد جداسازی شد و کمیت و کیفیت آن با استفاده از الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۵ درصد بررسی گردید. نتایج واکنش زنجیره‌ای پلیمرز بر روی DNA استخراج شده از ریشه‌های موئین تراریخت با استفاده از آغازگرهای اختصاصی، حضور و تکثیر یک قطعه ۱۰۰ جفت باز مورد انتظار را نشان داد (شکل ۲a). همچنین برای اثبات بیان ژن کدکننده‌ی پپتید DrsB1 در ریشه‌های تراریخت، از واکنش RT-PCR نیمه کمی استفاده شد. همانطوری که از شکل ۲b مشخص است، ژن کدکننده‌ی پپتید DrsB1 به درستی در ریشه‌های تراریخت بیان می‌شود، زیرا یک قطعه به طول ۱۰۰ جفت باز معادل طول mRNA بالغ ژن DrsB1 که در ریشه‌های موئین تراریخت سنتز می‌شود، هیچگونه بیانی از ژن DrsB1 در ریشه‌های شاهد مشاهده نگردید. همچنین برای اثبات تراریخت بودن ریشه‌های تراریخت، واکنش PCR روی این ریشه‌ها منجر به تکثیر قطعه از ژن *rolC* گردید که نشان می‌دهد ناحیه T-DNA پلاسمید Ri در ژنوم سلول‌های تراریخت به درستی وارد شده است (شکل ۲c).

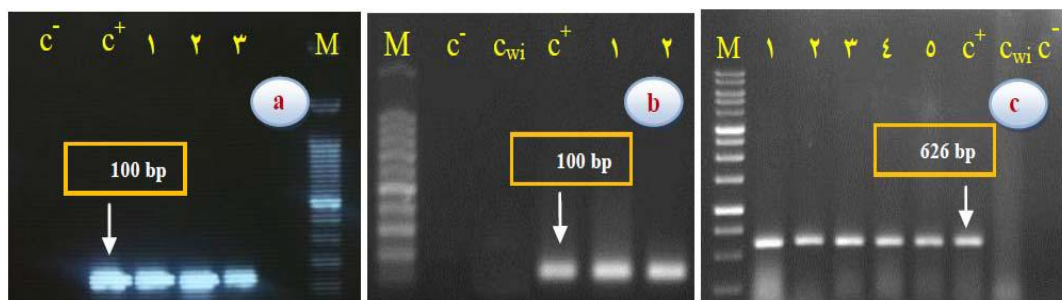
اثرات ضد میکروبی پپتید DrsB1 در محیط آزمایشگاه

استفاده از ریشه‌های موئین برای تولید ترکیبات ارزشمندی مانند پروتئین‌ها و واکسن‌های مهم انسانی و دامی،

این ریشه‌های موئین را به ابزار مناسبی برای زیست‌شناسان مولکولی تبدیل نموده است (Skarjinskaia et al., 2013). به منظور بررسی اثرات ضد میکروبی پپتید DrsB1، پروتئین کل از ریشه‌های موئین تراریخت جداسازی شد.

بررسی اثرات ضد میکروبی با استفاده از روش انتشار در دیسک در شکل ۳ نمایش داده شده است. همانطوری که دیده می‌شود، پپتید DrsB1 در مهار رشد باکتری *E. amylovora* نسبت به دو بیمارگر دیگر چندان موفق نبوده است.

به منظور بررسی آماری تفاوت اثر پپتید DrsB1 در کنترل بیمارگرها، آنالیز تجزیه واریانس داده‌ها صورت گرفت. تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که به لحاظ آماری اختلاف بسیار معنی‌داری ($P < 0.01$) بین تیمارهای مختلف عصاره پروتئینی بر روی سه باکتری مورد آزمایش وجود داشت (جدول ۲). همانطوری که مشاهده می‌شود تمام اثرات از جمله اثر متقابل غلظت × باکتری در سطح احتمال $\alpha = 0.01$ معنی‌دار شدند. Aleinein et al. (2015) نیز در تحقیقی مشابه موفق به تولید پپتید ضد میکروبی نو ترکیب رانالکسین در ریشه‌های موئین توتون شدند و نشان دادند که پپتید نو ترکیب فعالیت ضد میکروبی قابل توجهی علیه بیمارگرهای انسانی داشت. به علاوه، Pham et al. (2012) بیان موفقیت آمیز پپتید ضد میکروبی تائوماتین در ریشه‌های موئین تراریخت در توتون را گزارش کردند، اما اثرات ضد میکروبی این پپتید را بررسی نکردند.



شکل ۲- آنالیز PCR و RT-PCR نیمه کمی ریشه‌های موئین تراریخت توتون. a: نتایج آنالیز RT-PCR نیمه کمی با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن درماسپتین B1. b: غربالگری گیاهان تراریخت به کمک PCR و آنالیز PCR ژن *rolC*: نشانگرهای اندازه 1kb و 100bp، c^- و c^+ : به ترتیب کنترل منفی (ریشه‌های شاهد)، شاهد منفی (بدون DNA الگو) و کنترل مثبت (پلاسمید)، چاهک‌های ۱ تا ۵: ریشه‌های تراریخت.

Figure 2. PCR and semi-quantitative RT-PCR analysis of transgenic tobacco hairy roots. a) semi-quantitative RT-PCR amplification of a 100 bp DrsB1 peptide, using RT-PCR specific primers. b) PCR screening of transgenic plants. c) PCR analysis of *rolC* gene. M: 100 bp/1Kb size marker ladders, c^- , c_{wi} and c^+ are, negative control (non-transgenic roots), Negative control (No DNA template) and positive control (plasmid NA), respectively. 1-5: Transgenic root lines.

نیز کنترل کند (جدول ۲). اگرچه هر سه باکتری گرم منفی هستند و دلیل مستدلی برای مقاومت نسبی باکتری *E. amylovora* در مقابل پپتید این مطالعه وجود ندارد، اما برخی از تحقیقات مشابه، به مقاومت این باکتری به سایر پپتیدها نیز اشاره کرده‌اند. برای مثال، بیان یک پپتید به نام Tachypleisin I تنها مقاومت اندکی به سبب زمینی‌های تراریخت علیه این باکتری بخشید (Allefs et al., 1996). همانطوری که گفته شد، به نظر می‌رسد که بین غلظت پپتید و قدرت کشندگی آن رابطه‌ای مستقیم وجود دارد. وجود چنین ارتباطی نیز در بیان پپتید LFchimera در ریشه‌های موئین توتون همانند مطالعه حاضر اثبات شده است (Chahardoli et al., 2018). با این حال، برای نتیجه‌گیری بهتر لازم است تا اثر ضد باکتریایی پپتید DrsB1 علیه تعداد بیشتری از بیمارگرهای گیاهی بررسی شود. از آنجایی که دو باکتری *P. carotovorum* و *X. citri* خسارت‌های زیادی را به محصولات زراعی و باغی وارد می‌کنند، و بر اساس نتایج این مطالعه پپتید DrsB1 توانسته است از رشد این بیمارگرها جلوگیری کند، انتقال ژن کدکننده این پپتید به چنین گیاهانی و تولید لاین‌های تراریخت پایدار می‌تواند در ایجاد مقاومت به این باکتری‌ها موثر باشد.

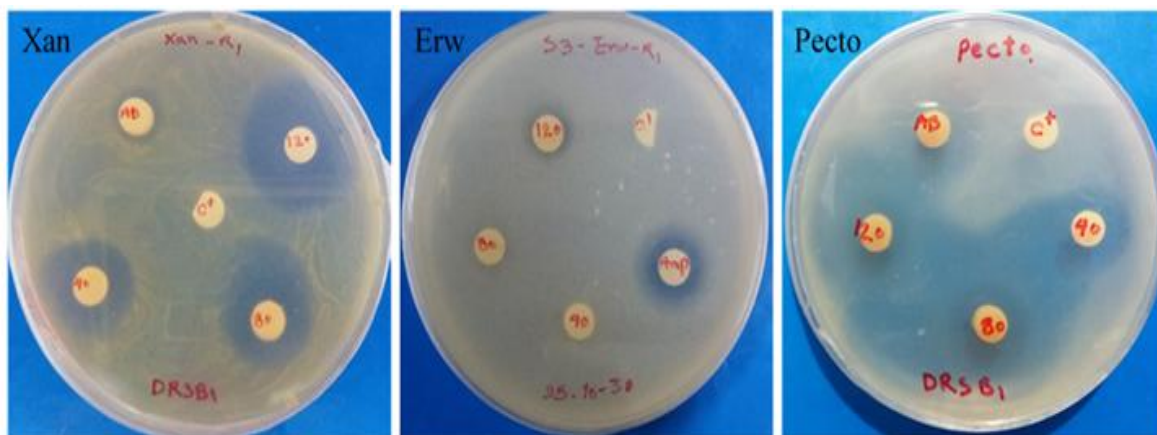
جدول ۲- تجزیه واریانس داده‌های مربوط به میانگین قطر هاله عدم رشد در تیمار با غلظت‌های مختلف پروتئین کل ریشه‌های موئین.

Table 2. Analysis of variance for mean growth inhibin zone treated with different concentrations of hairy roots total protein.

| Source of variation | Df | MS |
|------------------------|----|-----------|
| Bacteria | 2 | 770.028** |
| Concentration | 3 | 783.556** |
| Bacteria*Concentration | 6 | 106.472** |
| Error | 24 | 0.694 |
| Total | 36 | |

Significance at 0.01 level

به منظور مقایسه تاثیر پپتید DrsB1 در کنترل سه باکتری مهم بیماری‌زای گیاهی، قطر هاله عدم رشد باکتری‌ها اندازه‌گیری و مورد مقایسه آماری قرار گرفت (جدول ۳). اثر متقابل دو جانبه معنی‌دار ($P < 0.01$) گردید، از این‌رو مقایسه میانگین برای تیمارهای این اثر متقابل با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن صورت گرفت. همانطوری که ملاحظه می‌شود، با افزایش غلظت، اثر ضد میکروبی پپتید DrsB1 هم بیشتر شد. به نظر می‌رسد که پپتید DrsB1 در غلظت‌های کم قادر به مهار باکتری *E. amylovora* نبود، در حالی که به خوبی توانست دو باکتری بیمارگر دیگر را در غلظت‌های کمتر



شکل ۳- تاثیر ضد میکروبی پپتید DrsB1 علیه باکتری‌های بیماری‌زای گیاهی *P. carotovora*، *E. amylovora* و *X. citri* سطوح مختلف پروتئین کل (در سه سطح ۴۰، ۸۰ و ۱۲۰ میکرولیتر، معادل غلظت‌های ۲۵، ۵۰ و ۷۵ میکروگرم در میکرولیتر) از ریشه‌های تراریخت و شاهد، به روش آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی مورد مقایسه قرار گرفت. از آن‌تی بیوتیک جنتامایسین (۱۰ میکروگرم) به عنوان شاهد مثبت استفاده شد.

Figure 3. Antibacterial activity of DrsB1 peptide against *P. carotovora*, *E. amylovora* and *X. citri*. Different concentrations of total protein (40, 80 and 120 microliter equivalent to 25, 50 and 75 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) from transgenic and non-transgenic hairy roots were statistically compared as a factorial experiment under Randomized Complete Design (CRD) with 3 replications. Gentamicin antibiotic (10 μg) was used as a positive control.

جدول ۳- آنالیز مقایسه میانگین به روش دانکن ($\alpha=0.01$) قطر هاله‌های عدم رشد باکتری‌های

تیمار شده با عصاره پروتئین ریشه‌های موئین تراریخت و شاهد

Table 2. Duncan's multiple test range mean comparison ($\alpha=0.01$) of bacterial growth inhibition zone treated with transgenic and control roots protein extracts

| Treatment | Mean of inhibition zone (mm) | | |
|------------------------------|------------------------------|---------------------|-----------------------|
| | <i>X. citri</i> | <i>E. amylovora</i> | <i>P. carotovorum</i> |
| 25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ | 13 ^f | 0 ^h | 14 ^e |
| 50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ | 17 ^d | 0 ^h | 24 ^b |
| 75 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ | 23 ^c | 11 ^g | 33 ^a |
| Ut | 0 | 0 | 0 |
| GM | 4 | 9 | 17 |

Ut: گیاه شاهد غیر تراریخت. GM: جنتامایسین (۱۰ μg)

ریشه‌های موئین گیاه توتون به خوبی از رشد دو باکتری بیمارگر جلوگیری نمود. بر این اساس میتوان توسعه سیستم ریشه موئین به منظور تولید پروتئین‌های نو ترکیب کارا در گیاهان را روشی موثر قلمداد نمود. ضمن اینکه انتقال ژن پپتید درماسپتین به گیاهان جهت تکوین مقاومت گیاه، به منظور بهبود وضعیت زراعی گیاهان نیز توصیه می‌شود.

نتیجه گیری

نتایج این پژوهش برای اولین بار تولید پپتید ضد میکروبی درماسپتین در ریشه موئین توتون را گزارش می‌کند. در پژوهش حاضر پپتید ضد میکروبی درماسپتین در ریشه‌های موئین گیاه توتون تولید و اثر آن روی سه باکتری بیمارگر گیاهی بررسی شد. همانطور که ملاحظه گردید، درماسپتین تولید شده در

REFERENCES

- Aleinein, R., Schäfer, H., and Wink, M. 2015. Rhizosecretion of the recombinant antimicrobial peptide ranalexin from transgenic tobacco hairy roots. *RRJBS Phytopathol Gene Disease*, 1: 45-55.
- Allefs, S.J., De Jong, E.R., Florack, D.E., Hoogendoorn, C. and Stiekema, W.J. 1996. *Erwinia* soft rot resistance of potato cultivars expressing antimicrobial peptide tachyplesin I. *Molecular Breeding*, 2: 97-105.
- Badrhadad, A., Nazarian-Firouzabadi, F., and Ismaili, A. 2018. Fusion of a chitin-binding domain to an antibacterial peptide to enhance resistance to *Fusarium solani* in tobacco (*Nicotiana tabacum*). *3 Biotech*, 8: 391.
- 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.
- Chahardoli, M., Fazeli, A., Niazi, A., and Ghabooli, M. 2018. Recombinant expression of LFchimera antimicrobial peptide in a plant-based expression system and its antimicrobial activity against clinical and phytopathogenic bacteria. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 32 (3): 714-723.
- Cheredy, K.K., Her, C.-H., Comune, M., Moia, C., Lopes, A., Porporato, P.E., Vanacker, J., Lam, M.C., Steinstraesser, L., and Sonveaux, P. 2014. PLGA nanoparticles loaded with host defense peptide LL37 promote wound healing. *Journal of Controlled Release*, 194: 138-147.
- Daniell, H., Lee, S.-B., Panchal, T., and Wiebe, P.O. 2001. Expression of the native cholera toxin B subunit gene and assembly as functional oligomers in transgenic tobacco chloroplasts. *Journal of Molecular Biology*, 311: 1001-1009.
- Demain, A.L., and Vaishnav, P. 2009. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology Advances*, 27: 297-306.
- Deazevedo, L., Alexandre deAlmeida, S., Ciancaglini, P., and Stábeli, R.G. 2011. Antimicrobial peptides from *Phyllomedusa* frogs: from biomolecular diversity to potential nanotechnologic medical applications. *Amino Acids*, 40: 29-49
- Di, L. 2015. Strategic approaches to optimizing peptide ADME properties. *The AAPS Journal*, 17: 134-143.
- Doran, P.M. 2006. Foreign protein degradation and instability in plants and plant tissue cultures. *Trends in Biotechnology*, 24: 426-432.

Elisha, I.L., Botha, F.S., McGaw, L.J., and Eloff, J.N. 2017. The antibacterial activity of extracts of nine plant species with good activity against *Escherichia coli* against five other bacteria and cytotoxicity of extracts. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 17(1): 133-139.

Furner, I.J., Huffman, G.A., Amasino, R.M., Garfinkel, D.J., Gordon, M.P., and Nester, E.W. 1986. An *Agrobacterium* transformation in the evolution of the genus *Nicotiana*. *Nature* 319: 422.

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.

Jorgensen, J.H., and Turnidge, J.D. 2015. Susceptibility test methods: dilution and disk diffusion methods. In Jorgensen, J., Pfaller, M., Carroll, K., Funke, G., Landry, M., Richter, S., Warnock, D. (eds.). *Manual of Clinical Microbiology*, Eleventh Edition. American Society of Microbiology. pp. 1253-1273.

Mor, A., Van Huong, N., Delfour, A., Migliore-Samour, D., and Nicolas, P. 1991. Isolation, amino acid sequence and synthesis of dermaseptin, a novel antimicrobial peptide of amphibian skin. *Biochemistry*, 30: 8824-8830.

Nicolas, P., and El Amri, C. 2009. The dermaseptin superfamily: a gene-based combinatorial library of antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1788: 1537-1550.

Osusky, M., Zhou, G., Osuska, L., Hancock, R.E., Kay, W.W., and Misra, S. 2000. Transgenic plants expressing cationic peptide chimeras exhibit broad-spectrum resistance to phytopathogens. *Nature Biotechnology*, 18: 1162-1166.

Pham, N.B., Schäfer, H., and Wink, M. 2012. Production and secretion of recombinant thaumatin in tobacco hairy root culture. *Biotechnology Journal*, 7: 537-545.

Ravichandra, N. 2013. *Fundamentals of plant pathology*. PHI Learning Pvt. Ltd.

Schellenberger, V., Wang, C.-w., Geething, N.C., Spink, B.J., Campbell, A., To, W., Scholle, M.D., Yin, Y., Yao, Y., and Bogin, O. 2009. A recombinant polypeptide extends the in vivo half-life of peptides and proteins in a tunable manner. *Nature Biotechnology*, 27: 1186-1192.

Schwessinger, B., Bart, R., Krasileva, K.V., and Coaker, G. 2015. Focus issue on plant immunity: from model systems to crop species. *Frontiers in Plant Science*, 6: 195-198.

Skarjinskaia, M., Ruby, K., Araujo, A., Taylor, K., Goplasamy-Raju, V., Musiyuchuk, K., Chichester, J.A., Palmer, G.A., de la Rosa, P., and Mett, V. 2013. Hairy roots as a vaccine production and delivery system. In Skarjinskaia, M., Ruby, K., Araujo, A., Taylor, K., Goplasamy-Raja, V., Muslychuk, K., Chichester, J. A., Palmer, G. A., de la Rosa, P.,

Mett, V., Ugulava, N., and Streatfield, S. J. (eds.). Biotechnology of hairy root systems. Springer. pp. 115-134.

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.

Yevtushenko, D.P., and Misra, S. 2007. Comparison of pathogen-induced expression and efficacy of two amphibian antimicrobial peptides, MsrA2 and temporin A, for engineering wide-spectrum disease resistance in tobacco. Plant Biotechnology Journal, 5: 720-734.

Van der Weerden, N.L., Bleackley, M.R., and Anderson, M.A. 2013. Properties and mechanisms of action of naturally occurring antifungal peptides. Cellular and Molecular Life Sciences, 70: 3545-570.

Expression and antimicrobial activity analysis of a Dermaseptin B1 antibacterial peptide in tobacco hairy roots

A. Alibakhshi¹, F. Nazarian-Firouzabadi^{2*} and A. Ismaili³

1. M.Sc. student in Plant Biotechnology, Agronomy and Plant Breeding Department, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran
2. ***Corresponding Author:** Professor in Plant Biotechnology, Agronomy and Plant Breeding Department, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran (Nazarian.f@lu.ac.ir)
3. Associate Professor in Plant Biotechnology, Agronomy and Plant Breeding Department, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran

Received: 17 February 2017

Accepted: 7 October 2018

Abstract

Background and Objectives

Plant pathogens, insects and weeds contribute to more than 30% of crop losses annually. Toxic chemical bactericides have been extensively used to control plant pathogenic bacteria. These chemicals pose a health threat to humans and the environment and eventually lead to resistance of pathogens. Hence, breeding cultivars resistance to bacterial pathogens is a valuable and sustainable solution. Antimicrobial peptides (AMP) are a part of the immune system of all living organisms, including plants, to combat pathogenic bacteria. Hairy roots (HRs) system is a valuable tool to produce and evaluate the activity of AMPs *in planta*. The aim of this study was to produce a Dermaseptin B1 (Drs-B1) recombinant AMP in transgenic tobacco HRs using *Agrobacterium rhizogenes* and test its antibacterial activities.

Material and Methods

The DNA encoding sequence of a Drs-B1 peptide of a frog was codon optimized based and synthesized in the pGSA1285 expression vector under the control of 35S CaMV promoter ($\times 3$). A gene cassette containing the Drs-B1 gene was introduced to tobacco roots by *Agrobacterium rhizogenesis* mediated transformation.

Results

The transgenic HRs were confirmed by molecular methods. Antimicrobial activity of the protein extracts from transgenic HRs showed that the recombinant protein was able to prevent *Pectobacterium carotovorum*, *Erwinia amylovora* and *Xanthomonas citri* plant pathogenic bacteria growth. The anti-bacterial effects of Drs-B1 peptide against plant pathogenic bacteria were in the order of *X. citri* > *E. amylovora* > *P. carotovorum*.

Discussion

The peptide present in transgenic DrsB1-expressing HRs clones inhibited devastating plant pathogenic bacteria growth, suggesting that DrsB1 retains its antibacterial activity in plant cells. The results of present study may open promising opportunities to produce transgenic plants expressing antimicrobial peptides resistance to plant pathogens.

Keywords: Bactericide, Genetic engineering, Plant Breeding, Protein, resistance