

القا بیان پروتئین نوترکیب DrsB1-CBD_{Avr4} در ریشه‌های موئین 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 موئین و نابه‌جا برای بیان پروتئین‌های نوترکیب کارآمد هستند. در مطالعه حاضر به بررسی مقایسه میزان پروتئین نوترکیب DrsB1-CBD_{Avr4} در ریشه‌های موئین و نابه‌جا پرداخته شد. برای این منظور ابتدا، تأثیر عوامل مختلف بر بهینه‌سازی شرایط کشت برای تولید ریشه‌هایی نابه‌جا و موئین 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 رایزوزنز* و با آغازگرهای اختصاصی ژن *rolC* تأیید شد. همچنین با استفاده از PCR، ورود ژن‌های پیپتید نوترکیب در ماسپتین B1 در ژنوم کلون‌های ریشه-های موئین و نابه‌جا اثبات شد. سطح پروتئین نوترکیب با استفاده از آنالیز ELISA عصاره‌های کلون ریشه‌های موئین 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 به‌دست 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 به‌دست آمد و کمترین وزن‌تر و خشک در محیط MS ۱/۴ بدون هورمون NAA به‌دست 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 موئین در گیاه تراریخت بود. نتایج ELISA نشان داد که کلون‌های به‌دست آمده از هر دو ریشه تفاوت معنی‌داری از نظر میزان غلظت پروتئین کل نشان دادند. میزان پروتئین نوترکیب حاصل از کلون‌های ریشه موئین به‌مراتب بیشتر از پروتئین ریشه نابه‌جا بود.

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

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

مقدمه

پیشرفت های اخیر در زیست فناوری، استفاده از بیوراکتورهای گیاهی را به عنوان سیستمی جالب توجه در تولید تجاری پپتیدها، پروتئین ها و ترکیبات دارویی مطرح ساخته است. بیان بالای محصول و انباشت و همچنین بازیافت آن، نیازمند بررسی دقیق ویژگی های محصول و به کارگیری 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. سیستم های مختلف بیانی مبتنی بر گیاه از کشت سلول یا بافت تا گیاهان تراریخت ابزارهای مفیدی را در دستیابی به این هدف ارائه نموده اند (Shanmugaraj et al., 2020). این سیستم ها با هدف تولید پپتیدها و پروتئین ها، مقرون به صرفه هستند و پتانسیل بالایی در تولید با مقیاس بالا را دارند و از این جهت که موانع سایر سیستم های بیان زیستی در استفاده از آنها تعدیل شده است به سیستم امیدبخشی در تولید پروتئین های نو ترکیب تبدیل شده اند (Shanmugaraj et al., 2020). با این حال، یکی از بزرگ ترین چالش ها در این زمینه، ناپایداری ژنتیکی، رشد کم و بازده پایین کشت سلول های گیاهی است. در میان فنون مختلف کشت بافت، کشت ریشه های موین و نابه جا از قابلیت بالایی برای تولید پروتئین های نو ترکیب برخوردار هستند (Hussain et al., 2022).

اگر باکتریوم ریزوژنز (*Agrobacterium rhizogenes*) جز باکتری های گرم منفی بوده و عموماً گیاهان دولپه ای و گاهی گیاهان تک لپه ای را آلوده می کند و منجر به تشکیل ریشه های موین می شود (Christey and Braun, 2005). سلول های ریشه های موین حامل قطعه ی T-DNA پلاسمید Ri در درون ژنوم هسته ای خود می باشند. عوامل متعددی در فرآیند تراریخت کردن گیاهان با اگر باکتریوم ریزوژنز مؤثر است. این عوامل شامل ژنوتیپ، سن ریزنمونه ی گیاهی، نوع و ترکیبات محیط کشت می باشند (Chilton et al., 1982). ریشه های موین توانایی بی نظیری در رشد در شرایط درون شیشه ای در غیاب تنظیم کننده های رشد گیاهی را دارند.

از این ویژگی رشدی می توان برای تولید متابولیت های گیاهی و پروتئین نو ترکیب استفاده کرد (Giri and Narasu, 2000). همانند ریشه های موین، ریشه های نابه جا نیز دارای کاربرد مشابهی هستند. تشکیل ریشه های نابه جا به عواملی درونی به ویژه تنظیم سطح هورمون ها بستگی دارد (Pop et al., 2011). در میان هورمون ها، اکسین ها و اتیلن نقش مهمی در تولید ریشه های نابه جا در اکثر گیاهان ایفا می کنند (Pop et al., 2011; Rahmat and Kang, 2019).

مطالعات اخیر در زمینه ریشه های نابه جا نشان دهنده رشد سریع و بهره وری پایدار متابولیت ها، تکثیر سریع و پتانسیل تجمع و تولید ترکیبات زیست فعال بوده است (Carvalho and Curtis, 1998; Kevers et al., 1999; Sudha and Ravishankar, 2002). استفاده از ریشه های نابه جا در مقابل ریشه های موین به دلیل عدم وجود سوبستراهای شبیه اوپین و محصولات جانبی و مضر برای سلول های پستانداران، کاهش هزینه های خالص سازی به عنوان روشی ساده تر و ایمن تر تبدیل شده است. از این رو، کشت در شرایط آزمایشگاهی ریشه های نابه جا این پتانسیل را دارد که به عنوان یک استراتژی برای تولید ترکیبات زیست فعال 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 درماسپتین ها 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 سانتی گراد 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/اگر باکتریوم رازیوژنز: جهت القای ریشه موئین در گیاه تراریخت -DrsB1-CBD4Avr4، از دو سویه *اگر باکتریوم رازیوژنز* شامل ATCC15834 و A4 استفاده شد. باکتری‌های رازیوژنز در محیط کشت LB مایع حاوی ۵۰ میلی گرم بر لیتر از آنتی‌بیوتیک ریفامپیسین در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد 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 سانتی گراد 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 سانتی متری برش داده شدند (Dashchi et al., 2021)، سپس به درون مایع تلقیح حاوی *اگر باکتریوم رازیوژنز* منتقل و ۵ تا ۱۰ دقیقه تکان داده شدند. پس از آبیگری برگ‌های آلوده بر روی کاغذ صافی، ریزنمونه‌ها روی محیط کشت MS بدون هورمون و آنتی‌بیوتیک به مدت ۳ روز در شرایط تاریکی در دمای ۲۴ ± ۲ درجه سانتی گراد 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 مدت زمان‌های ۵ و ۱۰ دقیقه تلقیح و سویه باکتری ATCC15834 با مدت زمان‌های 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 نو ترکیب DrsB1-CBD4Avr4: برای تولید زیست‌توده ریشه‌های نابه‌جا به طول ۵ سانتی متر (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 نو ترکیب در گیاهان تراریخت نسل T1 از پپتید نو ترکیب DrsB1-CBD4Avr4 در ریشه موئین و نابه‌جا در منابع دیده نشده است. در این مطالعه برای اولین بار و با هدف تولید و القاء ریشه موئین 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-CBD4 مورد ارزیابی قرار گرفت.

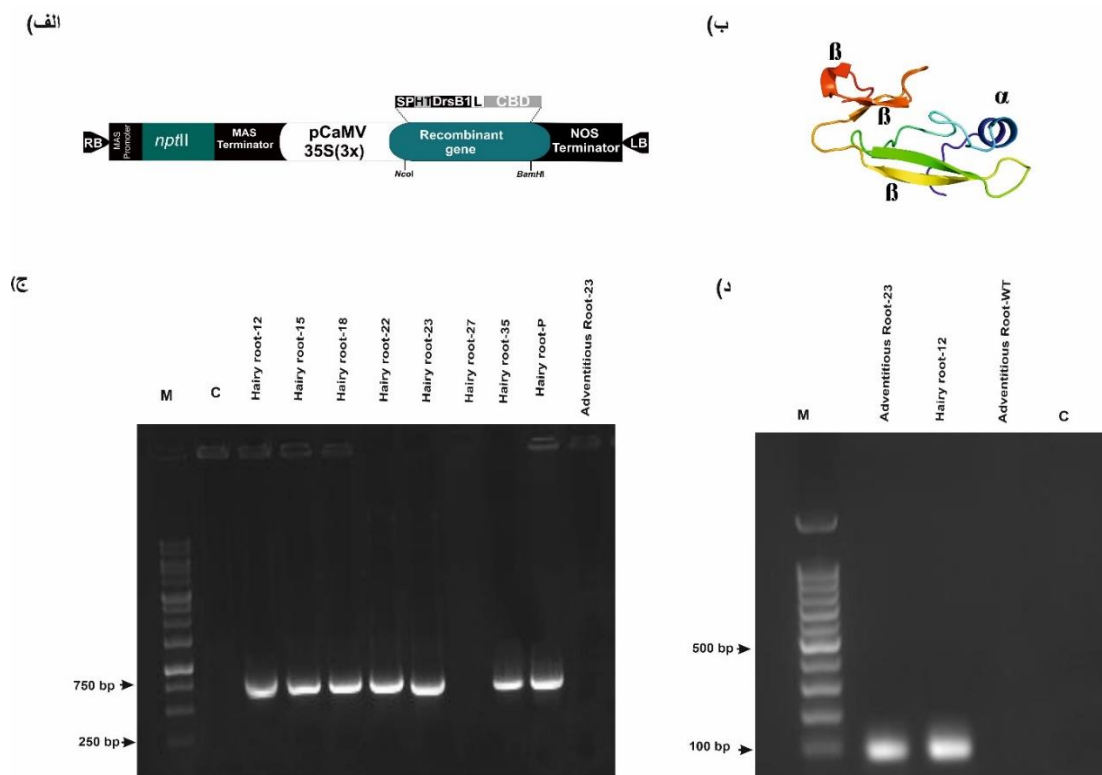
مواد روش‌ها

ضد عفونی و کشت بذرهاى تراریخت نسل T1: بذرهاى توتون نسل T1 حاوی سامانه ژنی DrsB1-CBD4Avr4 (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 میلی گرم بر لیتر آنتی‌بیوتیک کانامایسین و در شرایط نوری ۱۰۰۰ لوکس با ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در دمای ۲۴ ± ۲ درجه سانتی گراد در اتاق کشت نگهداری شدند.

تولید و القاء ریشه‌های نابه‌جا در گیاهان تراریخت نسل T1 حاوی پپتید نو ترکیب DrsB1-CBD4Avr4: به منظور تولید ریشه‌های نابه‌جا از ریزنمونه برگی گیاه توتون تراریخت نسل T1 حاوی پپتید نو ترکیب DrsB1-CBD4Avr4 سه هفته‌ای استفاده شد. ریزنمونه به اندازه یک سانتی متر برش داده شد و در محیط MS شامل غلظت‌های مختلف NAA (a₁: ۰، a₂: ۰/۵ و a₃: ۱ میلی گرم بر لیتر) و

فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار اجرا شد و صفات وزن تر و خشک به همراه میزان پروتئین اندازه گیری شد. بررسی های آماری و تجزیه و تحلیل داده ها، با استفاده از نرم افزارهای SAS (نسخه ۹/۱) و MSTATC انجام شد.

محیط های 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 غلظت های مختلف (c₁: ۰، c₂: ۰/۵ و c₃: ۱ میلی گرم 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: نوئومایسین فسفوترانسفراز II حاوی ژن مقاومت به کانامایسین، MAS-Ter: خاتمه دهنده مانوپین ستاز، CaMV35S: پیشبر موزاییک گل کلم توئون، CBD: توالی کدکننده دمین اتصال به کیتین پروتئین افکتور قارچ *Avr4*، SP: سیگنال پپتید، *DrsB1*: توالی کدکننده پپتید درماسپتین B1، OSC: خاتمه دهنده اکوپین ستاز؛ ب: ساختار سه بعدی پروتئین نو ترکیب با استفاده از نرم افزار phyre2؛ ج: آنالیز PCR ریشه های موین با استفاده از آغازگرهای ژن *roIC*؛ د: ادغام ژن *DrsB1* با استفاده از آنالیز PCR از DNA ژنومی استخراج شده در ریشه های موین و نابه جا. M: نشانگر ۱۰۰ kb و ۱ kb: کنترل منفی (بدون DNA الگو)، Adventitious-wt: ریشه نابه جا حاصل از گیاه شاهد (گیاه توئون بدون سامانه ژنی)، Hairy root-P: ریشه های موین حاصل از پلاسمید Ri، Hairy root-12: ریشه موین تراریخت، Adventitious root-23: ریشه نابه جا 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 predicated 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.

استخراج DNA ژنومی و تأیید تراریختی: به منظور تأیید حضور ژن پپتید نوترکیب در ماسپتین B1 در نسل T1، DNA ژنومی از کلون‌های ریشه‌های موئین 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 در ماسپتین B1 (DrsB1 F: GCTAAGGCTATGTGGAAGGATG و DrsB1 R: ATTGAGAAATAGTATCAGCAACA) روی DNA ژنومی کلون‌های ریشه موئین و ریشه‌های نابه‌جا به عنوان رشته الگو انجام شد. همچنین به منظور تأیید حضور قطعه T-DNA پلاسمید Ri در ریشه‌های موئین از آغازگر ژن *rolC* (F: CTCCTGACATCAAACTCGTC) و *rolC* (R: TGCTTCGAGTTATGGGTACA) برای واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) استفاده شد.

تعیین کمیت پپتید نوترکیب DrsB1-CBD_{Avr4} 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-CBD_{Avr4} در پروتئین‌های استخراج شده از ریشه‌های موئین 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 به مدت یک شب 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 به مدت یک شب 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 ۲ BSA (w/v) ۲ درصد به مدت ۲ ساعت

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-CBD_{Avr4} به عنوان درصدی از پروتئین محلول خالص - سازی شده (TSP درصد) در نمونه گزارش شد. به منظور مقایسه میزان بیان پروتئین و مقایسه آماری تیمارهای مختلف از آزمون t-Student استفاده شد.

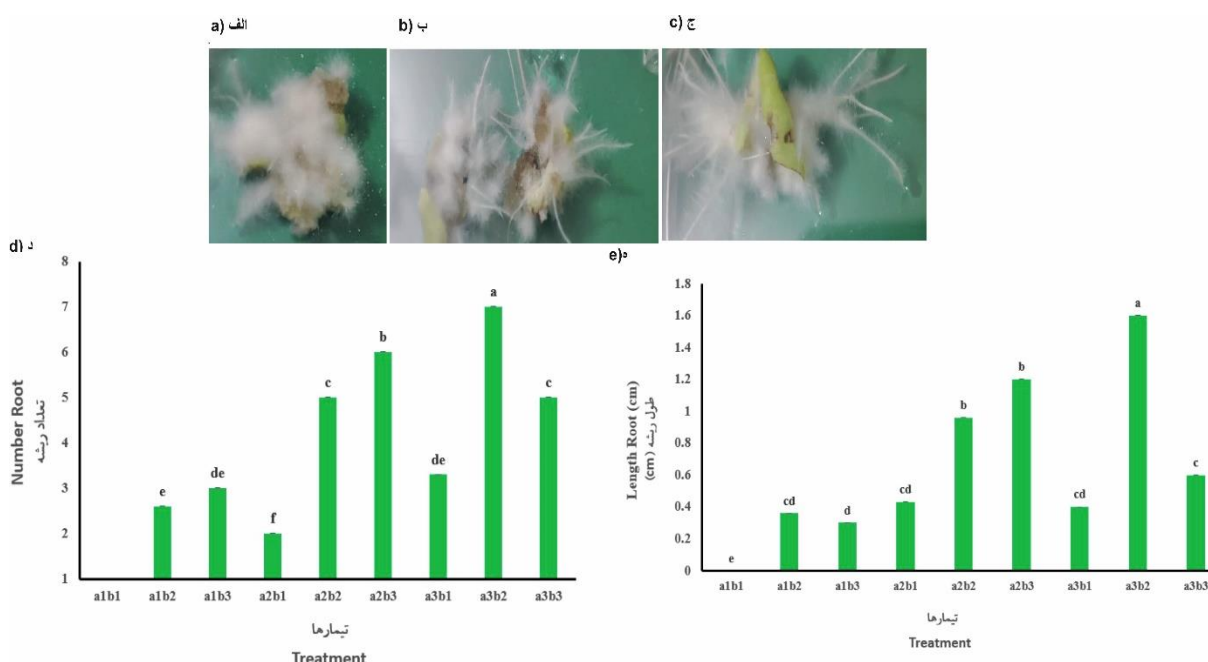
نتایج و بحث

پپتید نوترکیب DrsB1-CBD_{Avr4} به طول ۱۴۴ اسید آمینه 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 سه بعدی 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 در ماسپتین B1، در این تحقیق به بررسی و مقایسه تولید پروتئین نوترکیب در ریشه‌های موئین و نابه‌جا پرداخته شد.

از مجموع کل ریشه‌های موئین و نابه‌جا مورد استفاده، تعداد ۲۰ ریشه DNA ژنومی برای بررسی تأیید پپتید نوترکیب DrsB1-CBD_{Avr4} به همراه 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 موئین حاکی از تراریخت شدن ریزنمونه‌های نسل اول گیاهان حاوی سامانه ژنی DrsB1-CBD_{Avr4} 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 باندی به اندازه ۱۰۰bp به اندازه باند مورد نظر تکثیر شد، در حالی که

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 میلی گرم بر لیتر از NAA در ترکیب با ۰/۵ میلی گرم 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 میلی گرم بر لیتر از NAA؛ ب: محیط MS حاوی ۰/۵ میلی گرم بر لیتر از هر دو هورمون NAA و IBA؛ ج: محیط حاوی MS با میزان ۱ میلی گرم بر لیتر از NAA و ۰/۵ میلی گرم بر لیتر از IBA، مقایسه میانگین اثر متقابل هورمون NAA و IBA؛ د: تعداد و ه: طول ریشه نابه‌جا. تیمارها NAA (a₁: 0، a₂: ۰/۵ و a₃: ۱ میلی گرم بر لیتر) و IBA (b₁: ۰، b₂: ۰/۵ و b₃: ۱ میلی گرم بر لیتر). میانگین‌های با حداقل یک حرف مشترک باهم اختلاف معنی‌داری نداشتند. خطوط عمودی روی ستون‌ها نشان دهنده 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 *Agrobacterium* رایزوترنز 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 *Agrobacterium* رایزوترنز 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 ATCC15834 با ۱۰ دقیقه تلقیح مشاهده شد. کمترین طول ریشه موین در سویه A4 با مدت زمان ۵ دقیقه تلقیح ریزنمونه در محیط کشت MS با حداقل مقدار گلوکز به دست آمد (شکل ۳-ج و د). نتایج به دست آمده از این مطالعه نشان داد که بیشترین تعداد ریشه موین برای سویه باکتری ATCC15834 در محیط کشت MS پایه با ساکارز ۳ درصد به میزان ۱۰/۵ عدد به دست آمده است، این در حالی بود که برای همین سویه در شرایط ذکر شده برای گلوکز ۱ درصد، تعداد متوسط ریشه موین ۲ عدد بود. بررسی اثر عوامل مختلف کشت بر میزان تولید ریشه‌های موین نشان داد که از ترکیب ساکارز با محیط‌های کشت MS در مقایسه با گلوکز می‌توان ریشه‌های موین بیشتری تولید کرد. صرف نظر از نوع محیط کشت، ساکارز به عنوان منبع کربن در ترکیب محیط کشت نسبت به گلوکز اثر مطلوب‌تری بر رشد و تولید زیست توده ریشه‌های موین 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 صرف نظر از سویه باکتری مشاهده شد (شکل ۴). داده‌های حاصل از وزن تر 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 وزن تر و اثرات دوگانه نوع محیط $\times$ جامد و مایع بودن در صفت وزن خشک اختلاف معنی‌داری ($P \leq 0.01$) نشان دادند.

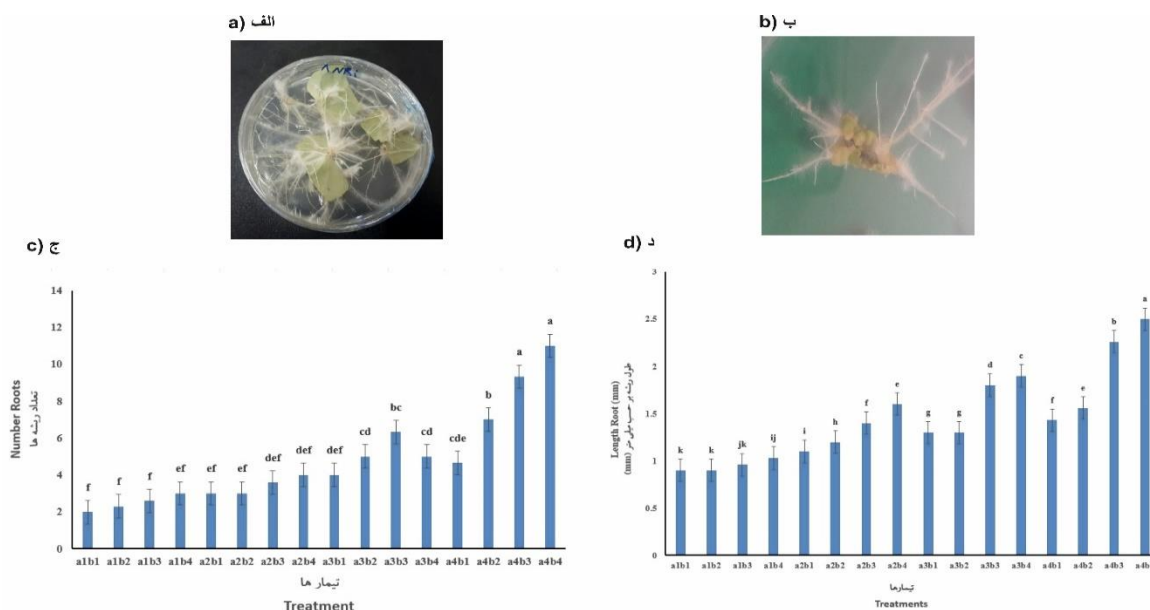
جدول ۳- تجزیه واریانس صفت زیست توده حاصل از ریشه‌های نابه‌جا

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	وزن خشک	غلظت پروتئین کل
		Fresh weight	Dry weight	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

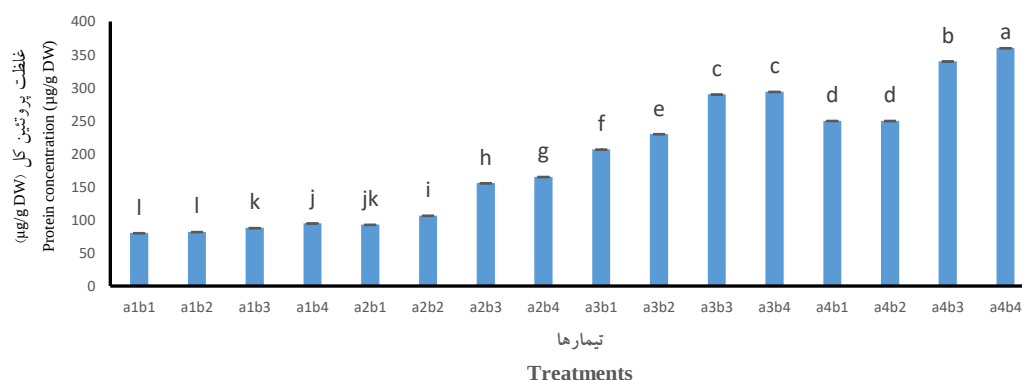
^{ns} و **: به ترتیب غیر معنی‌دار، معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد.

^{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). 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-CBD_{Avr4} در ریشه‌های موئین تراریخت حاصل از تیمار با بالاترین غلظت پروتئین کل محلول و ریشه‌های موئین 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 موئین 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-CBD_{Avr4} را ۴/۴۴ درصد TSP در ریشه‌های موئین تراریخت نشان داد که بالاتر (۳/۱۱ درصد) از سطح این پروتئین در ریشه‌های نابه‌جا بود (شکل ۷).

فن کشت ریشه‌های موئین القاشده به‌وسیله /گروباکتریوم /ریزوزنز 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 موئین 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) (۰/۰-۳/۱) میلی‌گرم بر لیتر، IBA (۰/۰-۱/۳) میلی‌گرم بر لیتر و NAA (۰/۱-۲) 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 اسکوریک 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 اسکوریک 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 کافیک 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.

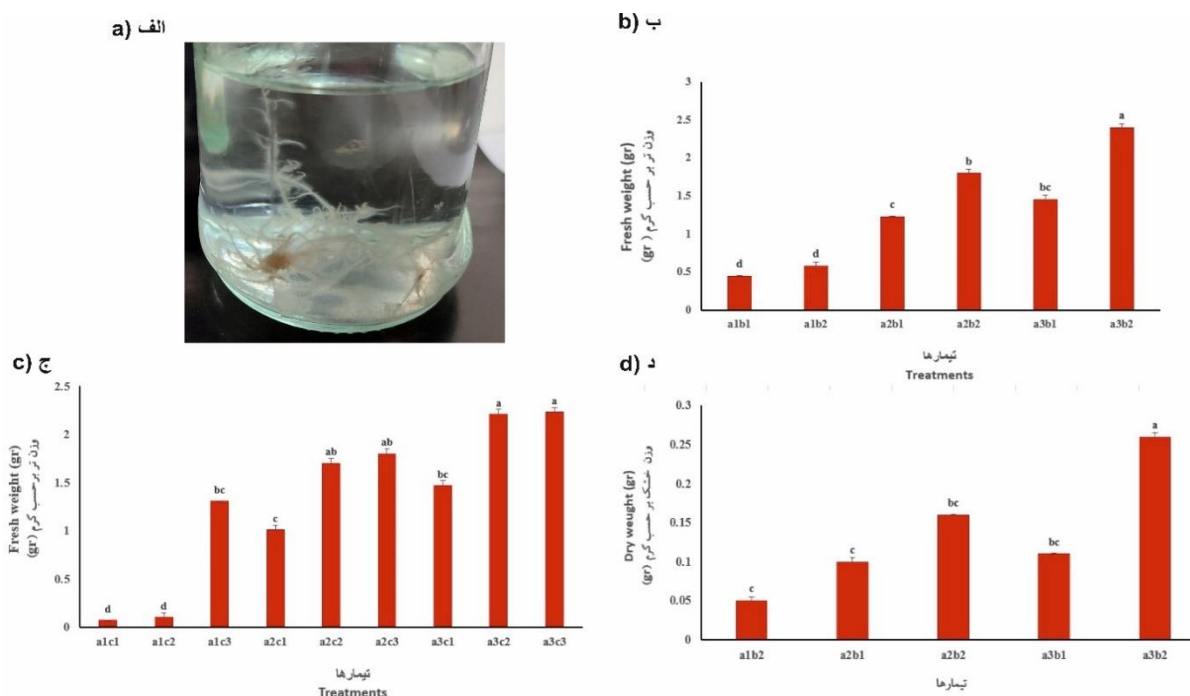
گیاه باجی (*Psoralea corylifolia*) یک گیاه دارویی در حال انقراض است؛ که دارای متابولیت‌های ارزشمندی است. برای بررسی تولید متابولیت پسورالا از ریزنمونه هیپوکوتیل برای القا و تولید ریشه‌های موئین و نابه‌جا استفاده شد و میزان تولید پسورالا در هر دو ریشه مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که میزان پسورالا 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 رایزوزنر 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.

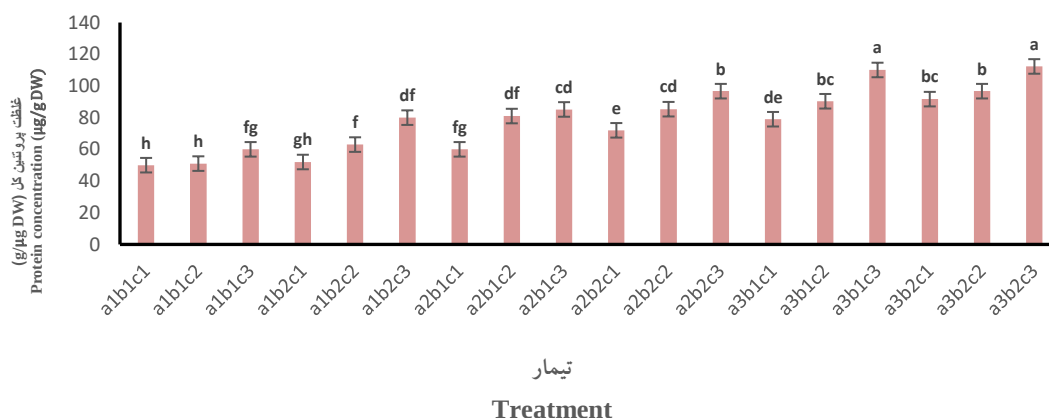
نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که در غلظت‌های مساوی از هر دو هورمون NAA و IBA تولید کالوس بیشتری مشاهده شد؛ به‌صورتی که در غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر از هر دو هورمون کالوس سفیدتر و در غلظت با میزان ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر کالوس‌های تیره مشاهده شد. همچنین در غلظت‌های ۱ میلی‌گرم بر لیتر از هورمون NAA و همچنین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



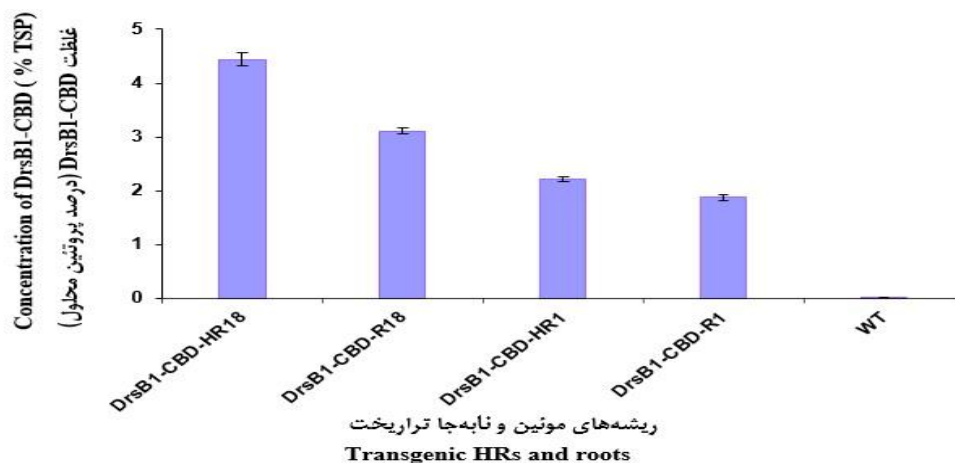
شکل ۵- توسعه ریشه های نایه جا در گیاهان تراریخت. الف: در محیط مایع؛ ب: مقایسه میانگین اثرات متقابل نوع محیط × محیط جامد و مایع روی وزن تر؛ ج و د: مقایسه میانگین اثرات متقابل نوع محیط × غلظت های مختلف هورمون NAA روی وزن تر و خشک، تیمار محیط های MS (a₁: ¼ MS، a₂: ½ MS و a₃: MS) در محیط به صورت کشت جامد (۰/۶ درصد آگار) و مایع (بدون آگار) (b₁: جامد و b₂: مایع) و با هورمون NAA با غلظت های مختلف (c₁: ۰، c₂: ۰/۵ و c₃: ۱ 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: ¼ MS, a₂: ½ 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: ¼ MS، a₂: ½ MS و a₃: MS) در محیط به صورت کشت جامد (۰/۶ درصد آگار) و مایع (بدون آگار) (b₁: جامد و b₂: مایع) و با هورمون NAA با غلظت های مختلف (c₁: ۰، c₂: ۰/۵ و c₃: ۱ 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: ¼ MS, a₂: ½ 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-R18: ریشه‌های موئین به ترتیب با بالاترین و پایین‌ترین غلظت پروتئین کل، DrsB1-CBD-HR1 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 $\text{mean} \pm \text{SE}$. 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 می- شوند. تأمین ساکارز محیط رشد باعث تنظیم پیشبر *rolC* و به تبع آن تحریک القاء تشکیل و استقرار ریشه موین و افزایش در میزان زیست توده می شود (Ziemenowicz *et al.*, 2008).

نتایج این مطالعه نشان می دهد که تغییر در هر یک از این ترکیبات محیط کشت می تواند در رشد ریشه موین و ریشه های نابه جا، افزایش زیست توده و بازده تولید مؤثر باشد. همچنین از ریشه های نابه جا می توان به عنوان بیوراکتورها در تولید پروتئین های نو ترکیب دارویی استفاده کرد. تاکنون در هیچ منبع علمی به مقایسه القاء و تولید ریشه موین و نابه جا 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.

سیاسگزاری

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

در یک مطالعه به منظور بررسی تحریک ریشه های موین در بین گونه های 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 موین در سویه ATCC15834 و کمترین درصد برای سویه A4 به دست آمد؛ بنابراین انتخاب یک سویه *اگروباکتریوم رایزوزنز* به گونه گیاه وابسته است و می تواند تأثیر مطلوبی روی تولید و القای ریشه های موین 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 می دهد 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 WR1 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 tobaccum* 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, Marzih 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 rhizogenesis* 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