

بررسی خاصیت آنتیاکسیدانی و محتوای فنولی و رنگدانه‌ای گیاهان *rolC* و *rolC* تراژن توتون

Evaluation of antioxidant activity, phenolic contents and pigment level of *rolC* and *rolC* transgenic tobacco plants

گیتا امینی، هانیه محجل شجاعی^{*}، روح الله متفسکر آزاد، الهام محجل کاظمی

Gita Amini, Hanieh Mohajjal Shoja^{*}, Rohollah Motafakkerazad,
Elham Mohajjal Kazemi

گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز

Department of Plant Biology, Faculty of Natural Science, University of Tabriz, IRAN

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: mohajelh@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۹۸/۶/۲۵ – تاریخ پذیرش: ۹۸/۹/۱۵)

چکیده

آگروباکتریوم از جنس‌های گرم منفی باکتری‌های خاکزی است که سبب ایجاد بیماری‌های مختلف در گیاهان خصوصاً دولپه‌ای‌ها به واسطه انتقال افقی ژنها می‌باشد. ژنهای *rolA* و *rolB* آگروباکتریوم ریزوپلزز عامل ایجاد سندروم ریشه‌های مویین در گیاهان آلوده بوده و نیز در افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهی نقش مهمی ایفا می‌کنند. همولوگ گیاهی ژن‌های *rol* باکتریایی در تعدادی از گیاهان خصوصاً جنس نیکوتینا و در *Linaria vulgaris* یافت شده‌اند. هدف این پژوهش بررسی تأثیر ژن باکتریایی *rolC* و همولوگ گیاهی آن، *rolC* از نظر محتوای متابولیت‌های ثانویه، رنگدانه‌های فتوستتری و خاصیت آنتیاکسیدانی در عصاره گیاهچه‌های چهار هفت‌های بود. به این منظور گیاهان توتون (*Nicotiana tabacum* L.) تراژن *rolC* و *rolC* و ژن‌ها تحت کنترل پروموتر القابی با گلوکوکورتیکوئید دگزامتازون بودند استفاده شد. آزمایشات به - صورت طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار انجام گرفت. نتایج حاصل نشان داد که محتوای کلروفیل های a و b و نیز کاروتینوئید و آنتوسیانین‌ها در هر دو لاین توتون تراژن پس از القا با دگزامتازون با کاهش چشمگیری نسبت به گیاهچه‌های بدون القا (شاهد) مواجه شدند. محتوای فلاونوئیدی گیاهچه‌ها در گیاهان تراژن القا شده نسبت به گیاهچه‌های شاهد تفاوت قابل ملاحظه‌ای نداشت، در حالیکه محتوای فنولی آنها افزایش یافت. خاصیت آنتیاکسیدانی عصاره گیاهان القا شده نیز بیشتر از گیاهان شاهد بود. با توجه به تشابه نتایج بدست آمده در هر دو لاین توتون تراژن می-توان نتیجه گیری نمود که ژن *rolC* در طول زمان و تکامل گیاه توانسته است ویژگی‌های عملکردی خود را حفظ نماید.

واژه‌های کلیدی

rol ژن

توتون،

محتوای فنولی،

فعالیت آنتیاکسیدانی

مقدمه

مورفین) و عطرها مورد مصرف واقع می‌شوند. روش‌های مختلفی به منظور افزایش تولید این متابولیت‌ها در گیاهان به کار گرفته شده‌اند که کشت بافت‌های گیاهی و استفاده از الیسیتورها از مهمترین آنها می‌باشند. مهندسی ژنتیک و ایجاد گیاهان تراژن نیز یکی از روش‌های جایگزین در این حوزه می‌باشد که در آن بیان ژنی خاص در گیاه باعث افزایش قابل توجه ترکیب مورد نظر می‌گردد. گزارش‌های متعددی تأثیر مثبت ژن آر. ریزوژنر را در تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهی نشان داده‌اند که از آن جمله می‌توان به افزایش آلکالوئیدهای گوناگون، Bonhomme *et al.* آنتراکینون‌ها و جینسنوسیدها اشاره نمود (Bulgakov, 1998; Shkryl *et al.* 2007). افزایش مقدار این ترکیبات در گیاه معمولاً توأم با افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی گیاه نیز می‌باشد (Bulgakov, 2008). به منظور بررسی عمیق‌تر تأثیر ژن *rolC* آر. ریزوژنر در گیاهان و مقایسه آن با همولوگ گیاهی اش، *rolC* (شکل ۱)، این پژوهش با هدف اندازه‌گیری محتوای رنگدانه‌ای و برخی متابولیت‌های ثانویه و نیز فعالیت آنتی-اکسیدانی گیاهان تراژن *C* و *rolC* که ژن‌ها تحت کنترل پرومومتر القا شونده با گلوکوکورتیکوئید دگراماتازون بودند، در شرایط کشت درون شبشه‌ای انجام پذیرفت. کاربرد غلظت‌های فزاینده القاگر، تأثیر آن را بر چگونگی تغییر پارامترهای مذکور نیز مورد بررسی قرار داد.

مواد و روش‌ها

بذر گیاهان تراژن مورد استفاده در این پژوهش در مؤسسه بیولوژی مولکولی گیاهی شهر استراسبورگ کشور فرانسه توسط خانم دکتر هانیه محجل شجاء (نویسنده مسئول مقاله) در سال ۲۰۱۰ تولید شدند. در این گیاهان ژن‌های *rolC* و *rolC* تحت کنترل پرومومتر القایی با گلوکوکورتیکوئید دگراماتازون بوده و تنها در حضور این ماده بیان این ژن‌ها صورت می‌گرفت (Amini *et al.* 2019). غلظت‌های استفاده شده دگراماتازون ۰، ۱، ۳، ۱۰ و ۲۰ میکرومولار در محیط کشت بود. ۵۰ عدد بذر استریل در ۲۰ میلی لیتر محیط کشت جامد MS کشت شد. جهت استریلیزاسیون،

گیاهان در طبیعت با تنش‌های مختلفی همچون خشکی، شوری، کمبود عنصر و پاتوژن‌های گوناگون مواجه می‌شوند و متناسب با نوع تنش، پاسخ‌های دفاعی گوناگونی از خود بروز می‌دهند. یکی از میکروب‌گانیسم‌های موجود در خاک که توانایی آلدگی سلول‌های گیاهی خصوصاً دولپه‌ای‌ها را دارد؛ باکتری گرم منفی آگروباکتریوم ریزوژنر است که به دلیل ویژگی منحصر به فرد خود، توانایی انتقال ژن‌های خود به درون ژنوم میزبان و ایجاد بیماری ریشه‌های مویین را دارا می‌باشد (Guillon *et al.* 2006). قطعه‌ای از ژنوم پلازمیدی آر. ریزوژنر که به درون ژنوم میزبان مهاجرت می‌کند DNA انتقال یافته (T-DNA) نامیده می‌شود که حاوی ژن‌های لوکوس ریشه *rolA*, *rolB* و *rolC* می‌باشد. مطالعات انجام شده نشان داده‌اند که برخی از گیاهان بطور طبیعی دارای توالی‌های مشابه توالی T-DNA آگروباکتریوم می‌باشد که از این میان می‌توان به جنس نیکوتینا اشاره نمود (Meyer *et al.* 1999; Aoki and Syono, 1995). تصور می‌شود در طول روند تکامل پس از آلدگی گیاهان با آگروباکتریوم برخی از ژن‌های *Nicotiana* باکتری در ژنوم گیاه ماندگار شده‌اند. در گیاه *tobacco tabaccum* همولوگ ژن *rolC* آر. ریزوژنر، *rolC* نامیده می‌شود و بیان اگرزوژن آن در گیاهان دیگر می‌تواند همچون ژن باکتریایی، باعث کلروزه شدن گیاه، تجمع نشاسته، کاهش طول ریشه و طول اندام هوایی و افزایش جذب قند از *rolC* (Mohajjel shoja *et al.* 2011). به عبارتی ژن *rolC* توانایی عملکردی خود را در ویژگی‌های ذکر شده حفظ نموده است. گیاهان گروه بزرگ و متنوعی از ترکیبات آلی به نام متابولیتها ثانویه را تولید می‌کنند که مقدار آنها کمتر از یک درصد وزن خشک گیاه می‌باشد و دارای عملکردهای اکولوژیکی مهم همچون حفاظت گیاه در مقابل گیاهخواران و عوامل بیماری‌زای میکروبی، جذب گرده افشان‌ها، رقابت گیاه با گیاه و همزیستی گیاه با میکروب می‌باشند. همچنین به عنوان دارو، علف‌کش‌های زیستی، عوامل طعم دهنده، رنگ‌های طبیعی، سم‌ها، مواد توهمندا (مانند کوکائین، هروئین،

آنتوسیانین برای هر عصاره با استفاده از رابطه زیر محاسبه گردید (Masukasu *et al.* 2003).

$$A = A_{530} - 0.25 A_{657}$$

ارزیابی فعالیت مهار رادیکالهای آزاد (DPPH)

این روش یکی از روش‌های مرسوم برای سنجش فعالیت آنتی-اکسیدانی نمونه‌های گیاهی می‌باشد و مبتنی بر به داماندازی میزان رادیکالهای آزاد ماده‌ای به نام ۲-دی‌فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل (DPPH) با استفاده از عوامل آنتی‌اکسیدانی می‌باشد که سبب کاهش میزان جذب در طول موج ۵۲۰ نانومتر می‌گردد. زمانی‌که محلول DPPH با یک ماده دهنده هیدروژن مخلوط گردد فرم احیای رادیکال‌ها تشکیل گشته با کاهش رنگ بنفش و تشکیل باند جذبی در طول موج ۵۲۰ نانومتر همراه می‌باشد. ۲ میلی لیتر DPPH ۱۰۰ میکرومولار محلول در متانول با ۲ میلی لیتر از غلظت‌های مختلف عصاره متانولی گیاه مخلوط شد. مخلوط به دست آمده ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت و سپس جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۲۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر اندازه گیری شد و درصد مهار رادیکال آزاد هر عصاره (IA) با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

$$IA\% = \frac{A_{520} \text{ control} - A_{520} \text{ sample}}{A_{520} \text{ control}} \times 100$$

تعیین محتوای فنول کل

محتوای فنول کل نمونه‌ها با روش فولین-سیوکالتیو اندازه گیری شد (Meda *et al.*, 2005). به این منظور عصاره‌ها با غلظت ۱۰ تهیه شد. سپس ۰/۰۵ ml از عصاره با ۰/۵ ml واکنشگر ۰/۲ نرمال فولین سیوکالتیو مخلوط و به مدت ۵ دقیقه هم زده شد. سپس ۲ ml از محلول کربنات‌سدیم ۲ درصد با غلظت ۷۵ گرم در لیتر اضافه شد. پس از ۲ ساعت قرار گرفتن نمونه‌ها در دمای اتاق، جذب نمونه‌ها با دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۷۶۰ نانومتر انجام شد. مقادیر فنول تام عصاره با استفاده از منحنی استاندارد بر اساس میلی گرم گالیک اسید در گرم عصاره گزارش شد.

بذرها به مدت ۲ دقیقه در اتانول ۷۰ درصد و سپس ۱۵ دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۱ درصد قرار گرفتند. سپس ۳ مرتبه و هر بار به مدت ۱۰ دقیقه با آب مقطر استریل شستشو داده شدند و پس از خشک شدن بر روی کاغذ صافی به محیط کشت انتقال داده شدند. طرح آزمایشی به کار رفته به صورت کاملاً تصادفی با ۳ تکرار بود. پتربیش‌ها در دمای ۲۳°C در شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار داده شدند. پس از طی چهار هفته از اجرای آزمایش عصاره‌گیری از گیاهچه‌ها برای هر کدام از فاکتورهای مورد بررسی، به ترتیبی که در ادامه ذکر خواهد شد، انجام گرفت و پس از جمع‌آوری داده‌های کمی، با استفاده از نرم افزار ۱۶ SPSS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد صورت گرفت و برای رسم نمودارها نیز از نرم-افزار Excel استفاده شد.

سنجش محتوای رنگیزه‌های فتوستزی و آنتوسیانین‌ها

جهت سنجش محتوای رنگیزه‌ها ۰/۱ گرم از بافت تر برگی در ۲ml متانول خالص ساییده و همگن شدند. بعد از ۲۴ ساعت قرار گرفتن در تاریکی، به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰g سانتریفیوژ شدند. جذب روشنوارها در طول موج‌های ۴۷۰، ۵۳۰ و ۶۶۵ نانومتر اندازه گیری و محتوای رنگیزه‌های فتوستزی با استفاده از فرمول‌های زیر محاسبه شدند (Şükran *et al.* 1998).

$$C_a = 15.65 A_{665} - 7.340 A_{653}$$

$$C_b = 27.05 A_{653} - 11.21 A_{665}$$

$$C_{\text{total}} = C_a / C_b$$

$$C_{x+c} = 1000 A_{470} - 2.860 C_a - 129.2 C_b / 245$$

$$\text{Chlorophyll a, } C_b = \text{Chlorophyll b, } C_{\text{total}} = \text{Total } C_a = \text{Chlorophyll, } C_{x+c} = \text{Total carotenoids}$$

برای سنجش آنتوسیانین، ۰/۲ گرم از بافت برگی گیاه در ۳ میلی لیتر محلول اسید کلریدریک ۱ درصد متانول ساییده و همگن شد و سپس عصاره حاصل به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰g سانتریفیوژ گردید. محلول رویی به مدت یک شب در یخچال و در تاریکی قرار داده شده و سپس جذب آن در طول موج ۵۳۰ و ۶۵۷ نانومتر با دستگاه اسپکتروفوتومتر خوانده شد. از محلول اسید کلریدریک ۱ درصد متانول به عنوان شاهد استفاده گردید. میزان

تعیین محتوای فلاونوئید کل

انتوسیانین نداشته است (شکل ۲). نکته‌ی قابل توجهی که وجود دارد اینکه روند تأثیر ژن‌های *rolC* و *rolC* بر میزان کاهش رنگدانه‌های گیاهی مشابه همدیگر می‌باشد. مطالعات متعددی تأثیر ژن باکتریایی *rolC* را در گیاهان مختلف و تغییرات فنوتیپی را که این ژن ایجاد می‌کند نشان داده‌اند. بعضی از این تغییرات شامل کوتولگی گیاهان بیان کننده این ژن به دلیل کاهش غالیت رأسی ساقه و در نتیجه افزایش غالیت جانبی و افزایش شاخه‌زایی، تسريع گلدهی، کاهش تولید دانه گرده، ایجاد برگ‌های باریک و دراز و رنگ پریده و مقاومت به برخی آلدگی‌های میکروبی همچون مقاومت به *Phytophthora cactorum* می‌باشد *rolC* (Schmülling et al. 1988, 1993; Landi et al. 2009).

از نظر توالی بیش از ۹۰ درصد به ژن *rolC* آگرو باکتریوم ریزوژنتر سویه A4 شباهت دارد و تغییرات نوکلئوتیدی که منجر به تغییرات اسیدآمینه‌ای در توالی پروتئین کد شده توسط این ژن با پروتئین گردد وجود ندارد (شکل ۲) و بنابراین می‌توان انتظار داشت که از نظر عملکردی ویژگی‌های نیای باکتریایی خود را تا حدودی محافظت نماید. تحقیقات انجام گرفته در این زمینه نیز نشان داده‌اند که تغییر پارامترهای رشدی گیاهان تراژن *rolC* و *rolC* همچون کاهش سرعت و درصد جوانه‌زنی، کاهش ارتفاع گیاهچه‌ها، کاهش طول ریشه و اندام هوایی، افزایش جذب قند از ریشه و تجمع نشاسته در این گیاهان مشابه یکدیگر می‌باشد (Mohajjel shoja et al. 2011; Amini et al. 2019) در پژوهش حاضر نیز کاهش محتوای رنگدانه‌ای گیاهان تراژن *rolC* و *rolC* بعد از القا مشاهده شد که تأییدی بر یافته‌های گزارش‌های قبلی می‌باشد.

بررسی محتوای برخی متابولیت‌های ثانویه محتوای فنول و فلاونوئید کل

همان‌گونه که در شکل ۳ مشاهده می‌شود محتوای فنول کل در گیاهان تراژن *rolC* و *rolC* بعد از القا نسبت به گیاهان گروه شاهد تا حدود ۰.۲۵٪ افزایش نشان داد و کاربرد غلظت‌های فراینده دگزامتاژون در محیط کشت تأثیر متفاوتی در افزایش فنول کل نداشت و بنابراین کمترین غلظت این ترکیب برای افزایش محتوای فنولی گیاهان کافی بود.

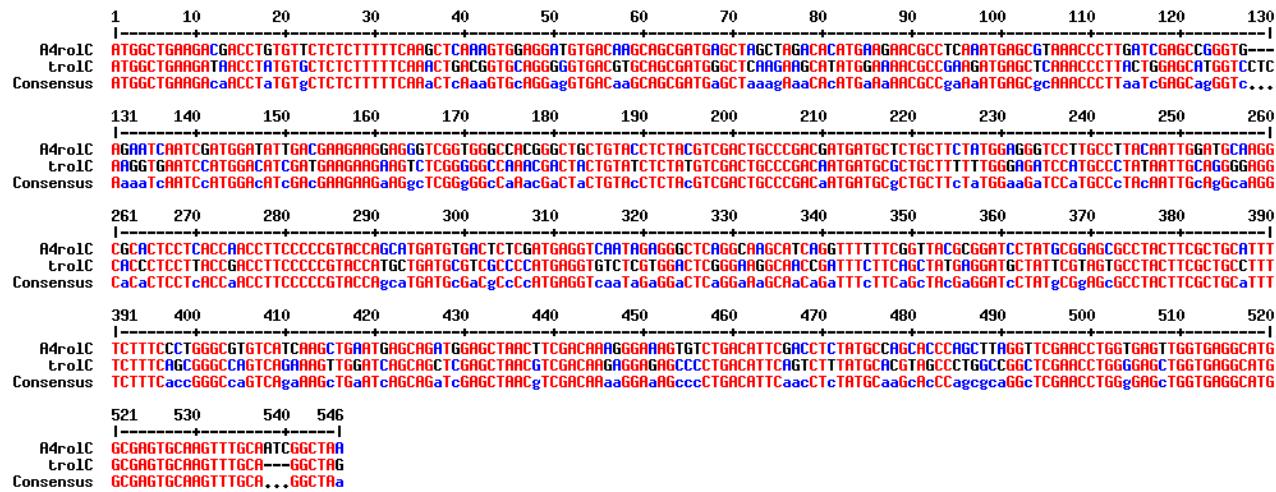
محتوای فلاونوئید عصاره با روش رنگ‌سنجدی ارزیابی شد (Chang et al. 2002). عصاره گیاهی با غلظت mg ۱۰ ml/mg تهیه شد. ml ۰/۵ از عصاره در ۱/۵ ml متابول حل و ۰/۱ ml محلول پتاسیم کلراید ۱۰ درصد به آن اضافه شد. سپس ۰/۱ ml استات ۱ مولار و ۲/۸ ml آب مقطر به این مخلوط اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. جذب مخلوط حاصل در طول موج ۴۱۵ نانومتر اندازه گیری شد. میزان فلاونوئید با استفاده از منحنی استاندارد بر اساس میلی‌گرم کوئرستین در گرم عصاره گزارش شد.

تجزیه و تحلیل آماری: تمام آزمایش‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار انجام شد. داده‌های حاصل از سنجش‌های انجام شده، براساس روش آنالیز واریانس یک طرفه (One-Way ANOVA) با استفاده از نرم‌افزار SPSS 16 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. پس از مشخص شدن وجود اختلاف معنی دار بین داده‌ها، میانگین‌ها با روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵٪ گروه‌بندی و مقایسه شدند.

نتایج و بحث

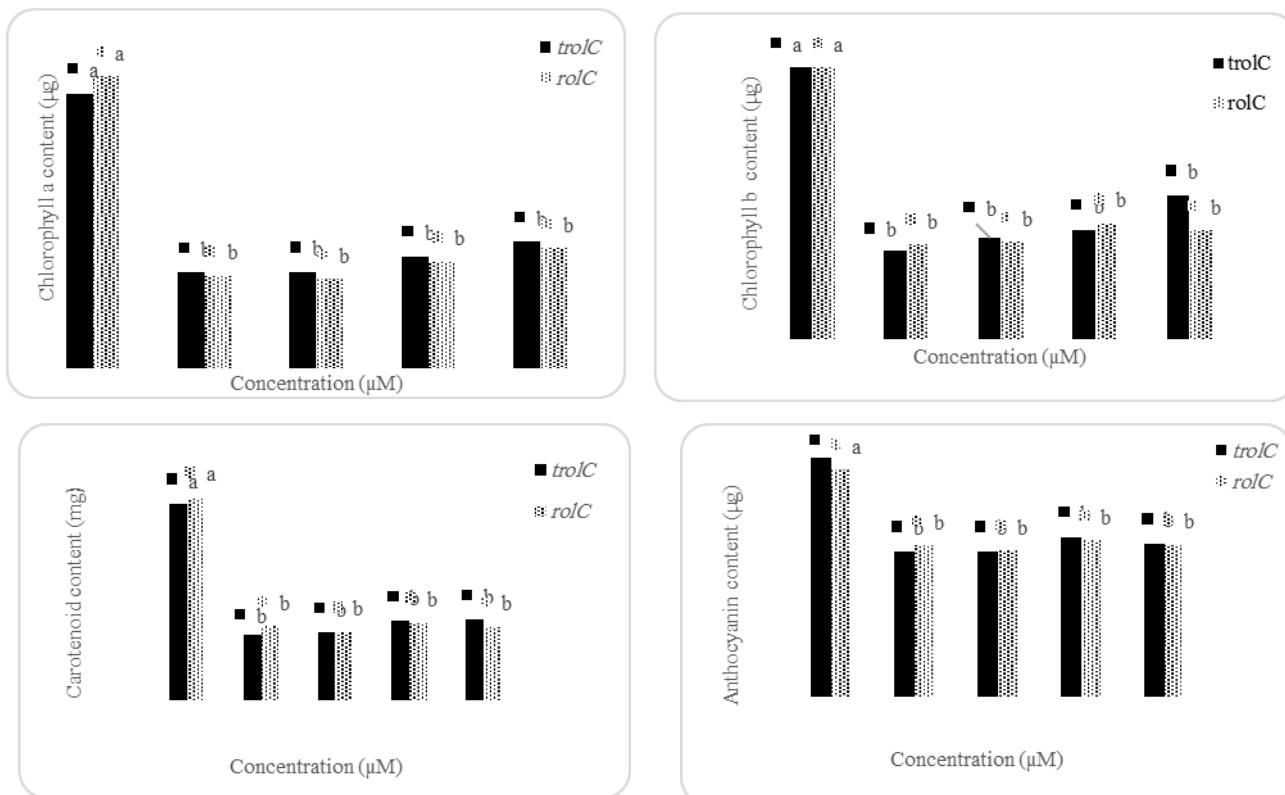
بررسی محتوای رنگدانه‌ای گیاهان

روند تغییرات رنگدانه‌های کلروفیل a و b و کاروتونوئیدها در گیاهان القانشده (گروه شاهد) و القا شده با غلظت‌های مختلف دگزامتاژون در شکل ۲ آمده است و جدول ۱ تجزیه واریانس داده‌های مربوطه را نشان می‌دهد. همان‌گونه که مشاهده می‌شود محتوای رنگدانه‌ای گیاهان شاهد در هر دو لاین *rolC* و *rolC* از گیاهان گروه القا بسیار بیشتر است؛ با این وجود غلظت‌های فزاینده القاگر، دگزامتاژون، تأثیر قابل توجهی در میزان کاهش رنگدانه‌ها نداشته و به عبارت دیگر غلظت پایین آن (۱ میکرو مولار) نیز باعث بیان حداقلی ژن‌های *rolC* و *rolC* و کلروزه شدن برگ‌ها و کاهش محتوای رنگدانه‌ای آنها گردیده است. مقدار آنتوسیانین-ها نیز در گیاهان گروه شاهد بیشتر از گروه القا بوده و غلظت‌های مختلف القاگر تأثیر متفاوتی در کاهش رنگدانه‌های



شکل ۱- مقایسه توالی نوکلئوتیدی ژن *rolC* آگروریکتیریوم ریزوئنر (سویه A4) با همولوگ گیاهی آن در توتون، *trolC*. حروف مشخص شده با رنگ قرمز نوکلئوتیدهای یکسان در دو توالی و حروف آبی و مشکی نوکلئوتیدهای غیریکسان را نشان می‌دهند. درصد تشابه نوکلئوتیدی بیش از ۹۰ درصد می‌باشد.

Figure 1. Comparison of nucleotide sequence between *A. rhizogenes* *rolC* gene (strain A4) with its plant homologue in tobacco, *trolC*. The letters marked in red represent the same nucleotides in the two sequences, and the blue and black letters represent non-identical nucleotides. The nucleotide similarity percentage is more than 90%.

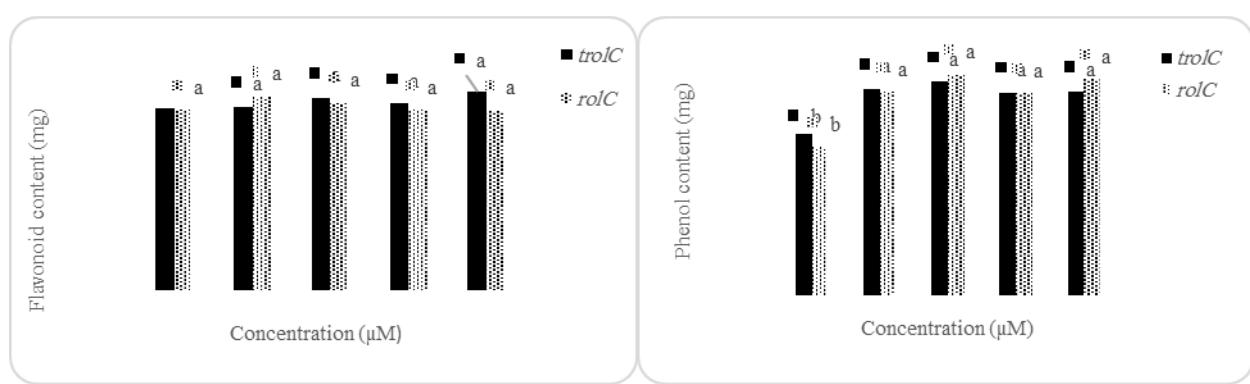


شکل ۲- محتوای رنگدانه‌ای گیاهان ترازن *troLC* و *rolC* در تیمار با غلظت‌های فزاینده دگراماتازون (dex). دگراماتازون صفر μM شرایط شاهد را نشان می‌دهد.

Figure 2. Pigment content of *rolC* and *troLC* transgenic plants in treatment with increasing concentrations of dexamethasone (dex). 0 μM of Dexamethasone indicates the control condition.

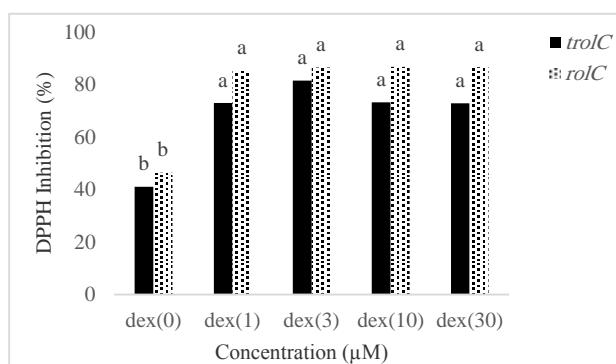
متabolیت‌های ثانویه شده و به احتمال زیاد با دخالت در واکنش‌های دفاعی گیاهان و تولید پروتئین‌هایی همچون بتا ۱ و ۳ phatogenesis (PR2) گلوكاناز -که جزء پروتئین‌های دفاعی related (گیاهی می‌باشد- در تحریک بیوستر متابولیت‌های ثانویه همچون مواد فنولی و آلکالوئیدی دخالت می‌کند. پژوهش حاضر علاوه بر ژن *rolC*، نقش تحریکی ژن *troLC* را در افزایش محتوای فنول کل گیاه به اثبات رساند (شکل ۳).

گزارش‌های متعددی در مورد نقش تحریکی ژن *rolC* در بیوستر متابولیت‌های ثانویه گیاهی وجود دارد که افزایش آلکالوئیدهای مختلف (Bonhomme et al. 2000; Palazón et al. 1998)، آنتراکینون‌ها (Bulgakov et al. 2003; Shkryl et al. 2007)، جینستوسیدها (Bulgakov et al. 1998) و اسکوپولامین (Bonhomme et al. 2000a) را در این گیاهان نسبت به گیاهان شاهد نشان می‌دهد. تصور کنونی این است که ژن *rolC* با تولید سیگنالی باعث تحریک در مسیر بیوستر



شکل ۳- محتوای فنول و فلاونوئید کل گیاهان تراژن *rolC* و *troLC* در تیمار با غلظت‌های فزاینده دگرامتاژون (dex). دگرامتاژون صفر μM شرایط شاهد را نشان می‌دهد.

Figure 3. Total phenol and flavonoid content of *roLC* and *troLC* transgenic plants in treatment with increasing concentrations of dexamethasone (dex). 0 μM of Dexamethasone indicates the control condition.



شکل ۴- خاصیت آنتی اکسیدانی عصاره گیاهان تراژن *rolC* و *troLC* در تیمار با غلظت‌های فزاینده دگرامتاژون (dex). دگرامتاژون صفر μM شرایط شاهد و محور عمودی درصد مهار رادیکال‌های آزاد عصاره‌های گیاهی را که به کمک ترکیب دی فنیل پیکریل هیدرازیل (DPPH) به دام انداخته شده‌اند- نشان می‌دهد.

Figure 4. Antioxidant activity of *roLC* and *troLC* transgenic plant extracts in treatment with increasing concentrations of dexamethasone (dex). 0 μM of Dexamethasone indicates the control condition. Vertical axis indicates the percentage of free radicals scavenging activities of plant extracts using DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl-hydrate).

جدول ۱- تجزیه واریانس تأثیر سطوح مختلف تیمار بر صفات مورد مطالعه گیاهچه‌های توتون

Table 1. Analysis of variance of the effect of different treatment levels on studied traits of tobacco plants. ns and ** indicate non-significant and significant differences at the 1% level, respectively.

										منابع تغییرات
DPPH	فلاؤنوثید	فنول	آنتوسیانین	کاروتونوئید	b کلروفیل	a کلروفیل	درجه آزادی			تیمار
** ۱۴۱۶/۱۵۴	ns ۹/۷۲۲	** ۰/۰۰۵	** ۶۳۴/۸۲۹	** ۰/۳۴۶	** ۴/۸۳۶	** ۵۴/۸۹۱	۳			
۸۲/۲۴۷	۸/۱۶۷	۰/۰۰۱	۱۷/۶۹۴	۰/۰۰۲	۰/۰۷۲	۰/۶۳۶				خطای آزمایش

ns و ** به ترتیب بیانگر عدم معنی دار بودن و معنی دار بودن اختلاف در سطح ۱٪ می‌باشند.

فعالیت آنتی اکسیدانی گیاهان *Lactuca sativa* که ژن *rolC* را بیان می‌کنند، بسیار بیشتر از گیاهان وحشی می‌باشد (Ismail et al. 2016). بمواظات در سلول‌های گیاهی تراژن *Rubia cordifolia* با ژن *rolC*، کاهش قابل ملاحظه‌ای در مقدار گونه-های فعال اکسیژن (ROS) نسبت به سلول‌های غیرتراژن مشاهده شد که نشان از حذف ROS‌ها به دلیل افزایش خاصیت آنتی-اکسیدانی عصاره این سلول‌ها بود (Bulgakov, 2008). فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره‌های گیاهی که در جلوگیری از تنفس‌های اکسیداتیو نقش اصلی را ایفا می‌کند؛ به دلیل حضور ترکیبات غیرآنژیمی همچون فنول‌ها و فلاؤنوثیدها و رنگدانه‌هایی همچون کاروتونوئیدها و آنتوسیانین‌ها و یا حضور آنزیم‌های آنتی اکسیدانی (پراکسیداز، کاتالاز و سوپر اکسید دیسموتاز) مربوط می‌باشد (Bailey-Serres and Mittler, 2006). گیاهان به عنوان موجوداتی هوشمند شرایط غیرطبیعی محیط‌زیست خود را بلافاصله ادراک نموده و متناسب با این شرایط، پاسخ‌های دفاعی متنوعی از خود بروز می‌دهند که در سطوح مختلف متابولیکی، مولکولی، مورفولوژیک و ساختاری نمود می‌یابند. تمامی این پاسخ‌ها بطور همزمان بروز نکرده و اولویت‌بندی بروز هر یک از پاسخ‌های دفاعی بسته به نوع گیاه و نوع تنفس بسیار متغیر است. در پژوهش حاضر، گیاهان تراژن القا شده، افزایش محتوای ترکیبات فنولی خود را که با افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی نیز همراه است در اولویت قرار داده و با سنتز بیشتر مواد فنولی، پیش‌تر از سایر ترکیبات آنتی اکسیدان (فلاؤنوثیدها، کاروتونوئیدها و آنتوسیانین‌ها) با حضور اگزوزن‌های *rolC* و *troLC* و اثرات آنها مقابله نمودند. در یک جمع‌بندی کلی از یافته‌های این پژوهش می‌توان چنین نتیجه-گیری نمود که همولوگ گیاهی ژن *rolC* باکتریایی یعنی ژن

برخلاف محتوای فنولی، گیاهان تراژن *rolC* و *troLC* بعد از القا آفزایشی در میزان فلاؤنوثید کل خود نسبت به گیاهان شاهد نشان ندادند که این امر می‌تواند بدلیل عدم تأثیر بیان این ژن‌ها در مسیر بیوسترنی فلاؤنوثیدها و آنزیم‌های مربوطه باشد. در گزارش‌های متعددی نیز همواره می‌توان تأثیر مثبت یک عامل بیولوژیک یا غیربیولوژیک را بر تحریک سنتز یک نوع متابولیت‌ثانویه و نه الزاماً بر روی متابولیت دیگر مشاهده نمود. سبحانی‌زاده و همکاران (Sobhanizadeh et al. 2017) نشان دادند که نانوذرات نقره سبب کاهش چشمگیر مقادیر فنول تام در عصاره استخراج شده از کالوس‌های گیاه سیاه دانه شد در حالیکه محتوای فلاؤنوثیدی آنها تغییر چندانی نکرد. جلیلی و همکاران (Jalili et al. 2017) نیز با تأثیر اشعه گاما در دوز شدید بر گیاه درمنه کوهی (*Artemisia aucheri*) نشان دادند که محتوای فنول کل گیاهان تحت تیمار افزایش یافت در حالیکه میزان فلاؤنوثید و تانن در آنها سیر کاهشی نشان داد. آنها یکی از دلایل احتمالی این امر را کاهش فعالیت آنزیم اختصاصی مسیر بیوسترن فلاؤنوثیدها، آنزیم چالکون سtantاز، و یا جهش در ژن کد کننده آن بر شمردند.

ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی

بررسی مقایسه‌ای فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره گیاهان تراژن القا شده و گیاهان شاهد نشان داد که در گیاهان تراژن *rolC* و *troLC* القا شده، قدرت احیاکنندگی رادیکال‌های آزاد در حدود ۵۰ درصد بیشتر از گیاهان شاهد بود و این گیاهان در حدود ۵۰٪ رادیکال‌های آزاد را به دام انداخته و مهار نمودند (شکل ۴). از طرف دیگر غلظت‌های فزاینده دگراماتازون در محیط کشت تأثیری در فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره‌ها اعمال نکرد. همراستا با نتایج بدست آمده در این پژوهش، ایسماعیل و همکاران نشان دادند که

فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان، بررسی‌های تشریحی- تکوینی و نیز مطالعات مولکولی گیاهان تراژن می‌تواند اطلاعات جامع‌تری در مورد مکانیسم عملکرد این ژن‌ها ارایه دهد.

trolC توانسته است در طول زمان و تکامل گاههای توتون ویژگی-های عملکردی خود را حفظ نماید و مشابه با ژن باکتریایی باعث ایجاد تغییرات مورفو‌لورژیک، فیزیولورژیک و بیوشیمیایی گردد. ادامه مطالعات عمیق‌تر در سطح بیوشیمیایی خصوصاً بررسی

منابع

- Amini G, Mohajjal Shoja H, Mohajjal Kazemi E, Motafakker Azad, R. 2019.** Investigation of the effect of *rolC* and *trolC* genes on germination and growth parameters of transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum*) seedlings. Journal of Cellular and Molecular Research 32(2): 155-165. (In Farsi with English abstract).
- Aoki S, Syono K. 1999c.** Horizontal gene transfer and mutation: *Ngrol* genes in the genome of *Nicotiana glauca*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 96: 13229–13234.
- Bailey-Serres J, Mittler R. 2006.** The Roles of Reactive Oxygen Species in Plant Cells. Plant physiology 141: 311
- Bonhomme V, Laurain-Mattar D, Fliniaux MA. 2000.** Effects of the *rolC* gene on hairy root: induction development and tropane alkaloid production by *Atropa belladonna*. J Nat Prod 63(9):1249-52.
- Bulgakov VP, Khodakovskaya MV, Labetskaya NV, Chernoded GK, Zhuravlev YN. 1998.** The impact of plant *rolC* oncogene on ginsenoside production by gingseng hairy root cultures. Phytochemistry 49:1929–1934.
- Bulgakov VP, Tchernoded GK, Mischenko NP, Shkryl YN, Glazunov VP, Fedoreyev SA, Zhuravlev YN. 2003.** Effects of Ca²⁺ channel blockers and protein kinase/phosphatase inhibitors on growth and anthraquinone production in *Rubia cordifolia* callus cultures transformed by the *rolB* and *rolC* genes. Planta 217: 349–355.
- Chang C, Yang M, Wen H, Chern J. 2002.** Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. J. Food Drug Analaysis 10: 178-182.
- Guillon S1, Trémouillaux-Guiller J, Pati PK, Rideau M, Gantet P. 2006.** Harnessing the potential of hairy roots: dawn of a new era. Trends Biotechnol 24(9):403-9.
- Ismail H, Dilshad E, Waheed MT, Sajid M, Kayani WK, Mirza B. 2016.** Transformation of *Lactuca sativa* L. with *rolC* gene results in increased antioxidant potential and enhanced analgesic, anti-inflammatory and antidepressant activities in vivo. 3 Biotech 6(2): 215.
- Jalili Sh, Ehsanpour AA, Asghary GhR, Abdi MR. 2017.** Effect of gamma radiation on physiological and antioxidant factors of *Artemisia aucheri* boiss. Journal of Plant Research 29(4): 741-750. (In Farsi with English abstract).
- Landi F, Capocasa E, Costantini B, Mezzetti M. 2009.** *rolC* strawberry plant adaptability, productivity, and tolerance to soil-borne disease and mycorrhizal interactions. Transgenic Res 18(6): 933-942
- Masukasu H, Karin O, Kyoto H. 2003.** Enhancement of anthocyanin biosynthesis by sugar in radish (*Raphanus sativus*) hypocotyls. Plant Science 164: 259–265.
- Meda A, Lamien CE, Romito M, Millogo J, Nacoulma OG. 2005.** Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. Food Chemistry 91: 571-577.
- Meyer AD, Ichikawa T, Meins F. 1995.** Horizontal gene transfer: regulated expression of tobacco homologue of the *Agrobacterium rhizogenes* *rolC* gene. Mol. Gen. Genet 249: 265–273.
- Mohajjal_Shoja H, Clement B, Perot J. 2011.** Biological activity of the *Agrobacterium rhizogenes*-derived *trolC* gene of *Nicotiana tabacum* and its functional relation to other plant genes. MPMI 24: 44–53.
- Palazon J, Cusido RM, Roig C, Piñol, MT. 1998.** Expression of the *rolC* gene and nicotine production in transgenic roots and their regenerated plants. Plant Cell Reports, 17: 384-390.
- Schmülling T, Fladung M, Grossmann K, Schell J. 1993.** Hormonal content and sensitivity of transgenic tobacco and potato plants expressing single *rol* genes of *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA. Plant J 3: 371 –382.
- Schmülling T, Schell J, Spena A. 1988.** Single genes from *Agrobacterium rhizogenes* influence plant development. EMBO J: 2621–2629.
- Shkryl YN, Veremeichik GN, Bulgakov VP, Tchernoded GK, Mischenko NP, Fedoreyev SA, Zhuravlev YN. 2008.** Individual and combined

effects of the *rolA*, *B* and *C* genes on anthraquinone production in *Rubia cordifolia* transformed calli. Biotechnol. Bioeng 1: 118-125.

Sobhanizadeh A, Solouki M, Fazeli-Nasab B. 2017. Optimization of Callus Induction and Effects of Biological and Non-biological Elicitors on Content of Phenol/ Flavonoid Compounds in *Nigella sativa* under In-Vitro Conditions. Cell and Tissue Journal 8(2): 165-184. (In Farsi with English abstract).

Sükran D, Tohit G, Ridvan S. 1998. Spectrophotometric Determination of chlorophyll - A, B and total carotenoid contents of some algae species using different solvents. Tr. J. Bot. 22: 13-17.

Genetic Engineering and Biosafety Journal**Volume 8, Number 2****Evaluation of antioxidant activity, phenolic contents and pigment level of *rolC* and *trolC* transgenic tobacco plants**

Gita Amini, Hanieh Mohajjal Shoja*, Rohollah Motafakkerazad, Elham Mohajjal Kazemi

Department of Plant Biology, Faculty of Natural Science, University of Tabriz, IRAN

*Corresponding Author Email: mohajelh@yahoo.com

Abstract

Agrobacterium is one of the gram negative genera of soil bacteria that causes many diseases in plants through the use of horizontal gene transfer. The *rol* genes of *A. rhizogenes*, *rolA*, *rolB* and *rolC*, are the major causes of 'hairy root' symptoms in infected plants. It has been demonstrated that *rol* genes could have a positive effect on secondary metabolism in plants. The homologue of *rol* genes has also been found in some plants such as the genus Nicotiana and a member of Scrophulariaceae, *Linaria vulgaris*. Here we examined the effect of *A. rhizogenes* *rolC* gene and its homologue in tobacco, *trolC* gene, on pigment content, production of some secondary metabolites and antioxidant activity in '*in vitro*' cultured 4-week old seedlings. In Nicotiana plants, the transgenes were located under the control of dexamethasone inducible promoter. Methanol extracts of aerial parts of seedlings were prepared and DPPH radical scavenging method was used to evaluate the antioxidant activity. Experiments were performed in completely randomized design with 3 replications. Results showed that in induced transgenic lines, pigments content (chlorophyll a, chlorophyll b, carotenoid and anthocyanin) were decreased and total phenol contents were significantly increased compared to non-induced plants (control) and DPPH radical scavenging activity exhibited a remarkable increase in induced plants. However, the level of flavonoids didn't show a significant change. These results indicate that plant homologue of bacterial *rolC* gene, *trolC*, functions as *rolC* and can be used as an alternative to enhance the level of secondary metabolite in plants.

Keywords: *rol* genes, Nicotiana tabacum, antioxidant activity, phenolic content