مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
دوره چهارم، شماره دوم، پاییز و زمستان ۱۳۹۴
صفحه ۱۶۳-۱۵۷

بررسی القای ریشه زایی در چند گونه گیاهی دارویی با تاثیر ژنهای *rol* آگروباکتریوم رایزوژنز

Study of root induction in several medicinal plant species using *A. rhizogenes rol* genes

آوین شجاعی[۱]، هانیه محجل شجا*[۲] و ناصر مهنا[۳]

Shojaii A.[1], mohajjel shoja H.[2]*, Mahna N.[3]

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد تکوین گیاهی،
۲- استادیار، گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز
۳- دانشیار، گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، ایران

1. MSc. student, 2. Assistant professor, Plant Biology Dept. Faculty of Natural Science, University of Tabriz
3. Associate professor, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: H_mohajjel@tabrizu.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۴/۱۲/۱۹ - تاریخ پذیرش: ۹۵/۸/۴)

چکیده

آگروباکتریوم رایزوژنز از طریق انتقال ژنهای *rol* موجود در ناقل Ri خود به درون ژنوم سلولهای گیاهی موجب القاء علایم ریشه‌های مویین در بسیاری از گیاهان دولپه‌ای می‌گردد. این ریشه‌ها بدلیل ویژگیهایی همچون رشد سریع، ثبات بالا از نظر ژنتیکی و بیوسنتزی، نگهداری آسان و قابلیت رشد در محیط کشت بدون هورمون دارای اهمیت زیادی در تولید انبوه متابولیتهای ثانویه در بیوراکتورهای صنعتی محسوب می‌شوند. در تحقیق پیش رو تاثیر ژن های *rol* خصوصا ژن *rolB* در القاء ریشه‌زایی گیاهان دارویی سنبل الطیب، سرخارگل و رازیانه که بخش دارویی مورد مصرف آنها ریشه می‌باشد مورد مطالعه قرار گرفت. برای این منظور ریزنمونه‌های برگی و قسمتهای زخمی گیاهان کامل برای تلقیح باکتری و القاء ریشه‌زایی استفاده شدند. اثبات تراژنی ریشه‌ها با استفاده از روش PCR بر روی DNAی ژنومی و اثبات بیان تراژنها نیز توسط روش RT-PCR به وسیله آغازگرهای اختصاصی ژن *rolB* انجام پذیرفت. نتایج بدست آمده نشان داد که بهترین ریشه‌زایی در گیاه سنبل‌الطیب و در شرایط کشت ریز نمونه های برگی در محیط کشت جامد MS صورت می‌گیرد و تلقیح باکتری بر روی گیاهچه‌های کامل تاثیری در القاء ریشه‌زایی نشان نداد.

واژه‌های کلیدی

آگروباکتریوم رایزوژنز
rol
ریشه مویین
RT-PCR

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-11-18]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1394.4.2.3.3]

مقدمه

گیاهان دارویی از دیرباز به منظور درمان بیماری‌ها مورد استفاده قرار گرفته‌اند. با پیشرفت علم شیمی تجزیه امکان شناخت مواد موثره گیاهی فراهم شده و داروهای گیاهی طبیعی و سنتتیک تولید گشته‌اند. با توجه به وحشی و نادر بودن اکثر گیاهان دارویی و وجود مشکلات مرتبط با اهلی نمودن و کشت زراعی آن‌ها و نیز غلظت پایین ترکیبات موثره دارویی (متابولیت‌های ثانویه) در این گیاهان، توجه پژوهشگران به استفاده از راهکارهای فناوری زیستی جهت افزایش تولید و بهره‌وری گیاهان دارویی معطوف شده است. کشت بافت گیاهان دارویی از جمله روش‌های بیوتکنولوژی می‌باشد که به منظور تولید بهینه متابولیت‌های ثانویه مورد استفاده قرار گرفته است (Matkowski, 2008; Davies and Deroles, 2014 ; Murthy *et al*. 2014). اخیراً کشت ریشه‌های موین به عنوان یک منبع پایدار برای بالا بردن سطح این متابولیت-ها پیشنهاد شده است (Chandra and Chandra, 2011; 2007 Srivastava and Srivastava,). ریشه‌های موین که در اثر آلودگی گیاه با آگروباکتریوم رایزوژنز ایجاد می‌شوند دارای رشد بسیار سریع‌تر از بافت‌های مجاور خود بوده و توان بالایی در تولید متابولیت‌های ثانویه دارند. دلیل اصلی سرعت بالای رشد این ریشه‌ها انتقال قطعه‌ای از ژنوم ناقل باکتری موسوم به قطعه T-DNA (Transferred-DNA) به درون ژنوم گیاه می‌باشد که با دارا بودن جایگاه‌های ژنی *rolA*، *rolB*، *rolC* و ژن‌های مربوط به سنتز هورمون‌هایی همچون اکسین باعث تراریزش ریشه‌ها و ایجاد علایم ریشه‌های موین در محل آلودگی گیاه با آگروباکتریوم می‌گردند (Chabaud *et al*. 2006). از ویژگی این ریشه‌ها ثبات بالا از نظر ژنتیکی و بیوسنتزی، نگهداری آسان و قابلیت رشد در محیط کشت بدون هورمون می‌باشد که استفاده از آن‌ها را در بیوراکتورهای صنعتی به منظور دستیابی به تولید انبوه میسر ساخته است. تحقیقات متعددی تولید انبوه متابولیت‌های ثانویه گیاهی را در کشت ریشه‌های موین به اثبات رسانده‌اند. محققان نشان داده‌اند که تولید متابولیت‌های ثانویه خصوصا فلاونوئیدها در ریشه‌های موین گیاه وسمه (*Isatis tinctoria*) آلوده به آگروباکتریوم رایزوژنز و نیز فعالیت آنتی‌اکسیدانی این ریشه‌ها در مقایسه با گیاهان شاهد بسیار چشم‌گیر می‌باشد (Gai *et al*. 2015). در کشت ریشه‌های موین گیاه *Dracocephalum kotschyi* Boiss افزایش ۱۵ برابری تولید رزمارینیک اسید (Fattahi *et al*. 2013) نسبت به گروه شاهد مشاهده شد. افزایش تولید فورانوکومارین‌ها در گیاه آلوده به آگروباکتریوم *Glehnia littoralis* (Terato *et al*. 2011) و افزایش تولید تروپان آلکالوئیدها نیز در ریشه‌های موین گیاه بنگدانه *Hyoscyamus muticus L.* (Dehghan *et al*. 2012) پس از آلودگی با آگروباکتریوم مشاهده شد. این‌چنین به نظر می‌رسد که ژن‌های *rol* از طریق افزایش میزان حساسیت سلول‌های گیاه میزبان به فیتوهورمون‌ها از جمله هورمون اکسین عملکرد ریشه‌زایی خود را انجام می‌دهند و لذا در حضور مقادیر بسیار ناچیز این هورمون – چه در درون سلول‌های ریشه و چه در محیط کشت– بیشترین تاثیر در القای ریشه‌زایی اتفاق می‌افتد (Cardarelli *et al*. 1987). از میان ژن‌های *rol*، ژن *rolB* به عنوان مهمترین و قوی‌ترین ژن ریشه‌زا تلقی می‌گردد چرا که این ژن به تنهایی قادر به القاء ریشه-زایی بر روی برگ و ساقه گیاهان توتون می‌باشد (Cardelli *et al*. 1987; Spena *et al*. 1987)، از طرف دیگر سویه‌های آگروباکتریوم رایزوژنز که دارای ژن جهش یافته *rolB* می‌باشند قادر به القا ریشه‌زایی به همان گونه‌ای که باکتری‌های تیپ وحشی ایجاد می‌کنند، نیستند (White *et al*. 1985). پژوهش حاضر قصد دارد اثر ژن‌های *rolABC* و نیز ژن *rolB* را در القای ریشه‌زایی چند گونه گیاهی که بخش دارویی مورد مصرف آن‌ها ریشه می-باشد مورد بررسی قرار دهد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: بذر گیاه توتون و نشاء گیاهان سنبل الطیب، سرخارگل و رازیانه از موسسه تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی آذربایجان شرقی در شهر تبریز تهیه شدند. بذر گیاه توتون و نشاء گیاهان سنبل الطیب، سرخارگل و رازیانه در خاک گلدان کاشته شدند و پس از گذشت ۸ هفته برداشت ریزنمونه از آنها جهت

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-11-18]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1394.4.2.3.3]

آلودگی با باکتری‌ها انجام پذیرفت. به این ترتیب که برگ‌های جوان و شاداب از قسمت دمبرگ چیده شدند و به مدت ۲ دقیقه در داخل الکل ۷۰ درصد قرار گرفتند. سپس به مدت ۱۵ دقیقه به آب ژاول ۲۰ درصد منتقل شده و سه مرحله و هر مرحله به مدت ۵ دقیقه در آب مقطر استریل شستشو داده شدند و در نهایت در زیر هود استریل برگ‌های ضد عفونی شده، به صورت قطعاتی به قطر ۲ سانتی‌متر برش داده شدند. برش‌ها به گونه‌ایی صورت گرفت که همه قطعات حاوی رگبرگ بودند. این قطعات به مدت ۲-۱ دقیقه با محلول باکتریایی آغشته شده و سپس ۵ ریزنمونه برگی به یک پتری حاوی محیط کشت MS (با ۴ تکرار) انتقال داده شدند. پتری‌های آماده سپس به اتاقک کشت با شرایط دمایی ۲۴ درجه سانتی‌گراد و فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی منتقل شدند.

باکتری: از سویه آگروباکتریوم رایزوژنز LBA4404 حامل هر سه ژن *rolA*، *rolB* و *rolC* (A985) –به عنوان شاهد مثبت–، آگروباکتریوم حامل ژن *rolB* (A847) و آگروباکتریوم حامل وکتور خالی (A826) –به عنوان شاهد منفی– استفاده شد.

کشت باکتری: از کلونی‌های مجزای باکتری موجود در محیط کشت جامد LB یک کلونی برداشته شد و به ۳ ml محیط کشت مایع در فالکون‌های ۱۵ ml انتقال یافت. این محیط کشت اولیه (Preculture) در شیکر دورانی با دور ۱۶۰ rpm در تاریکی و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۸°C قرار داده شد. سپس باکتری‌ها به ۳۰ ml محیط کشت اصلی (culture) انتقال داده شده و ارلن ها در شیکر با دور ۲۲۰ rpm در تاریکی و به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند. محیط کشت عاری از باکتری نیز به عنوان نمونه شاهد در نظر گرفته شد تا از عدم آلودگی محیط کشت در طول مدت آزمایش اطمینان حاصل شود. پس از ۲۴ ساعت محیط کشت اصلی در فالکون‌های ۵۰ ml با دور ۵۰۰۰ rpm و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند. محلول رویی دور ریخته شده و رسوب با ۲ میلی‌لیتر (۱۰ mM) MgSo4 شستشو گردید و مجددا سانتریفیوژ در همان شرایط قبلی انجام شد. پس از سانتریفیوژ، محلول (۱۰ mM) MgSo4 تا حدی بر رسوب اضافه شد که OD600 باکتری‌ها مساوی ۱ باشد. این سوسپانسیون برای تلقیح ریزنمونه‌های برگی مورد استفاده قرار گرفت.

تلقیح ریزنمونه‌ها:

ریزنمونه‌های برگی بدست آمده از گیاهان ۸ هفته‌ای توتون، سنبل الطیب، سرخارگل و رازیانه در سوسپانسیون باکتریایی به مدت یک دقیقه غوطه‌ور شدند و سپس مایع اضافی توسط کاغذ صافی استریل زدوده شد. سپس ریزنمونه‌ها به پتری‌های حاوی محیط کشت MS با ۷ درصد آگار و ۳ درصد ساکارز منتقل و در تاریکی با دمای ۲۴°C قرار داده شدند. پس از سپری شدن ۴۸ ساعت، به منظور حذف باکتری‌ها، ریزنمونه‌ها در محیط ½MS مایع حاوی ۳۵۰ mg/L سفوتاکسیم غوطه‌ور گردیدند و پس از زدودن مایع اضافی به محیط MS با ۷ درصد آگار و ۳ درصد ساکارز و دارای همان غلظت سفوتاکسیم منتقل شدند. هر دو هفته یک‌بار تعویض محیط کشت صورت پذیرفت تا مواد غذایی همواره در دسترس ریزنمونه ها قرار داشته باشد.

آزمایش‌های مولکولی: به منظور اطمینان از ماهیت تراژنی بافت-های آلوده، واکنش PCR بر روی DNA استخراج شده (به روش CTAB، Reichardt and Rogers, 1994) از ریزنمونه‌های برگی دارای ریشه و به کمک آغازگرهای اختصاصی ژن *rolB* انجام پذیرفت. همچنین به منظور بررسی بیان تراژن‌ها در بافت‌های آلوده استخراج RNA (به روش Trizol، ساخت شرکت Invitrogene) و سنتز cDNA (توسط کیت Superscript III ساخت شرکت Invitrogene) و سپس واکنش RT-PCR بر روی cDNA های سنتز شده، توسط همان آغازگرها صورت پذیرفت. توالی آغازگرهای مورد استفاده به شرح زیر است:

توالی آغازگرهای ژن *rol*B:

5'-ATGGATCCCAAATTGCTATTCC-3'
5'- TCGCGAGAAAGATAGACAAATA-3'

توالی آغازگر های ژن خانه دار rRNA16s:

5'-GGAGCGGTGAAATGCGTAGAG-3'
5'-TACGGCTACCTTGTTACGAC-3'

بررسی داده‌ها و محاسبات آماری: کلیه آزمایش‌ها براساس یک طرح کاملا تصادفی با ۴ تکرار انجام گردید. بررسی آماری داده‌ها،

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-11-18]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1394.4.2.3.3]

با استفاده از نرم افزار SPSS و مقایسه میانگین ها برای صفات اندازه گیری شده به روش دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

نتایج

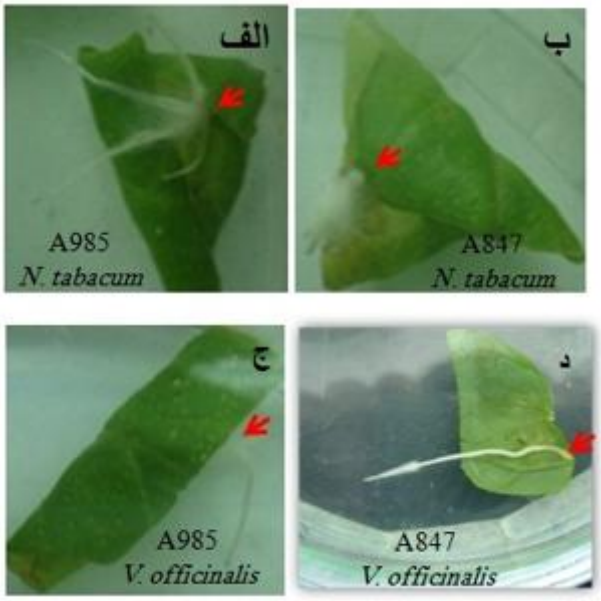
بررسی ریشه‌زایی در گونه‌های گیاهی مورد بررسی: بذر گیاهان سنبل الطیب (*Valeriana officialis L.*)، سرخارگل (*Echinacea purpurea*)، رازیانه (*Foeniculum vulgare*) و توتون (*Nicotiana tabacum*) در خاک کشت داده شدند. پس از گذشت ۴ ماه، زمانی‌که گیاهان در محله ۸–۱۲ برگی و با ارتفاع ۳۰–۴۰ سانتی‌متر بودند، ریزنمونه‌های برگی تهیه شدند و پس از استریلیزاسیون برای تلقیح با آگروباکتریوم مورد استفاده قرار گرفتند. از گیاهان کامل نیز پس از ایجاد زخم بر روی ساقه جهت تلقیح استفاده شد. اولین ریشه‌ها بر روی ربزنمونه‌های برگی پس از گذشت دو هفته ظاهر شدند و در طول دو هفته بعد از آن به بیشترین تعداد خود رسیدند.

گیاهان توتون شاهد: در گیاهان توتون شاهد، آگروباکتریوم A985 (حاوی ژن‌های *rolABC*) که به عنوان کنترل مثبت بود، بیشترین میزان ریشه‌زایی را نشان داد. به طوری‌که از مجموع ۲۰ ریزنمونه برگی، در ۱۱ قطعه از آن ریشه‌زایی مشاهده شد (شکل ۱–الف) که در مجموع طول ریشه‌های القایی در کل ریزنمونه‌های برگی ۵۲ سانتی‌متر بود. در ریزنمونه‌های برگی گیاهان توتون آغشته با آگروباکتریوم A826 که به عنوان کنترل منفی بود، القای ریشه‌زایی مشاهده نشد. آگروباکتریوم A847 (حامل ژن *rolB*) ریشه‌زایی قابل توجهی در ریزنمونه‌های برگی توتون نشان داد و از مجموع ۲۰ ریزنمونه برگی، در ۱۰ قطعه ریشه‌زایی اتفاق افتاد (شکل ۱–ب) که مجموع طول ریشه‌ها ۴۷ سانتی‌متر بود. زمانی‌که ساقه گیاهان کامل توتون خراش سطحی شدند و با سوسپانسیون باکتریایی آغشته گشتند در هیچ موردی حتی پس از گذشت چند ماه و با تکرر عمل آغشتگی القاء ریشه‌زایی مشاهده نشد.

گیاهان رازیانه: در ریزنمونه‌های برگی گیاهان رازیانه، ۵ـ۷ روز پس از آغشتگی ریزنمونه‌ها با باکتری‌های A985 و A847 ریزنمونه‌ها در محیط کشت زرد شده و از بین رفتند.

گیاهان سرخارگل: در ریزنمونه‌های برگی گیاهان سرخارگل نیز بعد از ۳ هفته تنها در یک مورد القاء ریشه‌زایی –آن‌هم در اثر آغشتگی با باکتری‌های A985- صورت گرفت که طول این ریشه در سن ۴ هفتگی ۴ سانتی‌متر بود.

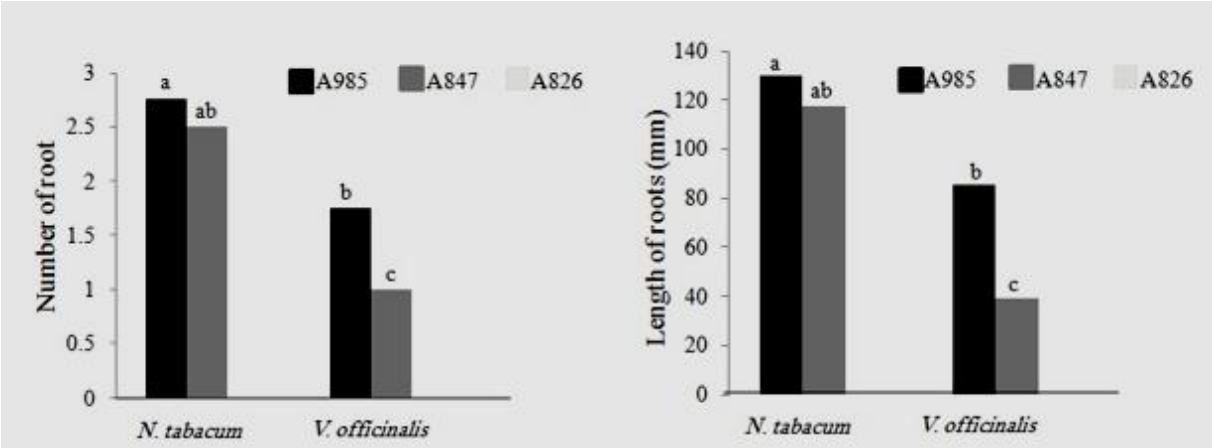
گیاهان سنبل الطیب: گیاهان سنبل الطیب بهترین نتیجه را از نظر القاء ریشه‌زایی از خود نشان دادند. به این ترتیب که پس از گذشت دو هفته اولین ریشه‌ها در ریزنمونه‌های برگی این گیاه در اثر آلودگی با A985 ظاهر شدند، که در انتهای چهارمین هفته تعداد ریشه‌های ایجاد شده ۷ عدد و مجموع طول ریشه‌ها معادل ۳۴ سانتی‌متر بود (شکل ۱–ج). آغشتگی ریزنمونه‌ها با باکتری‌های A847 باعث القاء ریشه‌هایی به تعداد ۴ عدد و در مجموع به طول ۲۰/۵ سانتی‌متر شد (شکل ۱–د).



شکل ۱– ریشه‌های القایی در گیاهان توتون (الف و ب) و سنبل الطیب (ج و د) پس از تلقیح ریزنمونه‌های برگی با آگروباکتریوم رایزوژنز A985 و A847. A985 حامل هر سه ژن *rolA*، *rolB* و *rolC* و A847 حامل ژن *rolB* می‌باشد.

Figure1. Induced roots in *N. tabacum* (A, B) and *V. officinalis* (C, D) after inoculating with *A. rhizogenese* A985 and A847. A985 contains *rol A, B* and *C* genes and A847 contains *rolB* gene.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-11-18]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1394.4.2.3.3]



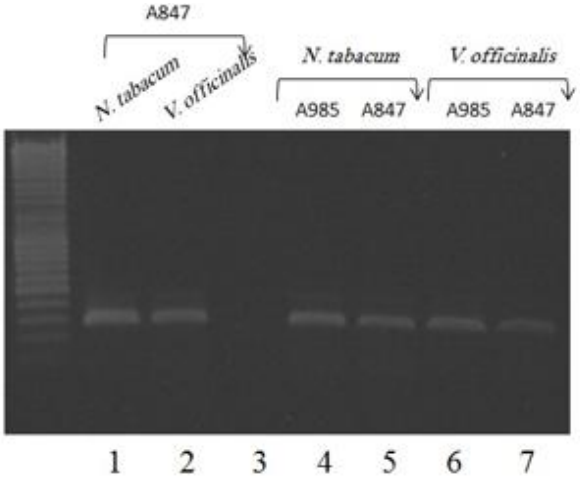
شکل ۲- میانگین طول ریشه (راست) و تعداد ریشه (چپ) در گیاه توتون و سنبل الطیب در حضور باکتری‌های مختلف. حروف غیر مشابه بیانگر معنی‌دار بودن (۰/۰۵≤ p) بر اساس آزمون دانکن می‌باشد.

Figure 2. The average length and number of roots in *N. tabacum* and *V. officinalis* after inoculating with *A. rhizogenese* A985, A847 and A826. A985 contains *rolA*, *B* and *C* genes (served as positive control), A847 contains *rolB* gene and A826 contain no gene (served as negative control). Dissimilar letters indicate significantly (0/05≥ p) based on Duncan test.

بر روی ساقه‌های خراشیده و آغشته به باکتری گیاهان کامل هیچ یک از گیاهان مورد مطالعه، القاء ریشه‌زایی حتی پس از گذشت چندین ماه مشاهده نشد. شکل ۲ میانگین طول و تعداد ریشه‌های القایی را در گیاهان سنبل الطیب و توتون در حضور باکتریهای مختلف نشان می دهد. به خوبی آشکار است که گیاه سنبل الطیب نیز همچون گیاه شاهد توتون القای ریشه‌زایی را در حضور ژن-های *rolABC* و یا ژن *rolB* به تنهایی نشان می‌دهد.

اگرچه مورفولوژی خاص و رشد پلاژیوتروپیک ریشه‌های القایی توسط آگروباکتریوم رایزوژنز در محیط کشت فاقد هورمون، موید نفوذ T-DNA به ژنوم سلول‌های گیاهی و تراریختگی این ریشه‌ها می‌باشد، با این وجود بررسی ماهیت تراریختگی آن‌ها توسط روش PCR الزامی است. به این منظور تکثیر قطعه‌ای از ژن *rolB* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی آن بر روی DNA استخراج شده از ریشه‌های القایی گیاهان توتون و سنبل الطیب آلوده با آگروباکتریوم‌های A985 و A847 انجام پذیرفت.

نتایج حاصل از PCR حضور این ژن (تکثیر قطعه 320 bp مورد انتظار) را در ژنوم سلول‌های ریشه‌های مویین تائید نمود (شکل ۳- لاین‌های ۴-۷). روش PCR روشی ساده و سریع برای پی بردن به حضور توالی تراژن در ژنوم مواد گیاهی تراریخته است.



شکل ۳- نتیجه واکنش PCR و RT-PCR بر روی DNA و RNA استخراج شده از ریشه‌های القایی با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن *rolB*. لاین‌های ۱و ۲ تکثیر قطعه cDNA سنتز شده از روی mRNA استخراجی و لاین‌های ۴ تا ۷ تکثیر قسمتی از ژن *rolB* از روی DNA ژنومی را نمایش می‌دهند. نوع گیاه و باکتری مورد استفاده جهت تلقیح آن در قسمت فوقانی تصویر نوشته شده است.

Figure 3- PCR and RT-PCR analysis on DNA and RNA extracted from induced roots using *rolB* gene specific primers. Line 1 and 2 corresponds to the results of RT-PCR and Line 4-7 corresponds to the genomic DNA amplification.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-11-18]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1394.4.2.3.3]

با این حال بررسی بیان یا عدم بیان تراژن در سلول‌های گیاهی نیز امری اجتناب ناپذیر بوده و می‌تواند کمک شایانی در تفسیر مکانیسم عمل و ایجاد فنوتیب خاص توسط توالی تراژن باشد. برای بررسی بیان تراژن در ریشه‌های تراریخته تکنیک RT-PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *rolB* و آغازگرهای ژن خانه‌دار rRNA16s بر روی cDNA سنتز شده از mRNA ی استخراجی این ریشه‌ها در گیاهان توتون و سنبل الطیب آلوده با آگروباکتریوم A847 صورت گرفته و بیان این ژن در ریشه‌های فوق به اثبات رسید (شکل ۳- لاین ۱و ۲).

نتایج حاصل از PCR حضور این ژن (تکثیر قطعه 320 bp مورد انتظار) را در ژنوم سلول‌های ریشه‌های مویین تائید نمود (شکل ۳- لاین‌های ۴-۷). روش PCR روشی ساده و سریع برای پی بردن به حضور توالی تراژن در ژنوم مواد گیاهی تراریخته است.

با این حال بررسی بیان یا عدم بیان تراژن در سلول‌های گیاهی نیز امری اجتناب ناپذیر بوده و می‌تواند کمک شایانی در تفسیر مکانیسم عمل و ایجاد فنوتیب خاص توسط توالی تراژن باشد. برای بررسی بیان تراژن در ریشه‌های تراریخته تکنیک RT-PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *rolB* و آغازگرهای ژن خانه‌دار rRNA16s بر روی cDNA سنتز شده از mRNA ی استخراجی این ریشه‌ها در گیاهان توتون و سنبل الطیب آلوده با آگروباکتریوم A847 صورت گرفته و بیان این ژن در ریشه‌های فوق به اثبات رسید (شکل ۳- لاین ۱و ۲).

بحث

در پژوهش حاضر، امکان القای ریشه‌های مویین با استفاده از آگروباکتریوم رایزوژنز در چند گیاه دارویی همچون سرخرگل، رازیانه، سنبل الطیب که بخش دارویی مورد مصرف آنها اکثرا ریشه می‌باشد و در گیاه توتون -به عنوان کنترل مثبت آزمایش- بررسی شد و از ریزنمونه‌های برگی و یا ساقه زخمی گیاهان برای تلقیح باکتری استفاده شد. وجود تفاوت در نوع گیاه و نوع ریزنمونه و در نتیجه امکان القای ریشه‌زایی و شدت آن توسط سویه خاصی از آگروباکتریوم و نیز تاثیر سویه‌های مختلف این باکتری بر القاء ریشه‌زایی گیاهان مختلف در مطالعات زیادی به خوبی اثبات شده است. Rugini و همکاران القاء ریشه‌زایی را در گیاه کیوی تحت تاثیر ژن‌های rol آ. رایزوژنز نشان دادند (Rugini *et al.* 1991). Bueno dos Reis و همکاران نیز در راس بریده گیاهچه‌های گل ساعتی که با محلول آگروباکتریوم رایزوژنز آغشته شده بود ظهور ریشه‌های مویین را به طور قابل ملاحظه‌ای مشاهده نمودند (Bueno dos Reis *et al.* 2005). Felker و همکاران ریشه‌زایی بهینه گیاه چوبی الباکهور (چیل بلانکو) را تحت تاثیر باکتری‌های مختلف از جمله آ. رایزوژنز به اثبات رساندند (Felker *et al.* 2005) و Villalobos-Amador و همکاران میزان بالای ریشه زایی تا ۶۷ درصد را در ریزنمونه‌های مشتق از ساقه گیاه کاج در اثر آلودگی با آ. رایزوژنز نشان دادند (2002). با توجه به افزایش رغبت در مصرف گیاهان دارویی و تولید بیش از پیش داروهای گیاهی، تمرکز پژوهش‌های گیاهی نیز به سمت گیاهان دارویی و انجام راهکارهایی جهت دستیابی به میزان بالای متابولیت‌های ثانویه و ترکیبات موثره گیاهی معطوف گشته است و در این میان استفاده از سویه‌های تومورزا و ریشه-زای آگروباکتریوم جهت رسیدن به توده‌های سلولی انبوه و در نتیجه دستیابی به مقدار قابل توجه متابولیت‌های ثانویه مورد توجه اکثر پژوهشگران قرار گرفته است. در پژوهش حاضر ساقه‌های زخمی گیاهان مورد استفاده، القاء ریشه‌زایی را در اثر آلودگی با آ. رایزوژنز از خود نشان ندادند، در حالی‌که ریزنمونه‌های برگی نمونه‌ها و خصوصا ریزنمونه‌های گیاه سنبل الطیب، القای ریشه-های مویین را در اطراف خود به خوبی نشان دادند و لذا یافته‌های این مطالعه می‌تواند مسیر بعدی تحقیقات را -که همان بررسی میزان متابولیت‌های ثانویه در این ریشه‌ها در مقایسه با گیاهان کنترل و نیز تعیین نوع متابولیت‌ها می‌باشد- فراهم سازد.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-11-18]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1394.4.2.3.3]

منابع

Bueno dos Reis L, Lemes da Silva M, Barcelos Passos Lima A, Peixoto de Oliveira ML, Lopes Paim Pinto D, Ribeiro Garcia Lani E, Campos Otoni W. 2007. *Agrobacterium rhizogenes*- mediated transformatiom of passion fruit species: *Passiflora cincinnata* and *P.edulis P. flavicarpa*. International Society for Horticultural Sience 425-431.

Cardarelli M, Mariotti D, Pomponi M, Spano L, Capone I, Costantino P. 1987. *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA genes capable of inducing hairy root phenotype. Molecular and General Genetics MGG 209(3):475–480.

Chabaud M, Boisson-Dernier A, Zhang J, Taylor CG, Yu O, Barker DG. 2006. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated root transformation. Medicago truncatula handbook 1-8.

Chandra S, Chandra R. 2011. Engineering secondary metabolite production in hairy roots. Phytochemistry Reviews 10(3):371–395.

Davies KM, Deroles SC. 2014. Prospects for the use of plant cell cultures in food biotechnology. Current Opinion in Biotechnology 26:133–140.

Dehghan E, Häkkinen ST, Oksman-Caldentey KM, Ahmadi FS. 2012. Production of tropane alkaloids in diploid and tetraploid plants and *in vitro* hairy root cultures of Egyptian henbane (*Hyoscyamus muticus* L.). Plant Cell Tissus and Organ Culture 110:35–44.

Fattahi M, Nazeri V, Torras-Claveria L, Sefidkon F, Cusido RM, Zamani Z, Palazon J. 2013. A new biotechnological source of rosmarinic acid and surface flavonoids: Hairy root cultures of *Dracocephalum kotschyi* Boiss. Industrial Crops and Products 50:256–263.

Felker P, Medina D, Soulier C, Velicce G, Velarde M, Gonzalez C. 2005. A survey of environmental and biological factors (*Azospirillum* spp, *Agrobacterium rhizogenes*, *Pseudomonas aurantiaca*) for their influence in rooting cuttings of *Prosopis alba* clones. Journal of Arid Environments 61(2):227–247.

Gai QY, Jiao J, Luo M, Wei ZF, Zu YG, Ma W, Fu YJ. 2015. Establishment of Hairy Root Cultures by *Agrobacterium Rhizogenes* Mediated Transformation of *Isatis Tinctoria* L. for the Efficient Production of Flavonoids and Evaluation of Antioxidant Activities. PLoS one 10 (3):e0119022.

Hu ZB, Du M. 2006. Hairy root and its application in plant genetic engineering. Journal of integrative plant biology 48(2):121–127.

Matkowski A. 2008. Plant *in vitro* culture for the production of antioxidants. Biotechnology Advances 26(6):548–560.

Murthy HN, Lee EJ, Paek KY. 2014. Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation. Plant Cell Tissue Organ Culture 118:1–16.

Richard E, Reichardt, M, Rogers S. 1994. Preparation of genomic DNA from plant tissue. Current protocols in molecular biology 2-3.

Rugini E, Pellegrineschi A, Mencuccini M, Mariotti D. 1991. Increase of rooting ability in the woody species kiwi (*Actinidia deliciosa* A. Chev.) by transformation with Agrobacterium rhizogenes *rol* genes. Plant Cell Reports 10(6-7):291-295.

Spena A, Schmulling T, Koncz C, Shell J. 1987. Independent and synergistic activity of *rolA*, *B* and *C* loci in stimulating abnormal growth in plants. The EMBO Journal 6(13):3891–3899.

Srivastavaa S, Srivastava AK. 2007. Hairy Root Culture for Mass-Production of High-Value Secondary Metabolites. Critical reviews in Biotechnology 27(1): 29-43.

Terato M, Ishikawa A, Yamada K, Ozeki Y, Kitamura Y. 2011. Increased furanocoumarin production by *Glehnia littoralis* roots induced via *Agrobacterium rhizogenes* infection. Plant Biotechnology 28(3): 317–321.

White FF, Taylor BH, Huffman GA, Gordon MP, Nester EW. 1985. Molecular and genetic analysis of the transferred DNA regions of the root-inducing plasmid of *Agrobacterium rhizogenes*. Journal of Bacteriology 164(1):33–44.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-11-18]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1394.4.2.3.3]

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Vol4, Number2, Fall 2015 and Winter 2016, Bi-seasonal

Study of Root Induction in Several Medicinal Plant Species using *A. rhizogenes rol* Genes

Shojaii A.[1], Mohajjel Shoja H.[2]*, Mahna N.[3]

1. MSc. student, 2. Assistant professor, Dept. of Plant Biology, Faculty of Natural Science, University of Tabriz
3. Associate professor, Dept. of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Iran

*Corresponding Author, Email: H_mohajjel@tabrizu.ac.ir

ABSTRACT

Agrobacterium rhizogenese can induce hairy root phenotype in many dicotyledonous plants via the transfer of *rol* genes into the plant genome. The characteristics of induced roots such as a rapid growth, high stability of genetic material, ease of conservation and their ability to grow in a hormone-free medium have led to their use in the production of secondary metabolites. In the present study, we have investigated the effect of *rol* genes, particularly the *rolB* gene, on root induction of three medicinal plants *valeriana officinalis*, Echinacea angustifolia and *Foeniculum vulgare*. Leaf explants and wounded parts of stems were inoculated with bacterial suspension and the presence of bacterial DNA as well as its expression in induced roots was demonstrated using PCR and RT-PCR techniques with *rolB* specific primers. The results showed that maximum rooting occurred with *Valeriana officinalis* leaf explants cultured in MS medium and the wounded parts of stems did not show rooting at inoculated areas.

Key Words

Agrobacterium rhizogenese, hairy root, *rol* genes, RT-PCR

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-11-18]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1394.4.2.3.3]