



Scan online to view this article

## Antimicrobial peptides and their heterologous production in plant systems

Shahnam Azizi-Dargahlou, Mohammad Ahmadabadi\*

Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran

### Abstract

Antimicrobial peptides, or AMPs, have broad-spectrum antimicrobial properties, as well as other effects such as anti-cancer, wound healing, and anti-inflammatory properties. The emergence of antibiotic-resistant microbes is one of the major challenges facing humanity, which can make the treatment of many common diseases very difficult. AMPs, found in all six genera of living organisms, can help overcome many of these problems. However, it is very difficult to obtain these peptides from natural sources, which makes the use of alternative methods unavoidable. One of the most important methods for efficient production of these peptides is their expression in biological reactors. Plants are one of the most important systems for the expression of recombinant peptides due to their numerous benefits, especially low production costs. In this review article, AMPs are introduced first and then the production of recombinant antimicrobial peptides and different expression systems with emphasis on the plant system is discussed. Finally, important applications of AMP production in plants are mentioned.

**Keywords:** Plant bioreactors, Recombinant peptides, Plant expression systems, AMP production technology, Iau Science.



برای مشاهده این مقاله به صورت آنلاین اسکن کنید

## پپتیدهای ضد میکروبی و تولید هترولوگوس آن‌ها

## در سیستم‌های گیاهی

شهنام عزیزی درگاهلو، محمد احمدآبادی\*

گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران

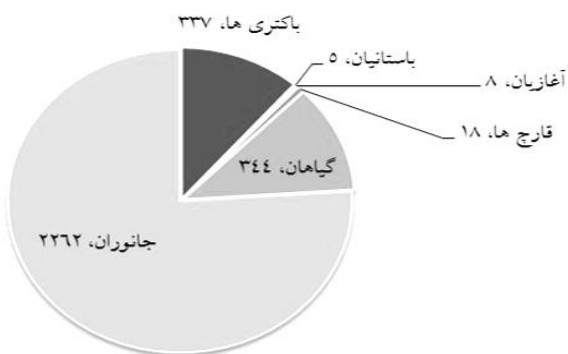
## چکیده

پپتیدهای ضد میکروبی یا AMPها دارای خواص ضد میکروبی با طیف اثر وسیع بوده و همچنین اثرات دیگری از قبیل ضد سرطان، بهبود زخم و ضد التهاب نیز از آن‌ها گزارش شده است. ظهور میکروب‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها، یکی از چالش‌های مهم پیش‌روی بشر است که می‌تواند درمان بسیاری از بیماری‌های رایج را بسیار سخت کند. AMPها که در هر شش سلسله موجودات زنده وجود دارند، می‌توانند در غلبه بر بسیاری از این مشکلات مؤثر باشند. با این حال، تهیه این پپتیدها از منابع طبیعی بسیار سخت است که استفاده از روش‌های جایگزین را غیرقابل اجتناب می‌کند. یکی از مهم‌ترین روش‌ها برای تولید کارآمد این پپتیدها، بیان آن‌ها در راکتورهای زیستی است. گیاهان، با توجه به مزایای بی‌شمار، به‌ویژه هزینه پایین تولید، یکی از مهم‌ترین سیستم‌های بیان پپتیدهای نو ترکیب هستند. در این مقاله مروری، ابتدا به معرفی AMPها پرداخته شده و سپس تولید پپتیدهای ضد میکروبی نو ترکیب و سیستم‌های بیان مختلف با تأکید بر سیستم گیاهی مورد بحث قرار گرفته است. در نهایت، کاربردهای مهم تولید AMPها در گیاهان ذکر شده است.

## واژه‌های کلیدی: بیوراکتورهای گیاهی، پپتیدهای نو ترکیب، سیستم‌های بیانی گیاهی، فن‌آوری تولید AMP،

Jau Science

آنتی‌بیوتیک‌های رایج که مقاومت به آن‌ها دیده شده است، مطرح باشند. AMPها در هر شش سلسله موجودات زنده شناخته شده‌اند که بیش‌ترین تعداد آن‌ها مربوط به سلسله‌های جانوران و گیاهان به ترتیب به تعداد ۲۲۶۲ و ۳۴۴ است (شکل ۱).



شکل ۱. توزیع پپتیدهای ضد میکروبی در شش سلسله موجودات زنده. این نمودار برحسب داده‌های موجود در پایگاه APD ترسیم شده است

## مقدمه

پپتیدهای ضد میکروبی (AMP: Antimicrobial peptides) ترکیباتی با فعالیت چندگانه هستند که در سیستم‌های دفاعی ایمنی ذاتی یوکاریوت‌ها و پروکاریوت‌ها وجود داشته (۱)، و توانایی تأثیر روی طیف وسیعی از میکروب‌ها را دارند. به‌عنوان مثال، این پپتیدها هم‌زمان می‌توانند روی باکتری‌های گرم‌مثبت و منفی، قارچ‌ها و ویروس‌ها اثر بگذارند. توانایی باکتری‌ها در مقاومت به این پپتیدها به‌دلایل مکانیسم چند اثری و پتانسیل کشندگی آن‌ها در مدت‌زمان کوتاه غیرمحتمل است (۲). این ویژگی‌ها باعث شده که این پپتیدها به‌عنوان یک کاندید مناسب برای جایگزینی

## نویسنده مسئول:

گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران

پست الکترونیکی: ahmadabadi@azaruniv.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۱/۱۸

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۲/۲۲

مکانیسم اثر پپتیدهای ضد میکروبی اغلب شامل نفوذپذیر کردن غشاء از طریق تشکیل حفره‌ها و یا تخریب غشای دولایه است که باعث نشت شیره سلولی و به دنبال آن، مرگ سلول می‌شود. با این حال، مکانیسم‌های دیگری نیز گزارش شده‌اند، که یکی از مهم‌ترین آن‌ها، انتقال پپتیدها به داخل سلول و مهار سنتز اسیدهای نوکلئیک، پروتئین‌ها و اجزای دیواره سلولی، و نیز فعالیت آنزیم‌های ضروری است (۱۹). در برخی موارد، اثرات هم‌افزایی پپتیدهای ضد میکروبی نیز گزارش شده است؛ به‌طور مثال استفاده از سه پپتید ضد میکروبی، اثرات کشندگی شدیدتری در مقایسه با کاربرد دو پپتید ضد میکروبی نشان داده است (۲۰).

تفاوت بنیادی بین غشای پستانداران با غشای میکروب-ها، باعث محافظت وابسته به دوز سلول‌های پستانداران در برابر AMPها می‌شود (۲۱). برخلاف میکروب‌ها، غشای سلول‌های پستانداران دارای مقادیر زیادی کلسترول است، که می‌تواند از طریق تثبیت دولایه فسفولیپیدی، باعث کاهش فعالیت AMPها شود (۲۲). همچنین، پتانسیل منفی قوی غشای باکتری‌ها یکی دیگر از عوامل مؤثر در فعالیت وابسته به دوز AMPها بین سلول‌های باکتریایی و پستانداران است (۲۱). این تفاوت‌ها باعث شده که برهم‌کنش بین AMPها و غشای سلول‌های پستانداران اغلب از نوع آب‌گریز باشد که در مقایسه با برهم‌کنش AMPها با غشای باکتری-ها که از نوع الکترواستاتیک است، به نسبت ضعیف است، که در نتیجه، کاهش تأثیر پپتیدهای ضد میکروبی روی غشای پستانداران را به دنبال دارد.

## اهمیت و نحوه تولید پپتیدهای ضد میکروبی

در سال‌های اخیر، به دلیل استفاده گسترده و نامناسب از آنتی‌بیوتیک‌ها، سرعت ظهور سویه‌های مقاوم باکتری‌ها به دارو در حال افزایش بوده، که یک تهدید آشکار برای سلامتی بشر است (۲۳)؛ بنابراین، تولید عوامل ضد میکروبی جدید که علیه میکروب‌های مقاوم به دارو مؤثر باشند، ضروری به نظر می‌رسد (۲۴). AMPها یکی از مهم‌ترین عوامل ضد میکروبی با طیف اثر وسیعی هستند که می‌توانند برای مقابله با نسل‌های جدید میکروب‌ها مورد استفاده قرار گیرند.

سه روش برای تولید پپتیدهای ضد میکروبی وجود دارد: جداسازی از منابع طبیعی، سنتز شیمیایی یا

پپتیدهای ضد میکروبی اندازه کوتاهی دارند، به طوری که بزرگ‌ترین آن‌ها دارای ۱۰۰ اسید آمینه است. هم-چنین، اکثریت آن‌ها دارای بار مثبت بوده و آب‌گریز هستند. پپتیدهای ضد میکروبی دارای فعالیت‌های مختلفی هستند، که از جمله‌ی آن‌ها می‌توان به پپتیدهای ضد باکتریایی (باکتری‌های گرم مثبت و منفی) (۳)، ضد ویروسی از قبیل ویروس ایدز (۴)، ضد قارچی (۵)، ضد انگل‌های مختلف از قبیل مالاریا (۶)، ضد آغازیان (۷)، ضد سرطان (۳)، و یا دارای خواص آنتی‌اکسیدانی (۸)، حشره‌کشی (۹)، مهارکننده پروتئاز (۱۰)، اسپرم‌کشی (۱۱)، بهبود زخم (۱۲)، ضد توکسین (۱۳)، بازدارنده کانال‌های یونی (۱۴) و ضد التهاب (۱۵) اشاره کرد. به علاوه، AMPها تجمع سلول‌های ایمنی را بهبود می‌بخشند و با القای رگ‌زایی به بهبود زخم کمک می‌کنند (۱۶، ۱۷). پپتیدهای ضد میکروبی را می‌توان بر اساس ویژگی‌های مختلف از قبیل فعالیت، ساختار و فراوانی اسیدهای آمینه به گروه‌های متفاوتی تقسیم‌بندی کرد که نمونه‌ای از این تقسیم‌بندی در جدول ۱ ارائه شده است.

جدول ۱: طبقه‌بندی پپتیدهای ضد میکروبی (۱۸)

معیار طبقه‌بندی		
فعالیت	ساختار	فراوانی اسیدهای آمینه
پپتیدهای ضد باکتری	پپتیدهای کوچک خطی	غنی از آرژینین
پپتیدهای ضد قارچی	ساختار مارپیچ آلفا	غنی از پرولین
پپتیدهای ضد التهاب	ساختار نوار بتا	غنی از تریپتوفان
پپتیدهای ضد ویروسی	هر دو ساختار مارپیچ آلفا و نوار بتا	غنی از گلايسین
پپتیدهای ضد انگلی		غنی از هیستیدین
پپتیدهای ضد ویروسی		

## پایگاه‌های داده موجود برای AMPها

تا به امروز پایگاه‌های داده مختلفی برای پپتیدهای ضد میکروبی ایجاد شده‌اند که هر کدام ویژگی‌های خاص خود را دارند. بعضی از این پایگاه‌های داده از قبیل APD Collection of Anti-Microbial Peptides (The Antimicrobial Peptide Database) و CAMP (Collection of Anti-Microbial Peptides) عمومی بوده و همه AMPها را دربر می‌گیرند، و برخی دیگر فقط گروه خاصی از AMPها را پوشش می‌دهند. برای مثال، پایگاه داده‌ی PhytAMP مخصوص پپتیدهای ضد میکروبی گیاهان است؛ و یا پایگاه داده BaAMPs پپتیدهای ضد میکروبی که علیه زیست‌لایه‌های میکروبی عمل می‌کنند را پوشش می‌دهد.

## مکانیسم اثر پپتیدهای ضد میکروبی

## قارچ‌ها

قارچ‌هایی از قبیل مخمر نان (*Saccharomyces cerevisiae*) و *Pichia pastoris* بیش‌تر به‌عنوان سیستم‌های بیان استفاده می‌شوند. مخمرها در مقایسه با سلول‌های باکتریایی چندین مزیت دارند، که مهم‌ترین آن‌ها به تغییرات پس از رونویسی و ترجمه، از قبیل گلیکولیزاسیون مربوط می‌شود (۳۲). در مقایسه با کشت سلول‌های پستانداران نیز، مخمرها به‌دلیل رشد سریع و ساده، مقرون به‌صرفه‌تر بوده و در کل موجب افزایش تولید و بهره‌وری پروتئین نوترکیب می‌شود. همچنین، امکان ترشح پروتئین نوترکیب از سلول‌های مخمر به محیط کشت، باعث تسهیل فرآیند تولید و خالص‌سازی پپتید نوترکیب در مقیاس وسیع می‌شود (۳۳، ۳۴). البته مخمر یک موجود تخمیری بوده و برخی از کربن‌های آن می‌تواند برای تولید اتانول هدایت شوند، که باعث کاهش بیوماس و به‌دنبال آن کاهش تولید پپتید نوترکیب می‌شود (۳۵). به‌همین دلیل، ممکن است مخمر نیز مناسب‌ترین میزبان برای تولید انبوه پپتیدهای ضد میکروبی نباشند.

## گیاهان

در مقایسه با سیستم‌های میکروبی و حیوانی، تولید پپتیدهای نوترکیب در سیستم‌های گیاهی مزایای متعددی، به‌ویژه هزینه پایین و سهولت تولید در مقیاس وسیع دارد (۳۶). همچنین، در مقایسه با باکتری‌ها، در سلول‌های گیاهی تغییرات پس از ترجمه به‌صورت صحیح روی پپتیدهای نوترکیب اتفاق می‌افتد (۳۷). به‌علاوه، گیاهان حاوی توکسین‌های باکتریایی و پاتوژن‌های انسانی از قبیل ویروس‌ها و پرئون‌ها نبوده، و در نتیجه، پپتیدهای نوترکیب به‌دست‌آمده از آن‌ها ایمن‌تر است. در برخی موارد، پپتیدهای نوترکیب تولیدشده در گیاهان می‌توانند بدون خالص‌سازی و به‌صورت واکسن خوراکی مصرف شوند که باعث کاهش چشم‌گیر هزینه تولید می‌شود (۳۸). در جدول زیر، مزایا و معایب سیستم‌های مختلف بیان پپتیدهای نوترکیب به‌صورت اجمالی آورده شده است (جدول ۲).

## تولید پپتیدهای نوترکیب در گیاهان

مقدار تولید پپتیدهای نوترکیب در گیاهان به‌شدت به انتخاب نوع پیش‌بر یا پروموتور، نوع درج ژنومی (هدفمند یا غیرهدفمند)، تعداد نسخه‌های تراژن و بافت هدف وابسته است (۴۰، ۴۱). استفاده از پروموتورهایی با قدرت بیان بالا، بهینه‌سازی کدون‌ها و جایابی مناسب

آزمایشگاهی، و در نهایت تولید نوترکیب آن‌ها در میزبان‌های مناسب. پپتیدهای ضد میکروبی طبیعی را می‌توان از مکانیسم سنتز به دو گروه تقسیم‌بندی کرد؛ (۱) پپتیدهای ضد میکروبی که توسط ژن‌ها کد شده و به‌واسطه ریبوزوم‌ها ساخته می‌شوند، و (۲) پپتیدهایی که به‌طور مستقیم توسط ژن‌ها کد نمی‌شوند، بلکه از طریق سیستم آنزیمی چندگانه ساخته می‌شوند. این پپتیدها در واقع متابولیت‌های ثانویه پپتیدی هستند که توسط ریبوزوم‌ها سنتز نمی‌شوند، بلکه سیستم‌های آنزیمی چندگانه و مشارکت اسیدهای آمینه تغییر یافته سنتز آن‌ها را امکان‌پذیر می‌کنند. از این گروه پپتیدها می‌توان به گرامیسیدین (*Gramicidin*)، کلسیتین (*Colistin*) و داپتومایسین (*Daptomycin*) اشاره کرد. به‌طور کلی ۹۸ درصد پپتیدهای ضد میکروبی موجود در پایگاه داده APD مربوط به گروه پپتیدهایی است که توسط ژن‌ها کد می‌شوند. این پپتیدها ممکن است بیان دائمی داشته باشند، یا این‌که برای حفظ سلامتی میزبان به‌صورت القایی تولید شوند (۲۵). AMP‌های مصنوعی، با استفاده از روش‌های سنتز پپتید ساخته می‌شوند (۲۶)، که به‌دلیل پیچیدگی، عملکرد پایین و هزینه زیاد، کاربرد محدودی دارند (۲۷). استفاده از تکنولوژی مهندسی ژنتیک برای بیان پپتیدهای نوترکیب در میزبان‌های مختلف از قبیل باکتری‌ها، قارچ‌ها و گیاهان می‌تواند یک روش امیدبخش برای تولید AMP‌ها با هزینه کم باشد (۲۸).

## تولید AMP‌ها در سیستم‌های باکتریایی،

### قارچی و گیاهی

### باکتری‌ها

در مطالعه‌های اخیر بیش‌تر از باکتری‌ها و قارچ‌ها به‌عنوان میزبان اصلی برای تولید AMP‌ها استفاده شده است، به‌طوری‌که ۹۷/۴ درصد بیان پپتیدهای ضد میکروبی نوترکیب را دربر می‌گیرند (۲۹). باکتری *Escherichia coli* بیش‌ترین استفاده را در تولید AMP‌ها داشته است (۳۰)، با این حال، چالش‌هایی در مسیر تولید AMP‌ها در میزبان‌های باکتریایی وجود دارد. یکی از مهم‌ترین این چالش‌ها، کنترل فعالیت طبیعی AMP‌ها است که می‌تواند روی سوبه‌های باکتری میزبان خاصیت کشندگی داشته باشد. از دیگر چالش‌ها می‌توان به ناپایداری AMP‌ها و تجزیه آن‌ها به‌وسیله پروتئازهای باکتریایی اشاره کرد (۳۱).

جدول ۲. مقایسه ویژگی‌های سیستم‌های مختلف برای تولید پپتیدهای نو ترکیب (۳۹)

میزبان	سرعت تولید	هزینه تولید	گلیکوزیلاسیون	مونتاز پروتئین‌های چند زیرواحدی	فولدینگ	ایمنی	قابلیت افزایش تولید
باکتری	+++	++	+	+	+	++	+
مخمر	++	++	+	+	+	++	++
کشت سلولی حشرات	+++	++	+	++	+	+	++
گیاهان	++	+++	++	++	++	+++	+++
کشت سلولی پستانداران	+	+	++	++	+++	+	+
حیوانات تراریخت	+	+	+++	+++	++	+	++

درون سلولی، می‌تواند باعث افزایش معنی‌دار تولید پپتیدهای نو ترکیب شود (۴۲). از هر دو روش بیان موقت و پایدار می‌توان برای تولید پپتیدهای نو ترکیب در گیاهان استفاده کرد که اطلاعات کلی این روش‌ها در جدول ۳ آمده است.

جدول ۳. مقایسه مشخصات بیان پایدار و موقت پپتیدهای نو ترکیب در گیاهان (۴۲)

مشخصات	بیان پایدار			بیان موقت	
	انتقال ژن به هسته	انتقال ژن به پلاستید	استفاده از تگنگ ژنی	استفاده از ویروس	تلقیح با آگروباکتریوم
وابستگی به ژنوتیپ	وابستگی کم	وابستگی کم	وابستگی کم	وابسته	وابسته
طیف گیاهان میزبان	زیاد	زیاد	زیاد	محدود	محدود
ناقل‌ها	ساده	ساده	پیچیده	پیچیده	پیچیده
قابلیت استفاده از DNA خطی	دارد	دارد	ندارد	ندارد	ندارد
انتقال قطعات بزرگ‌تر از ۱۰۰۰ kb	امکان پذیر	امکان پذیر	امکان پذیر	امکان پذیر	امکان پذیر
تعداد نسخه ژن درج شده در ژنوم	کم	زیاد	کم	بدون درج شدن	بدون درج شدن
تغییرات پس از ترجمه	امکان پذیر	امکان پذیر	امکان پذیر	امکان پذیر	امکان پذیر
سطح بیان	کم	کم	متوسط	زیاد	زیاد
کارایی انتقال ژن	کم	متوسط	زیاد*	زیاد	زیاد
نیاز به تجهیزات خاص و گران قیمت	ندارد	دارد	ندارد	ندارد	ندارد
پیچیدگی روش‌ها	پیچیده	ساده	ساده	ساده	ساده
ایمنی زیستی	نسبی**	نسبی**	نسبی**	زیاد***	زیاد***

\* کارایی انتقال ژن برای برخی گونه‌های گیاهی پایین است.

\*\* برای جلوگیری از آزاد شدن تراژن در طبیعت، نیاز به رعایت پروتکل‌های ایمنی-زیستی است.

\*\*\* پلاستیدها وراثت مادری دارند، و در نتیجه تراژن از طریق دانه‌های گرده منتشر نمی‌شود.

## مواردی از تولید موفق پپتیدهای ضد میکروبی در گیاهان

در سال ۱۹۹۸ میلادی، برای افزایش مقاومت به بیماری، ژن سارکوتوکسین IA به عنوان یک پپتید ضد میکروبی در توتون بیان شد. با وجود این که mRNA سارکوتوکسین IA در گیاهان تراریخته تا سطوح قابل تشخیص انباشته شد، مقدار پپتید تولید شده به قدری کم بود که به سختی قابل تشخیص بود، که دلیل آن ناپایداری پپتیدهای کوتاه در سلول‌های گیاهی عنوان شد. برای بررسی این احتمال، این ژن از طریق هم‌جوشی ترجمه‌ای به همراه ژن کدکننده بتا گلوکورونیداز (GUS) بیان شد. نتایج این تحقیق نشان داد که همانند رونوشت‌ها، پروتئین امتزاجی نیز در گیاهان تراریخته در سطوح بالایی تجمع پیدا می‌کند. با این حال، بر خلاف حالت

بیان انفرادی، گیاهان تراریخت بیان کننده پروتئین امتزاجی اغلب دارای غشاها و فنوتیپ‌های غیر طبیعی بودند (۴۳). پپتیدهای ضد میکروبی با ساختارهای مارپیچ آلفا، از قبیل BP100، دارای فعالیت قوی و اختصاصی در برابر باکتری‌های بیماری‌زای گیاهی هستند. همچنین، این پپتیدها به عنوان مواد درمانی و نگهدارنده با ارزش شناخته می‌شوند. با این حال، مشتقات بسیار فعال BP100 اغلب هنگامی که در سطوح بالا به عنوان پپتیدهای نو ترکیب در گیاهان بیان می‌شوند، فیتوتوکسیک هستند. بررسی‌ها نشان داده که تولید پپتیدهای فیتوتوکسیک نو ترکیب در گیاهان تراریخته با محدود کردن دقیق بیان ژن در بافت‌ها و شرایط خاص امکان پذیر است. برای مثال، در برنج، با استفاده از پروموتور Os.hsp82 که در پاسخ به شوک حرارتی به شدت القا می‌شود، لاین‌های تراریخته‌ای تولید شد که بازدهی متوسطی برای تولید

مشقتات سمی BP100 را در مواجهه با دمای بالا داشتند (۴۴).

سکروپین A (Cecropin A) یک پپتید ضد میکروبی طبیعی است که با داشتن فعالیت لیتیک سریع، قوی و طولانی مدت پتانسیل بیوتکنولوژیکی بالایی برای ایجاد مقاومت در برابر طیف وسیعی از پاتوژن‌ها دارد. تولید سکروپین A با استفاده از نسخه مصنوعی ژن با کدون بهینه شده تحت کنترل پروموتور اختصاصی آندوسپرم در بذر گیاه برنج گزارش شده است. نتایج نشان داد که سکروپین A در آندوسپرم برنج تجمع می‌یابد، بدون اینکه تأثیری بر زنده ماندن بذر یا رشد گیاهچه داشته باشد. به علاوه، بذرهای تراریخته نسبت به عفونت توسط پاتوژن‌های قارچی و باکتریایی از قبیل *Fusarium verticillioides* و *Dickeya dadantii* مقاومت نشان دادند (۴۵).

استفاده نامناسب از آنتی‌بیوتیک‌ها، موجب افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی پاتوژن‌ها و گسترش روزافزون بیماری‌های عفونی پستانداران می‌شود. پپتیدهای ضد میکروبی از قبیل پروتگرین-۱ (Protegrin-1: PG-1) با داشتن اثرات ضد میکروبی با طیف وسیع، می‌توانند جایگزین مناسبی برای رفع این مشکل باشند. این پپتید با موفقیت در گیاه توتون بیان شده است. برخلاف گیاهان طبیعی، عصاره پروتئینی بافت‌های گیاهان تراریخته میزان رشد را به میزان ۵۳٪ در *Klebsiella pneumoniae* ۷۰٪ در *Staphylococcus aureus*، ۵۶٪ در *Escherichia coli*، ۷۲٪ در *Mycobacterium bovis* BCG و ۷۰٪ در *Candida albicans* مهار کرد (۴۶). بنابراین، این نوع پپتیدهای ضد میکروبی تولید شده در سلول‌های گیاهی، می‌توانند رشد و فعالیت چندین پاتوژن باکتریایی و قارچی انسان را کنترل کنند.

لاتروسپورولین ۱ (Laterosporulin-1) به‌عنوان یک پپتید ضد میکروبی با دامنه وسیع مهارکنندگی در برابر عوامل بیماری‌زا از قبیل *Staphylococcus aureus* و *Mycobacterium tuberculosis*، با موفقیت در گیاه توتون به مقدار ۹۳/۸ میکروگرم در گرم وزن تر بیان شده است (۴۷).

اخیراً پپتید ضد میکروبی LL-37 با استفاده از پروموتور مخصوص آندوسپرم، در بذر گیاه جو تولید شده است. تولید پپتید LL-37 در طول ۶ نسل متوالی و اثرات ضد میکروبی آن پایداری پپتید عملکردی در گیاهان تراریخت را اثبات کرد (۴۸). تولید پپتیدهای ضد میکروبی در اندام‌هایی از قبیل بذر می‌تواند علاوه بر جلوگیری از اثرات نامطلوب پروتئین بیگانه

روی اندام‌های دیگر گیاه، در نگهداری طولانی‌مدت، حمل و نقل آسان، و استخراج و خالص‌سازی محصول، مفید باشد.

در سال‌های اخیر، گیاهان به دلیل مزایای منحصر به فرد خود مانند سرعت، مقیاس‌پذیری و ایمنی بیش‌تر برای تولید AMPها مورد توجه قرار گرفته‌اند. هم‌چنین، همان‌طور که در بالا اشاره شد، پپتیدهای ضد میکروبی می‌توانند برای توسعه رویکردهای جدید برای حفاظت از گیاهان و در نتیجه افزایش عملکرد محصول مورد استفاده قرار گیرند (۴۹).

## کلروپلاست یک میزبان استثنایی برای تولید پپتیدهای ضد میکروبی

تا حدود یک دهه پیش، بیش‌تر تحقیقات بیان پپتیدهای نو ترکیب از طریق انتقال پایدار ژن مورد نظر به ژنوم هسته انجام می‌گرفت. مشکل اصلی تولید پپتیدهای نو ترکیب از طریق انتقال ژن به هسته، بیان بسیار پایین آن در اکثر موارد است، به طوری که به‌طور معمول به بیش از یک درصد کل پروتئین‌های محلول نمی‌رسد. کلروپلاست از اندامک‌های داخل سلولی است که با انجام عمل فتوسنتز، بقای حیات بر روی کره زمین را تضمین می‌کند. یک سلول مزوفیل برگ تنباکو حدود ۱۰۰ عدد کلروپلاست دارد و در هر کلروپلاست کمابیش ۱۰۰ نسخه از ژنوم کلروپلاست وجود دارد. بنابراین هر سلول مزوفیل برگ می‌تواند بیش از ۱۰۰۰۰ نسخه ژنوم کلروپلاست داشته باشد (۵۰). اگر ژن خارجی را به داخل ژنوم کلروپلاست انتقال دهیم، در واقع در داخل هر سلول مزوفیل برگ، حدود ۱۰۰۰۰ نسخه از آن وجود خواهد داشت (برای مطالعه بیش‌تر به مقاله (۵۱) مراجعه نمایید). در نتیجه، میزان بیان پروتئین خارجی به‌مراتب بیش‌تر از انتقال ژن به هسته خواهد بود. در هسته، انتقال چند نسخه از ژن خارجی، احتمال خاموشی ژن وارد شده را افزایش می‌دهد، در حالی که، خاموشی ژن تا به حال در اندامک کلروپلاست گزارش نشده است (۵۲). با این حال، تعداد نسخه‌های بالای ژنوم پلاستید، انتقال پایدار ژن به این اندامک را بسیار سخت می‌کند، چرا که پس از انتقال موفق ژن خارجی به یکی از نسخه‌های ژنوم پلاستید، برای رسیدن به حالت پایدار، باید تمام نسخه‌های طبیعی حذف و با نسخه تراریخت ژنوم پلاستید (ترانس-پلاستوم) جایگزین شوند. این حالت که به اصطلاح هموپلاسمی گفته می‌شود، از طریق دو الی چهار دور باززایی مجدد روی محیط گزینشی با فشار بالا صورت می‌گیرد (۵۱).

کلروپلاست‌ها که از اجداد پروکاریوتی منشاء گرفته‌اند، دارای غشای دولایه هستند که می‌تواند پروتئین‌های خارجی را محافظت کرده و تأثیر آن‌ها بر روی فرآیندهای فیزیولوژیکی



## چالش‌های موجود در تولید پپتیدهای نو ترکیب در گیاهان

اگرچه تولید AMPها در گیاهان راهکار امیدوارکننده‌ای را برای کاربردهای جدید در پزشکی و کشاورزی ارائه می‌کند، با این حال، تولید تجاری مسیری چالش‌برانگیز است. این چالش‌ها ممکن است در مراحل مختلف توسعه یا فرآیند تولید از جمله طراحی استراتژی بیان، تولید ارگانیسم‌های تراریخته، تکثیر کلون‌ها، و توسعه تکنیک‌های استخراج و خالص‌سازی ایجاد شوند (۶۸). علاوه بر این، پپتیدهای مشتق شده از گیاه باید همان استانداردهای ایمنی، کیفیت و اثربخشی سایر سیستم‌های بیان هترولوگ را داشته باشند.

در حال حاضر، رهاسازی و جذب پروتئین‌های نو ترکیب خوراکی یکی از مهم‌ترین چالش‌های تولید پپتیدهای نو ترکیب در گیاهان است. دیواره سلولی گیاهان در برابر اسیدهای معده و سایر آنزیم‌های گوارشی مقاوم هستند، و بنابراین پروتئین‌های نو ترکیب به وسیله این مانع طبیعی از تجزیه شدن در سیستم گوارشی انسان محافظت می‌شوند. زمانی که سلول‌های دست‌نخورده گیاهی به روده‌ی کوچک می‌رسند، برخی میکروب‌ها، گلیکان‌های دیواره سلول گیاهی را هضم کرده و باعث تسهیل آزادسازی پپتیدهای دارویی نو ترکیب می‌شوند. برای عبور پپتیدهای دارویی از سلول‌های اپی‌لیال روده و ورود آن‌ها به سیستم گردش خون یا سیستم ایمنی بدن، لازم است پپتیدهای نو ترکیب با پپتیدهای نشانه مناسب هم‌جوشی یابند (۶۹).

از دیگر چالش‌های موجود در مسیر تولید پپتیدهای نو ترکیب دارویی در گیاهان، تفاوت‌های تغییرات پس از ترجمه از قبیل گلیکوزیلاسیون در گیاهان و پستانداران است. برای مثال، در گیاهان افزودن قندهای بتا (۱،۲) زایلوز و آلفا (۱،۳) فوکوز به صورت N-گلیکوزیدی معمول است، در حالی که این قندها در سلول‌های پستانداران وجود ندارند. البته، روش‌هایی برای ممانعت از این نوع تغییرات پس از ترجمه و انجام گلیکوزیلاسیون صحیح به کار گرفته شده‌اند (۷۰،۷۱). برای مثال، ژن‌های کدکننده آنزیم‌های زایلوزیل ترانسفراز و فوکوزیل ترانسفراز که در واکنش‌های گلیکوزیلاسیون گیاه دخالت دارند، با استفاده از فناوری‌های RNAi و CRISPR/Csa9 حذف شده، و ژن‌های کدکننده آنزیم‌های گلیکوزیلاسیون انسانی از قبیل سالیسیلیک اسید ترانسفراز و گالاکتوزیل ترانسفراز به صورت پایدار و یا موقت به گیاه منتقل شده‌اند (۳۹،۷۲).

گیاه میزبان کاهش دهد. چندین ویژگی پروکاریوتی نیز در پلاستیدها حفظ شده است، که برای آزمایشات انتقال ژن مفید است. برای مثال، سیستم بیان ژن در پلاستیدها به صورت پلی‌سیسترونیک بوده، و در نتیجه، انتقال و بیان چندین ژن به صورت هم‌زمان در قالب یک اپرون امکان‌پذیر است (۵۳). یک ویژگی منحصر به فرد دیگر در کلروپلاست‌ها، بالا بودن کارایی نو ترکیبی همولوگی است که درج هدفمند ژن خارجی در جایگاه از پیش تعیین شده در ژنوم کلروپلاست را ممکن می‌کند. برای این منظور لازم است تا ناقل‌های اختصاصی برای درج ژن در کلروپلاست طراحی و ساخته شود (۵۴،۵۵). در انتقال ژن به هسته، درج ژن به طور معمول به صورت تصادفی اتفاق می‌افتد، و بنابراین، بسته به محل درج ژن خارجی، میزان بیان آن متفاوت خواهد بود. البته در سال‌های اخیر، سیستم‌هایی برای درج هدفمند ژن در ژنوم هسته با استفاده از اندونوکلازهای مهندسی شده از قبیل TALENها، ZFNها و سیستم CRISPR/Cas9 نیز توسعه یافته‌اند. در نهایت، وراثت مادری کلروپلاست در اکثر گیاهان باعث می‌شود که ژن خارجی از طریق دانه گرده به محیط اطراف پراکنده نشود (۵۶) که می‌تواند احتمال فرار تراژن از طریق دانه‌ی گرده را به حداقل برساند. این مزایا سبب شده است که تا به حال چندین پروتئین درمانی از جمله پروتئین‌های خون انسان از قبیل سوماتوتروپین (۵۷)، فاکتور رشد شبه انسولین (۵۸،۵۹) و آلفا-۱-آنتی‌تریپسین (۶۰) در این اندامک تولید شود. به علاوه، چندین واکسن آنتی‌ژن علیه چندین پاتوژن باکتریایی از جمله زیرواحد B توکسین وبا (۶۱)، سم کزاز (۶۲) و آنتی‌ژن محافظ سیاه‌زخم (۶۳) در کلروپلاست بیان شده‌اند. پپتید ضد میکروبی MSI-99 در کلروپلاست‌های تنباکوی تراریخته بدون اثرات مضر روی گیاه تولید شده است (۶۴). در مطالعه دیگر، یک پپتید ضد میکروبی به نام PlyGBS در کلروپلاست‌های توتون در سطوح بالای (بیش از ۷۰٪ TSP) بیان شد (۶۵). رتروسیکلین-۱۰۱ (Retrocyclin-101) و پروتگرین-۱، به دلیل ساختار پیچیده و فعالیت‌های ضد میکروبی نمی‌توانند در سیستم‌های میکروبی تولید شوند. با این حال، هر دو پپتید با موفقیت و به ترتیب به میزان ۳۸ و ۲۶ درصد پروتئین کل محلول در کلروپلاست گیاه توتون تولید شده‌اند (۶۶). این نتایج نشان می‌دهند که علی‌رغم فرضیه موجود در خصوص منشاء باکتریایی کلروپلاست (۶۷)، به نظر می‌رسد تغییرات ایجاد شده در غشای کلروپلاست‌ها در طول تکامل برای سازگاری این اندامک با سیستم یوکاریوتی به اندازه‌ای بوده که پپتیدهای ضد میکروبی روی آن‌ها تأثیر منفی نداشته باشند.

پروتئازهای موجود در گیاه میزبان نیز یکی از فاکتورهای مهم تأثیرگذار در میزان تجمع پروتئین‌های نوترکیب است. این پروتئازها در تخریب پروتئین‌های غیرطبیعی و یا پروتئین‌هایی که به‌درستی فولد نشده‌اند، نقش دارند. چندین روش برای جلوگیری یا کاهش اثرات پروتئازها بر روی پروتئین‌های نوترکیب و افزایش پایداری آن‌ها توسعه یافته‌اند. از این تکنیک‌ها می‌توان به بیان پروتئین‌ها در اندامک‌های درون-سلولی، بیان القایی پروتئین‌ها در یک بافت یا زمان خاص، بیان هم‌زمان پروتئین با یک بازدارنده پروتئیناز، و یا هم-جوشی پروتئین هدف با یک پپتید نشانه با پایداری بالا اشاره کرد (۷۳). شبکه اندوپلاسمی (ER) یکی از اجزای سلولی است که حاوی تعداد کمی آنزیم پروتئاز است و بنابراین، می‌تواند یک محیط مناسب برای تجمع پروتئین‌های نوترکیب فراهم کند. استفاده از توالی‌های پپتید نشانه KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) و HDEL (His-Asp-Glu-Leu) نیز می‌تواند پایداری پروتئین‌های نوترکیب در ER را افزایش دهد. همچنین، حضور پروتئین‌های چپرون در ER می‌تواند به فولدینگ و مونتاژ پروتئین‌های خارجی و انجام تغییرات پس‌از ترجمه صحیح به‌ویژه گلیکوزیلاسیون نیز کمک کند (۷۴،۷۵).

انتقال افقی ژن از گیاهان به میکروارگانیسم‌ها به‌ویژه زمانی که گیاهان تراریخت حاوی ژن‌های گزینشگر مقاومت به آنتی-بیوتیک هستند، یکی دیگر از چالش‌های استفاده از سیستم‌های گیاهی برای تولید پروتئین‌های نوترکیب است. با وجود اینکه احتمال این پدیده بسیار کم است (۷۶،۷۷)، با این حال، برای اطمینان بیشتر، توصیه می‌شود ژن گزینشگر پس از انتقال ژن هدف، از گیاه تراریخت حذف شود. همچنین، بهتر است عمل برداشت محصول قبل از گل‌دهی صورت گیرد تا امکان فرار ژن از طریق گرده‌افشانی به حداقل برسد.

### اهداف تولید AMPها در میزبان‌های گیاهی

تولید هترولوگوس AMPها در گیاهان با دو هدف صورت می‌گیرد. هم‌چنان‌که در قسمت‌های قبل شرح داده شد، گیاهان به‌عنوان یک میزبان مناسب برای تولید پپتیدهای نوترکیب هستند. همچنین، ویژگی‌هایی از قبیل وزن مولکولی کم، طیف اثر وسیع، عملکرد سریع، سمیت کم برای سلول‌های پستانداران و حالت‌های مختلف اثرگذاری، استفاده از AMPها را به‌عنوان یکی از روش‌های امیدوارکننده برای کنترل پاتوژن‌های گیاهی مخرب در کشاورزی تبدیل کرده است (۷۸). در این مورد، بیش‌تر از AMPهای گیاهان و جانوران برای تولید گیاهان تراریخت مقاوم به بیماری‌های باکتریایی و قارچی استفاده می‌شود و پپتیدهای ضد میکروبی مشتق شده از باکتری‌ها به‌ندرت استفاده می‌شوند (۷۹). پاتوژن‌های گیاهی

اغلب شامل باکتری‌ها، قارچ‌ها، اومیسیت‌ها، ویروس‌ها و نماتدها هستند که هر ساله خسارت زیادی به محصولات زراعی وارد می‌کنند. تا به امروز ژن‌های پپتیدهای ضد میکروبی مختلفی به‌صورت تکی (۸۱، ۸۰) و یا چندتایی (۷۲) به‌منظور افزایش مقاومت گیاهان به پاتوژن‌های مختلف به گیاهان وارد شده‌اند و مقاومت گیاهان تراریخت در مقابل بیماری‌های باکتریایی و قارچی به اثبات رسیده است. تحقیقات نشان می‌دهند که تغییرات پس از ترجمه از قبیل فولدینگ صحیح، تشکیل پیوندهای دی‌سولفیدی و گلیکوزیلاسیون که برای فعالیت AMPها ضروری‌اند، در سیستم‌های تولید مبتنی بر گیاهان دست‌یافتنی هستند (۷۵، ۸۲). در اغلب مطالعه‌ها، بیان پایدار AMPها تحت کنترل پروموتور CaMV35S و یا یوبی کوئیتین به‌دست‌آمده است (۷۸). برخی از پروموتورهای القاء‌شونده با زخم یا پاتوژن می‌توانند به‌منظور کنترل بیان AMPها استفاده شوند که این عمل به حذف اثرات جانبی AMPها در گیاه میزبان و جلوگیری از اثرات ناخواسته روی موجودات غیرهدف که با گیاهان در ارتباط هستند، کمک می‌کند (۷۸). در گیاه برنج، برای مثال، درج پایدار ژن پپتید ضد میکروبی Cecropin A در بذور با استفاده از پروموتور مخصوص اندوسپرم، باعث مقاومت آن‌ها به بیماری‌های قارچی و باکتریایی شد، بدون اینکه تأثیر منفی روی قوه نامیه بذرها داشته باشد (۸۳).

### نتیجه‌گیری

پپتیدهای ضد میکروبی یا AMPها پپتیدهایی با اندازه کوچک هستند که روی دامنه وسیعی از میکروب‌ها تأثیر می‌گذارند. تاکنون تعداد زیادی از این پپتیدها در تمام سلسله‌های موجودات زنده کشف، و ژن‌های آن‌ها شناسایی شده‌اند. امروزه با ظهور میکروب‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها و ناتوانی بشر در کنترل این نوع میکروب‌ها، AMPها می‌توانند برای درمان بیماری‌های دام و طیور، آبیان و گیاهان، بسیار امیدبخش باشند. در سال‌های اخیر، تولید تجاری این پپتیدها که کاربردهای وسیع دیگری از جمله در صنایع غذایی و بهداشتی نیز دارند، بیش‌تر مورد توجه قرار گرفته است. استفاده از سیستم‌های بیان پروتئین‌های نوترکیب در میزبان‌های مناسب از جمله باکتری‌ها، مخمرها و گیاهان، یکی از مهم‌ترین روش‌های تولید مقرون‌به‌صرفه AMPها در سطوح تجاری است. در این بین، با توجه به این‌که گیاهان برای رشد خود نیازمند تهیه و تدارک محیط‌های کشت خاصی نبوده و با تکیه بر نور خورشید، دی‌اکسیدکربن هوا، آب و خاک مناسب رشد می‌کنند، می‌توانند به‌عنوان یک میزبان ارزان‌قیمت برای تولید AMPهای نوترکیب استفاده شوند. در مواردی نیز می‌توان پپتیدهای نوترکیب تولید شده در گیاهان را به‌صورت مستقیم



و بدون نیاز به مرحله‌ی خالص‌سازی که سخت و هزینه‌بر می‌باشد، استفاده کرد. امروزه با پیشرفت روش‌های نوین در درج هدفمند ژن‌ها در ژنوم گیاهان و همچنین بهره‌گیری از اندامک کلروپلاست که میزان تولید پپتید نوترکیب را تا بیش از ۷۰ درصد کل پروتئین‌های محلول گیاه بالا می‌برد، استفاده از گیاهان برای تولید پپتیدهای نوترکیب به‌ویژه AMPها، موردتوجه ویژه پژوهش‌گران قرار گرفته است.

1. Bulet P, Hetru C, Dimarcq J-L, Hoffmann D. Antimicrobial Peptides in Insects; Structure And Function. *Develop & Compar Immunol*. 1999;23(4-5):329-44.
2. Malanovic N, Lohner K. Antimicrobial Peptides Targeting Gram-Positive Bacteria. *Pharmaceuticals*. 2016;9(3):59.
3. Rozek T, Wegener KL, Bowie JH, Olver IN, Carver JA, Wallace JC, et al. The Antibiotic And Anticancer Active Aurein Peptides From the Australian Bell Frogs *Litoria aurea* and *Litoria raniformis* The Solution Structure of Aurein 1.2. *Eur J Biochem*. 2000;267(17):5330-41.
4. Helynck G, Dubertret C, Mayaux JF, Leboul J. Isolation of RP 71955, A New Anti-HIV-1 Peptide Secondary Metabolite. *J Antibiot (Tokyo)*. 1993;46(11):1756-7.
5. Osborn RW, De Samblanx GW, Thevissen K, Goderis I, Torrekens S, Van Leuven F, et al. Isolation and Characterisation of Plant Defensins From Seeds of Asteraceae, Fabaceae, Hippocastanaceae and Saxifragaceae. *FEBS Lett*. 1995;368(2):257-62.
6. Love MS, Millholland MG, Mishra S, Kulkarni S, Freeman KB, Pan W, et al. Platelet Factor 4 Activity Against *P. falciparum* and Its Translation to Nonpeptidic Mimics as Antimalarials. *Cell host & microbe*. 2012;12(6):815-23.
7. Rogozhin EA, Ryazantsev DY, Grishin EV, Egorov TA, Zavriev SK. Defense Peptides From Barnyard Grass (*Echinochloa crusgalli* L.) Seeds. *Peptides*. 2012;38(1):33-40.
8. Mohseni S, Emtenani S, Emtenani S, Asoodeh A. Antioxidant Properties of a Human Neuropeptide and Its Protective Effect on Free Radical-Induced DNA Damage. *J Pept Sci*. 2014;20(6):429-37.
9. Orivel J, Redeker V, Le Caer JP, Krier F, Revol-Junelles AM, Longeon A, et al. Ponericins, New Antibacterial and Insecticidal Peptides From the Venom of The Ant *Pachycondyla goeldii*. *J Biol Chem*. 2001;276(21):17823-9.
10. Charp PA, Rice WG, Raynor RL, Reimund E, Kinkade JM, Jr., Ganz T, et al. Inhibition of Protein Kinase C by Defensins, Antibiotic Peptides From Human Neutrophils. *Biochem Pharmacol*. 1988;37(5):951-6.
11. Silkin L, Hamza S, Kaufman S, Cobb SL, Vederas JC. Spermicidal Bacteriocins: Lacticin 3147 and Subtilosin A. *Bioorg Med Chem Lett*. 2008;18(10):3103-6.
12. Simonetti O, Cirioni O, Goteri G, Ghiselli R, Kamysz W, Kamysz E, et al. Temporin A is Effective in MRSA-Infected Wounds Through Bactericidal Activity and Acceleration of Wound Repair in a Murine Model. *Peptides*. 2008;29(4):520-8.
13. Kim C, Gajendran N, Mittrucker HW, Weiwad M, Song YH, Hurwitz R, et al. Human Alpha-Defensins Neutralize Anthrax Lethal Toxin and Protect Against its Fatal Consequences. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(13):4830-5.
14. Meng L, Xie Z, Zhang Q, Li Y, Yang F, Chen Z, et al. Scorpion Potassium Channel-blocking Defensin Highlights a Functional Link with Neurotoxin. *J Biol Chem*. 2016;291(13):7097-106.
15. Wei L, Yang J, He X, Mo G, Hong J, Yan X, et al. Structure and Function of a Potent Lipopolysaccharide-Binding Antimicrobial and Anti-Inflammatory Peptide. *J Med Chem*. 2013;56(9):3546-56.
16. Bowdish DM, Davidson DJ, Lau YE, Lee K, Scott MG, Hancock RE. Impact of LL- 37 on Anti-Infective Immunity. *J Leukocyte Biol*. 2005;77(4):451-9.
17. Elsbach P. What Is The Real Role of Antimicrobial Polypeptides That Can Mediate Several Other Inflammatory Responses? *The J Clinic Invest*. 2003;111(11):1643-5.

18. Huan Y, Kong Q, Mou H, Yi H. Antimicrobial Peptides: Classification, Design, Application and Research Progress in Multiple Fields. *Front Microbiol.* 2020;11:582779.
19. Nguyen LT, Haney EF, Vogel HJ. The Expanding Scope of Antimicrobial Peptide Structures and Their Modes of Action. *Trends Biotechnol.* 2011;29(9):464-72.
20. Yu G, Baeder DY, Regoes RR, Rolff J. Combination Effects of Antimicrobial Peptides. *Antimicrob Agent Chemotherap.* 2016;60(3):1717-24.
21. Yeaman MR, Yount NY. Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and Resistance. *Pharmacol Rev.* 2003;55(1):27-55.
22. Zasloff M. Antimicrobial Peptides of Multicellular Organisms. *Nature.* 2002;415(6870):389.
23. Rai J, Randhawa GK, Kaur M. Recent advances in antibacterial drugs. *Int J Appl Basic Med Res.* 2013;3(1):3.
24. Spížek J, Novotná J, Řezanka T, Demain AL. Do We Need New Antibiotics? The Search for New Targets and New Compounds. *J Indust Microbiol & Biotechnol.* 2010;37(12):1241-8.
25. Boman H. Antibacterial Peptides: Basic Facts and Emerging Concepts. *J Intern Med.* 2003;254(3):197-215.
26. Merrifield RB. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *JACS.* 1963;85(14):2149-54.
27. Ahmad M, Hirz M, Pichler H, Schwab H. Protein Expression in *Pichia pastoris*: Recent Achievements and Perspectives for Heterologous Protein Production. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2014;98(12):5301-17.
28. Wang G. *Antimicrobial Peptides: Discovery, Design and Novel Therapeutic Strategies*: Cabi; 2017.
29. Li Y, Chen Z. RAPD: a database of recombinantly-produced antimicrobial peptides. *FEMS Microbiol Let.* 2008;289(2):126-9.
30. Ingham AB, Moore RJ. Recombinant Production of Antimicrobial Peptides in Heterologous Microbial Systems. *Biotechnol Appl Biochem.* 2007;47(1):1-9.
31. Li Y. Recombinant Production of Antimicrobial Peptides in *Escherichia coli*: A Review. *Prot Exp Purif.* 2011;80(2):260-7.
32. Cregg JM, Tolstorukov I, Kusari A, Sunga J, Madden K, Chappell T. Expression in the Yeast *Pichia pastoris*. *Meth Enzymol.* 463: Elsevier; 2009. p. 169-89.
33. Byrne L, O'Callaghan K, Tuite M. *Pharmaceutical Proteins from Methylotrophic Yeasts. Methods in Molecular Biology*: Humana Press New Jersey; 2005. p. 51-64.
34. Romanos MA, Scorer CA, Clare JJ. Foreign Gene Expression in Yeast: A Review. *Yeast.* 1992;8(6):423-88.
35. Mattanovich D, Branduardi P, Dato L, Gasser B, Sauer M, Porro D. Recombinant Protein Production in Yeasts. *Recombinant gene expression*: Springer; 2012. p. 329-58.
36. Fischer R, Stoger E, Schillberg S, Christou P, Twyman RM. Plant-Based Production of Biopharmaceuticals. *Curr Opin Plant Biol.* 2004;7(2):152-8.
37. Sindarovska Y, Gerasymenko I, Sheludko Y, Olevinskaya Z, Spivak N, Kuchuk N. Production of Human Interferon ALPHA 2b in Plants of *Nicotiana excelsior* by Agrobacterium-Mediated Transient Expression. *Cytol Genet.* 2010;44(5):313-6.
38. Larrick JW, Thomas DW. Producing Proteins in Transgenic Plants and Animals. *Curr Opin Biotechnol.* 2001;12(4):411-8.

39. Lee JH, Ko K. Production of Recombinant Anti-Cancer Vaccines in Plants. *Biomol & Therap.* 2017;25(4):345.
40. Delaunois B, Cordelier S, Conreux A, Clément C, Jeandet P. Molecular Engineering of Resveratrol in Plants. *Plant Biotechnol J.* 2009;7(1):2-12.
41. Hernandez-Garcia CM, Bouchard RA, Rushton PJ, Jones ML, Chen X, Timko MP, et al. High Level Transgenic Expression of Soybean (*Glycine max*) GmERF and Gmubi Gene Promoters Isolated by a Novel Promoter Analysis Pipeline. *BMC Plant Biol.* 2010;10(1):237.
42. Vyacheslavova A, Berdichevets I, Tyurin A, Shimshilashvili KR, Mustafaev O, Goldenkova-Pavlova I. Expression of Heterologous Genes in Plant Systems: New Possibilities. *Russ J Genet.* 2012;48(11):1067-79.
43. Okamoto M, Mitsuhara I, Ohshima M, Natori S, Ohashi Y. Enhanced Expression of an Antimicrobial Peptide Sarcotoxin IA by GUS Fusion in Transgenic Tobacco Plants. *Plant Cell Physiol.* 1998;39(1):57-63.
44. Company N, Nadal A, Ruiz C, Pla M. Production of Phytotoxic Cationic Alpha-Helical Antimicrobial Peptides in Plant Cells Using Inducible Promoters. *PLoS One.* 2014;9(11):e109990.
45. Bundo M, Montesinos L, Izquierdo E, Campo S, Mieulet D, Guiderdoni E, et al. Production of Cecropin A Antimicrobial Peptide in Rice Seed Endosperm. *BMC Plant Biol.* 2014;14:102.
46. Patiño-Rodríguez O, Ortega-Berlanga B, Llamas-González YY, Flores-Valdez MA, Herrera-Díaz A, Montes-de-Oca-Luna R, et al. Transient Expression and Characterization of the Antimicrobial Peptide Protegrin-1 in *Nicotiana tabacum* for Control of Bacterial and Fungal Mammalian Pathogens. *PCTOC.* 2013;115(1):99-106.
47. Ghidey M, Islam SMA, Pruett G, Kearney CM. Making Plants into Cost-Effective Bioreactors for Highly Active Antimicrobial Peptides. *NewBbiotechnol.* 2020;56:63-70.
48. Mirzaee M, Holásková E, Mičúchová A, Kopečný DJ, Osmani Z, Frébort I. Long-Lasting Stable Expression of Human LL-37 Antimicrobial Peptide in Transgenic Barley Plants. *Antibiotics.* 2021;10(8):898.
49. Shanmugaraj B, Bulaon CJI, Malla A, Phoolcharoen W. Biotechnological Insights on the Expression and Production of Antimicrobial Peptides in Plants. *Molecules.* 2021;26(13).
50. Koop H-U, Herz S, Golds TJ, Nickelsen J. The Genetic Transformation of Plastids. *Cell and molecular biology of plastids: Springer;* 2007. p. 457-510.
51. Ahmadabadi M. Gen transfer into plastids: A Review on Complete Mechanism, Recent Advances and Existing Obstacles. *Iran J Novel Genet.* 2010;5(2):5-19.
52. Waheed MT, Ismail H, Gottschamel J, Mirza B, Lössl AG. Plastids: The Green Frontiers for Vaccine Production. *Front Plant Sci.* 2015;6:1005.
53. Lössl AG, Waheed MT. Chloroplast- Derived Vaccines Against Human Diseases: Achievements, Challenges and Scopes. *Plant Biotechnol J.* 2011;9(5):527-39.
54. Nojavan S, Ahmadabadi M, Pazhouhandeh M. Isolation and Cloning of Human Insulin-Like Growth Factor 1 (IGF1) cDNA in Chloroplast Transformation Vectors. *WASET.* 2011; 76:526-527.
55. Darabi S, Ramazani S, Ahmadabadi M. Cloning of Human Insulin-Like Growth Factor Gene in Plant Expression Vectors. *Agricul Biotechnol J.* 2017;9(1):15-30.
56. Daniell H, Khan MS, Allison L. Milestones in Chloroplast Genetic Engineering: an Environmentally Friendly Era in Biotechnology. *Trends Plant Sci.* 2002;7(2):84-91.
57. Staub JM, Garcia B, Graves J, Hajdukiewicz PT, Hunter P, Nehra N, et al. High-Yield Production of a Human Therapeutic Protein in Tobacco Chloroplasts. *Nat Biotechnol.* 2000;18(3):333-8.

58. Daniell H, Ruiz G, Denes B, Sandberg L, Langridge W. Optimization of Codon Composition and Regulatory Elements for Expression of Human Insulin Like Growth Factor-1 in Transgenic Chloroplasts and Evaluation of Structural Identity and Function. *BMC Biotechnol.* 2009;9:33-.
59. Ahmadabadi M. Transfer and Expression of Native Human Insulin-Like Growth Factor-1 in Tobacco Chloroplasts. *Iran J Biotechnol.* 2021;19(4):14-21.
60. Nadai M, Bally J, Vitel M, Job C, Tissot G, Botterman J, et al. High-Level Expression of Active Human Alpha1-Antitrypsin in Transgenic Tobacco Chloroplasts. *Transgenic Res.* 2009;18(2):173-83.
61. Daniell H, Lee SB, Panchal T, Wiebe PO. Expression of the Native Cholera Toxin B Subunit Gene and Assembly as Functional Oligomers in Transgenic Tobacco Chloroplasts. *J Mol Biol.* 2001;311(5):1001-9.
62. Tregoning JS, Nixon P, Kuroda H, Svab Z, Clare S, Bowe F, et al. Expression of Tetanus Toxin Fragment C in Tobacco Chloroplasts. *Nucleic Acids Res.* 2003;31(4):1174-9.
63. Watson J, Koya V, Leppla SH, Daniell H. Expression of *Bacillus anthracis* Protective Antigen in Transgenic Chloroplasts of Tobacco, a non-food/feed crop. *Vaccine.* 2004;22(31-32):4374-84.
64. DeGray G, Rajasekaran K, Smith F, Sanford J, Daniell H. Expression of an Antimicrobial Peptide Via the Chloroplast Genome to Control Phytopathogenic Bacteria and Fungi. *Plant Physiol.* 2001;127(3):852-62.
65. Oey M, Lohse M, Kreikemeyer B, Bock R. Exhaustion of the Chloroplast Protein Synthesis Capacity by Massive Expression of a Highly Stable Protein Antibiotic. *Plant J.* 2009;57(3):436-45.
66. Lee SB, Li B, Jin S, Daniell H. Expression and Characterization of Antimicrobial Peptides Retrocyclin-101 and Protegrin-1 in Chloroplasts to Control Viral and Bacterial Infections. *Plant Biotechnol J.* 2011;9(1):100-15.
67. Zhong B, Xi Z, Goremykin VV, Fong R, McLenachan PA, Novis PM, et al. Streptophyte Algae and the Origin of Land Plants Revisited Using Heterogeneous Models With Three New Algal Chloroplast Genomes. *Mol Biol Evol.* 2014;31(1):177-83.
68. Broz A, Huang N, Unruh G. Plant-Based Protein Biomanufacturing. *Genetic Engineering & Biotechnol News.* 2013;33(4).
69. Zhang B, Shanmugaraj B, Daniell H. Expression and Functional Evaluation of Biopharmaceuticals Made in Plant Chloroplasts. *Curr Opin Chem Biol.* 2017;38:17-23.
70. Strasser R, Altmann F, Mach L, Glössl J, Steinkellner H. Generation of *Arabidopsis thaliana* Plants With Complex N- Glycans Lacking  $\beta$ 1, 2- Linked Xylose and Core  $\alpha$ 1, 3- linked fucose. *FEBS Let.* 2004;561(1-3):132-6.
71. Loos A, Steinkellner H. Plant Glyco-Biotechnology on the Way to Synthetic Biology. *Front Plant Sci.* 2014;5:523.
72. Rivero M, Furman N, Mencacci N, Picca P, Toum L, Lentz E, et al. Stacking of Antimicrobial Genes in Potato Transgenic Plants Confers Increased Resistance to Bacterial and Fungal Pathogens. *J Biotechnol.* 2012;157(2):334-43.
73. Streatfield SJ. Approaches to Achieve High-Level Heterologous Protein Production in Plants. *Plant Biotechnol J.* 2007;5(1):2-15.
74. Nuttall J, Vine N, Hadlington JL, Drake P, Frigerio L, Ma JKC. ER-Resident Chaperone Interactions With Recombinant Antibodies in Transgenic Plants. *Eur J Biochem.* 2002;269(24):6042-51.
75. Ma JK, Drake PM, Christou P. The Production of Recombinant Pharmaceutical Proteins in Plants. *Nat Rev Genet.* 2003;4(10):794-805.
76. bembe OO, Popoola JO, Leelavathi S, Reddy SV. Advances in Plant Molecular farming. *Biotechnol Adv.* 2011;29(2):210-22.

77. Keese P. Risks from GMOs due to Horizontal Gene transfer. *Environ Biosafety Res.* 2008;7(3):123-49.
78. Holaskova E, Galuszka P, Frebort I, Oz MT. Antimicrobial Peptide Production and Plant-Based Expression Systems for Medical and Agricultural Biotechnology. *Biotechnol Adv.* 2015;33(6):1005-23.
79. Pelegrini PB, Lay FT, Murad AM, Anderson MA, Franco OL. Novel Insights on the Mechanism of Action of  $\alpha$ - Amylase Inhibitors from the Plant Defensin Family. *Proteins.* 2008;73(3):719-29.
80. Gao A-G, Hakimi SM, Mittanck CA, Wu Y, Woerner BM, Stark DM, et al. Fungal Pathogen Protection in Potato by Expression of a Plant Defensin Peptide. *Nat Biotechnol.* 2000;18(12):1307.
81. Allefs SJ, De Jong ER, Florack DE, Hoogendoorn C, Stiekema WJ. Erwinia Soft Rot Resistance of Potato Cultivars Expressing Antimicrobial Peptide Tachyplesin I. *Mol Breed.* 1996;2(2):97-105.
82. Ramessar K, Capell T, Christou P. Molecular Pharming in Cereal Crops. *Phytochem Rev.* 2008;7(3):579-92.
83. Bundó M, Montesinos L, Izquierdo E, Campo S, Mieulet D, Guiderdoni E, et al. Production of Cecropin A Antimicrobial Peptide in Rice Seed Endosperm. *BMC Plant Biol.* 2014;14(1):102.