مجله ایمنی زیستی

دوره ۱۸، شماره ۱، بهار ۱۴۰۴

شاپای چاپی: ۰۶۳۲ – ۲۷۱۷، شاپای الکترونیکی: ۹۸۰۴ - ۲۷۱۶

طراحی، مهندسی و بیان ژن رمزگذار پپتید ضد قارچی FeAP در گیاه مدل توتون با هدف توسعه استراتژی نوین در کنترل قارچ *Ascochyta rabiei*

نوع مقاله: پژوهشی 20.1001.1.27170632.1404.18.1.1.6

صهبا طوسی[۱]، سعید ملک‌زاده شفارودی[۱*]، فرهاد شکوهی‌فر[۲]، مجتبی ممرآبادی[۲]، نسرین مشتاقی[۱]

۱. گروه بیوتکنولوژی و به نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

۲. گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

malekzadeh-s@um.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۹/۱۰، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۱۱/۲۸

صفحه ۱۴-۱

چکیده

امروزه پپتیدهای ضد قارچی یکی از استراتژی‌های موثر در مقابله با قارچ‌های بیماریزا مانند *Ascochyta rabiei* هستند. از این‌رو، این مطالعه با هدف بررسی ظرفیت پپتید ضد قارچی FeAP بر قارچ *A. rabiei* صورت پذیرفت. بدین منظور، پس از طراحی سازه بیانی و انجام آنالیزهای دینامیک مولکولی به منظور بررسی پایداری پپتید ضد قارچی، ژن هدف سنتز و به ناقل بیانی pCAMBIA3301 وارد گردید. سازه به اگروباکتریوم انتقال یافت و سپس گیاه توتون با این باکتری آلوده شد. تایید انتقال ژن به توتون با استفاده از ژن گزارشگر GUS و روش RT-PCR انجام شد. پس از استخراج و خالص سازی پپتید FeAP با ستون نیکل از گیاه تراریخته، عملکرد آن با استفاده از روش انتشار چاهک بر روی قارچ *A. rabiei* مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که سازه طراحی شده برای تولید پپتید ضد قارچی امکان تولید پپتید پایدار را فراهم ساخته است. تایید تولید پپتید ضد قارچی با وزن مولکولی حدودی ۱۱ کیلودالتون روی ژل SDS-PAGE صورت گرفت. ایجاد هاله ۱۴ میلی‌متری در ممانعت رشد از قارچ در غلظت ۳۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نشان از ظرفیت بالای پپتید ضد میکروبی تولید شده برای انتقال به گیاه نخود و ایجاد گیاهی مقاوم نسبت به این قارچ است.

واژه‌های کلیدی: آگروباکتریوم، انتقال ژن، پپتید ضد قارچی، دینامیک مولکولی

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1404.18.1.1.6]

مقدمه

نخود از حبوبات با اهمیت اقتصادی و کشاورزی بسیار بالا در سراسر جهان است که بعد از لوبیا معمولی (*Phaseolus vulgaris*) به عنوان دومین محصول حبوبات کشت شده در جهان شناخته می‌شود (Singh *et al*., 2021). مطالعات نشان می‌دهد که در سال ۲۰۲۲، کل سطح کشت جهانی نخود ۸/۱۴ میلیون هکتار بود که منجر به به برداشت ۱/۱۸ میلیون تن نخود گردید. مطابق مستندات فائو، مولدترین کشورها در این خصوص کشور هند و استرالیا هستند که به ترتیب ۵/۱۳ و ۱/۱ میلیون تن نخود تولید کرده‌اند (FAOSTAT, 2024). با توجه به اهمیت ارزش تغذیه‌ای نخود، این محصول یک غذای باکیفیت از پروتئین، ویتامین‌ها، فیبر و مواد معدنی بالا است که فواید مهمی برای سلامت انسان و دام دارد (Wang *et al*., 2021). علاوه بر فواید مستقیم اقتصادی و غذایی نخود، کشت آن سیستم‌های کشاورزی را از طریق تثبیت زیستی نیتروژن بهبود می‌بخشد (Singh *et al*., 2021). در ایران، این محصول به خصوص در نیمه غربی به دلیل قرار گرفتن در تناوب با گندم و جو، نقش بسیار مهمی در حفظ و بقای کشاورزی منطقه ایفا می‌کند.

یکی از شایع‌ترین بیماری‌ها در سطح جهان در محصول نخود، برق زدگی نخود یا بلایت آسکوکیتایی (Ascochyta blight) نام دارد که توسط قارچ *Ascochyta rabiei* ایجاد می شود. این بیمارگر به قسمت هوایی نخود (برگ، دمبرگ، ساقه، غلاف و دانه) حمله می کند (Singh *et al*., 2022). علائم با ظهور لکه‌های نکروز با دایره‌های متحدالمرکز سیاه روی برگ‌ها و غلاف‌ها، با ضایعات مستطیل بیشتر روی ساقه‌ها مشخص می‌شود (Foresto *et al*., 2023). ظهور بیمارگر در غلاف منجر به عفونت بذر و پراکندگی آن به نسل بعدی نیز می‌شود. با این حال، آسیب‌زاترین ضایعه قارچ روی ساقه‌ها اتفاق می‌افتد، زیرا می‌تواند گیاهان را سوخته و از بین ببرد (Singh *et al*., 2022; Foresto *et al*., 2023). در حال حاضر، به دلیل نبود واریته‌های مقاوم به این قارچ و عدم توانایی مناسب مواد شیمیایی در حذف قارچ *A. rabiei*، مقابله با این بیماری بسیار سخت شده است (Morcuende *et al*., 2024). با اینحال راهکارهای مختلفی از قبیل استفاده از بذر تایید شده عاری از بیماری‌زا، تناوب با محصولات غیرمیزبان (مانند غلات)، سوزاندن کلش نخود، استفاده از ارقام نسبتاً مقاوم، استفاده از قارچ‌کش‌های سیستمیک (مهارکننده‌های دمتیلاسیون، مهارکننده‌های سوکسینات دهیدروژناز و مهارکننده‌های خارجی کوئینون) و استفاده از استراتژی‌های زیستی پیشنهاد شده است (Manjunatha *et al*., 2018; Foresto *et al*., 2023).

در استراتژی‌های مبارزه بیولوژیک، پروتئین‌ها و پپتیدهای ضد میکروبی، اولین خط دفاعی در مقابله با حفاظت گیاه از میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا است. این نوع پروتئین‌ها به دلیل فعالیت ضدقارچی گسترده، ایمنی و عدم پایداری مقاومتی در برابر آنها پتانسیل بالایی برای استفاده در کشاورزی دارند. در حال حاضر، پروتئین‌ها و پپتیدهای ضد قارچ در کنترل بیماری، حفظ دانه و بهبود واریته گیاهی به موفقیت‌هایی دست یافته‌اند (Gupta *et al*., 2014; Puig *et al*., 2015; Lee *et al*., 2017; Moosa *et al*., 2018). وانگ و همکاران (۲۰۱۸) موفق به خالص‌سازی پپتید ضد قارچی موثر از گیاه گندم سیاه (*Fagopyrum esculentum*) شدند که دارای تشابه بالا با پپتید Fα-AMP1 گندم سیاه است. آنها گزارش کردند که این پپتید نقش بسزایی در جلوگیری از جوانه زنی اسپورها و رشد میسلیوم‌های *Botrytis cinerea* در گیاه گوجه فرنگی دارد (Wang *et al*.,

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1404.18.1.1.6]

2018). وجود ویژگی‌های منحصر به فرد این پپتید از قبیل پایداری حرارتی، پایداری در شرایط اسیدی، قدرت بسیار بالای اثر ضد قارچی و داشتن عملکرد در حضور مواد معدنی مختلف این پپتید را تبدیل به یکی از بهترین کاندیداها جهت تولید واریته‌های مقاوم به قارچ‌ها می‌کند.

از این‌رو، این مطالعه، برای اولین‌بار در دنیا، به منظور بررسی ساختار پروتئینی نوترکیب پپتید FeAP به شکل دینامیکی و آزمایشگاهی جهت تولید نوترکیب در گیاه توتون صورت پذیرفت. سپس از نتایج آمده جهت تولید واریته‌های مقاوم نخود به قارچ‌های بیماری‌زا استفاده خواهد شد.

مواد و روش ها

مطالعات دینامیک مولکولی

آماده سازی ساختاری پروتئین

توالی ژنی مربوط به پپتید ضد میکروبی FeAP از داده‌های ژنومی گیاه گندم سیاه (*Fagopyrum esculentum*) در محدوده ۳۴۵۹۴-۳۶۳۵۵ نوکلئوتیدی از پایگاه ژنی NCBI استخراج گردید. با توجه به عدم دسترسی به ساختار پروتئینی FeAP در پایگاه PDB (www.rcsb.org)، ساختار پروتئینی با استفاده از نرم افزار Swaiss-Model برآورد گردید (Waterhouse *et al*., 2018). همچنین کیفیت مدل تولید شده با استفاده از سرور PROCHECK (http://servicesn.mbi.ucla.edu/PROCHECK) مورد بررسی قرار گرفت (Laskowski *et al*., 2001).

محاسبه دینامیک مولکولی

به منظور بررسی دینامیک مولکولی ساختار پپتید ضد میکروبی FeAP، از نرم افزار دینامیک مولکولی GROMAC2018 استفاده شد (Abraham *et al*., 2015). همچنین از میدان نیروی CHARMM27 به منظور بررسی پایداری پروتینی FeAP استفاده شد. به منظور رهاسازی پپتید، یک فضای مکعب مربع (1×1×1 mm) طراحی و از مدل آبی SPC به عنوان محلول استفاده گردید. به منظور خنثی سازی بار محیط از یون های سدیم و کلر با جایگزینی یون‌های محلول استفاده شد. به حداقل رساندن انرژی سیستم (Energy minimization) با استفاده از الگوریتم steepest descent انجام گردید. به منظور ایجاد تعادل دمایی (NVT) و فشار (NPT)، به ترتیب الگوریتم های Nosé-Hoover با پایداری زمانی ۰/۱ پیکوثانیه و Parrinello-Rahman با پایداری زمانی ۰/۵ پیکوثانیه بکارگیری شد (Nosé *et al*., 1983). سیستم ابتدا برای تعادل دمای تحت ۳۱۰ درجه کلوین به مدت ۴۰۰ پیکوثانیه متعادل و سپس تحت فشار ۱ بار به مدت ۱۰۰۰ پیکوثانیه متعادل گردید. به منظور بررسی وضعیت الکترواستاتیک پروتئین نهایی از الگوریتم Particle Mesh Ewald (PME) استفاده شد. دینامیک مولکلولی پپتید ضدمیکروبی FeAP به مدت ۵۰ نانوثانیه تحت فشار ۱ بار و دمای ۳۱۰ درجه کلوین صورت پذیرفت. دینامیک و پایدرای پپتید FeAP با استفاده از پارامترهایRMSD (root mean square deviation)، RMSF (root-mean-square-fluctuations) و شعاع ژیراسیون (Gration) مورد ارزیابی قرار گرفت (Kollman *et al*., 2003).

تولید نوترکیب پپتید FeAP

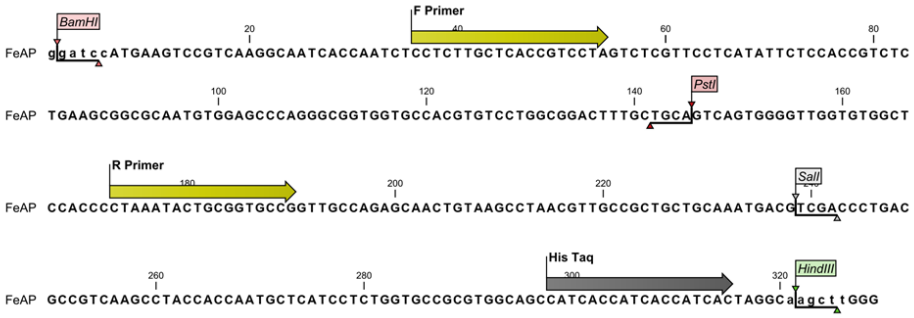
طراحی سازه‌های بیانی

به منظور طراحی سازه‌های بیانی پپتید FeAP، از نرم افزار CLC Main Workbench استفاده شد (QIAGEN, Aarhus, Denmark). از آنزیم‌های محدودکننده BamHI و HindIII جهت زیرهمسانه ژن هدف به حامل بیانی pCAMBIA3301 در طراحی استفاده شد. حامل بیانی pCAMBIA3301 حاوی ژن *GUS Gene reporter*

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1404.18.1.1.6]

اینترون‌دار تحت کنترل پیشبر کامل CaMV35S است که در صورت انتقال صحیح به گیاه هدف و بیان پروتئین، تولید رنگ آبی می‌کند (Shokouhifar *et al.*, 2018). همچنین در انتهایی ژن هدف، شش اسید آمینه هیستدین به منظور خالص‌سازی آسان به با استفاده ستون Ni-NTA در نظر گرفته شد. توالی نهایی جهت بیان پروتئین در میزبان گیاه توتون و نخود، بهینه یابی کدون و سپس توسط شرکت GENSCRIPT ساخته شد.



شکل ۱. شماتیکی از مهندسی توالی ژنی *FeAP* پپتید ضد قارچی

کلونینگ ژن *FeAP* در ناقل بیانی و انتقال آن به باکتری آگروباکتریوم

به منظور انتقال ژن *FeAP* ساخته شده در ناقل pUC57 به ناقل بیانی pCAMBIA3301، هر دو ناقل با غلظت یکسان از آنزیم‌های محدود کننده BamHI و HindIII هضم و سپس واکنش اتصال ژن *FeAP* با ناقل بیانی با استفاده از کیت T4 DNA Ligation شرکت Roche صورت پذیرفت. محصول به باکتری *Escheruchia coli* سویه DH5α منتقل و سپس تکثیر گردید. به منظور تایید واکنش همسانه‌سازی و تعیین صحت چهارچوب خوانش باز از روش‌های کلونی PCR و توالی‌یابی استفاده گردید. پس از تایید فرآیند همسانه‌سازی، ناقل بیانی استخراج و به سلول‌های اگروباکتریوم سویه LBA4404 انتقال یافت. به منظور تایید انتقال صحیح ناقل بیانی به سلول‌های آگروباکتریوم از روش کلونی PCR استفاده شد (Shokouhifar *et al.*, 2018).

آماده سازی گیاه توتون جهت انتقال ژن *FeAP*

به منظور انتقال ژن *FeAP* به توتون از بذور گیاه توتون *Nicotiana tabacum var. xanthi* استفاده شد. بذور توتون در گلدان حاوی مخلوط ورمی کولیت، پیت ماس و کوکوپیت کشت شد. گلدان‌ها تا زمان جوانه‌زنی با پوشش پلاستیکی پوشانیده و در نور مصنوعی با شرایط دمایی ۲۲ درجه و فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و رطوبت مناسب نگهداری شدند. پس از جوانه زنی پوشش گلدان‌ها حذف شد.

آماده سازی سوسپانسیون آگروباکتریوم و تزریق به برگ گیاه توتون برای بررسی بیان ژن *FeAP*

به منظور آماده‌سازی سلول‌های باکتری جهت تزریق، کلنی مورد تایید در ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت LB حاوی آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین و ریفامپسین کشت و به مدت ۳ روز در دمای ۲۸ درجه سلسیوس و دور ۱۵۰ rpm در انکوباتور قرار

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1404.18.1.1.6]

گرفتند. سلول‌ها رسوب داده شده و در بافر القاء (NH_4Cl ۱ گرم بر لیتر، $MgSO_4$-$7H_2O$ ۰/۳ گرم بر لیتر، KCl ۰/۰۱۵ گرم بر لیتر، $CaCl_2$ ۰/۰۱ گرم بر لیتر، $FeSO_4$-$7H_2O$ ۲/۵ میلی‌گرم بر لیتر، MES ۲۰ میلی‌مولار، بافر فسفات ۲ میلی‌مولار و گلوکز ۰/۰۱ میلی‌مولار) کاملا حل و به مدت یک شب در تاریکی نگهداری شدند. سپس سلول‌ها پس از سانتریوفوژ مجدد در بافر تزریق ($MgSO_4$-$7H_2O$ ۱۰ میلی‌مولار و MES ۱۰ میلی‌مولار) حل شد و عمل تزریق به روش تزریق آگروباکتریوم (Agroinjection) با سرنگ بدون سوزن در پشت برگهای گیاه توتون در بین رگبرگ انجام شد. گیاهان پس از تزریق با پوشش پلاستیکی پوشانده شدند و در شرایط تاریکی و دمای محیط به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند (Yang *et al*., 2000).

سنجش هیستوشیمیایی عملکرد ژن *GUS*

به منظور سنجش هیستوشیمیایی فعالیت ژن *GUS*، ۴۸ ساعت پس از تزریق دیسک‌های برگی از موضع تزریق تهیه و به مدت ۲۴ ساعت در محلول سنجش فعالیت آنزیم بتاگلوکورونیداز قرار داده شد. دیسک‌های برگی با استفاده از الکل ۷۰ درصد کلرفیل زدایی شدند (Cervera, 2005). دیسک‌های برگی فاقد کلروفیل با میکروسکوپ مدل Nikon Eclipse Ni-U و دوربین Nikon Ds-Fi3 گروه بیوتکنولوژی دانشگاه فردوسی مشهد بررسی شدند و فعالیت آنزیم بتاگلوکرونیداز در آنها تصویر برداری شد.

بررسی بیان ژن *FeAP* با استفاده از روش RT-PCR

بدین منظور، از برگ‌های تایید شده در مرحله قبل با استفاده از کیت فنل کلروفورم شرکت دنا زیست استخراج آران‌ا صورت پذیرفت. سپس با استفاده از کیت سنتز cDNA شرکت ترموساینتفیک، cDNA سنتز و سپس با استفاده از آغازگرهای رفت CCTCTTGCTCACCGTCCTA و برگشت CGGCACCGCAGTATTTAG در این مطالعه واکنش RT PCR انجام شد. محصول واکنش PCR روی ژل آگارز مورد بررسی قرار گرفت (Morcuende *et al*., 2024).

استخراج پپتید ضد میکروبی نوترکیب با استفاده از ستون Ni-NTA

بدین منظور، ۱ گرم از برگ‌های تایید شده در مراحل قبلی جمع‌آوری و در ازت مایع پودر شدند. سپس به ازای هر میلی‌گرم از پودر گیاهی، ۳ میلی‌لیتر بافر استخراج (۱۰۰ میلی‌مولار Tris Hcl، ۱۰ میلی‌مولار EDTA، ۰/۵ درصد بتا مرکاپتواتانول و ۵۰ میلی مولار PMSF) به آن اضافه شد. محلول به مدت ۱۰ دقیقه روی یخ قرار داده شد و سپس در rpm ۱۲۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفوژ گردید. پس از تایید تولید پپتید ضد میکروبی، از کیت Ni-NTA شرکت کیاژن به منظور خالص‌سازی پروتئین نوترکیب دارای ۶ اسید آمینه هیستدین استفاده گردید. به منظور تایید تولید پپتید ضدمیکروبی نوترکیب و محصول خالص‌سازی شده آن، ۵۰ میکرولیتر از هر محلول روی ژل SDS-PAGE برده شد. از روش برادفورد به منظور تعیین غلظت پروتئین استخراجی استفاده شد (Hanittinan *et al*., 2020).

بررسی اثر پپتید ضد قارچی بر قارچ *A. rabiei*

به منظور بررسی اثر پپتید نوترکیب ضد قارچی تولید شده در این مطالعه، قارچ آسکوکیتا ربیعی از بانک میکروارگانیسم پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد تهیه شد. قارچ روی محیط کشت حاوی پودر نخود (۲۰۰ گرم بر لیتر)، دکستروز (۲۰ گرم بر لیتر) و اگار (۲۰ گرم بر

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1404.18.1.1.6]

لیتر) کشت داده شد. با استفاده از روش ول دیفیوژن غلظت های مشخص (۱۶۰ و ۳۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) از پپتید ضد میکروبی در داخل منافذ ایجاد شده روی محیط کشت، قرار داده شد. همچنین از قارچ‌کش منکوزب با غلظت ۲ در هزار به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید. (Wen *et al*., 2022).

آنالیز آماری

تجزیه و تحلیل نتایج بدست آمده در این مطالعه با استفاده از نرم افزار SAS ver 9.1 صورت پذیرفت. همچنین مقایسه میانگین آماری از طریق ازمون t-test صورت پذیرفت.

نتایج و بحث

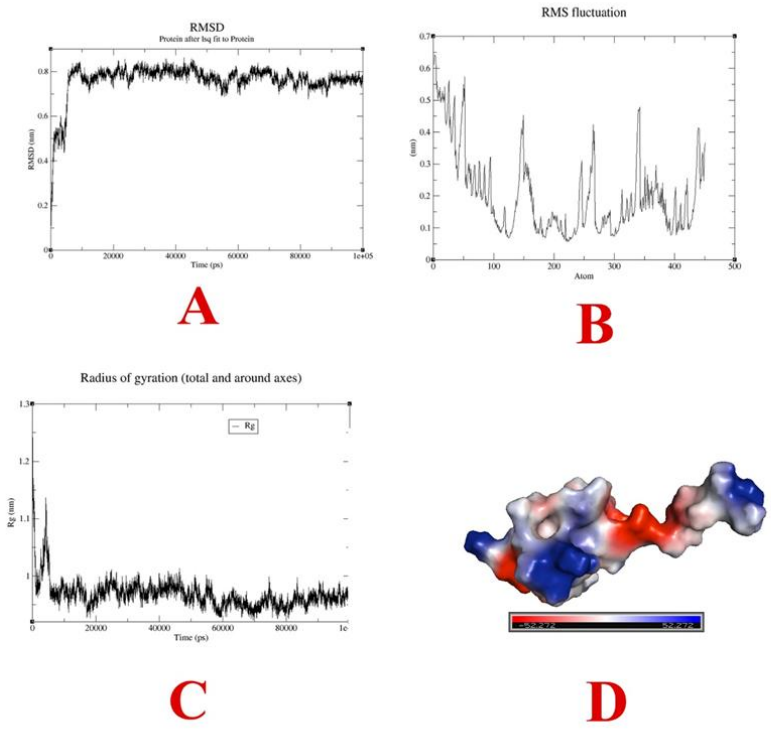
بررسی پایداری پپتید ضد قارچی FeAP

به منظور تولید نوترکیب این پپتید نیازبود تا سازه طراحی شده برای تولید نوترکیب این پروتئین در مطالعات بیوانفورماتیک مورد بررسی قرار گیرد تا پروتئین تولید شده دارای عملکرد و پایداری مناسبی باشد. از اینرو، ساختار پپتید ضد قارچی FeAP به نرم افزار گرومکس معرفی و پایداری پروتئین تولید شده توسط سازه طراحی شده در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفت. در این خصوص آنالیز ساختاری با استفاده جذر متوسط مجذور انحرافات (RMSD) که دقیقترین روش در برآورد پایداری پروتئین در شرایط دینامیک مولکولی است، صورت پذیرفت (شکل ۲A) نتایج بدست آمده نشان می دهد که پپتید ضدقارچی در ۱۰ نانوثانیه اول دارای ناپایداری بوده و بعد از آن به پایداری می رسد. نوسان مقدار RMSD از A ۴/۰ تا A ۸/۰ نشان از پایداری کامل پپتید ضد قارچی دارد. پارامتر RMSD میزان فاصله متوسط بین اتم‌ها برای بررسی تعادل و پایداری ساختاری پپتید ضد قارچی مورد نیاز است. بطورکلی RMSD مختصات اتمی بین موقعیت اولیه در (t = 0) و مکان‌های اتمی جدید در زمان مشخص t را براساس تجزیه و تحلیل شرایط سیستم از طریق تعیین شباهت در ساختار سه‌بعدی تعیین می‌نماید (Cardoso *et al*., 2022). لازم به ذکر است که تغییرات در ساختار RMSD نشان دهنده انحراف ساختاری احتمالی در نتیجه اضافه شدن آمینواسیدهای سازه مانند ۴ امینواسید آنزیم‌های برشی و ۶ آمینو اسید هیستدین مربوط خالص سازی پروتئین است (Cardoso *et al*., 2022). انعطاف پذیری آمینواسیدها با استفاده از آنالیز جذر میانگین مجذور نوسانات (RMSF) صورت پذیرفت و نتایج آن نشان داد که اتم‌ها دارای انعطاف‌پذیری مناسب در فاصله ۱/۰ تا ۴/۰ نانومتر هستند (شکل ۲B) از آنالیز شعاع ژیراسیون (Rg) به منظور بررسی میزان فشردگی پپتید ضد قارچی استفاده گردید (شکل ۲C) نتایج نشان داد پایداری مناسبی از میزان فشردگی پپتید ضدقارچی در طول فرآیند دینامیک مولکولی وجود داشته است. از اینرو، با بررسی جامع آنالیزهای RMSD، RMSF و Rg مشخص گردید که پایداری پپتید ضد قارچی FeAP با استفاده از طراحی صورت گرفته در این مطالعه (اضافه شدن امینواسیدهای هیستدین و مابقی آمینواسیدهای اضافی که از ناقل به پپتید اصلی متصل شده است) قابل تایید است. از آنجا که یکی از مهمترین خصوصیات پپتیدهای ضدمیکروبی شارژ سطحی مربوط به آن می باشد (Islam *et al*., 2023)، شارژ سطحی پپتید ضد قارچی FeAP مورد آنالیز قرار گرفت (شکل ۲D). نتایج بدست آمده نشان داد که اضافه شدن ۶ آمینواسید هیستدین سبب افزایش شارژ سطحی پپتید شد. این افزایش شارژ سطح پروتئین می‌تواند نقش موثری در اتصال پپتید ضدقارچی به دیواره سلولی داشته باشد (Huang and Peng, 2014). پژوهشگران گزارش کردند که یادگیری عمیق (deep learning) یکی از قویترین ابزارهای

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1404.18.1.1.6]

روز دنیا در تسریع کشف پپتیدهای ضد میکروبی است که به همراه محاسبات دینامیک مولکولی امکان تولید محصولی کارآمد را فراهم ساخته است (Cao *et al.*, 2023). از اینرو در این مطالعه، با هدف بررسی کارآمدی سازه طراحی شده، ساختار نهایی پروتئین نوترکیب طراحی شده، مورد ارزیابی قرار گرفت و پایداری پروتئین نوترکیب قابل تولید از سازه طراحی شده تایید گردید. محققان با بکارگیری آنالیز دینامیک مولکولی روی پپتید ضد میکروبی باتاسین، سعی در طراحی داروی کارآمد در مقابله با باکتری‌های گرم منفی و مثبت مقاوم در برابر آنتی بیوتیک‌ها کرده‌اند (Chakraborty *et al.*, 2020).



شکل ۲. آنالیز بررسی پایداری پپتید ضد قارچی FeAP در طول ۵۰ نانوثانیه شبیه سازی. (A): تغییرات RMSD، (B): تغییرات RMSF، (C): تغییرات Rg و (D): وضعیت الکتوراستاتیک پپتید ضد قارچی

تولید نوترکیب پپتید ضد قارچی FeAP

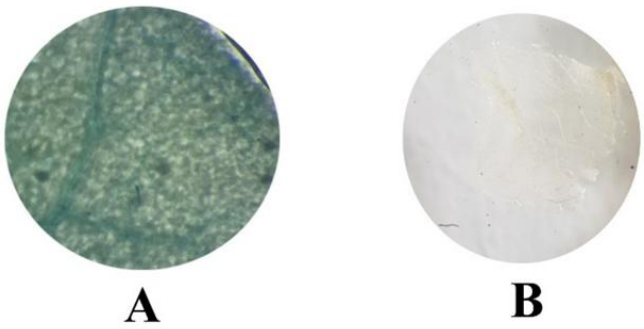
تایید انتقال سازه به گیاه توتون

به منظور تولید نوترکیب پپتید ضدقارچی FeAP، سازه طراحی شده در ناقل pCAMBIA3301 به باکتری اگروباکتریوم منتقل و سپس گیاه توتون با این باکتری آلوده گردید. طراحی سازه در این مطالعه به گونه‌ای بود که در صورت صحت انجام این فرآیندها، ژن *gus* در گیاه توتون فعال شده و رنگ آبی روی دیسک‌های گیاه در زیر میکروسکوپ مشاهده شود (شکل ۳). مطمئنا اولین انتخاب پژوهشگران گیاهی برای گزارشگر بیان ژن، ژن *GUS* است (Basu *et al.*, 2004). روش مورد استفاده در انتقال ژن هدف به گیاه از طریق اگروباکتریوم است که منجر به تعداد متفاوتی از نسخه‌های یکپارچه دی‌ان‌ای خارجی در

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1404.18.1.1.6]

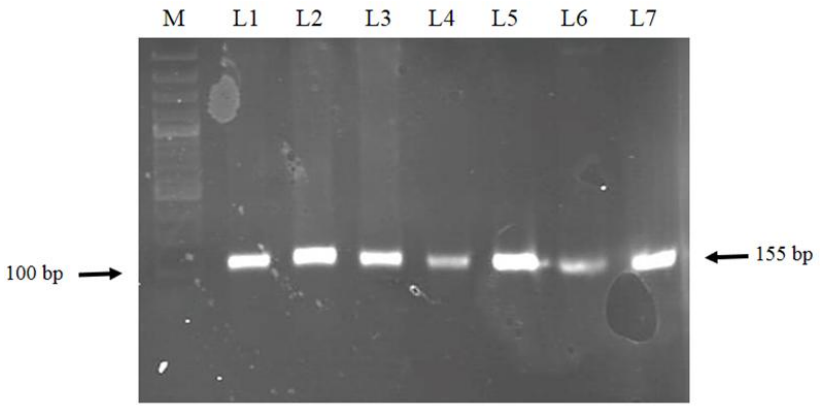
گیاه می‌شود و این به نوبه خود سبب تولید مقادیر متفاوتی از بیان ژن می‌شود (Podia *et al*., 2023).



شکل ۳. بررسی صحت طراحی سازه و انتقال آن به گیاه توتون با استفاده از ژن گزارش دهنده *GUS*. A: گیاه توتون آلوده شده با آگروباکتریوم و بیان ژن *GUS*، B: گیاه توتون آلوده شده با آگروباکتریوم بدون سازه بیانی

تایید بیان ژن پپتید ضدمیکروبی FeAP

به منظور بررسی امکان تولید پپتید ضد قارچی نوترکیب در سطح مولکولی از پرایمرهای اختصاصی جهت تکثیر ژن در سطح آرانا استفاده شد. تکثیر قطعه ۱۵۵ جفت بازی در واکنش RT-PCR نشان از بیان موفق ژن هدف در گیاه توتون دارد (شکل ۴).



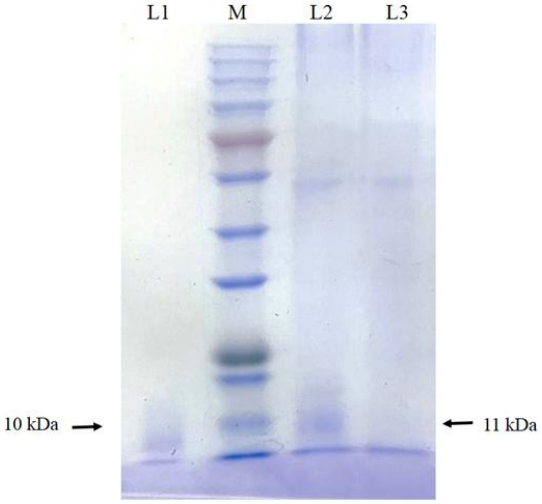
شکل ۴. بررسی تکثیر ژن پپتید ضد میکروبی در واکنش RT-PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی. M: نشانگر دی‌ان‌ای ۱۰۰ جفت بازی، L1-L7: محصول PCR برای نمونه های مختلف برگ گیاه توتون با آغازگرهای اختصاصی

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1404.18.1.1.6]

تایید بیان پپتید ضدمیکروبی FeAP

به منظور تایید تولید پپتید ضد میکروبی در گیاه توتون، محصول استخراج شده روی ژل SDS-PAGE برده شد. نتایج بدست آمده در این مرحله نشان می‌دهد که گیاه توتون توانسته با غلظت مناسبی پروتئین هدف را با وزن ملکولی حدودی ۱۱ کیلودالتون تولید نماید (شکل ۴). وجود شش اسید امینه هیستدین در انتهای توالی پپتیدی امکان خالص‌سازی پروتئین با استفاده از ستون نیکل فراهم کرد (شکل ۵). غلظت پروتئین خالص‌سازی شده با استفاده از روش برادفورد، ۲۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر محاسبه شد. پروتئین FeAP خالص‌سازی شده به شکل طبیعی مطابق گزارش وانگ و همکاران (۲۰۱۹) نیز دارای وزن مولکولی حدودی ۱۱ کیلودالتون گزارش شده است. از این‌رو، علی‌رغم تولید نوترکیب این پروتئین، وزن مولکولی پروتئین FeAP تغییر انچنانی نداشته است. همچنین غلظت پروتئین استخراجی به شکل طبیعی ۳۰/۲ تا ۵۹/۴ میلی گرم بر میلی لیتر گزارش شده است (Wang *et al.*, 2019). یکی از مهمترین مزیت‌های تولید پروتئین نوترکیب، دستیابی به غلظت بالای از محصول نهایی است (Szeto *et al.*, 2022). از این‌رو، نتایج بدست آمده در این بخش نشان می‌دهد که سازه مهندسی شده در این مطالعه، قابلیت تولید پپتیدی با عملکرد و ساختار مشابه طبیعی را دارد. همچنین تولید نوترکیب این محصول با استفاده از این سازه سبب افزایش ۴ برابری غلظت محصول نهایی استخراج شده می‌گردد.



شکل ۵. بررسی پروتئین نوترکیب FeAP استخراج و خالص‌سازی شده از گیاه توتون روی ژل SDS-PAGE. L1: نمونه خالص‌سازی شده از برگ آلوده با ستون Ni، M: نشانگر پروتئینی رنگی، L2: کل پروتئین جدا شده از برگ توتون آلوده، L3: پروتئین برگ توتون بدون آلودگی با اگروباکتریوم

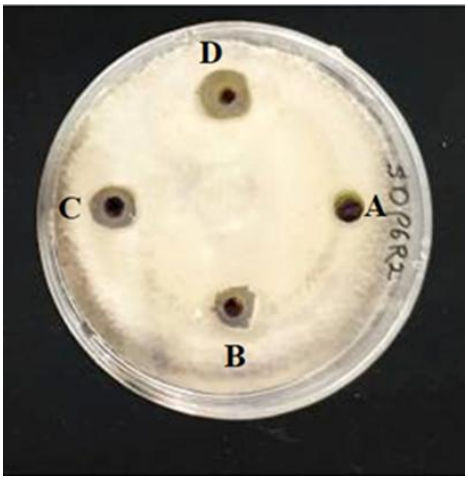
بررسی اثر پپتید ضدقارچی FeAP بر قارچ *A. rabiei*

به منظور بررسی اثر پپتید ضد قارچی **FeAP**، از روش انتشار چاهک استفاده شد. بدین منظور، غلظت‌های مشخص (۱۶۰ و ۳۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) از پپتید ضد میکروبی در داخل منافد ایجاد شده روی محیط کشت، قرار داده شد. همچنین از قارچ‌کش منکوزب با غلظت ۲ در هزار به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید. نتایج نشان داد که پپتید ضد قارچی با غلظت ۱۶۰ میلی‌گرم

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1404.18.1.1.6]

بر میلی لیتر دارای قدرتی مشابه با قارچ‌کش منکوزب بوده و استفاده از پپتید در غلظت ۳۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر قادر به ایجاد هاله‌هایی به قطر ۱۴ میلیمتر گردیده است (شکل ۶). در تنها مطالعه انجام شده روی پپتید ضد قارچی FeAP، وانگ و همکاران (۲۰۱۹) گزارش کردند که غلظت بازدارنده این پپتید ضد میکروبی بر قارچ *Botrytis cinerea*، ۱/۲۴۸ میلی‌گرم می‌باشد. مطالعات نشان داده که پپتیدهای ضد قارچی، تاثیرات متفاوتی بر قارچ‌های مختلف دارند (Alyousef, 2021). در مطالعه پپتیدهای ضد میکروبی جدا شده از گیاه *Myrtus communis* به همراه متانولیک بر روی گونه‌های مختلف قارچ کاندیدیا با استفاده از روش انتشار چاهک صورت پذیرفت. آنها توانستند بازدارندگی رشد ۵/۲۳ و ۷/۲۰ میلیمتری روی محیط کشت را مشاهده نمایند (Alyousef, 2021). از این‌رو، با توجه به نتایج بدست آمده در این مطالعه و عملکرد مناسب FeAP بر روی قارچ *A. rabiei*، امکان بکارگیری سازه طراحی شده در این مطالعه به منظور انتقال به گیاه نخود و بیان پایدار پپتید ضد قارچی مذکور به منظور تولید گیاهی مقاوم به قارچ *A. rabiei* وجود دارد.



شک۶. نتیجه آزمایش اول دیفیوژن پپتید ضد قارچی FeAP بر روی پاتوتیپ ۶ قارچ *A. rabiei* A: کنترل منفی (آب استریل)، B: غلظت دو در هزار سم منکوزب، C و D به ترتیب غلظت های ۱۶۰ و ۳۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر پپتید

نتیجه گیری

قارچ‌کش‌های زیستی تنها راه ایمن در کنترل قارچ‌ها و جلوگیری از خسارات سنگین کشاورزی است. نتایج بدست آمده از این مطالعه نشان می‌دهد که پپتید ضد قارچی FeAP عملکرد بسیار مناسب در کنترل تکثیر قارچ *A. rabiei* داشته که این به نوبه خود تاییدی کامل بر روند اجرای این پژوهش می‌باشد. از این‌رو، انتقال ژن پپتید ضد قارچی FeAP به گیاه نخود و سپس پایدارسازی بیان ژن، می‌تواند منجر به تولید رقم مقاوم نخود به قارچ *A. rabiei* شود.

سپاسگزاری

این پژوهش حاصل از طرح پژوهش دانشجوی دکتری دانشگاه فردوسی مشهد به شماره ۴۷۹۳۸

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1404.18.1.1.6]

است که بدین ترتیب از آن دانشگاه محترم سپاسگزاری می‌گردد.

منابع

Alyousef AA. (2021) Antifungal activity and mechanism of action of different parts of *Myrtus communis* growing in Saudi Arabia against *Candida* Spp. ***Journal of Nanaomaterials***. *8*: 124-132. .https://doi.org/10.1155/2021/3484125.

Abraham MJ, Murtola T, Schulz R, Páll S, Smith JC, Hess B, Lindahl E. (2015) GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. ***SoftwareX***. *1-2*: 19–25. https://doi.org/10.1016/j.softx.2015.06.001.

Basu C, Kausch AP, Chandlee JM. (2004) Use Of β-glucuronidase reporter gene for gene expression analysis in turfgrasses. ***Biochemical and Biophysical Research Communications***. *320*(1): 7-10. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.05.128.

Cao Q, Ge C, Wang X, Harvey PJ, Zhang Z, Ma Y, Wang X, Jia X, Mobli M, Craik DJ, Jiang T, Yang J, Wei Z, Wang Y, Chang S, Yu R. (2023) Designing antimicrobial peptides using deep learning and molecular dynamic simulations. ***Briefings in Bioinformatics***. *24*(2): bbad058. https://doi.org/10.1093/bib/bbad058.

Cardoso FJB, Xavier LP, Santos AV, Pereira HDM, Santos LDS, Molfetta FAD. (2022) Identification of potential inhibitors of *Schistosoma mansoni* purine nucleoside phosphorylase from neolignan compounds using molecular modelling approaches. ***Journal of Biomolecular Structure and Dynamics***. *40*(18): 8248-8260. https://doi.org/10.1080/07391102.2021.1910073.

Cervera M. (2005) Histochemical and fluorometric assays for uidA (GUS) gene detection. *In*: Peña L. (eds.) Transgenic plants: Methods and protocols. Methods in molecular biology. Humana Press, USA. https://doi.org/10.1385/1-59259-827-7:203.

Chakraborty K, Kizhakkekalam VK, Joy M, Chakraborty RD. (2020) Moving away from traditional antibiotic treatment: can macrocyclic lactones from marine macroalga-associated heterotroph be the alternatives? ***Applied Microbiology and Biotechnology***. *104*: 7117–7130. https://doi.org/10.1007/s00253-020-10658-0.

FAOSTAT Database. (2024) http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC. [Accessed 10 February 2024).

Foresto E, Carezzano ME, Giordano W, Bogino P. (2023) Ascochyta blight in chickpea: An update. ***Journal of Fungi***. *9*: 203. https://doi.org/10.3390/jof9020203.

Gupta R, Srivastava S. (2014) Antifungal effect of antimicrobial peptides (AMPs LR14) derived from *Lactobacillus plantarum* strain LR/14 and their applications in prevention of grain spoilage. ***Food Microbiol***. *42*: 1-7. https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.02.005.

Hanittinan O, Oo Y, Chaotham C, Rattanapisit K, Shanmugaraj B, Phoolcharoen W. (2020) Expression optimization, purification and in vitro characterization of human epidermal growth factor produced in *Nicotiana benthamiana*. ***Biotechnology Reports***. *5*(28): e00524. https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00524.

Huang HF, Peng CF. (2014) Antibacterial and antifungal activity of alkylsulfonated chitosan. ***Biomarkers and Genomics Medicine***. *7*(2): 83-86. https://doi.org/10.1016/j.bgm.2014.09.001.

Islam MM, Asif F, Zaman SU, Arnab MKH, Rahman MM, Hasan M. (2023) Effect of charge on the antimicrobial activity of alpha-helical amphibian antimicrobial peptide. ***Current Research in Microbial Sciences***. *4*: 100182. https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2023.100182.

Kollman PA, Massova I, Reyes C, Kuhn B, Huo S, Chong L, Lee M, Lee T, Duan Y, Wang W, Donini O, Cieplak P, Srinivasan J, Case DA, Cheatham TE. (2000) Calculating structures and free energies of complex molecules: Combining molecular mechanics and continuum models. ***Accounts Chemical Research***. *33*(12): 889-897. https://doi.org/10.1021/ar000033j.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1404.18.1.1.6]

Laskowski RA, MacArthur MW, Thornton JM. (2001) PROCHECK: Validation of protein structure coordinates. *In*: Rossmann MG, Arnold E. (eds.) International tables of crystallography, Volume F. Crystallography of biological macromolecules. Kluwer Academic Publishers, Netherlands. https://doi.org/10.1107/97809553602060000882.

Lee IH, Jung YJ, Cho YG, Nou IS, Huq MA, Nogoy FM, Kang KK. (2017) SP-LL-37, human antimicrobial peptide, enhances disease resistance in transgenic rice. ***Plos One***. *12*(3): https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172936.

Manjunatha L, Saabale PR, Srivastava AK, Dixit GP, Yadav LB, Kumar K. (2018) Present status on variability and management of *Ascochyta rabiei* infecting chickpea. ***Indian Phytopathology***. *71*: 9–24. https://doi.org/10.1007/s42360-018-0002-6.

Moosa A, Farzand A, Sahi ST, Khan SA. (2018) Transgenic expression of antifungal pathogenesis-related proteins against phytopathogenic fungi-15 years of success. ***Israel Journal of Plant Sciences***. *65*(1-2): 38-54. https://doi.org/10.1080/07929978.2017.1288407.

Morcuende J, Martín-García J, Velasco P, Sánchez-Gómez T, Santamaría Ó, Rodríguez VM, Poveda J. (2024) Effective biological control of chickpea rabies (*Ascochyta rabiei*) through systemic phytochemical defenses activation by *Trichoderma* roots colonization: From strain characterization to seed coating. ***Biological Control***. *193*: 1049-9644. https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2024.105530.

Nosé S, Klein ML. (1983) Constant pressure molecular dynamics for molecular systems. ***Molecular Physics***. *50*(5): 1055-1076. https://doi.org/10.1080/00268978300102851.

Podia V, Chatzopoulos D, Milioni D, Stravopodis DJ, Dervisi I, Roussis A, Roubelakis-Angelakis KA, Haralampidis K. (2023) GUS reporter-aided promoter deletion analysis of *A. thaliana* POLYAMINE OXIDASE 3. ***International Journal of Molecular Sciences***. *24*(3): 2317. https://doi.org/10.3390/ijms24032317.

Puig M, Moragrega C, Ritz L, Montesinos E, Llorente I. (2015) Controlling brown spot of pear by a synthetic antimicrobial peptide under field conditions. ***Plant Disease***. *99*(12): 1816-1822. https://doi.org/10.1094/PDIS-03-15-0250-RE.

Shokouhifar F, Abbaspour N, Toosi S, Ghafarinia NS. (2018) Construction and expression analysis of plant binary vector pCaBGi. ***Applied Biology***. *31*(2): 137-155. https://doi.org/10.22051/jab.2018.4314.

Singh V, Chauhan Y, Dalal R, Schmidt S. (2021) Chickpea. *In*: Pratap A, Gupta S. (eds.) The beans and the peas. Woodhead Publishing, UK. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821450-3.00003-2.

Singh R, Kumar K, Purayannur S, Chen W, Verma PK. (2022) Ascochyta rabiei: A threat to global chickpea production. ***Molecular Plant Physiology***. *23*: 1241–1261. https://doi.org/10.1111/mpp.13235.

Szeto TH, Drake PM, The AY, Falci Finardi N, Clegg AG, Paul MJ, Reljic R, Ma JK. (2022) Production of recombinant proteins in transgenic tobacco plants. *In*: Schillberg S, Spiegel H. (eds.) Recombinant proteins in plants. Methods in Molecular Biology. vol 2480. Springer, USA. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2241-4_2.

Wang W, Deng L, Yao S, Zeng K. (2018) Control of green and blue mold and sour rot in citrus fruits by the cationic antimicrobial peptide PAF56. ***Postharvest Biology and Technology***. *136*: 132-138. https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2017.10.015.

Wang C, Yuan S, Zhang W, Ng T, Ye X. (2019) Buckwheat antifungal protein with biocontrol potential to inhibit fungal (*Botrytis cinerea*) infection of cherry tomato. ***Journal of Agricultural and Food Chemistry***. *67*(24): 6748-6756. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b01144.

Wang J, Li Y, Li A, Liu RH, Gao X, Li D. (2021) Nutritional constituent and health benefits of chickpea (*Cicer arietinum* L.): A review. ***Food Research International.*** *150*: 110790. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110790.

Waterhouse A, Bertoni M, Bienert S, Studer G, Tauriello G, Gumienny R, Heer FT, de Beer TAP, Rempfer C, Bordoli L, Lepore R, Schwede T. (2018) SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. ***Nucleic Acids Research***. *46*: W296-W303. https://doi.org/10.1093/nar/gky427.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1404.18.1.1.6]

Wen Q, Liu R, Ouyang Z, He T, Zhang W, Chen X. (2022) Identification of a new antifungal peptide W1 from a marine *Bacillus amyloliquefaciens* reveals its potential in controlling fungal plant diseases. ***Frontiers in Microbiology***. *13*(13): 922454. https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.922454.

Yang Y, Li R, Qi M. (2000) In vivo analysis of plant promoters and transcription factors by agroinfiltration of tobacco leaves. ***The Plant Journal***. *22*(6): 543-551. https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2000.00760.x.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1404.18.1.1.6]

Design, Engineering, and Expression of the Gene Encoding FeAP Antifungal Peptide in Tobacco with Aimed of Developing a Novel Strategy for Controlling the *Ascochyta rabiei* Fungus

Sahba Toosi[1], Saeid Malekzadeh-Shafaroudi[1*], Farhad Shokouhifar[2], Mojtaba Mamarabad[2], Nasrin Moshtaghi[1]

1. Department of Plant Biotechnology and Breeding, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
2. Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

malekzadeh-s@um.ac.ir

Abstract

Antifungal peptides are among the effective strategies for combating pathogenic fungi such as *Ascochyta rabiei*. This study was conducted to investigate the antifungal activity of the FeAP peptide against *A. rabiei*. Therefore, an expression construct was designed and molecular dynamics analyses were performed to evaluate the stability of the antifungal peptide. The target gene was synthesized and inserted into the pCAMBIA3301expression vector. The construct was transformed into *Agrobacterium* and then tobacco plants were infected with this bacterium. Successful transformation of tobacco plants was confirmed using the GUS reporter gene and RT-PCR analysis. The FeAP peptide purified using a Ni-NTA affinity column, and its antifungal activity was evaluated using the well diffusion method against *A. rabiei*. The results of the molecular dynamics analyses indicated that the designed construct enabled the production of a stable peptide. Production of the antifungal peptide, with an approximate molecular weight of 11 kDa, was confirmed by SDS-PAGE. A clear zone with a diameter of 14 mm demonstrated inhibition of *A. rabiei* growth at a concentration of 320 mg/ml. Furthermore, the findings of this study may contribute to the development of chickpea plants resistant to *A. rabiei*.

Keywords: *Agrobacterium*, Gene delivery, Antifungal peptide, Molecular dynamics

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1404.18.1.1.6]