مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
ISSN 2588-5073 چاپی
ISSN 2588-5081 الکترونیکی
دوره ۸، شماره ۲، پاییز و زمستان ۹۸
صفحه ۱۴۲-۱۳۳

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 8, Number 2

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

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

گیتا امینی، هانیه محجل شجا*، روح اله متفکر آزاد، الهام محجل کاظمی

Gita Amini, Hanieh Mohajjel Shoja*, Rohollah Motafakkerazad, Elham Mohajjel 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*، *rolB* و *rolC* *آگروباکتریوم ریزوژنز* 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 *نیکوتیانا* و در*Linaria vulgaris* یافت شده‌اند. هدف این پژوهش بررسی تأثیر ژن باکتریایی *rolC* و همولوگ گیاهی آن، *trolC*، از نظر محتوای متابولیت‌های ثانویه، رنگدانه‌های فتوسنتزی و خاصیت آنتی‌اکسیدانی در عصاره گیاهچه‌های چهار هفته‌ای بود. به این منظور گیاهان توتون (*Nicotiana tabacum* L.) تراژن *rolC* و *trolC* که ژن‌ها تحت کنترل پروموتر القایی 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 کاروتنوئید 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 فلاونوییدی گیاهچه‌ها در گیاهان تراژن القا شده نسبت به گیاهچه‌های شاهد تفاوت قابل ملاحظه ای 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 می‌توان نتیجه گیری نمود که ژن *trolC* در طول زمان و تکامل گیاه توانسته است ویژگی‌های عملکردی خود را حفظ نماید.

واژه‌های کلیدی

ژن *rol*،
توتون،
محتوای فنولی،
فعالیت آنتی‌اکسیدانی

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-13]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.2.4.2]

مقدمه

گیاهان در طبیعت با تنش‌های مختلفی همچون خشکی، شوری، کمبود عناصر و پاتوژن‌های گوناگون مواجه می‌شوند و متناسب با نوع تنش، پاسخ‌های دفاعی گوناگونی از خود بروز می‌دهند. یکی از میکروارگانیسم‌های موجود در خاک که توانایی آلودگی سلول-های گیاهی خصوصاً دولپه‌ای‌ها را دارد؛ باکتری گرم منفی *آگروباکتریوم ریزوژنز* 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 *آ. ریزوژنز* 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 می باشند که از این میان می توان به جنس *نیکوتیانا* اشاره نمود (Meyer *et al.* 1995; Aoki and Syono, 1999). تصور می شود در طول روند تکامل پس از آلودگی گیاهان با آگروباکتریوم برخی از ژن‌های باکتری در ژنوم گیاه ماندگار شده‌اند. در گیاه *Nicotiana tabaccum* هومولوگ ژن *rolC* *آ. ریزوژنز*، *trolC* (tobacco *rolC*) نامیده می‌شود و بیان اگزوژن 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 ریشه گردد (Mohajjel shoja *et al.* 2011). به عبارتی ژن *trolC* توانایی عملکردی خود را در ویژگی‌های ذکر شده حفظ نموده است. گیاهان گروه بزرگ و متنوعی از ترکیبات آلی به نام متابولیتهای 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، رنگ-های طبیعی، سم‌ها، مواد توهم‌زا (مانند کوکائین، هروئین، 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 می-باشد که در آن بیان ژنی خاص در گیاه باعث افزایش قابل توجه ترکیب مورد نظر می‌گردد. گزارش‌های متعددی تأثیر مثبت ژن *rolC* *آ. ریزوژنز* را در تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهی نشان داده‌اند که از آن جمله می‌توان به افزایش آلکالوئیدهای گوناگون، آنتراکینون‌ها و جینسنوسیدها اشاره نمود (Bonhomme *et al.* 2000; Bulgakov, 1998; Shkryl *et al*. 2007). افزایش مقدار این ترکیبات در گیاه معمولاً توأم با افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه نیز می‌باشد (Bulgakov, 2008). به منظور بررسی عمیق‌تر تأثیر ژن *rolC* *آ. ریزوژنز* در گیاهان و مقایسه آن با همولوگ گیاهی اش، *trolC* (شکل ۱)، این پژوهش با هدف اندازه‌گیری محتوای رنگدانه‌ای و برخی متابولیت‌های ثانویه و نیز فعالیت آنتی-اکسیدانی گیاهان تراژن *rolC* و *trolC* که ژن‌ها تحت کنترل پروموتر القا شونده با گلوکوکورتیکوئید دگزامتازون بودند، در شرایط کشت درون شیشه‌ای 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 *trolC* تحت کنترل پروموتر القایی با گلوکورتیکوئید دگزامتازون بوده و تنها در حضور این ماده بیان این ژن‌ها صورت می‌گرفت (Amini *et al.* 2019). غلظت‌های استفاده شده دگزامتازون ۰، ۱، ۳، ۱۰ و ۳۰ میکرومولار در محیط کشت بود. ۵۰ عدد بذر استریل در ۲۰ میلی لیتر محیط کشت جامد MS کشت شد. جهت استریلیزاسیون،

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-13]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.2.4.2]

بذرها به مدّت ۲ دقیقه در اتانول ۷۰ درصد و سپس ۱۵ دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۱۰درصد قرار گرفتند. سپس ۳ مرتبه و هر بار به مدّت 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. پتری‌دیش‌ها 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 SPSS 16 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 فتوسنتزی 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 روشناورها در طول موج‌های ۶۶۵، ۶۵۳ و ۴۷۰ نانومتر اندازه‌گیری و محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی با استفاده از فرمول‌های زیر محاسبه شدند (Şükran *et al*. 1998).

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

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

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

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

Chlorophyll a, C_b = Chlorophyll b, C_{total} =Total C_a = Chlorophyll, C_{x+c} = 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 سانتریفوژ 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 اسپکتروفتومتر خوانده شد. از محلول اسید کلریدریک ۱ درصد متانول به عنوان شاهد استفاده گردید. میزان آنتوسیانین برای هر عصاره با استفاده از رابطه‌ی 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 ۲و۲-دی فنیل ۱-پیکریل هیدرازیل (DPPH) با استفاده از عوامل آنتی‌اکسیدانی می‌باشد که سبب کاهش میزان جذب در طول موج ۵۲۰ نانومتر می گردد. زمانی‌که محلول DPPH با یک ماده‌ی 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 اسپکتروفتومتر اندازه گیری شد و درصد مهار رادیکال آزاد هر عصاره (IA) با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

$$IA\% = \frac{A520\ control - A520\ sample}{A520\ control} \times 100$$

تعیین محتوای فنول کل

محتوای فنول کل نمونه‌ها با روش فولین- سیوکالتیو اندازه‌گیری شد (Meda *et al*., 2005). به این منظور عصاره‌ها با غلظت ۱۰ml/mg تهیه شد. سپس ۰/۵ ml از عصاره با ۲/۵ 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 قرارگرفتن نمونه‌ها در دمای اتاق، جذب نمونه‌ها با دستگاه اسپکتروفوتومتر درطول 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.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-13]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.2.4.2]

تعیین محتوای فلاونوئید کل

محتوای فلاونوئید عصاره با روش رنگ‌سنجی ارزیابی شد (Chang *et al*. 2002). عصاره گیاهی با غلظت ۱۰ml/mg تهیه شد. ۰/۵ ml از عصاره در ۱/۵ ml متانول حل و ۰/۱ ml آلومینیوم کلراید ۱۰ درصد به آن اضافه شد. سپس ۰/۱ ml محلول پتاسیم 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 ٤١٥ 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 کاملا 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 معنی‌دار بین داده‌ها، میانگین‌ها با روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ ٪ گروه‌بندی و مقایسه شدند.

نتایج و بحث

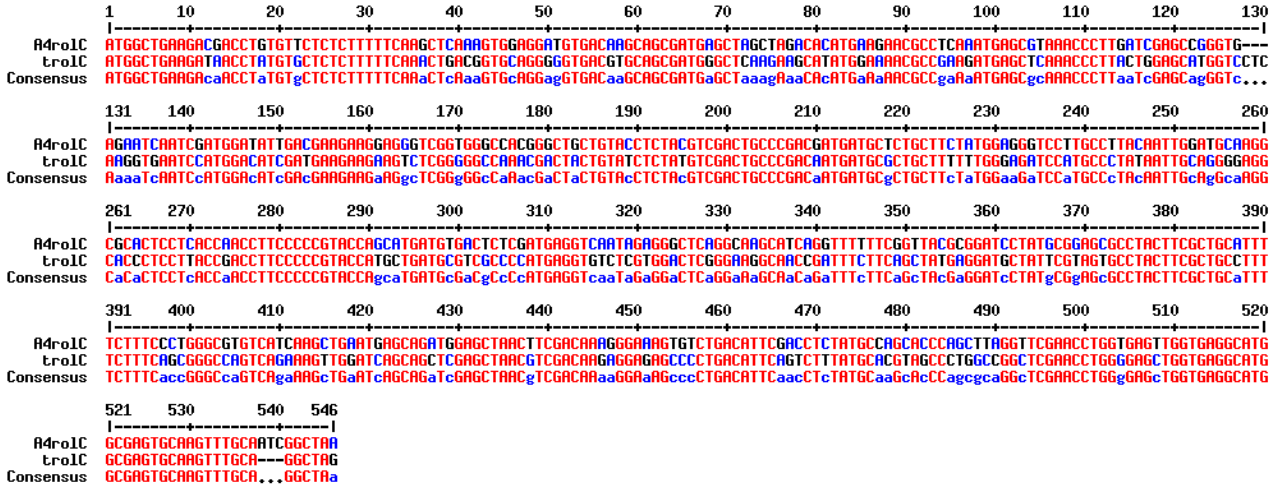
بررسی محتوای رنگدانه‌ای گیاهان

روند تغییرات رنگدانه‌های کلروفیل a و b و کاروتنوئیدها در گیاهان القانشده (گروه شاهد) و القا شده با غلظت‌های مختلف دگزامتازون در شکل ۲ آمده است و جدول ۱ تجزیه واریانس داده های مربوطه را نشان می‌دهد. همان‌گونه که مشاهده می‌شود محتوای رنگدانه‌ای گیاهان شاهد در هر دو لاین *rolC* و *trolC* از گیاهان گروه القا بسیار بیشتر است؛ با این جود غلظت‌های فزاینده القاگر، دگزامتازون، تأثیر قابل توجهی در میزان کاهش رنگدانه‌ها نداشته و به عبارت دیگر غلظت پایین آن (۱ میکرو مولار) نیز باعث بیان حداکثری ژن‌های *rolC* و *trolC* 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 غلظت-های مختلف القاگر تأثیر متفاوتی در کاهش رنگدانه‌های انتوسیانین نداشته است (شکل ۲). نکته‌ی قابل توجهی که وجود دارد اینکه روند تأثی ژن‌های *rolC* و *trolC* 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 می کند نشان داده‌اند. بعضی از این تغییرات شامل کوتولگی گیاهان بیان کننده این ژن به دلیل کاهش غالبیت رأسی ساقه و در نتیجه افزایش غالبیت جانبی و افزایش شاخه-زایی، تسریع گلدهی، کاهش تولید دانه گرده، ایجاد برگ‌های باریک و دراز و رنگ پریده و مقاومت به برخی آلودگی‌های میکروبی همچون مقاومت به *Phytophthora cactorum* می‌باشد (Schmülling *et al*. 1988, 1993; Landi *et al*. 2009). ژن *trolC* از نظر توالی بیش از ۹۰درصد به ژن *rolC* *آگرو باکتریوم ریزوژنز* 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 *trolC* 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 *trolC* بعد از القا مشاهده شد که تأییدی بر یافته‌های گزارش‌های قبلی می‌باشد.

بررسی محتوای برخی متابولیت‌های ثانویه محتوای فنول و فلاونوئید کل

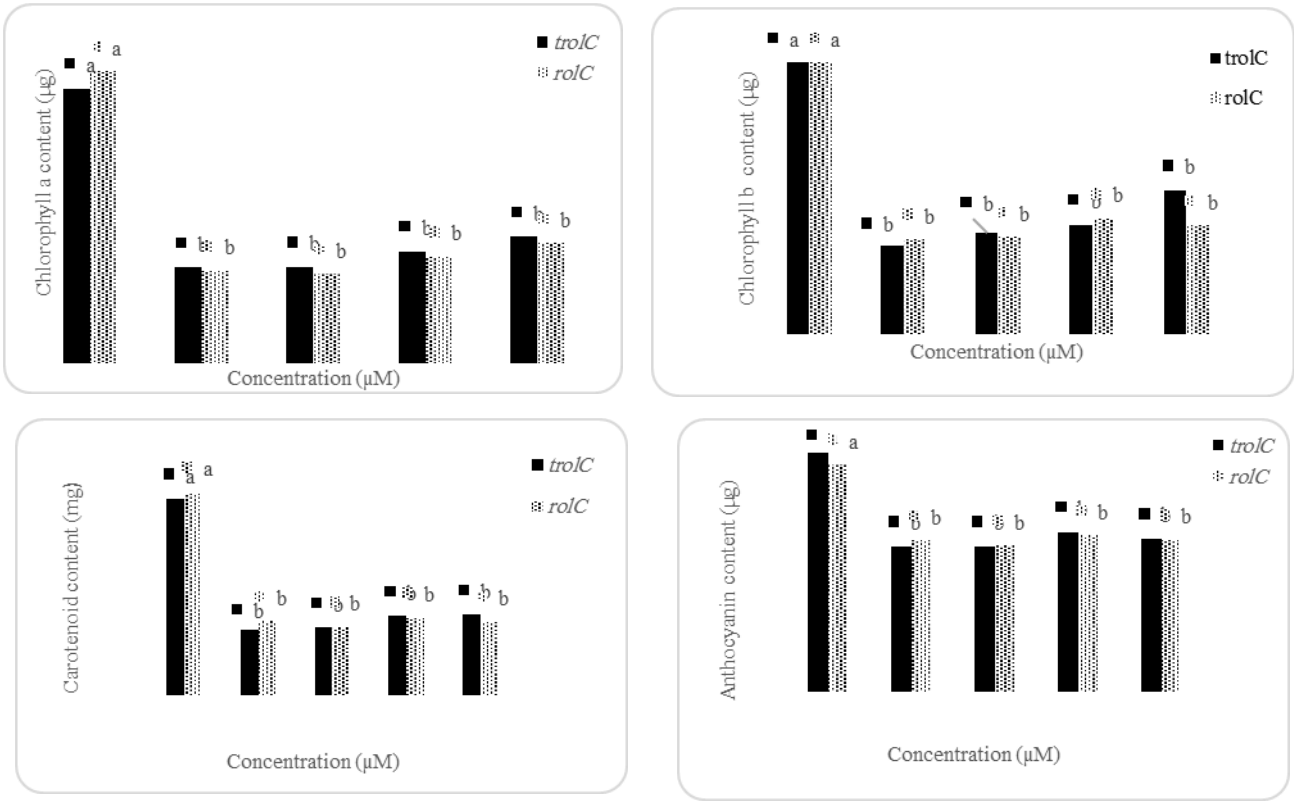
همان‌گونه که در شکل۳ مشاهده می‌شود محتوای فنول کل در گیاهان تراژن *rolC* و *trolC* بعد از القا نسبت به گیاهان گروه شاهد تا حدود ۲۵٪ افزایش نشان داد و کاربرد غلظت‌های فزاینده دگزامتازون در محیط کشت تأثیر متفاوتی در افزایش فنول کل نداشت و بنابراین کمترین غلظت این ترکیب برای افزایش محتوای فنولی گیاهان کافی بود.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-13]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.2.4.2]



شکل ۱- مقایسه‌ی توالی نوکلئوتیدی ژن *rolC آگروباکتریوم ریزوژنز* (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 ۹۰درصد می‌باشد.

Figure1. 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%.

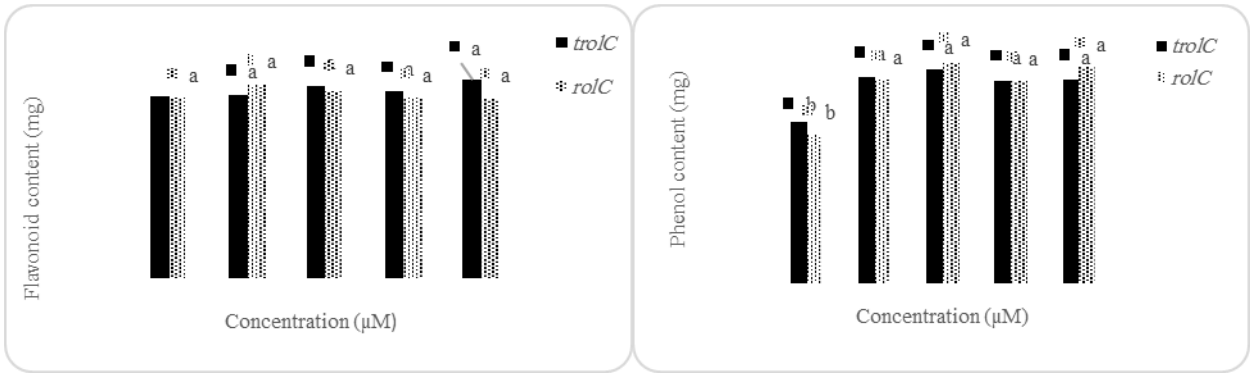


شکل۲- محتوای رنگدانه‌ای گیاهان تراژن *rolC* و *trolC* در تیمار با غلظت‌های فزاینده دگزامتازون (dex). دگزامتازون صفر µM شرایط شاهد را نشان می‌دهد.

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

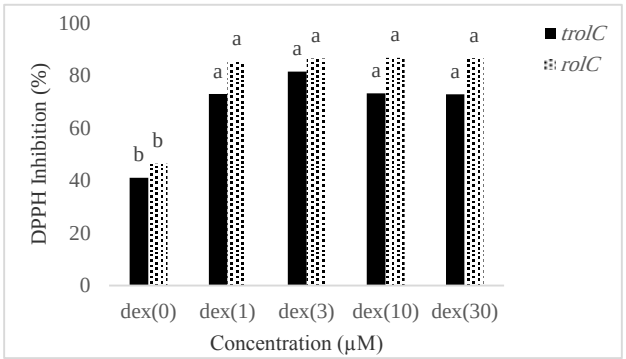
[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-13]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.2.4.2]

گزارش‌های متعددی در مورد نقش تحریکی ژن *rolC* در بیوسنتز 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)، جینسنوسیدها (Bulgakov *et al*. 1998)، هیوسیامین 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 بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه شده و به احتمال زیاد با دخالت در واکنش های دفاعی گیاهان و تولید پروتئین‌هایی همچون بتا ۱و ۳ گلوکاناز –که جزء پروتئین‌های دفاعی PR2 (phatogenesis related) گیاهی می‌باشند– در تحریک بیوسنتز 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).



شکل۳– محتوای فتول و فلاونوئید کل گیاهان تراژن *rolC* و *trolC* در تیمار با غلظت‌های فزاینده دگزامتازون (dex). دگزامتازون صفر µM شرایط شاهد را نشان می-دهد.

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



شکل٤– خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره گیاهان تراژن *rolC* و *trolC* در تیمار با غلظت‌های فزاینده دگزامتازون (dex). دگزامتازون 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 Mµ 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).

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-13]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.2.4.2]

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.

	میانگین مربعات							
منابع تغییرات	درجه آزادی	a کلروفیل	b کلروفیل	کاروتنوئید	آنتوسیانین	فنول	فلاونوئید	DPPH
تیمار	۳	٥٤/٨٩١ **	٤/٨٣٦**	۰/۳٤٦ **	٦۳٤/٨۲۹**	۰/۰۰٥ **	۹/۷۲۲ ns	۱٤۱٦/۱٥٤**
خطای آزمایش		۰/٦۳٦	۰/۰۷۲	۰/۰۰۲	۱۷/٦۹٤	۰/۰۰۱	۸/۱٦۷	۸۲/۲٤۷

ns و ** به‌ترتیب بیانگر عدم معنی‌دار بودن و معنی‌دار بودن اختلاف در سطح ۱٪ می‌باشند.

برخلاف محتوای فنولی، گیاهان تراژن *rolC* و *trolC* بعد از القا افزایشی در میزان فلاونوئید کل خود نسبت به گیاهان شاهد نشان ندادند که این امر می‌تواند بدلیل عدم تأثیر بیان این ژن‌ها در مسیر بیوسنتزی فلاونوئیدها 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 برروی 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 فلاونوئیدی 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 فلاونوئید و تانن در آنها سیر کاهشی نشان داد. آنها یکی از دلایل احتمالی این امر را کاهش فعالیت آنزیم اختصاصی مسیر بیوسنتز فلاونوئیدها، آنزیم چالکون سنتاز، و یا جهش در ژن کد کننده آن برشمردند.

ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی

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 ۵۰درصد بیشتر از گیاهان شاهد بود و این گیاهان درصد بیشتری از رادیکال‌های آزاد را به دام انداخته و مهار نمودند (شکل ٤). از طرف دیگر غلظت‌های فزاینده دگزامتازون در محیط‌کشت تأثیری در فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها اعمال نکرد. همراستا با نتایج بدست آمده در این پژوهش، ایسمعیل و همکاران نشان دادند که فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاهان *Lactuca sativa* که ژن *rolC* را بیان می‌کنند، بسیار بیشتر از گیاهان وحشی می‌باشد (Ismail *et al*. 2016). بموازات در سلول‌های گیاهی تراژن *Rubia cordifolia* با ژن *rolC*، کاهش قابل ملاحظه‌ای در مقدار گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) نسبت به سلول‌های غیرتراژن مشاهده شد که نشان از حذف ROSها به دلیل افزایش خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره این سلول‌ها بود (Bulgakov, 2008). فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های گیاهی که در جلوگیری از تنش‌های اکسیداتیو نقش اصلی را ایفا می‌کند؛ به دلیل حضور ترکیبات غیرآنزیمی همچون فنول‌ها و فلاونوئیدها و رنگدانه‌هایی همچون کارتنوئیدها و آنتوسیانین‌ها و یا حضور آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (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 تنش بسیار متغیر است. در پژوهش حاضر، گیاهان تراژن القا شده، افزایش محتوای ترکیبات فنولی خود را که با افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی نیز همراه است در اولویت قرار داده و با سنتز بیشتر مواد فنولی، پیش‌تر از سایر ترکیبات آنتی‌اکسیدان (فلاونوئیدها، کارتنوئیدها و آنتوسیانین‌ها) با حضور اگزوژن‌های *rolC* و *trolC* و اثرات آنها مقابله نمودند. در یک جمع‌بندی کلی از یافته‌های این پژوهش می‌توان چنین نتیجه‌گیری نمود که همولوگ گیاهی ژن *rolC* باکتریایی یعنی ژن

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-13]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.2.4.2]

trolC توانسته است در طول زمان و تکامل گیاه توتون ویژگی-های عملکردی خود را حفظ نماید و مشابه با ژن باکتریایی باعث ایجاد تغییرات مورفولوژیک، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی گردد. ادامه مطالعات عمیق‌تر در سطح بیوشیمیایی خصوصاً بررسی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، بررسی‌های تشریحی- تکوینی و نیز مطالعات مولکولی گیاهان تراژن می‌تواند اطلاعات جامع‌تری در مورد مکانیسم عملکرد این ژن‌ها ارایه دهد.

منابع

Amini G, Mohajjel Shoja H. Mohajjel 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 Ca^{+2} 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.

Mohajjel_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. Expres sion 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 J7: 2621–2629.

Shkryl YN, Veremeichik GN, Bulgakov VP, Tchernoded GK, Mischenko NP, Fedoreyev SA, Zhuravlev YN. 2008. Individual and combined

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-13]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.2.4.2]

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, Rıdvan 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.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-13]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.2.4.2]

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 Mohajjel Shoja*, Rohollah Motafakkerazad, Elham Mohajjel 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. rhizogenese*, *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. rhizogeneses 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 prompter. 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

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-13]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.2.4.2]