مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
دوره ۵، شماره ۱، بهار و تابستان ۱۳۹۵
صفحه ۵۰-۴۱

تاثیر ژن *rolC* در گیاه دارویی پروانش (*Catharanthus roseus*)

امین سهندی خلیفه‌کندی[۱]، مقصود پژوهنده*[۲] و هانیه محجل شجاء[۳]

The effect of *rolC* gene the medicinal plant *Catharanthus roseus*

Amin Sahandi Khalifeh-Kandy[1], Maghsoud Pazhouhandeh[2]*
and Hanieh Mohajjel-Shoja[3]

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی، ۲- دانشیار گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران
۳- استادیار گروه زیست شناسی گیاهی، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، ایران

1. Master of Science in Biotechnology and 2. Associate Prof. Biotechnology Dept. Azarbaijan Shahid Madani University,
3. Assistant Prof. Plant Biology Dept. Faculty of Natural Science, University of Tabriz, IRAN

*نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: pazhouhandeh@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۹۵/۳/۳۱- تاریخ پذیرش: ۹۵/۶/۱۷)

چکیده

پروانش (*Catharanthus roseus*) از مهم‌ترین گیاهان دارویی بوده و دارای آلکالوئیدهای بسیار مهم از جمله وین‌بلاستین و وین‌کریستین می‌باشد که در درمان انواع سرطان‌ها کاربرد دارد. با توجه به اهمیت و نقش ژنهای پلاستیسیتی مثل *rolC* در بیوسنتز آلکالوئیدها، در این پژوهش به بررسی بهبود ریشه دهی و القای ریشه در گیاه دارویی پروانش به کمک این ژن پرداخته شد. برای این منظور بذرهای این گیاه، استریل شده و در شرایط درون شیشه‌ای کشت شدند. ریزنمونه‌های برگی حاصل از گیاهچه‌های استریل توسط باکتری *Agrobacterium tumefaciens* حامل وکتور pBI121-*rolC* (تحت پیشبر CaMV35S) تلقیح شدند. ریزنمونه‌های تلقیح شده در پنج نوع محیط مختلف با هورمن و بدون هورمن برای بررسی ریشه‌زایی کشت شدند. ۹ روز بعد در محیط MS فاقد هورمن و دارای آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم اولین ریشه‌ها در ریزنمونه‌های برگی ظاهر شدند. دو لاین دارای رشد بسیار سریع ریشه بوده و در آنها ریشه ها به سرعت منشعب شدند. تاریختی ریشه‌های القا شده از ریزنمونه‌های برگی پروانش از طریق PCR و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *rolC* تایید شدند. نتیجه این تحقیق علاوه بر اینکه نشان داد می‌توان از ژن *rolC* برای بهبود ریشه دهی و القای ریشه در گیاهان دارویی استفاده کرد همچنین نشان داد که ژن *rolC* نسبت به ترکیب‌های مختلف هورمونی در القای ریشه مویین موفق‌تر می باشد.

واژه‌های کلیدی

پروانش
ریشه
انتقال ژن
*rol*C

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-05-31]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.1.4.9]

مقدمه

بیماری ریشه مویین به‌وسیله *Agrobacterium rhizogenes* ایجاد می‌شود (Ricker et al. 1930). این باکتری رشد نئوپلاستیک را در سلول‌های گیاهی القا می‌کند که در نتیجه آن ریشه‌های مویین القا می‌شوند (Costantino et al. 1994). ریشه‌های مویین به‌صورت نابجا در محل آلودگی و یا در نزدیکی آن ایجاد می‌شوند (Chilton 2001). از لحاظ مورفولوژی، ریشه‌های مویین القا شده توسط این باکتری بسیار مشابه با ریشه‌های وحشی می‌باشد، با این حال ریشه‌های مویین دارای ویژگی‌های اختصاصی می‌باشند، رشد سریع و منشعب، رشد در محیط بدون هورمون، رشد ریشه‌ها به‌صورت Ageotropic (عدم تمایل به سمت جاذبه زمین)، پایداری از لحاظ ژنتیکی، تولید بیشتر متابولیت نسبت به ریشه‌های معمولی، پایداری متابولیت‌های تولید شده از این ریشه‌ها و توانایی بیشتر این متابولیت‌ها در اتصال به سلول‌های هدف از ویژگی‌های ریشه‌های مویین القا شده توسط *A. rhizogenes* می‌باشد (Sevon et al. 1998). به همین دلیل از ریشه‌های مویین به‌طور وسیعی به‌عنوان ابزاری در جهت تولید متابولیت‌ها و همچنین برای مطالعه عملکرد ژن در گیاه استفاده می‌شود. محققان از این ابزار جهت مطالعه رشد و واکنش‌های زیستی ریشه، بیان بیشتر پروتئین‌ها و تولید بیشتر متابولیت‌های ثانویه، سم زدایی آلودگی‌های محیطی و افزایش مقاومت به خشکی استفاده می‌کنند. ریشه‌های مویین به‌وسیله یک قطعه DNA جدا شده (T-DNA) از پلاسمید Ri این آگروباکتریوم و ورود آن به درون کروموزم‌های سلول گیاهی القا می‌شود (Chilton et al. 1982).

ژن‌هایی که از T-DNA پلاسمید Ri طی بیماری‌زایی به سلول‌های گیاه میزبان منتقل می‌شود، معمولا ژن‌های (*rol*) *root oncogenic loci* و ژن‌های مربوط به سنتز اکسین می‌باشند. این ژن‌ها به ترتیب در ناحیه TL-DNA و TR-DNA پلاسمید Ri نوع آگروپین قرار دارند (Christey 2001). آنالیز جهش ناحیه TL-DNA منجر به شناسایی چهار ناحیه ژنی *rolA*، *rolB*، *rolC* و *rolD* شد (جدول ۱) که در القای ریشه مویین موثر می‌باشند. در توالی کامل نوکلئوتیدی ناحیه TL-DNA ۱۸ عدد چارچوب ترجمه (open reading frame) شناسایی شده است که چهارتای آن‌ها به ترتیب مربوط به ژن‌های *rolA*، *rolB*، *rolC* و *rolD* می‌باشد. این آنالیز همچنین نشان داد که ژن‌های *rolA*، *rolB* و *rolC* نقش مهمی را در القای ریشه‌های مویین بازی می‌کنند (Palazon et al. 1997). بررسی دیگری نشان داد که اگر چه ناحیه TR-DNA برای القای ریشه مویین ضروری نیست اما با توجه به داشتن ژن اکسین امکان تغییر شکل سلول‌ها را فراهم می‌کند. Moyanoa و همکاران نشان دادند که ژن‌های *aux* نقش معنی‌داری را در تغییر شکل ریشه‌های تراریخت *Datura metel* و *Duboisia hybrid* بازی می‌کنند (Moyanoa et al. 1999). ژن‌های کد کننده اکسین (*tms1 and tms2*) و ژن‌های سنتز آگروپین (*ags*) هم بر روی TR-DNA قرار دارند (White et al. 1985).

هر چند هر سه ژن *rolA* و *rolB* و *rolC* به‌صورت مستقل از هم تشکیل ریشه در توتون را افزایش می‌دهند ولی رشد ریشه هنگامی که هر سه ژن با هم فعالیت کنند بهتر انجام می‌گیرد (Schmulling et al. 1993). بیان ژن *rolC* در گیاهان مختلف تراریخته الگوی پیچیده‌ای از خود نشان می‌دهد، بیان این ژن به‌تنهایی و در عدم حضور سایر ژن‌های T-DNA در ریشه به میزان زیاد، در برگ کم و در ساقه اصلا بیان نمی‌شود (Estruch et al. 1991). طبق گزارش‌های اخیر بیان ژن *rolC* با تولید آلکالوئیدهای تروپانی همبستگی داشته و باعث افزایش تولید آلکالوئیدها از ریشه‌های مویین می‌شود (Moyanoa et al. 1999). میزان بالای بیان ژن *rolC* باعث القای ژن‌های دفاعی (β-۱،۳-گلوکاناز) در گیاه می‌شود و این مسئله نشان می‌دهد که بیان *rolC* می‌تواند پاسخ‌های دفاعی گیاه را فعال کند (Kiselev et al. 2006). گیاهان توتون تراریخته با *rolC* خصوصیات فنوتیپی متفاوتی نسبت به گونه وحشی از خود نشان دادند، از جمله کاهش اندازه گل، کوتاه شدن قد گیاه، کوچکتر شدن دانه‌های کپسول و افزایش انشعابات جانبی گیاه (Schmulling et al. 1988). در گیاهان دیگری هم که با *rolC* تراریخته شده‌اند، کاهش اندازه گیاه، کاهش غالبیت راسی، گلدهی زود هنگام و گاهی نیز فنوتیپ پرپشتی مشاهده شده است. علاوه بر این نشان داده شده است که ساکارز موجب بیان بیشتر ژن *rolC* در گیاهان می‌شود (Yokoyama et al. 1994).

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-05-31]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.1.4.9]

انسان با شناخت گیاهان دارویی از هزاران سال پیش به شفا بخشی و اثرات درمانی این گیاهان پی برد و به منظور پیشگیری و درمان بیماری‌ها از آن‌ها استفاده کرد. بر اساس تخمین سازمان جهانی بهداشت امروزه ۸۰ درصد مردم جهان از داروهای گیاهی در درمان بیماری‌های مختلف استفاده می‌کنند و تقریبا یک چهارم داروهای تولید شده حاوی عصاره گیاهی یا ترکیباتی هستند که از مواد گیاهی بدست آمده‌اند یا براساس ترکیبات گیاهی مدل‌سازی شده‌اند (Tripathi and Tripathi 2003). در ایران نیز هزاران گونه گیاهی می‌روید که بیشتر آنها دارای اثرات دارویی می‌باشند و در درمان بیماری‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند. اما با توجه به محدود بودن زیستگاه طبیعی گیاهان و پایین بودن مواد موثره مورد نظر در گیاهان، استفاده از گیاهان دارویی دارای محدودیت‌هایی می‌باشد. بر این اساس محققین جهت بهره‌وری بیشتر از گیاهان دارویی و افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه از آنها به استفاده از فن‌آوری زیستی روی آورده‌اند (Mulabagal and Tsay 2004). اخیرا نیز کشت ریشه‌های مویین از طریق کشت بافت گیاهی به عنوان یک منبع پایدار برای تولید متابولیت‌ها پیشنهاد شده است. رشد سریع، پایداری ژنتیکی و توانایی بالا در تولید متابولیت‌های ثانویه از مهم‌ترین مزیت‌های کشت ریشه‌های مویین محسوب می‌شود (Giri and Narasu 2000).

جدول۱- توصیف و مشخصات ژنهای *rol* باکتری *A. rhizogenes* که بر روی T-DNA پلاسمید Ri آن قرار دارند.

Table1. Description of *A. rhizogenes rol* genes

ژن	**اندازه** (جفت باز)	**نقش و اثر در گیاه**	**منبع**
rolA	۴۲۳-۲۷۹	در توتون تراریخت: برگ‌های کوچکتر و چروکیده، میانگره‌های بلندتر، پیری دیر هنگام، گل-آذین متراکم و غیر طبیعی، اندازه گل و خامه بزرگتر، ضخیم شدن ساقه‌ها و ضعیف بودن برگ-ها و ریشه‌ها، تداخل با هورمون ژیبرلین	Maurel et al. 1990 Schmulling et al. 1988 Dehio et al. 1993
rolB	۸۳۷-۷۶۲	دو ژن ($rolB_{TR}$ و $rolB_{TL}$) از نظر توالی تا حدی مشابه هم هستند. β-Glucosidase را کد می کنند. غیر فعال کردن *rolB* منجر به عدم بیماری‌زایی آگروباکتریوم می‌شود. ژن $rolB_{TR}$ قادر به القای ریشه‌های مویین در دیسک‌های برگی توتون نمی‌باشد. $rolB_{TL}$ در ریشه زایی و تغییر استیل گلها نقش دارد. نقش مهم در تشکیل ریشه‌های نابجا و جانبی گیاه توتون تراریخته شده با ژن *rolB* خصوصیاتی از قبیل افزایش اندازه خامه و گل، تشکیل ریشه‌های نابجا بر روی ساقه، چین خوردگی برگ‌ها، تشکیل ریشه‌های فراوان و سطحی و توانایی قطعات برگی برای تشکیل ریشه در یک محیط بدون هورمون را از خود نشان دادند. بیان بیشتر این ژن باعث نکروز زودرس در گیاه می‌شود	Bouchez and Camilleri 1990 Lemcke and Schmulling 1998 Cardarelli et al. 1987 Estruch et al. 1991 Moriuchi et al. 2004
rolC	۵۴۰	*rolC* بر روی TL-DNA پلاسمید Ri قرار گرفته و به ژن *rolB* متصل است و بصورت ترانسژن در القای ریشه مویین با *rolB* اثر همکاری دارند. گیاهان توتونی که ژن *rolC* در آنها بیان می‌شود، فنوتیپ پرپشت و قد کوتاهی دارند. طول میان گره‌ها کم شده و تعداد ساقه‌ها و برگ‌ها (برگ‌های نوک تیز و کوتاه) افزایش می یابد. گیاهان تراریخته با *rolC* به دلیل فتوسنتز کمتر برگ‌ها به رنگ سبز متمایل به زرد و کلروزه دیده می‌شوند. ریشه‌های القا شده با ژن *rolC* به‌صورت مستقیم رشد می‌کنند فعال کردن پاسخ‌های دفاعی گیاه	Estruch et al. 1991 Schmulling et al. 1993 Spena et al. 1987 Kiselev et al. 2006
rolD	۱۰۲۳	جهش در ژن *rolD* باعث القای طبیعی ریشه‌های مویین فعالیت پروموتور این ژن در بافت‌های در حال تمایز بیشتر است و با افزایش سن گیاه بیان آن کاهش یافته و در نهایت قطع می‌شود	Slightom et al. 1986 Cardarelli et al. 1987 Trovato et al. 1997

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-05-31]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.1.4.9]

پروانش با نام علمی *Catharanthus roseus* گیاهی علفی و همیشه سبز متعلق به تیره خرزهره (Apocynaceae) است. این گیاه ارتفاعی معادل ۳۰ تا ۱۰۰ سانتی‌متر داشته، دارای ساقه‌های استوانه‌ای، مستقیم و چوبی به رنگ‌های سبز یا قرمز کم‌رنگ است. برگ‌های گیاه به صورت براق، سبز تیره و گل‌های آن معطر و در رنگ‌های سفید تا بنفش متمایل به صورتی در انتهای ساقه قرار دارد. ارقامی که دارای گل‌های صورتی هستند به علت مقدار بالای آلکالوئیدهای آن بیشتر مورد توجه است، همچنین این گیاه به صورت معمول به عنوان گیاه زینتی نیز کشت می‌شود (Aslam et al. 2010). این گیاه یکی از مهم‌ترین گیاهان دارویی و طبی است که دارای بیش از ۴۰۰ نوع آلکالوئید از نوع ترپنوئید ایندول آلکالوئید است (Faheem et al. 2011). ریشه این گیاه محل تجمع دو آلکالوئید آجمالینو و سرپنتین است. این آلکالوئیدها ترکیبات مهم دارویی برای درمان انواع بیماری‌های قلبی-عروقی از جمله فشار خون بالا می‌باشد (Shabani et al. 2014). همچنین این گیاه دارای آلکالوئیدهای وین‌بلاستین و وین‌کریستین است که در شیمی درمانی انواع سرطان‌های خون، غده‌های لنفاوی، پستان، ریه و تخمدان به کار برده می‌شود (Van der Heijden et al. 2004). این دو ماده دارای ارزش اقتصادی بالا هستند. قیمت هر کیلوگرم وین‌بلاستین یک میلیون دلار و تولید سالانه آن ۱۲ کیلوگرم و قیمت هر کیلوگرم وین‌کریستین ۳/۵ میلیون دلار و تولید سالانه آن یک کیلوگرم می‌باشد (Loyola-Vargas et al. 2007) که اهمیت اقتصادی این گیاه را روشن می‌کند. در حال حاضر مواد وین‌بلاستین و وین‌کریستین به طور عمده توسط استخراج از این گیاه بدست می‌آیند. دلیل این امر آن است که روش‌های سنتز و نیمه سنتز و روش‌های دیگر برای تولید این مواد در مقیاس صنعتی مناسب نیستند همچنین تلاش زیادی برای تولید این ترکیبات در مقیاس وسیع به وسیله کشت سوسپانسیون سلولی و ریشه مویین انجام شده است (Shabani et al. 2014). با توجه به غلظت بسیار پایین آلکالوئیدهای ضد سرطان گیاه پروانش و قیمت بسیار بالای این آلکالوئیدها و با توجه به اینکه تنها راه تولید این داروها استخراج از گیاه می‌باشد. افزایش مقدار این آلکالوئیدها به هر نحوی می‌تواند از نظر اقتصادی ارزش زیادی داشته باشد. هدف این تحقیق استفاده از ژن *rolC* جهت تولید ریشه مویین در گیاه پروانش است. این ژن علاوه بر القای ریشه مویین همبستگی مستقیمی با بیوسنتز آلکالوئیدها دارد (Moyanoa et al. 1999).

مواد و روشها

بذرهای گیاه پروانش مورد نیاز در این تحقیق از مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان آذربایجان شرقی تهیه گردید. بذرهای استریل شده (۳ دقیقه الکل ۷۰٪، ۱۵ دقیقه هیپوکلریت ۱/۵٪ و ۵ مرتبه شستشو با آب مقطر استریل) در محیط کشت جامد MS بدون هورمون و در داخل شیشه مربا کشت شدند، سپس به فیتوترون با دمای ۲۵°C، رطوبت ۲۲٪ و میزان نور ۲۵۰۰ لوکس منتقل شدند.

ناقل و باکتری مورد استفاده:

ناقل بیانی استفاده شده در این تحقیق ناقل PBI121 می‌باشد. این ناقل دارای ۱۴۰۰۰ جفت نوکلئوتید و دارای ژن گزینشگر مقاومت به آنتی‌بیوتیک کانامایسین برای باکتری می‌باشد. CaMV35S پیشبر ژن در این ناقل است که از ویروس موزاییک گل کلم گرفته شده‌است. ترمیناتور به‌کار رفته در آن‌هم Nopaline (NOS) synthase می‌باشد. این ناقل به روش الکتروپوراسیون به باکتری *A. tumefaciens* سویه LBA4404 منتقل شده و باکتری‌ها جهت تایید تراریزش در محیط LB جامد حاوی ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر آنتی‌بیوتیک کانامایسین کشت و در انکوباتور ۲۸ °C به مدت دو شب نگهداری شدند.

آماده‌سازی آگروباکتریوم:

به منظور آماده سازی باکتری *A. tumefaciens* سویه LBA4404 جهت تراریزش ریزنمونه‌ها، ابتدا ناقل نوترکیب pBI121-*rolC* از طریق روش الکتروپوراسیون به باکتری مستعد این روش منتقل و باکتری‌های ترانسفورم شده در محیط کشت LB جامد حاوی کانامایسین کشت و در انکوباتور ۲۸ °C به مدت ۲ شب نگهداری شد. با توجه به اینکه ناقل pBI121 دارای ژن مقاومت به کانامایسین است باکتری‌هایی که این ناقل را دریافت کردند در

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-05-31]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.1.4.9]

محیط LB حاوی کانامایسین رشد کرده و کلنی‌هایی را تشکیل می‌دهند. برای هم‌کشتی آگروباکتریوم با ریزنمونه‌ها، باید دو روز قبل از هم‌کشتی، آگروباکتریوم پیش‌کشت شود، برای این منظور به محیط LB حاوی آنتی‌بیوتیک (ریفامپیسین و کانامایسین) و سولفات منیزیم (۱۰ میلی‌مولار) به مقدار ۱۰ میلی‌لیتر، به اندازه نوک خلال دندان از یک کلنی باکتری که حاوی ناقل حامل ژن *rolC* می‌باشد تلقیح شد و در انکوباتور شیکر نگهداری شد، در روز دوم به محیط LB (کشت اصلی) که در فلاسک ۲۵۰ میلی-لیتری به مقدار ۶۰ میلی‌لیتر ریخته شده بود، حدود ۴۰۰ میکرولیتر از باکتری روز قبل اضافه شد تا چگالی نوری آن (OD_{600nm}) برای هم‌کشتی با گیاه خیلی افزایش نیابد. بعد از رسیدن غلظت باکتری به ۰/۶ محتویات فلاسک در زیر هود به فالکن ۵۰ میلی‌لیتری منتقل و رسوب باکتری از طریق سانتریفیوژ (۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه) صورت گرفت، محیط رویی باکتری در زیر هود حذف شده و تا نصف حجم محیط حذف شده به آن محیط ۱/۲MS جهت معلق کرن سلولهای باکتری اضافه شد. بعد از تهیه سوسپانسیون باکتری به میزان ۵۰ میکرومولار استوسیرینگون به سوسپانسیون باکتری جهت تحریک بیان ژن‌های *Vir* اضافه شد. سوسپانسیون مورد نظر بعد از قرار گرفتن در شیکر انکوباتور به مدت ۳۰ دقیقه (۱۱۰rpm و ۲۵ $^{\circ}C$) جهت تلقیح و تراریزش به روی ریزنمونه‌ها اضافه شد.

تلقیح ریزنمونه‌ها با آگروباکتریوم و بررسی القای ریشه مویین در ریزنمونه‌های مختلف:

به منظور القای ریشه در ریزنمونه‌های گیاه پروانش از گیاهچه‌های استریل این گیاه بعد از ۵ هفته ریزنمونه‌های برگی تهیه و تعدادی از آن‌ها توسط باکتری *A. tumefaciens* حامل ناقل pBI121 همکشت شدند و تعدادی نیز بدون همکشتی با آگروباکتریوم ابتدا در محیط MS معمولی به مدت ۴۸ ساعت نگهداری و در نهایت به محیط‌های مختلف MS (جدول ۲) حاوی آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم منتقل شدند.

بررسی حضور تراژن در ریشه‌های القا شده با PCR : به منظور تایید تراریختی ریشه‌های القا شده از ریزنمونه‌های برگی پروانش، استخراج DNA از آنها به روش CTAB (Dellaporta et al., 1983) صورت گرفت. سپس برای اندازه‌گیری کیفیت DNA استخراج شده، ۵ میکرولیتر از محصول استخراج شده بر روی ژل آگارز یک درصد ران شدند، برای حضور ژن *rolC* در آنها (تائید تراریختی ریشه‌ها القا شده) از واکنش PCR با آغازگرهای اختصاصی طراحی شده برای ژن *rolC* (GenBank: X64255.1) استفاده شد. شرایط دمایی PCR شامل واسرشته‌سازی اولیه به مدت ۵ دقیقه، تکثیر در طول ۳۵ چرخه شامل واسرشته‌سازی به مدت ۲۵ ثانیه در دمای ۹۲ درجه سانتیگراد، اتصال آغازگرها به DNA الگو به مدت ۳۵ ثانیه در ۵۲ درجه سانتیگراد و بسط آغازگرها به مدت ۴۵ ثانیه در ۷۲ درجه سانتیگراد و بسط نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتیگراد انجام شد. ۱۰ میکرولیتر از محصول استخراج شده و ۲ میکرولیتر بافر بارگذاری باهم مخلوط شده و بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد بارگذاری شد.

جدول ۲- ترکیبات هورمونی مختلف برای بررسی ریشه‌زایی در ریزنمونه‌های گیاه پروانش

Table1. The culture media with different hormones for rooting in *Catharanthus roseus* explants

نام هورمون	غلظت هورمون‌های مختلف در محیط‌های کشت (g/l)				
محیط	MS4	MS3	MS2	MS1	MS
2,4-D	–	–	۲	۱	-
NAA	۱	۰/۵	–	–	-
BAP	۱	۱	۱	۱	-
Cefotaxime	۳۵۰	۳۵۰	۳۵۰	۳۵۰	۳۵۰

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-05-31]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.1.4.9]

نتایج و بحث

در این تحقیق، با هدف بررسی اثر ژن *rolC* در گیاه پروانش و تولید لاین‌های تراریخت با ریشه دهی سریع و زیاد، بذرهای تهیه شده گیاه پروانش (شکل ۱- الف) ضدعفونی شدند. اکثر بذرهای استریل شده گیاه پروانش بعد از ۱۵ روز جوانه زدند. سرعت رشد گیاهچه‌ها پایین بوده و آن‌ها بعد از چهار هفته حدود پنج سانتی-متر رشد کردند (شکل ۱- ب).

القای ریشه مویین در ریزنمونه‌های برگی گیاه پروانش: حدود ۶ هفته بعد از جوانه‌زنی بذرهای این گیاه، ریزنمونه‌های برگی آن تحت شرایط استریل تهیه شدند. بررسی القای ریشه از این ریزنمونه‌ها تحت تاثیر تیمارهای مختلف صورت گرفت. برای این منظور بخشی از این ریزنمونه‌ها تراریزش شدند. این ریزنمونه‌ها بعد از همکشتی با آگروباکتریوم حامل ژن *rolC* ابتدا در محیط MS معمولی به مدت ۴۸ ساعت نگهداری شدند (شکل ۱- ج). سپس این ریزنمونه‌ها در محیط MS حاوی ۳۵۰ میلی‌گرم بر لیتر سفوتاکسیم قرار گرفتند. تعدادی از ریزنمونه‌ها بعنوان کنترل منفی (بدون تراریزش) در این محیط قرار گرفت و بخشی نیز جهت بررسی اثر ترکیب‌های هورمونی مختلف در ریشه‌زایی از ریزنمونه‌های برگی این گیاه در مقایسه با ژن *rolC* در محیط‌های هورمون‌دار کشت شدند. بازکشت ریزنمونه‌ها هر هفت روز صورت گرفت. با توجه به وجود مقادیر بالایی از مواد فنلی در این گیاه، از ریزنمونه‌های برگی برش یافته آن مقدار زیادی مواد فنلی ترشح شده و بعد از ۷ روز اکثر ریزنمونه‌های موجود در محیط MS معمولی و در محیط حاوی غلظت‌های مختلفی از هورمون NAA از لبه‌های برش یافته شروع به سیاه شدن کرده و در نهایت بعد از ۲ هفته از بین رفتند (شکل ۱ – د، ه). تنها تعداد کمی از ریزنمونه‌های موجود در محیط‌هایی با تیمارهای هورمونی حاوی هورمون 2,4-D (۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و همچنین ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP) در این مرحله شروع به تولید کالوس کرده بنابراین این ریزنمونه‌ها کمتر دچار سیاه‌شدگی شدند (شکل ۱- و)، این ریزنمونه‌ها ماندگاری خود را تا ۵ هفته بعد از تراریزش حفظ کرده و بطور کامل به کالوس تبدیل شدند. این امر بیانگر این موضوع است که هورمون 2,4-D در برابر فعالیت بیش از حد مواد فنلی ممانعت کرده و از طرفی با توجه به تشکیل کالوس و ترمیم سریع ریزنمونه‌های برش یافته در محیط حاوی هورمون 2,4-D میزان سنتز مواد فنلی نیز کمتر شده در نتیجه ریزنمونه‌ها کمتر دچار سیاه شدگی و نکروز شدند. این امر در محیط حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر این هورمون مشهودتر بود.

با توجه به نتایج بدست آمده که بافت‌های آسیب دیده و ریزنمونه‌های برش یافته از نظر تولید مواد فنلی مستعد بودند، در ادامه این پژوهش بجای ریزنمونه‌های برش یافته، از برگ‌های کامل جهت تراریزش استفاده شد. لازم به ذکر است که کشت ریزنمونه‌های برش یافته در محیط‌های کشت حاوی تیمارهای فوق بعلاوه ۲ میلی‌گرم بر لیتر زغال فعال نیز ممانعتی در برابر سیاه شدگی ریزنمونه‌ها ایجاد نکرد و بعد از گذشت ۱۴ روز اکثر ریزنمونه‌ها دچار نکروز شده و از بین رفتند. ریزنمونه‌های برگ کامل تلقیح شده با آگروباکتریوم حامل ژن *rolC* نیز جهت رشد بهتر ریزنمونه‌ها و جلوگیری از رشد باکتری آگروباکتریوم، هر ۷ روز واکشت شده و به محیط جدید منتقل شدند. بعد از گذشت ۹ روز از همکشتی ریزنمونه‌ها با آگروباکتریوم، در حدود ۲۰ درصد این ریزنمونه‌ها که در محیط MS معمولی کشت شده بودند ریشه‌هایی مشاهده شد (شکل ۲- الف، ب). این ریشه‌ها در ابتدا رشد کمی داشته و با گذشت زمان به سرعت رشد کرده و منشعب شدند. بیشترین رشد این ریشه‌ها در چهارمین بازکشت ریزنمونه-ها و ۱۶ روز بعد از ظهور ریشه‌ها مشاهده شد. میزان رشد ریشه-های القا شده به تدریج چهار هفته بعد از تلقیح کاهش یافت. ریزنمونه‌های موجود در محیط‌های حاوی هورمون 2,4-D باتوجه به اینکه تبدیل به کالوس شدند ریشه‌هایی از آن‌ها ظاهر نشد، قسمت بیشتر این ریزنمونه‌ها درانتهای هفته چهارم به کالوس تبدیل شدند (شکل ۲- ج). در تیمارهای حاوی هورمون اکسین NAA نیز هیچ ریشه‌ای مشاهده نشد و ریزنمونه‌های موجود در این محیط به تدریج سیاه شده و از بین رفتند (شکل ۲- د).

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-05-31]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.1.4.9]

شکل ۱- بذر گیاه پروانش (الف)، گیاهچه‌های استریل پروانش ۴ هفته بعد از کشت در محیط MS معمولی (ب)، ریزنمونه‌های برگی تلقیح شده در محیط همکشتی (ج)، سیاه شدن ریزنمونه‌های تلقیح شده پروانش در محیط MS معمولی (د)، نکروز شدید ریزنمونه‌های پروانش در محیط حاوی هورمون NAA (ه)، تشکیل کالوس در ریزنمونه‌های پروانش موجود در محیط حاوی 2,4-D (و).

Fig1. *Catharanthus roseus* seed and explants and callus

شکل ۲- ریزنمونه‌های برگ کامل گیاه پروانش، القای ریشه در ریزنمونه‌های تلقیح یافته با آگروباکتریوم حامل ژن *rolC* ۹ روز بعد از تلقیح (الف، ب)، القای کالوس در ریزنمونه‌های موجود در محیط حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP بعد از ۴ هفته (ج)، سیاه‌شدگی ریزنمونه‌های موجود در محیط MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP بعد از ۴ هفته (د). ریشه‌های مویین القا شده از ریزنمونه‌های برگ کامل پروانش ۱۶ روز بعد از ظهور ریشه‌ها (ه)، ریشه‌های حاصل از جوانه‌زنی بذر گیاه پروانش از گیاهچه‌های ۳۰ روزه (و)، وجود فنوتیپ ریشه‌های مویین در ریشه‌های القا شده از ریزنمونه‌های تلقیح شده با آگروباکتریوم (م)، ریشه‌های معمولی گیاه (ن).

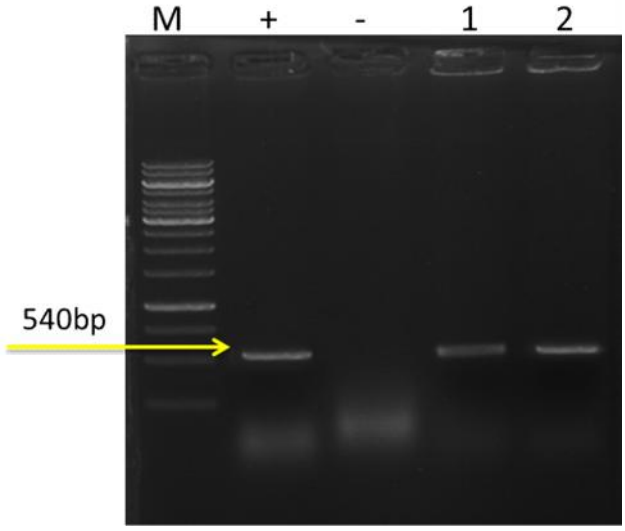
Fig2. Root inducing in *Catharanthus roseus* explants by *rolC* gene

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-05-31]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.1.4.9]

بررسی میزان رشد ریشه‌های القا شده از ریزنمونه‌های تلقیح شده با آگروباکتریوم (شکل ۲- ه) در مقایسه با ریشه‌های حاصل از جوانه‌زنی بذر این گیاه (شکل ۲- و) نیز حاکی از رشد بیشتر و سریعتر ریشه‌های مویین نسبت به ریشه‌های حاصل از جوانه‌زنی بذر این گیاه بود، اندازه‌گیری وزن این ریشه‌ها نشان داد که میزان رشد ریشه‌های مویین ۱۵ روز بعد القا که بطور میانگین ۷۹ میلی-گرم بود که نسبت به میزان رشد ریشه‌های حاصل از جوانه‌زنی بذر این گیاه که بطور میانگین ۱۲ میلی‌گرم اندازه‌گیری شد، ۶/۵۸ برابر بیشتر است. بررسی فنوتیپی این ریشه‌ها نیز نشان داد که ریشه‌های القا شده از ریزنمونه‌های تلقیح شده با آگروباکتریوم فنوتیپ ریشه‌های مویین (رشد سریع، رشد بصورت مستقیم، رنگ سفید و فراوانی تارهای کشنده) را دارد (شکل ۲- م) در حالیکه ریشه‌های معمولی گیاه (شکل ۲- ن) این خصوصیات را از خود نشان ندادند. نتایج این مرحله از تراریزش نشان داد که القای ریشه از ریزنمونه‌های برگی تلقیح شده گیاه پراونش با آگروباکتریوم حامل ژن *rolC* و میزان رشد آن‌ها در محیط MS معمولی نسبت به محیط‌های هورمون‌دار با کارایی بالایی انجام می‌گیرد همچنین این ریشه‌ها با سرعت بیشتری نسبت به ریشه-های معمولی گیاه رشد می‌کنند. بنابراین از این ریشه‌ها با توجه به بیوماس بالایی که نسبت به ریشه‌های معمولی تولید می‌کنند و کارایی بالایی در سنتز آلکالوئیدهای مهم دارویی نسبت به بافت-های دیگر گیاه دارند و از همه مهم‌تر از نظر ژنتیکی نیز پایدار هستند، می‌توان به‌عنوان منبعی غنی برای تولید متابولیت‌های ثانویه به‌صورت انبوه، از طریق کشت در راکتورهای زیستی استفاده کرد.

آنالیز مولکولی ریشه‌های القا شده از ریزنمونه‌های برگی پروانش: به منظور تایید تراریختی ریشه‌های القا شده از ریزنمونه-های برگی گیاه پروانش، دو لاین از ریشه‌های القا شده در محیط MS معمولی که بعد از ۲۵ روز بیشترین رشد را داشتند انتخاب شده و استخراج DNA از آنها صورت گرفت. برای تائید وجود T-DNA پلاسمید Ti آگروباکتریوم در داخل ژنوم ریشه‌های القا شده و حضور ژن *rolC* در آنها (تائید تراریختی ریشه‌ها القا شده) از واکنش PCR با آغازگرهای اختصاصی طراحی شده برای ژن *rolC* استفاده شد. بدین منظور PCR طبق برنامه ذکر شده در مواد و روش‌ها انجام شد. ۱۰ میکرولیتر از محصول استخراج شده و ۲ میکرولیتر بافر بارگذاری باهم مخلوط شده و بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد بارگذاری شدند. نتیجه الکتروفورز محصول PCR بیانگر تراریختی لاین‌های انتخاب شده ریشه‌های مویین است (شکل ۳).

در یکی از تحقیقاتی که در این زمینه انجام شده است ریز نمونه-های هیپوکوتیل گیاه پروانش بعد از قرار گرفتن به مدت ۸ هفته در محیط MS حاوی ۳۱/۱ میکرومولار BA و ۵/۴ میکرومولار NAA تشکیل کالوس دادند. این کالوس‌ها توسط *A. rhizogenes* آلوده شده و بعد از ۱۰ روز ریشه‌های مویین از آنها خارج شد. بعد از رشد ۸ هفته‌ای ریشه‌ها، تولید متابولیت‌های ثانویه از طریق HPLC از این ریشه‌ها مورد بررسی قرار گرفت. متابولیت‌های ثانویه وین‌بلاستین و وین‌کریستین که در تحقیقات ضد میکروبی و ضد سرطان استفاده می‌شوند از این ریشه‌ها جداسازی شدند (Zargar et al. 2010).



شکل ۳- الکتروفورز محصول PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن *rolC*، پلاسمید pBI121-*rolC* (+)، DNA استخراج شده از ریشه‌های مویین (۱، ۲) و DNA استخراج شده از ریشه معمولی (-).

Fig3. PCR results of *rolC* gene on roots' DNA

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-05-31]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.1.4.9]

در مطالعه دیگری به منظور القای ریشه مویین در گیاه پروانش ریزنمونه‌های برگی از گیاهچه‌های ۲۰ روزه این گیاه تهیه و بعد از ۱۰ دقیقه همکشتی با استرین *A. rhizogenes* A4 در محیط B51/2 کشت داده شدند. این ریزنمونه‌ها بعد از دو روز به محیط B5 جامد منتقل شدند. ۲ تا ۳ هفته بعد از تلقیح اولین ریشه‌های مویین از این ریزنمونه‌ها خارج شده و پنج هفته بعد لاین‌های تراریخت از آنها بدست آمد (Zhou et al. 2012). در این تحقیق علاوه بر بررسی و بهینه سازی روش تراریزش پروانش و بدست آوردن ترکیب هورمونی مناسب برای کالزایی و باززایی این گیاه، دو لاین تراریخت با ژن *rolC* باکتری بدست آمد که دارای رشد بسیار سریع ریشه بوده و در آنها ریشه‌ها به سرعت منشعب شدند. تراریختی ریشه‌های حاصل از ریزنمونه‌های برگی پروانش از طریق PCR و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *rolC* تایید شدند. نتیجه این تحقیق علاوه بر اینکه نشان داد می‌توان از ژن *rolC* برای بهبود ریشه دهی و القای ریشه در گیاهان دارویی استفاده کرد همچنین نشان داد که ژن *rolC* نسبت به ترکیب‌های مختلف هورمونی در القای ریشه مویین موفق‌تر می‌باشد.

منابع

Aslam J, Haque Khan S, H. SZ. 2010. Catharanthus roseus (L.) G. Don. an important drug: its applications and production. Pharmacie global 4: 1-16.

Bouchez D, Camilleri C. 1990. Identification of a putative rol B gene on the TR-DNA of the Agrobacterium rhizogenes A4 Ri plasmid. Plant Mol Biol 14: 617-619.

Cardarelli M, Mariotti D, Pomponi M, Spano L, Capone I, Costantino P. 1987. Agrobacterium rhizogenes T-DNA genes capable of inducing hairy root phenotype. Mol Gen Genet 209: 475-480.

Dehio C, Grossmann K, Schell J, Schmulling T. 1993. Phenotype and hormonal status of transgenic tobacco plants overexpressing the rolA gene of Agrobacterium rhizogenes T-DNA. Plant Mol Biol 23: 1199-1210.

Dellaporta S, Hicks JW, Hicks JB, 1983. A plant DNA minipreparation:Version II. Plant Mol. Biol. Rep. 1:19-21.

Estruch JJ ,Schell J, Spena A. 1991. The protein encoded by the rolB plant oncogene hydrolyses indole glucosides. EMBO J 10: 3125-3128.

Faheem M, Singh S, Tanwer BS, Khan M, Shahzad A. 2011. In vitro regeneration of multiplication shoots in Catharanthus roseus - an important medicinal plant. Advances in Applied Science Research 2: 208-213.

Giri A, Narasu ML. 2000. Transgenic hairy roots. recent trends and applications. Biotechnol Adv 18: 1-22.

Kiselev KV, Kusaykin MI, Dubrovina AS, Bezverbny DA, Zvyagintseva TN, Bulgakov VP. 2006. The rolC gene induces expression of a pathogenesis-related beta-1,3-glucanase in transformed ginseng cells. Phytochemistry 67: 2225-2231.

Lemcke K, Schmulling T. 1998. A putative rolB gene homologue of the Agrobacterium rhizogenes TR-DNA has different morphogenetic activity in tobacco than rolB. Plant Mol Biol 36: 803-808.

Loyola-Vargas VML, Rosa M, Avalos G, KuCauich R. 2007. Catharanthus biosynthetic enzymes: the road ahead. Phytochemistry Reviews 6: 307-339.

Maurel C, Brevet J, Barbier-Brygoo H, Guern J, Tempe J. 1990. Auxin regulates the promoter of the root-inducing rolB gene of Agrobacterium rhizogenes in transgenic tobacco. Mol Gen Genet 223: 58-64.

Moriuchi H, Okamoto C, Nishihama R, Yamashita I, Machida Y, Tanaka N. 2004. Nuclear localization and interaction of RolB with plant 14-3-3 proteins correlates with induction of adventitious roots by the oncogene rolB. Plant J 38: 260-275.

Moyanoa E, Fornaléb S, Palazóna J, Cusidóa RM, Bonfilla M, Moralesa C, Piñola MT. 1999. Effect of Agrobacterium rhizogenes T-DNA on alkaloid production in Solanaceae plants. Phytochemistry 52: 1287-1292.

Mulabagal V, Tsay H. 2004. Plant cell cultures-an alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites. . International Journal of Applied Science and Engineering 2: 29-48.

Shabani M, Farsi M, Mirshamsi Kakhaki A. 2014. The effect of ethylene on the expression of genes T16H, G10H, DAT and AVLBS the plant periwinkle (Catharanthus roseus). Modern genetic journal 9: 151-160. (In Farsi with English abstract).

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-05-31]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.1.4.9]

Schmulling T, Fladung M, Grossmann K, Schel J. 1993. Hormonal content and sensitivity of transgenic tobacco and potato plants expressing single rol genes of Agrobacterium rhizogenes T-DNA. The Plant Journal 3: 371-382.

Schmulling T, Schell J, Spena A. 1988. Single genes from Agrobacterium rhizogenes influence plant development. EMBO J 7: 2621-2629.

Slightom JL, Durand-Tardif M, Jouanin L, Tepfer D. 1986. Nucleotide sequence analysis of TL-DNA of Agrobacterium rhizogenes agropine type plasmid. Identification of open reading frames. J Biol Chem 261: 108-121.

Spena A, Schmulling T, Koncz C, Schell JS. 1987. Independent and synergistic activity of rol A, B and C loci in stimulating abnormal growth in plants. EMBO J 6: 3891-3899.

Tripathi L, Tripathi J. 2003. Role of biotechnology in medicinal plants. Tropical Journal of Pharmaceutical Research 2: 243-253.

Trovato M, Mauro ML, Costantino P, Altamura M, M. 1997. The rolD gene Agrobacterium rhizogenes is developmentary regulated in transgenic tobacco. Protoplasma 197: 111-120.

Van der Heijden R, Jacobs DI, Snoeijer W. 2004. The Catharanthus alkaloids: Pharmacognosy and biotechnology. Current Medicinal Chemistry 11: 1241-1253.

Yokoyama R, Hirose T, Fujii N, Aspuria ET, Kato A, Uchimiya H. 1994. The rolC promoter of Agrobacterium rhizogenes Ri plasmid is activated by sucrose in transgenic tobacco plants. Mol Gen Genet 244: 15-22.

Zargar M, Farahani F, Nabavi T. 2010. Hairy roots production of transgenic Catharanthus roseus L. plants with Agrobacterium rhizogenes under in vitro conditions Journal of Medicinal Plants Research 4: 2199-2203.

Zhou ML, Zhu XM, Shao JR, Wu YM, Tang YX. 2012. An protocol for genetic transformation of Catharanthus roseus by Agrobacterium rhizogenes A4. Appl Biochem Biotechnol 166: 1674-1684.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-05-31]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.1.4.9]

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Vol5, Number1, Spring and summer 2016, Bi-seasonal

The effect of *rolC* gene on the medicinal plant *Catharanthus roseus*

Amin Sahandi Khalifeh-Kandy[1], Maghsoud Pazhouhandeh[2]*and Hanieh Mohajjel-Shoja[3]

1. Master of Science in Biotechnology,
2. Associate Prof. Biotechnology Dept. Agriculture Faculty, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz,
3. Assistant Prof. Plant Biology Dept. Faculty of Natural Science, University of Tabriz, IRAN

* Corresponding Author, Email: pazhouhandeh@gmail.com

A B S T R A C T

Catharanthus roseus is a medicinal plant containing very important alkaloids such as Vincristine and Vinblastin that are used to treat a variety of cancers. Due to the importance of the plasticity genes such as *rolC* in the biosynthesis of alkaloids, this study we investigated possible improvement of rooting and root induction in *C. roseus* using the *rolC* gene. To this end, the seeds of this plant were superficially sterilized and cultured in *in vitro* conditions. The leaf explants of these *in vitro* plants were inoculated by *Agrobacterium tumefaciens* carrying pBI121-*rolC* plasmid (*rolC* under control of the CaMV 35S promoter). The inoculated explants were cultured in five different media with or without hormones for rooting. After nine days, the first roots appeared in leaf explants on the MS medium without hormones and containing cefotaxime antibiotic. Two lines had very rapid rooting and the roots branched quickly. Molecular analysis by PCR using *rolC* specific primers confirmed the presence of the *rolC* gene in the transgenic plants. Results showed that the *rolC* gene could be used to induce rooting in the medicinal plants and that the *rolC* gene is also more successful in induction of hairy roots than various different combinations of plant hormones.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-05-31]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.1.4.9]

Key Words

Catharanthus, Root, Transformation, *rolC*

E