

القا بیان پروتئین نوترکیب DrsB1-CBD_{Avr4} در ریشه‌های مویین و نابه‌جا گیاهان تراریخت T1

میترا خادمی^۱، مرضیه وارسته شمس^۱ و فرهاد نظریان فیروزآبادی^{۲*}

۱- دکتری تخصصی، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد

۲- استاد، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۲/۲۷ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۵/۲۲)

چکیده

ریشه‌های مویین و نابه‌جا برای بیان پروتئین‌های نوترکیب کارآمد هستند. در مطالعه حاضر به بررسی مقایسه میزان پروتئین نوترکیب DrsB1-CBD_{Avr4} در ریشه‌های مویین و نابه‌جا پرداخته شد. برای این منظور ابتدا، تأثیر عوامل مختلف بر بهینه‌سازی شرایط کشت برای تولید ریشه‌هایی نابه‌جا و مویین در سه آزمایش جداگانه با ارزیابی تولید زیست‌توده در گیاه تراریخت DrsB1-CBD_{Avr4} مورد بررسی قرار گرفت. صحت تولید ریشه‌های القاء شده توسط *اگروباکتریوم ریزوژنز* و با آغازگرهای اختصاصی ژن *roIC* تأیید شد. همچنین با استفاده از PCR، ورود ژن‌های پیپتید نوترکیب در ماسپتین B1 در ژنوم کلون‌های ریشه‌های مویین و نابه‌جا اثبات شد. سطح پروتئین نوترکیب با استفاده از آنالیز ELISA عصاره‌های کلون ریشه‌های مویین و نابه‌جا اندازه‌گیری شد. تجزیه واریانس داده‌های حاصل از تولید و القا ریشه نابه‌جا نشان داد که بیشترین تعداد و بلندترین طول ریشه در محیط‌های MS حاوی ۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر IBA به دست آمد. نتایج حاصل از زیست‌توده ریشه نابه‌جا نشان داد که محیط MS مایع حاوی ۱ میلی‌گرم بر لیتر از هورمون NAA روی میزان تولید زیست‌توده اثرات معنی‌داری ($P \leq 0.01$) دارند. بیشترین زیست‌توده در محیط کشت MS حاوی میزان ۱ میلی‌گرم بر لیتر هورمون NAA به دست آمد و کمترین وزن تر و خشک در محیط MS ۱/۴ بدون هورمون NAA به دست آمد. همچنین نتایج این مطالعه نشان داد که سویه ATCC15834، در محیط MS همراه با ساکارز ۳ درصد با مدت‌زمان تلقیح ۱۰ دقیقه بهترین ترکیب تیماری جهت تحریک ریشه مویین در گیاه تراریخت بود. نتایج ELISA نشان داد که کلون‌های به دست آمده از هر دو ریشه تفاوت معنی‌داری از نظر میزان غلظت پروتئین کل نشان دادند. میزان پروتئین نوترکیب حاصل از کلون‌های ریشه مویین به مراتب بیشتر از پروتئین ریشه نابه‌جا بود.

واژگان کلیدی: پیپتید نوترکیب، تنظیم‌کننده‌های رشد، ریشه مویین، ریشه نابه‌جا، زیست‌توده

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

مقدمه

پیشرفت‌های اخیر در زیست‌فناوری، استفاده از بیوراکتورهای گیاهی را به‌عنوان سیستمی جالب‌توجه در تولید تجاری پپتیدها، پروتئین‌ها و ترکیبات دارویی مطرح ساخته است. بیان بالای محصول و انباشت و همچنین بازیافت آن، نیازمند بررسی دقیق ویژگی‌های محصول و به‌کارگیری راهبرد خاصی است (Shanmugaraj *et al.*, 2020).

تولید پپتیدهای ضد میکروبی در گیاهان با دو هدف کلی محافظت از گیاهان و زراعت مولکولی انجام شده است. سیستم‌های مختلف بیانی مبتنی بر گیاه از کشت سلول یا بافت تا گیاهان تراریخت ابزارهای مفیدی را در دستیابی به این هدف ارائه نموده‌اند (Shanmugaraj *et al.*, 2020). این سیستم‌ها با هدف تولید پپتیدها و پروتئین‌ها، مقرون‌به‌صرفه هستند و پتانسیل بالایی در تولید با مقیاس بالا را دارند و از این جهت که موانع سایر سیستم‌های بیان زیستی در استفاده از آن‌ها تعدیل شده است به سیستم امیدبخشی در تولید پروتئین-های نو ترکیب تبدیل شده‌اند (Shanmugaraj *et al.*, 2020). با این حال، یکی از بزرگ‌ترین چالش‌ها در این زمینه، ناپایداری ژنتیکی، رشد کم و بازده پایین کشت سلول‌های گیاهی است. در میان فنون مختلف کشت بافت، کشت ریشه‌های مویین و نابه‌جا از قابلیت بالایی برای تولید پروتئین‌های نو ترکیب برخوردار هستند (Hussain *et al.*, 2022).

اگر باکتریوم رایزوترنز (*Agrobacterium rhizogenes*) جز باکتری‌های گرم منفی بوده و عموماً گیاهان دولپه‌ای و گاهی گیاهان تک‌لپه‌ای را آلوده می‌کند و منجر به تشکیل ریشه‌های مویین می‌شود (Christey and Braun, 2005). سلول‌های ریشه‌های مویین حامل قطعه‌ی T-DNA پلاسمید Ri در درون ژنوم هسته‌ای خود می‌باشند. عوامل متعددی در فرآیند تراریخت کردن گیاهان با اگر باکتریوم رایزوترنز مؤثر است. این عوامل شامل ژنوتیپ، سن ریزنمونه‌ی گیاهی، نوع و ترکیبات محیط کشت می‌باشند (Chilton *et al.*, 1982). ریشه‌های مویین توانایی بی‌نظیری در رشد در شرایط درون‌شیشه‌ای در غیاب تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی را دارند.

از این ویژگی رشدی می‌توان برای تولید متابولیت‌های گیاهی و پروتئین نو ترکیب استفاده کرد (Giri and Narasu, 2000). همانند ریشه‌های مویین، ریشه‌های نابه‌جا نیز دارای کاربرد مشابهی هستند. تشکیل ریشه‌های نابه‌جا به عواملی درونی به‌ویژه تنظیم سطح هورمون‌ها بستگی دارد (Pop *et al.*, 2011). در میان هورمون‌ها، اکسین‌ها و اتیلن نقش مهمی در تولید ریشه‌های نابه‌جا در اکثر گیاهان ایفا می‌کنند (Pop *et al.*, 2011; Rahmat and Kang, 2019).

مطالعات اخیر در زمینه ریشه‌های نابه‌جا نشان دهنده رشد سریع و بهره‌وری پایدار متابولیت‌ها، تکثیر سریع و پتانسیل تجمع و تولید ترکیبات زیست‌فعال بوده است (Carvalho and Curtis, 1998; Kevers *et al.*, 1999; Sudha and Ravishankar, 2002). استفاده از ریشه‌های نابه‌جا در مقابل ریشه‌های مویین به دلیل عدم وجود سوبستراهای شبیه اوپین و محصولات جانبی و مضر برای سلول‌های پستانداران، کاهش هزینه‌های خالص‌سازی به‌عنوان روشی ساده‌تر و ایمن‌تر تبدیل شده است. از این‌رو، کشت در شرایط آزمایشگاهی ریشه‌های نابه‌جا این پتانسیل را دارد که به‌عنوان یک استراتژی برای تولید ترکیبات زیست‌فعال در مقیاس وسیع مورد استفاده قرار گیرد (Choi *et al.*, 2000; Gaosheng and Jingming, 2012).

درماسپتین B1 (Dermaseptin B1, DrsB1) یک پپتید ضد میکروبی کاتیونی به طول ۳۱ اسید آمینه متعلق به خانواده درماسپتین است که از ترشحات پوستی نوعی قورباغه (*Phylomedusa bicolor*) جداسازی شده است (Mor *et al.*, 1994; Mor and Nicolas, 1994; Khademi *et al.*, 2019). درماسپتین B1 بیشترین قدرت ضد میکروبی را در بین همه درماسپتین‌ها دارد (Yevtushenko and Misra, 2007). نتایج آزمایش سنجش فعالیت ضد میکروبی درماسپتین B1 در شرایط آزمایشگاهی نشان داده است که این پپتید دارای اثرات ضد میکروبی با طیف گسترده علیه بیمارگرهای مختلف باکتریایی و قارچی است (Osusky *et al.*, 2005). از بین پپتیدهای نو ترکیب درماسپتین B1 تا به امروز بیشترین فعالیت ضد میکروبی علیه بیمارگرهای قارچی و باکتریایی در پپتید نو ترکیب DrsB1-CBD_{Avr4} مشاهده شده است (Khademi *et al.*, 2021).

IBA (b₁: ۰، b₂: ۰/۵ و b₃: ۱ میلی گرم بر لیتر) در شرایط تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت سه هفته نگهداری شد. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد و صفات‌های تعداد ریشه و طول ریشه اندازه‌گیری شدند.

ترازیش ژنتیکی توتون تراریخت نسل T1 با آگروباکتریوم

رایزوزنز: جهت القای ریشه موپین در گیاه تراریخت -DrsB1-CBDAvr4، از دو سویه آگروباکتریوم رایزوزنز شامل ATCC15834 و A4 استفاده شد. باکتری‌های رایزوزنز در محیط کشت LB مایع حاوی ۵۰ میلی گرم بر لیتر از آنتی‌بیوتیک ریفامپیسین در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد بر روی شیکر با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه به مدت ۴۸ ساعت کشت داده شدند. سوسپانسیون باکتری با OD برابر با ۰/۴ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و با ۴۰۰۰ دور در دقیقه رسوب داده شد و رسوب باکتری در محیط MS به آرامی حل شده و از این سوسپانسیون به منظور تلقیح استفاده شد. نمونه برگی سترون از گیاهان سه هفته‌ای تهیه شدند. برگ‌ها در عرض به فاصله یک سانتی‌متری برش داده شدند (Dashchi et al., 2021)، سپس به درون مایع تلقیح حاوی آگروباکتریوم رایزوزنز منتقل و ۵ تا ۱۰ دقیقه تکان داده شدند. پس از آگیری برگ‌های آلوده بر روی کاغذ صافی، ریزنمونه‌ها روی محیط کشت MS بدون هورمون و آنتی‌بیوتیک به مدت ۳ روز در شرایط تاریکی در دمای ۲ ± ۲۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. سپس ریزنمونه‌ها در محیط حاوی منبع کربن مختلف (گلوکز ۱ درصد، گلوکز ۵ درصد، ساکارز ۱ درصد و ساکارز ۳ درصد) با ترکیبی از سویه‌های باکتری و بازه‌های زمانی (سویه باکتری A4 با مدت‌زمان‌های ۵ و ۱۰ دقیقه تلقیح و سویه باکتری ATCC15834 با مدت‌زمان‌های ۵ و ۱۰ دقیقه) به مدت دو هفته نگهداری شدند. این تیمارها در آزمایشی به صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار مقایسه شدند. صفات اندازه‌گیری شده در این بخش از آزمایش شامل تعداد، طول و میزان پروتئین ریشه بود.

تولید زیست‌توده ریشه‌های نابه‌جا در گیاهان تراریخت نسل

T1 حاوی پپتید نوترکیب DrsB1-CBDAvr4: برای تولید زیست‌توده ریشه‌های نابه‌جا به طول ۵ سانتی‌متر (۰/۲ گرم) در

تحقیقات متعددی بر روی مهندسی مقاومت به بیمارگرهای گیاهی از طریق انتقال ژن‌های بیان‌کننده پپتیدهای ضد میکروبی در ماسپتین B1 در گیاهان صورت گرفته است (Osusky et al., 2005; Khademi et al., 2020)، با این حال تاکنون مطالعه‌ای که به بررسی میزان تولید پروتئین نوترکیب در گیاهان تراریخت نسل T1 از پپتید نوترکیب DrsB1-CBDAvr4 در ریشه موپین و نابه‌جا در منابع دیده نشده است. در این مطالعه برای اولین بار و با هدف تولید و القاء ریشه موپین و نابه‌جا در حضور پارامترهای مختلفی از جمله غلظت‌های مختلف هورمون‌های اکسین‌ها (NAA و IBA) و نوع محیط کشت و همچنین بهینه‌سازی و تولید زیست‌توده در مقیاس آزمایش‌های مقدماتی در ریشه‌های نابه‌جا در گیاهان تراریخت نسل T1 حاوی سامانه‌های ژنی DrsB1-CBD مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد روش‌ها

ضد عفونی و کشت بذرهاى تراریخت نسل T1: بذرهاى

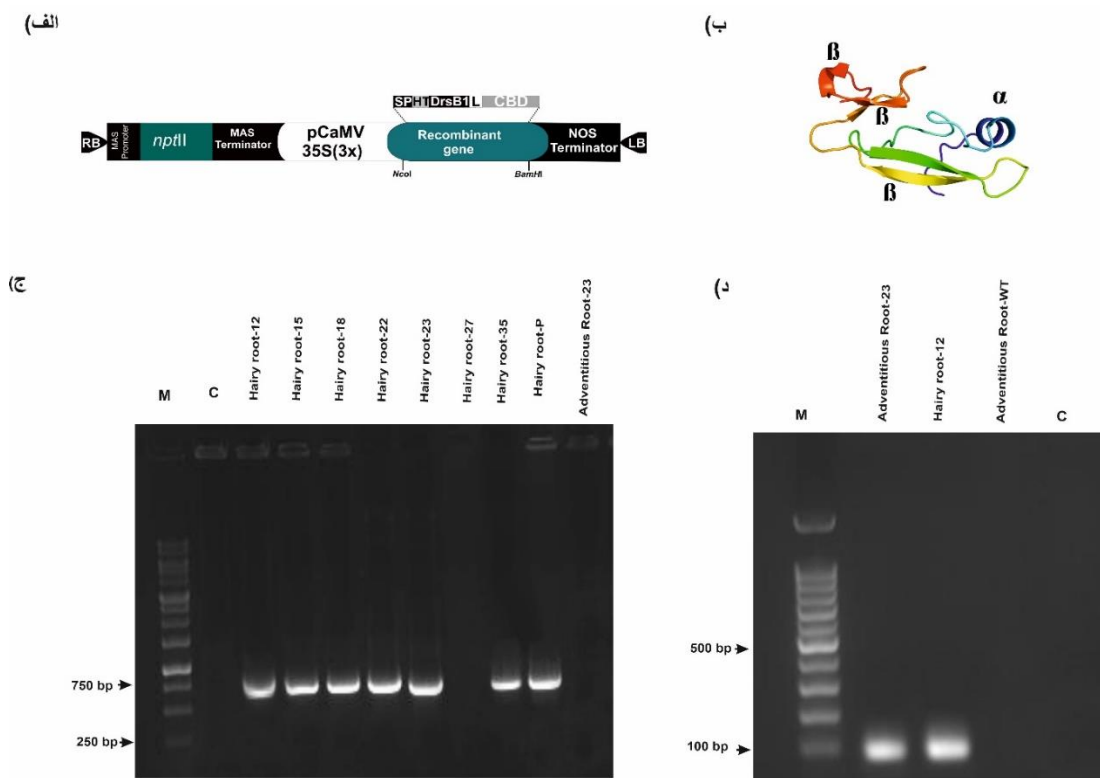
توتون نسل T1 حاوی سامانه ژنی DrsB1-CBDAvr4 (شکل ۱-الف) که حاصل پژوهش قبلی گروه تحقیقاتی حاضر (Khademi et al., 2021) می‌باشند، به مدت ۱۰ دقیقه در شوینده حاوی ۳۰۰ میکرولیتر هیپوکلریت سدیم ۵ درصد، ۶ میکرولیتر تریتون X ۱۰۰ و ۷۰۰ میکرولیتر آب استریل، ضد عفونی و سپس سه مرتبه با آب استریل شستشو شدند. بذرها به صورت فاصله‌دار بر روی محیط کشت MS (pH = ۵/۸) حاوی ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر آنتی‌بیوتیک کانامایسین و در شرایط نوری ۱۰۰۰ لوکس با ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در دمای ۲ ± ۲۴ درجه سانتی‌گراد در اتاق کشت نگهداری شدند.

تولید و القاء ریشه‌های نابه‌جا در گیاهان تراریخت نسل

T1 حاوی پپتید نوترکیب DrsB1-CBDAvr4: به منظور تولید ریشه‌های نابه‌جا از ریزنمونه برگی گیاه توتون تراریخت نسل T1 حاوی پپتید نوترکیب DrsB1-CBDAvr4 سه هفته‌ای استفاده شد. ریزنمونه به اندازه یک سانتی‌متر برش داده شد و در محیط MS شامل غلظت‌های مختلف NAA (a₁: ۰، a₂: ۰/۵ و a₃: ۱ میلی‌گرم بر لیتر) و

فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار اجرا شد و صفات وزن تر و خشک به همراه میزان پروتئین اندازه‌گیری شد. بررسی‌های آماری و تجزیه و تحلیل داده‌ها، با استفاده از نرم‌افزارهای SAS (نسخه ۹/۱) و MSTATC انجام شد.

محیط‌های MS (a₁: MS ۱/۴، a₂: MS ۱/۲ و a₃: MS) در محیط به صورت کشت جامد (۰/۶ درصد آگار) و مایع (بدون آگار) (b₁: جامد و b₂: مایع)، با هورمون NAA در غلظت‌های مختلف (c₁: ۰، c₂: ۰/۵ و c₃: ۱ میلی‌گرم بر لیتر) برای مدت یک ماه قرار داده شدند. آزمایش به صورت



شکل ۱-الف: سامانه ژنی بیان شده در گیاهان تراریخت T1. MAS Prp، پیشبر مانوپین ستاز، npt II: نو مایسین فسفو ترانسفرز II حاوی ژن مقاومت به کانامایسین، MAS-Ter: خاتمه دهنده مانوپین ستاز، CaMV35S: پیشبر موزاییک گل کلم توتون، CBD: توالی کدکننده دمین اتصال به کیتین پروتئین افکتور قارچ Avr4، SP: سیگنال پپتید، DrsB1: توالی کدکننده پپتید در ماسپتین B1، OSC: خاتمه دهنده اکتوپین ستاز؛ ب: ساختار سه بعدی پروتئین نو ترکیب با استفاده از نرم‌افزار phyre2؛ ج: آنالیز PCR ریشه‌های موین با استفاده از آغازگرهای ژن *roIC*؛ د: ادغام ژن DrsB1 با استفاده از آنالیز PCR از DNA ژنومی استخراج شده در ریشه‌های موین و نابه‌جا. M: نشانگر ۱۰۰ bp و ۱ kb، c: کنترل منفی (بدون DNA الگو)، Adventitious-wt: ریشه نابه‌جا حاصل از گیاه شاهد (گیاه توتون بدون سامانه ژنی)، Hairy root-P: ریشه‌های موین حاصل از پلاسمید Ri، Hairy root-12: ریشه موین تراریخت، Adventitious root-23: ریشه نابه‌جا تراریخت

Figure 1. a: Schematic representation of genetic constructs expressed in T1 transgenic plants. MAS promoter: Mannopine synthase promoter, npt II: Neomycin phosphotransferase II, MAS Ter: Mannopine synthase terminator, CaMV35S (3x) Cauliflower mosaic virus 35S promoter, CBD: Chitin binding domain from Avr4 effector protein, SP: Signal peptide, DrsB1: Dermaseptin B1 peptide, OSC: Octopine synthase terminator; b: The 3D structure of recombinant protein predicted by phyre2 software; c: PCR analysis for hairy roots using the *roIC* gene (629 bp) specific primer; d: Stable integration of the DrsB1 gene (100 bp) was determined by PCR analysis of genomic DNA extracted from transformed adventitious and hairy roots. M: 100 bp and 1 Kb DNA Marker, C: negative control, Adventitious-WT: DNA from wild-type adventitious root (not transgenic), Hairy root-P: Hairy root derived from Ri plasmid, Hairy root-12: transgenic hairy root, Adventitious root-23: transgenic adventitious root.

در دمای اتاق انکوبه شد، سپس پلیت شسته شد. حجم ۱۰۰ میکرولیتر از محلول سوبسترا در هر چاهک توزیع و پس از ایجاد رنگ، ۱۰۰ میکرولیتر محلول توقف به چاهک‌ها اضافه شد. میزان جذب (چگالی نوری) هر چاهک در طول موج ۴۵۰ نانومتر خوانده و محتوای DrsB1-CBDAvr4 به‌عنوان درصدی از پروتئین محلول خالص - سازی شده (TSP درصد) در نمونه گزارش شد. به‌منظور مقایسه میزان بیان پروتئین و مقایسه آماری تیمارهای مختلف از آزمون t-Student استفاده شد.

نتایج و بحث

پپتید نوترکیب DrsB1-CBDAvr4 به طول ۱۴۴ اسیدآمینه دارای دمین اتصال به کیتین از قارچ کلادوسپوریوم فلاوم (*Cladosporium fulvum*) است (شکل ۱-الف). این پپتید دارای اثرات ضد میکروبی قوی علیه بیمارگرهای گیاهی قارچی همچون فوزاریوم و *آلترناریا* است (Khademi *et al.*, 2021). بررسی ساختار سه‌بعدی پروتئین نوترکیب با ابزار Phyre2 نشان دهنده وجود ساختارهای متعدد مارپیچ آلفا و صفحات بتا بود که در پایداری و عملکرد این پپتید نوترکیب نقش مهمی دارد (شکل ۱-ب). با توجه به خصوصیات ذکر شده و برتری این پپتید نسبت به سایر پپتیدهای نوترکیب خانواده درماسپتین B1، در این تحقیق به بررسی و مقایسه تولید پروتئین نوترکیب در ریشه‌های مویین و نابه‌جا پرداخته شد.

از مجموع کل ریشه‌های مویین و نابه‌جا مورد استفاده، تعداد ۲۰ ریشه DNA ژنومی برای بررسی تأیید پپتید نوترکیب DrsB1-CBDAvr4 به‌همراه شاهد، استخراج شد. ابتدا واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *rolC* انجام شد که وجود باند مشخص از ژن *rolC* در ژنوم ریشه‌های مویین حاکی از تراریخت شدن ریزنمونه‌های نسل اول گیاهان حاوی سامانه ژنی DrsB1-CBDAvr4 را تأیید نمود (شکل ۱-ج). سپس در مرحله بعد با آزمون PCR با آغازگر اختصاصی DrsB1 حضور سامانه ژنی تأیید گردید. در ریشه‌های انتخابی بانوی به‌اندازه ۱۰۰bp به‌اندازه باند مورد نظر تکثیر شد، در حالی که

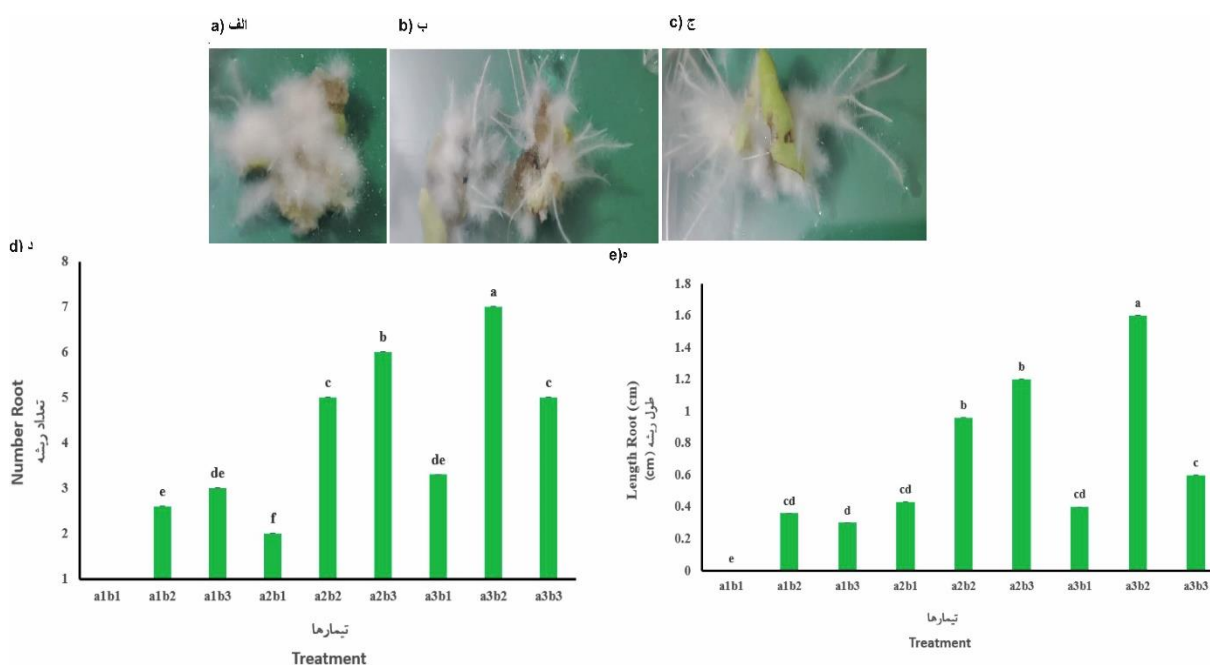
استخراج DNA ژنومی و تأیید تراریختی: به‌منظور تأیید حضور ژن پپتید نوترکیب درماسپتین B1 در نسل T1، DNA ژنومی از کلون‌های ریشه‌های مویین و نابه‌جا به روش CTAB استخراج شد و پس از تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراج شده، تکثیر با استفاده از آغازگر اختصاصی ژن کدکننده پپتید نوترکیب درماسپتین B1 (DrsB1 F: GCTAAGGCTATGTGGAAGGATG و DrsB1 R: ATTGAGAAATAGTATCAGCAACA) روی DNA ژنومی کلون‌های ریشه مویین و ریشه‌های نابه‌جا به‌عنوان رشته الگو انجام شد. همچنین به‌منظور تأیید حضور قطعه T-DNA پلاسمید Ri در ریشه‌های مویین از آغازگر ژن *rolC* (rolC F: CTCCTGACATCAAACTCGTC و rolC R: TGCTTCGAGTTATGGGTACA) برای واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) استفاده شد.

تعیین کمیت پپتید نوترکیب DrsB1-CBDAvr4 توسط ELISA: استخراج پروتئین با استفاده از روش استون و همکاران (۱۹۹۷) انجام شد (Stone and Gifford, 1997). غلظت پروتئین استخراج شده از ستون نیکل حاصل از ریشه‌ها به روش برادفورد و همکاران (Bradford, 1976) اندازه‌گیری شد.

سطوح بیان شده DrsB1-CBDAvr4 در پروتئین‌های استخراج شده از ریشه‌های مویین و نابه‌جا تازه توسط ELISA مستقیم با استفاده از آنتی‌بادی برچسب‌گذاری شده (anti-His Sigma-Aldrich, product No. A7058) ارزیابی شد. حجم ۵۰ میکرولیتر از پروتئین کل ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای پوشش صفحات پلی‌استایرن ۹۶ چاهک استفاده شد. پلیت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت یک‌شب انکوبه شد و سپس دو بار با ۲۰۰ میکرولیتر PBS-T (PBS 0.05% Tween-20) شسته شد و با ۲۰۰ میکرولیتر ۲ درصد PBS BSA (w/v) در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت یک‌شب مسدود شد. پس از حذف بافر مسدودکننده، چاهک‌ها شسته شدند. پلیت با ۱۰۰ میکرولیتر رقیق شده (۱:۱۰۰۰) آنتی‌بادی anti-His-tagged در PBS-T حاوی BSA (w/v) ۲ درصد به‌مدت ۲ ساعت

مقایسه میانگین اثر متقابل دو گانه NAA و IBA نشان داد که بیشترین میزان تعداد و طول ریشه نابه‌جا در محیط مایع با تیمار هورمونی ۱ میلی‌گرم بر لیتر از NAA در ترکیب با ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر از هورمون IBA به دست آمد (شکل ۲-د و ه)؛ بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که ترکیب دو هورمون در سطوح مورد نظر بیشترین تأثیر را در تولید و القای ریشه‌های نابه‌جا داشتند (شکل ۲-د و ه). همچنین، محیط بدون هورمون NAA و IBA تأثیری بر القای ریشه‌های نابه‌جا نداشت.

در ریشه گیاه شاهد (غیرتراریخت) هیچ قطعه‌ای با آغازگرهای اختصاصی پپتید نو ترکیب تکثیر نشد (شکل ۱-د). سه هفته پس از ظهور ریشه‌ها (شکل ۲-الف، ب و ج) داده‌های حاصل از میزان تعداد ریشه و طول ریشه‌های نابه‌جا بعد از آزمون نرمال بودن داده‌ها مورد تجزیه و تحلیل‌های آماری قرار گرفتند. نتایج حاصل از تجزیه واریانس این داده‌ها در جدول ۱ آورده شده‌اند. بررسی نتایج جدول تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثرات دوجانبه هورمون NAA × IBA بر روی صفات تعداد ریشه و طول ریشه اثر معنی‌داری ($P \leq 0.01$) داشتند.



شکل ۲- توسعه ریشه‌های نابه‌جا در محیط‌های مختلف مورد مطالعه. الف: محیط MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر از NAA؛ ب: محیط MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر از هر دو هورمون NAA و IBA؛ ج: محیط حاوی MS با میزان ۱ میلی‌گرم بر لیتر از NAA و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر از IBA، مقایسه میانگین اثر متقابل هورمون NAA و IBA؛ د: تعداد و ه: طول ریشه نابه‌جا. تیمارها NAA (a₁: 0، a₂: 0/5 و a₃: ۱ میلی‌گرم بر لیتر) و IBA (b₁: 0، b₂: 0/5 و b₃: ۱ میلی‌گرم بر لیتر). میانگین‌های با حداقل یک حرف مشترک باهم اختلاف معنی‌داری نداشتند. خطوط عمودی روی ستون‌ها نشان دهنده‌ی انحراف معیار است.

Figure 2. Development of adventitious roots in different media. a: MS medium supplemented with 0.5 mg/L NAA; b: MS medium supplemented with 0.5 mg/L of both NAA and IBA hormones; c: MS medium supplemented with 1 mg/L NAA and 0.5 mg/L IBA, Means comparison the of the interaction effect of NAA and IBA hormones on d: number and e: length of adventitious roots. NAA (a₁: 0, a₂: 0.5 and a₃: 1) and IBA (b₁: 0, b₂: 0.5 and b₃: 1) Treatment. Means with at least one common letter are not significantly different, the error bars indicate mean values \pm SD.

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر هورمون‌های NAA و IBA بر ریشه‌های نابه‌جا

Table 1. Analysis of variance of the effects of NAA and IBA hormones on adventitious roots

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی D.F	میانگین مربعات MS	
		تعداد ریشه Number of roots	طول ریشه Root length
نفتالین اسید استیک NAA	2	25.44**	1.29**
ایندول بوتیریک اسید IBA	2	27.11**	1.18**
× نفتالین اسید استیک ایندول بوتیریک اسید NAA × IBA	4	2.05**	0.39**
خطا Error	18	0.07	0.013
ضریب تغییرات (درصد) CV (%)		7.20	17.02

^{ns} و ^{**}: به ترتیب غیرمعنی‌دار، معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد.

^{ns} and ^{**}: Non-significant and significant at 1% probability level, respectively.

جدول ۲- تجزیه واریانس برخی صفات بر روی ریشه موئین تراریخت

Table 2. Analysis of variance of some traits in transgenic hairy roots

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی D.F	میانگین مربعات MS		
		تعداد ریشه Number root	طول ریشه Length root	غلظت پروتئین Protein concentration
منبع کربن Carbon source	3	14.05**	0.94**	14703.806**
ترکیب زمان تلقیح با نژاد باکتری Combination of inoculation time with bacterial strain	3	70.05**	2.09**	120181.806**
ترکیب زمان تلقیح با نژاد باکتری × منبع کربن Combination of inoculation time with bacterial strain × Carbon source	9	4.29**	0.11**	1339.898**
خطا Error	32	0.62	0.001	7.47
ضریب تغییرات (درصد) CV (%)		16.64	2.28	1.42

^{ns} و ^{**}: به ترتیب غیرمعنی‌دار، معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد.

^{ns} and ^{**}: Non-significant and significant at 1% probability level, respectively.

ترکیب منبع کربن که شامل ساکارز (۳ درصد و ۱ درصد) و گلوکز (۵ درصد و ۱ درصد) همراه با ترکیب سویه‌های آگروباکتریوم رایزوزنز ATCC15834 و A4 با زمان‌های تلقیح ۵ و ۱۰ دقیقه برای سه صفت مورد بررسی تفاوت بارزی را نشان دادند (شکل ۳-الف و ب). نتایج حاصل از تجزیه واریانس این داده‌ها در جدول ۲ ارائه شده است. بررسی نتایج جدول تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که ترکیب سویه با زمان تلقیح با نوع و درصد منبع کربن اثر معنی‌داری روی کارایی و القای ریشه موئین ($P \leq 0.01$) داشتند. نتایج حاصل از مقایسه میانگین اثر متقابل دوگانه ترکیب نوع و درصد منبع کربن در ترکیب سویه باکتری و زمان تلقیح با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۱ درصد بر روی صفت تعداد، طول ریشه و میزان پروتئین کل انجام شد (شکل ۳). بیشترین طول ریشه موئین در محیط کشت MS پایه با ۳ درصد

ترکیب منبع کربن که شامل ساکارز (۳ درصد و ۱ درصد) و گلوکز (۵ درصد و ۱ درصد) همراه با ترکیب سویه‌های آگروباکتریوم رایزوزنز ATCC15834 و A4 با زمان‌های تلقیح ۵ و ۱۰ دقیقه برای سه صفت مورد بررسی تفاوت بارزی را نشان دادند (شکل ۳-الف و ب). نتایج حاصل از تجزیه واریانس این داده‌ها در جدول ۲ ارائه شده است. بررسی نتایج جدول تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که ترکیب سویه با زمان

ساکارز که با سویه ATTC15834 با ۱۰ دقیقه تلقیح مشاهده شد. کمترین طول ریشه مویین در سویه A4 با مدت‌زمان ۵ دقیقه تلقیح ریزنمونه در محیط کشت MS با حداقل مقدار گلوکز به‌دست آمد (شکل ۳-ج و د). نتایج به‌دست آمده از این مطالعه نشان داد که بیشترین تعداد ریشه مویین برای سویه باکتری ATCC15834 در محیط کشت MS پایه با ساکارز ۳ درصد به میزان ۱۰/۵ عدد به‌دست آمده است، این در حالی بود که برای همین سویه در شرایط ذکر شده برای گلوکز ۱ درصد، تعداد متوسط ریشه مویین ۲ عدد بود. بررسی اثر عوامل مختلف کشت بر میزان تولید ریشه‌های مویین نشان داد که از ترکیب ساکارز با محیط‌های کشت MS در مقایسه با گلوکز می‌توان ریشه‌های مویین بیشتری تولید کرد. صرف‌نظر از نوع محیط کشت، ساکارز به‌عنوان منبع کربن در ترکیب محیط کشت نسبت به گلوکز اثر مطلوب‌تری بر رشد و تولید زیست‌توده ریشه‌های مویین تراریخت داشت.

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که ترکیب سویه با زمان با نوع منبع کربن اثر معنی‌داری ($P \leq 0.01$) روی غلظت پروتئین داشتند. همچنین نتایج بررسی غلظت پروتئین نشان دهنده غلظت پروتئین در محیط MS حاوی ساکارز ۳ درصد با سویه ATCC15834 افزایش یافت؛ در حالی که کمترین غلظت پروتئین در محیط MS حاوی ۱ درصد گلوکز صرف‌نظر از سویه باکتری مشاهده شد (شکل ۴). داده‌های حاصل از وزن‌تر و خشک ریشه‌های نابه‌جا بعد از یک ماه (شکل ۵-الف و ب) مورد تجزیه و تحلیل‌های آماری قرار گرفتند. نتایج حاصل از تجزیه واریانس این داده‌ها در جدول ۳ ارائه شده است. بررسی نتایج جدول تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثرات دوگانه نوع محیط کشت \times هورمون NAA و جامد و مایع بودن \times هورمون NAA در صفت وزن‌تر و اثرات دوگانه نوع محیط \times جامد و مایع بودن در صفت وزن خشک اختلاف معنی‌داری ($P \leq 0.01$) نشان دادند.

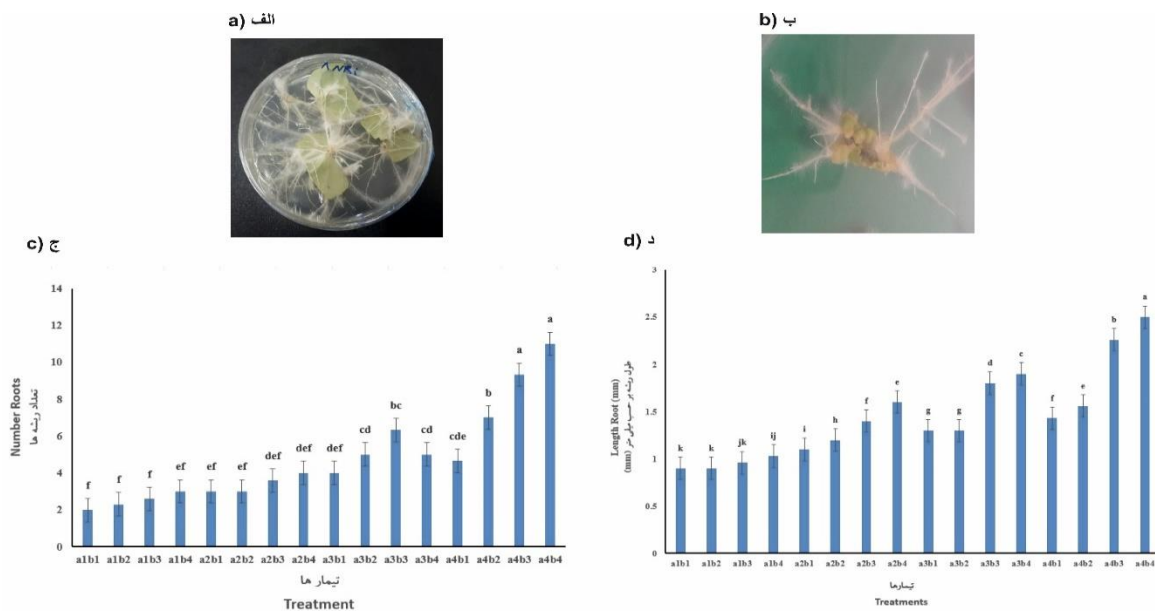
جدول ۳- تجزیه واریانس صفت زیست‌توده حاصل از ریشه‌های نابه‌جا

Table 3. Analysis of variance of biomass trait of adventitious roots

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی D.F	میانگین مربعات MS		
		وزن تر Fresh weight	وزن خشک Dry weight	غلظت پروتئین کل Protein concentration
محیط Media	2	10.40**	0.08**	5111.44**
جامد و مایع Liquid and solid cultures	1	4.22**	0.06**	1134.37**
محیط \times جامد و مایع Media \times liquid and solid culture	2	1.004**	0.02**	35.37 ^{ns}
هورمون NAA	2	3.93**	0.02**	2465.005**
محیط \times هورمون Media \times NAA	4	0.66**	0.002 ^{ns}	686.63**
جامد و مایع \times هورمون Liquid and solid culture \times NAA	2	0.31**	0.008 ^{ns}	14.042 ^{ns}
محیط \times جامد و مایع \times هورمون Media \times liquid and solid culture \times NAA	4	0.06 ^{ns}	0.003 ^{ns}	84.083**
خطا Error	36	0.15	0.003	13.62
ضریب تغییرات (درصد) CV (%)		29.74	24.18	4.6

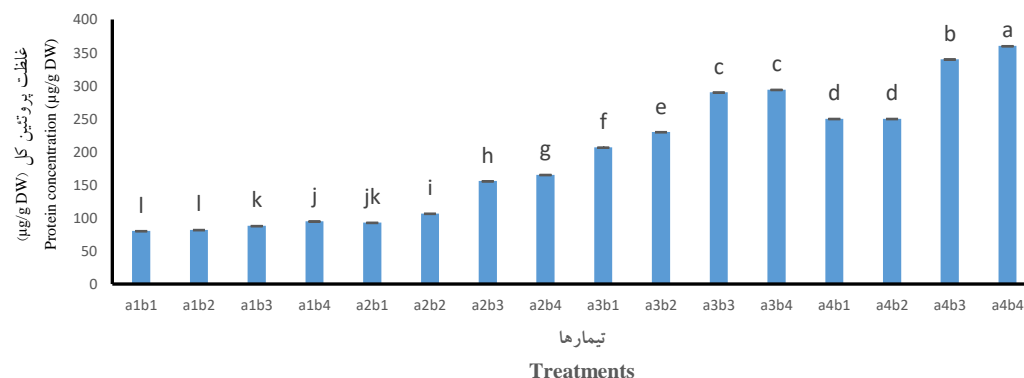
^{ns} و **: به ترتیب غیرمعنی‌دار، معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد.

^{ns} and **: Non-significant and significant at 1% probability level, respectively.



شکل ۳- تشکیل ریشه موئین در گیاهان تراریخت. الف: در محیط با ساکارز ۳ درصد تلقیح با باکتری ATTCC15834 زمان تلقیح ۱۰ دقیقه؛ ب: محیط با گلوکز ۵ درصد تلقیح با ATTCC15834 زمان تلقیح ۱۰ دقیقه، مقایسه میانگین اثرات متقابل نوع محیط، میزان غلظت NAA و جامد و مایع بودن محیط کشت روی صفت؛ ج: تعداد و د: طول ریشه، تیمارها شامل غلظت کربن (a₁: گلوکز ۱ درصد، a₂: گلوکز ۵ درصد، a₃: ساکارز ۱ درصد و a₄: ساکارز ۳ درصد) و ترکیب سویه با مدت زمان تلقیح باکتری (b₁: سویه باکتری A4 با تلقیح ۵ دقیقه، b₂: سویه باکتری A4 با تلقیح ۱۰ دقیقه، b₃: سویه باکتری ATTC با تلقیح ۵ دقیقه و b₄: سویه باکتری ATTC با تلقیح ۱۰ دقیقه). میانگین‌های با حداقل یک حرف مشترک باهم اختلاف معنی‌داری نداشتند. خطوط عمودی روی ستون‌ها نشان دهنده‌ی انحراف معیار است.

Figure 3. Hairy root formation in transgenic plants. a: MS medium supplement with 3% sucrose inoculated with ATTCC15834 bacterial inoculation time 10 minutes; b: MS medium supplement with 5% glucose inoculated with ATTCC15834 inoculation time 10 minutes, comparison of mean interactions of the medium, NAA concentration, solid and liquid of the culture medium on; c: Number and d: Root length on the trait. Treatments carbon source (a₁: Glucose 1%, a₂: Glucose 5%, a₃: sucrose 1% and a₄: source 3%) and combination of inoculation time with bacteria strain (b₁: A4 strain with 5 min inoculation, b₂: A4 strain with 10 min inoculation, b₃: ATTC strain with 5 min inoculation and b₄: ATTC strain with 10 min inoculation). Means with at least one common letter are not significantly different. Data represent mean value \pm SD



شکل ۴- مقایسه میانگین اثرات متقابل نوع محیط با نژاد باکتری \times منبع کربن بر روی غلظت پروتئین کل، میانگین‌های با حداقل یک حرف مشترک باهم اختلاف معنی‌داری نداشتند. تیمارها شامل غلظت کربن (a₁: گلوکز ۱ درصد، a₂: گلوکز ۵ درصد، a₃: ساکارز ۱ درصد و a₄: ساکارز ۳ درصد) و ترکیب سویه با مدت زمان تلقیح باکتری (b₁: سویه باکتری A4 با تلقیح ۵ دقیقه، b₂: سویه باکتری A4 با تلقیح ۱۰ دقیقه، b₃: سویه باکتری ATTC با تلقیح ۵ دقیقه و b₄: سویه باکتری ATTC با تلقیح ۱۰ دقیقه). میانگین‌های با حداقل یک حرف مشترک باهم اختلاف معنی‌داری نداشتند. خطوط عمودی روی ستون‌ها نشان دهنده‌ی انحراف معیار است.

Figure 4. Compare means of the interactions effect type of culture medium with bacterial strain \times Carbon source on total protein concentration. Treatments carbon source (a₁: Glucose 1%, a₂: Glucose 5%, a₃: sucrose 1% and a₄: source 3%) and combination of inoculation time with bacteria strain (b₁: A4 strain with 5 min inoculation, b₂: A4 strain with 10 min inoculation, b₃: ATTC strain with 5 min inoculation and b₄: ATTC strain with 10 min inoculation). Means with at least one common letter are not significantly different. Error bars represent mean value \pm SD.

بیشترین میزان زیست‌توده در محیط کشت MS مایع با میزان ۱ میلی‌گرم بر لیتر از هورمون NAA به‌دست آمد. همچنین، کمترین میزان وزن‌تر و خشک در محیط کشت‌های با میزان کمتری از غلظت هورمون NAA مشاهده شد. از نتایج بالا چنین استنباط می‌شود که بین تیمار (شکل ۵-ج و د) مورد مطالعه، نسبت بالای هورمون NAA نیز تأثیر بالایی روی میزان زیست‌توده داشت و با کاهش این نسبت، میزان وزن‌تر و خشک به‌تبع کاهش یافت. همچنین نتایج نشان داد که اثر متقابل سه‌گانه نوع محیط، جامد و مایع و میزان هورمون NAA بر میزان پروتئین کل ریشه‌های نابه‌جا معنی‌دار ($P \leq 0.01$) بود.

آنالیز ELISA جهت برآوردهای کمی از سطح پروتئین DrsB1-CBDAvr4 در ریشه‌های مویین تراریخت حاصل از تیمار با بالاترین غلظت پروتئین کل محلول و ریشه‌های مویین تراریخت حاصل از ترکیب تیماری محیط مایع با سطح MS کامل و میزان هورمون ۱ میلی‌گرم بر لیتر از هورمون NAA با بالاترین غلظت پروتئین کل محلول انجام شد (شکل ۷). همچنین کمیت پروتئین نو ترکیب ریشه‌های مویین با تیمارهای که کمترین غلظت پروتئین کل محلول با کمیت پروتئین نو ترکیب ریشه‌های نابه‌جا حاصل از تیمار MS ۱/۴ در محیط مایع بدون هورمون NAA با کمترین غلظت پروتئین کل محلول مقایسه شدند. نتایج این مقایسه، غلظت بهینه پروتئین محلول بارگذاری شده در چاهک‌های پلیت‌های میکرولیتر، سطوح پروتئین DrsB1-CBDAvr4 را ۴/۴۴ درصد TSP در ریشه‌های مویین تراریخت نشان داد که بالاتر (۳/۱۱ درصد) از سطح این پروتئین در ریشه‌های نابه‌جا بود (شکل ۷).

فن کشت ریشه‌های مویین القاشده به‌وسیله آگروباکتريوم ریزوژنز و ریشه‌های نابه‌جا توسط فیتوهورمون‌ها، به‌منظور افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه و تولید پروتئین‌های نو ترکیب در گیاهان، در دهه‌های اخیر توسعه فراوانی یافته است؛ بنابراین برای افزایش زیست‌توده نیاز است قبل از هر کاری شرایط را بهینه‌سازی کرد (Khademi et al., 2021).

در همین راستا مطالعات متعددی برای بهینه‌سازی کشت ریشه‌های مویین و ریشه‌های نابه‌جا انجام شده است. رودریگز و همکاران (۲۰۲۱) با استفاده از فن کشت ریشه‌های نابه‌جا به بررسی بهینه‌سازی برای تولید بیشتر ریشه و افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه پرداختند. در این مطالعه تیمارهای مختلفی از جمله میزان هورمون ایندول اسید استیک (IAA) (۳/۱-۰/۰ میلی‌گرم بر لیتر)، IBA (۳/۱-۰/۰ میلی‌گرم بر لیتر) و NAA (۲-۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر) به‌صورت منفرد یا ترکیبی از هورمون‌ها مورد استفاده قرار گرفت. نتایج این مطالعه نشان دهنده افزایش زیست‌توده در محیط حاوی NAA با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر و IBA با میزان ۰/۳ میلی‌گرم بر لیتر بعد از مدت ۶۰ روز به‌دست آمد. همچنین نتایج این مطالعه حاکی از تولید پایدار زیست‌توده و متابولیت 2H4MB در طی دو سال با استفاده از کشت ریشه‌های نابه‌جا برای مصارف در صنعت طعم‌دهنده‌ها و عطر بود (Rodrigues et al., 2021).

در مطالعه دیگر بر روی گیاه دارویی برگ سنا (*Helicteres angustifolia* L.) با استفاده از فن ریشه‌های نابه‌جا به بهینه‌سازی زیست‌توده و افزایش تولید متابولیت‌ها نسبت به ریشه‌های طبیعی پرداخته شد. در این مطالعه عواملی از جمله دماهای مختلف (۲۴، ۲۶، ۲۸ و ۳۰ درجه سانتی‌گراد) در تاریکی و میزان اسکوربیک اسید (۰-۰/۴ میلی‌گرم بر لیتر) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این مطالعه نشان دهنده افزایش تولید ریشه‌های نابه‌جا در محیط‌های حاوی MS با میزان NAA با غلظت ۳ میلی‌گرم بر لیتر و اسید اسکوربیک با غلظت ۰/۴ میلی‌گرم بر لیتر در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد با کارایی ۱۰۰ درصد بود. تعداد ریشه‌های نابه‌جا در این گیاه در هر ریزنمونه برگی 2 ± 15 با طول $0.52 \pm 1/7$ سانتی‌متر به‌دست آمد. میزان ترکیبات متابولیت نسبت به ریشه‌های معمولی در ترکیبات اسید گالیک $0.09 \pm 1/97$ میلی‌گرم بر گرم، کانکول 0.17 میلی‌گرم بر لیتر، اسید کافنیک 0.01 ± 0.34 میلی‌گرم بر لیتر و کورستین 0.02 ± 0.84 میلی‌گرم بر لیتر مشاهده شد (Yang et al., 2019).

یافت. همچنین بررسی میزان پروتئین نوترکیب تولید شده در ریشه نابه‌جا در محیط کشت‌های مختلف نشان داد که غلظت پروتئین تولید شده در محیط با میزان بالای NAA اختلاف معنی‌داری با غلظت پروتئین تولید شده در محیط‌های فاقد هورمون NAA داشت. به نظر می‌رسد که تأثیر اکسین روی رشد و با افزایش تقسیم سلولی و افزایش تعداد سلول‌ها و تشکیل بیشتر توده‌های سلولی بود، افزایش معنی‌دار میزان پروتئین نیز در این تیمارها بیشتر نسبت به سایرین بوده است.

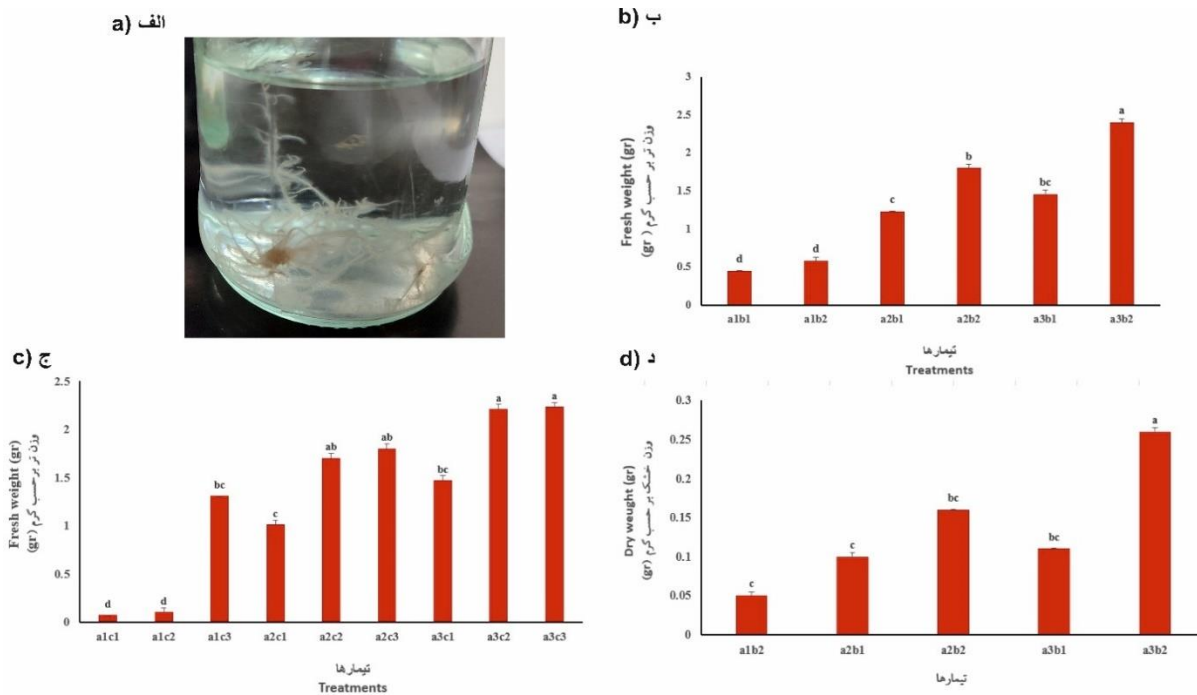
گیاه باجی (*Psoralea corylifolia*) یک گیاه دارویی در حال انقراض است؛ که دارای متابولیت‌های ارزشمندی است. برای بررسی تولید متابولیت پَسورالا از ریزنمونه هیپوکوتیل برای القا و تولید ریشه‌های موئین و نابه‌جا استفاده شد و میزان تولید پَسورالا در هر دو ریشه مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که میزان پَسورالا در ریشه موئین در حدود ۳ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک به‌مراتب بیشتر از ریشه‌های نابه‌جا بود. در این مطالعه نیز به بررسی سطوح پروتئین تولید شده در ریشه‌های موئین و نابه‌جا با استفاده از روش ELISA پرداخته شد که سطوح پروتئین تولید شده در ریشه‌های موئین به‌مراتب بیشتر از ریشه‌های نابه‌جا بود؛ اما از نکات قابل توجه در این مطالعه استفاده از هورمون اکسین برای افزایش تولید پروتئین نوترکیب بود که با افزایش این هورمون تأثیر مثبتی روی روند رشد و میزان پروتئین در ریشه‌های نابه‌جا به‌دست آمد.

همچنین در این مطالعه عواملی از جمله ترکیب منبع کربن (ساکارز و گلوکز با درصد متفاوت) و نوع سویه ترکیب با مدت‌زمان تلقیح برای تولید و القا ریشه موئین مورد مطالعه قرار گرفت. با توجه به اثر متقابل گیاه و سویه باکتری رایزوزنز و نقش اساسی آن در القای ریشه موئین در این تحقیق از دو سویه ATCC15834 و A4 برای بررسی القای ریشه موئین استفاده شد که این سویه‌ها هرکدام عملکرد متفاوتی نشان دادند. به‌طوری که سویه ATCC15834 از کارایی بالایی در این گیاه برخوردار بود ولی سویه A4 از این نظر کارایی پایین‌تری نشان داد.

تاکنون مطالعات گسترده‌ای جهت بهینه‌سازی شرایط تحریک رشد ریشه موئین در گیاهان صورت گرفته است که این امر در مطالعات مربوط به ریشه‌های نابه‌جا به نسبت کمتر بوده است؛ بنابراین در این مطالعه، ابتدا به بررسی تأثیر هورمون‌های اکسین از جمله NAA و IBA در غلظت‌های مختلف جهت القاء و تولید ریشه‌های نابه‌جا پرداخته شد. نتایج نشان دهنده افزایش تولید و القاء ریشه نابه‌جا با تعداد ۷ ریشه و طول ۱/۵ سانتی‌متر بود. این یافته‌ها نشان می‌دهد که ترکیب هورمون‌های NAA و IBA نقش مؤثری در تحریک ریشه نابه‌جا و فراوانی آن‌ها دارد و کاهش این نسبت در کمترین میزان باعث عدم تولید ریشه شده است. نتایج ما با یافته‌های سیونسن و همکاران (Sivanesan and Jeong, 2009) در رابطه با کاربرد هورمون‌های اکسین بر افزایش تعداد ریشه موئین (۱۹ عدد) بر گیاه علف سربی (*Plumbago zeylanica*) مطابقت داشت.

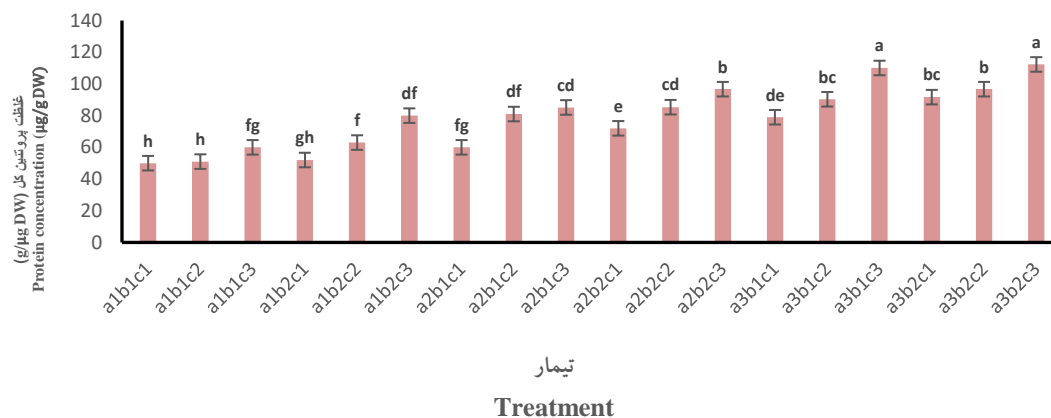
نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که در غلظت‌های مساوی از هر دو هورمون NAA و IBA تولید کالوس بیشتری مشاهده شد؛ به‌صورتی که در غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر از هر دو هورمون کالوس سفیدتر و در غلظت با میزان ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر کالوس‌های تیره مشاهده شد. همچنین در غلظت‌های ۱ میلی‌گرم بر لیتر از هورمون NAA و همچنین در محیط‌های با میزان ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر از IBA باززایی گیاهچه از کالوس‌ها مشاهده شد (شکل ۸).

همچنین در آزمایش دیگری در این مطالعه به بررسی زیست-توده حاصل از ریشه‌های نابه‌جا در محیط‌های مختلف (MS، ۱/۴ MS، ۱/۲ MS و MS) جامد و مایع با غلظت‌های هورمون NAA (۰، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر) مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه بیشترین میزان زیست‌توده با ۳/۷ و ۰/۴۵ گرم وزن تر و وزن خشک به‌ترتیب به‌دست آمد و میزان بالای NAA تأثیری معنی‌داری روی زیست‌توده با افزایش رشد ریشه داشت. افزایش میزان NAA در کنار سایر عوامل مانند محیط MS مایع باعث افزایش طول ریشه موئین نسبت به شاهد شد و با کم شدن غلظت این مواد تعداد ریشه و طول ریشه کاهش



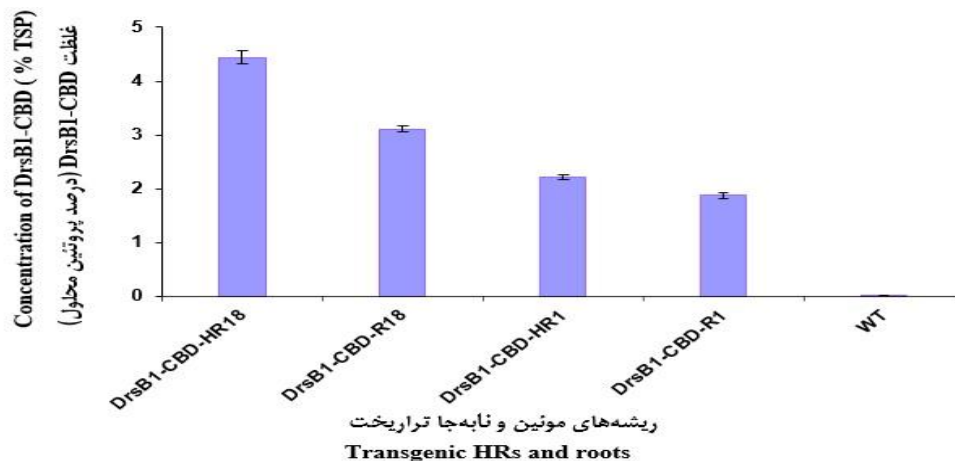
شکل ۵- توسعه ریشه های نابه جا در گیاهان تراریخت. الف: در محیط مایع؛ ب: مقایسه میانگین اثرات متقابل نوع محیط × محیط جامد و مایع روی وزن تر؛ ج و د: مقایسه میانگین اثرات متقابل نوع محیط × غلظت های مختلف هورمون NAA روی وزن تر و خشک، تیمار محیط های MS (a₁: 1/4 MS، a₂: 1/2 MS و a₃: MS) در محیط به صورت کشت جامد (1/6 درصد آگار) و مایع (بدون آگار) (b₁: جامد و b₂: مایع) و با هورمون NAA با غلظت های مختلف (c₁: 0، c₂: 0.5 و c₃: 1 میلی گرم بر لیتر). میانگین های با حداقل یک حرف مشترک باهم اختلاف معنی داری نداشتند. خطوط عمودی روی ستون ها نشان دهنده ی انحراف معیار است.

Figure 5. Development of adventitious roots in transgenic plants. a: in the liquid medium; b: Means Comparison of the effect of type of culture media × solid and liquid culture on fresh weight; c and d: Means Comparison of the effect of type of culture media supplement NAA on the fresh and dry weight. Treatment MS media (a₁: 1/4 MS, a₂: 1/2 MS and a₃: MS), type of media (b₁: solid culture and b₂: liquid culture), and NAA (c₁: 0, c₂: 0.5 and c₃: 1 mg/L). Means with at least one common letter are not significantly different. Error bars represent mean value ± SD.



شکل ۶- مقایسه میانگین اثرات متقابل نوع محیط × جامد و مایع بودن × غلظت های مختلف هورمون NAA بر روی غلظت پروتئین کل، خطوط عمودی روی ستون ها نشان دهنده ی انحراف معیار است. تیمار محیط های MS (a₁: 1/4 MS، a₂: 1/2 MS و a₃: MS) در محیط به صورت کشت جامد (1/6 درصد آگار) و مایع (بدون آگار) (b₁: جامد و b₂: مایع) و با هورمون NAA با غلظت های مختلف (c₁: 0، c₂: 0.5 و c₃: 1 میلی گرم بر لیتر). میانگین های با حداقل یک حرف مشترک باهم اختلاف معنی داری نداشتند.

Figure 6. Means Comparison of the effect of media × solid and liquid culture × different concentrations of NAA hormone on total protein concentration. MS media (a₁: 1/4 MS, a₂: 1/2 MS and a₃: MS), type of medium (b₁: solid culture and b₂: liquid culture), and NAA (c₁: 0, c₂: 0.5 and c₃: 1 mg/L). Means with at least one common letter are not significantly different error bars represent mean value ± SD.



شکل ۷- نتایج آنالیز ELISA غلظت پروتئین نو ترکیب DrsB1-CBD_{Avr4} در ریشه‌های موئین و نابه‌جا سه هفته‌ای حاصل از ترکیب تیماری با بالاترین و پایین‌ترین غلظت پروتئین کل به صورت درصد پروتئین کل محلول (% TPS) نشان داده شده است. DrsB1-CBD- HR18 و DrsB1-CBD-HR1: ریشه‌های موئین به ترتیب با بالاترین و پایین‌ترین غلظت پروتئین کل، DrsB1-CBD-R18 و DrsB1-CBD-R1: ریشه‌های نابه‌جا به ترتیب با بالاترین و پایین‌ترین غلظت پروتئین کل، WT: ریشه نابه‌جا غیر تراریخت. بارها نشان دهنده $\text{mean} \pm \text{SE}$ هستند. آزمون t-Students برای تجزیه و تحلیل معنی‌داری اختلاف‌ها انجام شد، $N=3$ ، مقدار $P \leq 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شده است. کمیت پروتئین بیان شده در ریشه‌های موئین و ریشه‌های نابه‌جا با بالاترین (DrsB1-CBD-HR18 و DrsB1-CBD-R18) و پایین‌ترین (DrsB1-CBD-HR1 و DrsB1-CBD-R1) غلظت پروتئین کل به صورت جداگانه مقایسه شدند.

Figure 7. The results of ELISA analysis of the highest and lowest total protein concentration of DrsB1-CBD_{Avr4} recombinant protein expressed in three-week-old hairy and adventitious roots are shown as the percentage of total soluble protein (TPS%). DrsB1-CBD-HR18, DrsB1-CBD-HR1: Hairy roots with the highest and lowest total protein concentrations, respectively, DrsB1-CBD-R18, DrsB1-CBD-R1: Adventitious roots with the highest and lowest total protein concentrations, respectively, WT: Non-transgenic adventitious root. Error bars represent mean \pm SE. The Student's t test was performed to analyze the significance of differences, $N = 3$, the value of $P \leq 0.05$ is considered as significant. The amount of protein expressed in hairy roots and adventitious roots were compared separately with the highest (DrsB1-CBD-HR18 and DrsB1-CBD-R18) and lowest (DrsB1-CBD-HR1 and DrsB1-CBD-R1) total protein concentrations.



شکل ۸- اثرات هورمون‌های NAA و IBA در تشکیل ریشه‌های نابه‌جا. الف: در محیط حاوی ۱ میلی‌گرم بر لیتر از NAA و IBA؛ ب: تشکیل کالوس‌های سفید در محیط MS حاوی ۱ میلی‌گرم بر لیتر از NAA و IBA؛ ج: تولید کالوس‌های تیره و سفت در محیط حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر از هورمون NAA؛ د: باززایی گیاهیچه در محیط حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر از IBA.

Figure 8. Effects of exogenous NAA and IBA on Adventitious root formation. a: in medium supplemented with 1 mg/L of NAA and IBA; b: Formation of white calli in MS medium supplemented with 1 mg/L of NAA and IBA; c: Production of dark and hard calli in MS medium supplemented with 0.5 mg/L of NAA hormone; d: plant regeneration in media supplemented with 0.5 mg/L of IBA.

است به دلیل نقش ساکارز در تنظیم پیشبر *rolC* باشد. پیشبر *rolC* توسط ساکارز و پرموتر *rolB* توسط IAA تنظیم می‌شوند. تأمین ساکارز محیط رشد باعث تنظیم پیشبر *rolC* و به تبع آن تحریک القاء تشکیل و استقرار ریشه مویین و افزایش در میزان زیست توده می‌شود (Ziemiencowicz *et al.*, 2008).

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که تغییر در هر یک از این ترکیبات محیط کشت می‌تواند در رشد ریشه مویین و ریشه‌های نابه‌جا، افزایش زیست توده و بازده تولید مؤثر باشد. همچنین از ریشه‌های نابه‌جا می‌توان به عنوان بیوراکتورها در تولید پروتئین‌های نو ترکیب دارویی استفاده کرد. تاکنون در هیچ منبع علمی به مقایسه القاء و تولید ریشه مویین و نابه‌جا در گیاهان تراریخت به منظور بررسی تولید زیست توده و بررسی بیان پروتئین نو ترکیب پرداخته نشده است و این تحقیق برای اولین بار به این موضوع پرداخته است.

سپاسگزاری

هزینه‌های اجرای این تحقیق از محل طرح پژوهشی درون دانشگاهی توسط دانشگاه لرستان تأمین شده است.

در یک مطالعه به منظور بررسی تحریک ریشه‌های مویین در بین گونه‌های مختلف از گیاه بنگ (*Haworthia arachnoidea*) اثر سویه مختلف باکتری رایزوزنز از جمله LBA9402، A4، ATCC15834، ۲۶۵۹ و ۱۷۲۴ مورد ارزیابی قرار گرفت که نتایج آن نشان داد که بالاترین میزان تولید ریشه مویین در سویه ATCC15834 و کمترین درصد برای سویه A4 به دست آمد؛ بنابراین انتخاب یک سویه آگروباکتریوم رایزوزنز به گونه گیاه وابسته است و می‌تواند تأثیر مطلوبی روی تولید و القا ریشه‌های مویین داشته باشد (Akramian *et al.*, 2008). همچنین استفاده از منبع کربن متفاوت ساکارز و گلوکز با ۱ درصد و ۵ درصد در کنار سویه باکتری مورد بررسی قرار گرفت که نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که رشد در محیط حاوی گلوکز به طور معنی داری در مقایسه با محیط ساکارز ۳ درصد کم تر بود. ترکیب ساکارز ۳ درصد با سویه ATCC15834 نسبت به محیط حاوی گلوکز ۱ درصد با سویه A4 در تولید تعداد و طول ریشه اثر مطلوب تری داشت. ارجحیت ساکارز نسبت به گلوکز به عنوان منبع کربن در تعداد ریشه ممکن

References

- Akramian, M., Tabatabaei, S.M.F. and Mirmasoumi, M. (2008). Virulence of different strains of *Agrobacterium rhizogenes* on genetic transformation of four *Hyoscyamus* species. *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences*, **3**: 759-763.
- 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.
- Carvalho, E.B. and Curtis, W.R. (1998). Characterization of fluid-flow resistance in root cultures with a convective flow tubular bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, **60**: 375-384.
- Chilton, M.D., Tepfer, D.A., Petit, A., David, C., Casse-Delbart, F. and Tempé, J. (1982). *Agrobacterium rhizogenes* inserts T-DNA into the genomes of the host plant root cells. *Nature*, **295**: 432-434.
- Choi, S.M., Son, S.H., Yun, S.R., Kwon, O.W., Seon, J.H. and Paek, K.Y. (2000). Pilot-scale culture of adventitious roots of ginseng in a bioreactor system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **62**: 187-193.
- Christey, M.C. and Braun, R.H. (2005). Production of hairy root cultures and transgenic plants by *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation. *Transgenic Plants: Methods and Protocols*. Humana Press Publisher, Totowa, New Jersey, USA.
- Dashchi, S., Rahnema, H., Cheghamirza, K. and Zamani, K. (2021). Construction of plant expression vectors harboring WR11 and LPAAT genes and Its transformation in tobacco plants. *Plant Genetic Researches*, **7(2)**: 41-54 (In Persian).
- Gaosheng, H. and Jingming, J. (2012). Production of useful secondary metabolites through regulation of biosynthetic pathway in cell and tissue suspension culture of medicinal plants. *Recent Advances in Plant In vitro Culture*, **10**: 53038.

- Giri, A. and Narasu, M.L.** (2000). Transgenic hairy roots recent trends and applications. *Biotechnology Advances*, **18**: 1-22.
- Hussain, M.J., Abbas, Y., Nazli, N., Fatima, S., Drouet, S., Hano, C. and Abbasi, B.H.** (2022). Root Cultures, a Boon for the Production of Valuable Compounds: A Comparative Review. *Plants*, **11**: 439.
- Kevers, C., Jacques, P., Thonart, P. and Gaspar, T.** (1999). In vitro root cultures of *Panax ginseng* and *P. quinquefolium*. *Plant Growth Regulation*, **27**: 173-179.
- Khademi, M., Nazarian-Firouzabadi, F. and Ismaili, A.** (2021). The effect of phosphorus and nitrogen on hairy roots production in *Nicotiana glauca* as a model plant. *Journal of Plant Productions*, **44**: 13-24.
- Khademi, M., Varasteh-Shams, M., Nazarian-Firouzabadi, F. and Ismaili, A.** (2020). New Recombinant Antimicrobial Peptides Confer Resistance to Fungal Pathogens in Tobacco Plants. *Frontiers in Plant Science*, **11**: 1236.
- Khademi, M. and Nazarian-Firouzabadi, F.** (2019). Expression and antimicrobial activity analysis of dermaseptin B1 recombinant peptides in tobacco transgenic plants. *Plant Genetic Researches*, **6(1)**: 139-150 (In Persian).
- Mor, A., Hani, K. and Nicolas, P.** (1994). The vertebrate peptide antibiotics dermaseptins have overlapping structural features but target specific microorganisms. *Journal of Biological Chemistry*, **269**: 31635-31641.
- Mor, A. and Nicolas, P.** (1994). The NH₂-terminal alpha-helical domain 1-18 of dermaseptin is responsible for antimicrobial activity. *Journal of Biological Chemistry*, **269**: 1934-1939.
- Osusky, M., Osuska, L., Kay, W. and Misra, S.** (2005). Genetic modification of potato against microbial diseases: in vitro and in planta activity of a dermaseptin B1 derivative, MsrA2. *Theoretical and Applied Genetics*, **111**: 711-722.
- Pop, T.I., Pamfil, D. and Bellini, C.** (2011). Auxin control in the formation of adventitious roots. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, **39**: 307-316.
- Rahmat, E. and Kang, Y.** (2019). Adventitious root culture for secondary metabolite production in medicinal plants: a review. *Journal of Plant Biotechnology*, **46**: 143-157.
- Rodrigues, V., Kumar, A., Prabhu, K.N., Pragadheesh, V., Shukla, A.K. and Sundaresan, V.** (2021). Adventitious root cultures of *Decalepis salicifolia* for the production of 2-hydroxy-4-methoxybenzaldehyde, a vanillin isomer flavor metabolite. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **105**: 3087-3099.
- Shanmugaraj, B., I Bulaon, C.J. and Phoolcharoen, W.** (2020). Plant molecular farming: A viable platform for recombinant biopharmaceutical production. *Plants*, **9**: 842.
- Sivanesan, I. and Jeong, B.R.** (2009). Induction and establishment of adventitious and hairy root cultures of *Plumbago zeylanica* L. *African Journal of Biotechnology*, **8(20)**: 5294-5300.
- 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.
- Sudha, G. and Ravishankar, G.** (2002). Involvement and interaction of various signaling compounds on the plant metabolic events during defense response, resistance to stress factors, formation of secondary metabolites and their molecular aspects. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **71**: 181-212.
- Yang, X., Zhang, J., Lei, Z., Yan, X., Hu, X., Cheng, D. and Zhang, Z.** (2019). Adventitious root cultures from leaf explants of *Helicteres angustifolia* L. as a novel source for production of natural bioactive compounds. *Acta Physiologiae Plantarum*, **41**: 1-10.
- 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.
- Ziemienowicz, A., Tzfira, T. and Hohn, B.** (2008) *Mechanisms of T-DNA integration in Agrobacterium: from Biology to Biotechnology*. Springer, Berlin, DE.

Induction of DrsB1-CBD_{Avr4} Recombinant Protein in Hairy and Adventitious Roots of T1 Transgenic Plants

Mitra Khademi¹, Marziyeh Varasteh-Shams¹ and Farhad Nazarian-Firouzabadi^{2,*}

1- Ph.D., Production Engineering and Plant Genetics Department, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran

2- Professor, Production Engineering and Plant Genetics Department, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran

(Received: May 17, 2022 – Accepted: August 13, 2022)

Abstract

Hairy and adventitious roots are efficient systems for expressing recombinant proteins. In the present study, the amount of DrsB1-CBD_{Avr4} recombinant protein in hairy and adventitious root systems was compared. To this end, the effect of different factors on the optimization of culture conditions to obtain adventitious and hairy roots was evaluated in three separate experiments by assessment of biomass production in T1 transgenic plants expressing DrsB1-CBD_{Avr4} recombinant protein. The efficacy of *Agrobacterium rhizogenes* in producing hairy roots was ensured using *rolC* gene specific primers. The insertion of DrsB1-CBD_{Avr4} recombinant peptide transgene in the genome of hairy and adventitious roots was confirmed by PCR analysis. Also, the level of DrsB1-CBD_{Avr4} protein was measured in hairy and adventitious roots by ELISA analysis. Analysis of the variance of data showed that the highest number of roots and the longest roots were obtained in MS media supplemented with 1 mg/L NAA and 0.5 mg/L IBA. The results of adventitious root biomass showed that liquid MS medium containing 1 mg/L of NAA hormone had a significant effect ($P < 0.01$) on biomass production. More biomass was obtained in MS medium supplemented with 1mg/L NAA, whereas a lower fresh and dry weight was obtained in a 1/4 MS medium with no NAA. The results also showed that ATCC15834 strain with MS media supplemented with 3% sucrose, 10 minutes inoculation time was high efficiency to induce hairy roots in tobacco plants. The results of ELISA analysis showed that clones obtained from both roots showed a significant difference in terms of total protein content. The amount of recombinant protein from hairy roots was much higher than that of adventitious roots.

Keywords: Recombinant peptides, Growth regulator, Hairy root, Adventitious root, Biomass

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