

تأثیر 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-Kandy¹, Maghsoud Pazhouhandeh^{2*}
and Hanieh Mohajjel-Shoja³

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 پلاستیستی 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 ریشه‌ها به سرعت منشعب شدند. تراریختی 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 موثرتر می‌باشد.

واژه‌های کلیدی

پروانش

ریشه

انتقال ژن

rolC

مقدمه

بیماری ریشه مویین به وسیله *Agrobacterium rhizogenes* ایجاد می شود (Ricker et al. 1930). این باکتری رشد نوپلاستیک را در سلول های گیاهی القا می کند که در نتیجه آن ریشه های مویین القا می شوند (Costantino et al. 1994). ریشه های مویین به صورت نابجا در محل آلودگی و یا در نزدیکی آن ایجاد می شوند (Chilton 2001). از لحاظ مورفولوژی، ریشه های مویین القا شده توسط این باکتری بسیار مشابه با ریشه های وحشی می باشد، با این حال ریشه های مویین دارای ویژگی های اختصاصی می باشند، رشد سریع و منشعب، رشد در محیط بدون هورمون، رشد ریشه ها به صورت Ageotropic (عدم تمایل به سمت جاذبه زمین)، پایداری از لحاظ ژنتیکی، تولید بیشتر متابولیت نسبت به ریشه های معمولی، پایداری متابولیت های تولید شده از این ریشه ها و توانایی بیشتر این متابولیت ها در اتصال به سلول های هدف از ویژگی های ریشه های مویین القا شده توسط *A. rhizogenes* می باشد (Sevon et al. 1998). به همین دلیل از ریشه های مویین به طور وسیعی به عنوان ابزاری در جهت تولید متابولیت ها و همچنین برای مطالعه عملکرد ژن در گیاه استفاده می شود. محققان از این ابزار جهت مطالعه رشد و واکنش های زیستی ریشه، بیان بیشتر پروتئین ها و تولید بیشتر متابولیت های ثانویه، سم زدایی آلودگی های محیطی و افزایش مقاومت به خشکی استفاده می کنند. ریشه های مویین به وسیله یک قطعه DNA جدا شده (T-DNA) از پلاسمید Ri این آگروباکتریوم و ورود آن به درون کروموزم های سلول گیاهی القا می شود (Chilton et al. 1982).

ژن هایی که از T-DNA پلاسمید Ri طی بیماری زایی به سلول های گیاه میزبان منتقل می شود، معمولاً ژن های *rol* (*root*) و *oncogenic loci* و ژن های مربوط به سنتز اکسین می باشند. این ژن ها 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 می باشند. در توالی کامل نوکلئوتیدی ناحیه TL-DNA ۱۸ عدد چارچوب ترجمه (open reading frame) شناسایی شده است که چهار تایی

آن ها به ترتیب مربوط به ژن های *rolA*، *rolB*، *rolC* و *rolD* می باشد. این آنالیز همچنین نشان داد که ژن های *rolA*، *rolB* و *rolC* نقش مهمی را در القای ریشه های مویین بازی می کنند (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 سلول ها را فراهم می کند. Moyanoa و همکاران نشان دادند که ژن های *aux* نقش معنی داری را در تغییر شکل ریشه های تراریخت *Datura metel* و *Duboisia hybrid* بازی می کنند (Moyanoa et al. 1999). ژن های کد کننده اکسین (*tms1* and *tms2*) و ژن های سنتز آگروپین (*ags*) هم بر روی TR-DNA قرار دارند (White et al. 1985).

هر چند هر سه ژن *rolA*، *rolB* و *rolC* به صورت مستقل از هم تشکیل ریشه در توتون را افزایش می دهند ولی رشد ریشه هنگامی که هر سه ژن با هم فعالیت کنند بهتر انجام می گیرد (Schmulling et al. 1993). بیان ژن *rolC* در گیاهان مختلف تراریخته الگوی پیچیده ای از خود نشان می دهد، بیان این ژن به تنهایی و در عدم حضور سایر ژن های T-DNA در ریشه به میزان زیاد، در برگ کم و در ساقه اصلاً بیان نمی شود (Estruch et al. 1991). طبق گزارش های اخیر بیان ژن *rolC* با تولید آلکالوئیدهای تروپانی همبستگی داشته و باعث افزایش تولید آلکالوئیدها از ریشه های مویین می شود (Moyanoa et al. 1999). میزان بالای بیان ژن *rolC* باعث القای ژن های دفاعی (β -۱،۳-گلکاناز) در گیاه می شود و این مسئله نشان می دهد که بیان *rolC* می تواند پاسخ های 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 دانه های کپسول و افزایش انشعابات جانبی گیاه (Schmulling et al. 1988). در گیاهان دیگری هم که با *rolC* تراریخته شده اند، 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 می شود (Yokoyama et al. 1994).

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 تقریباً 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). اخیراً نیز کشت ریشه‌های موئین 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 موئین محسوب می‌شود (Giri and Narasu 2000).

جدول ۱- 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
<i>rolA</i>	۲۷۹-۴۲۳	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 برگ‌ها و ریشه‌ها، تداخل با هورمون ژبیرلین
<i>rolB</i>	۷۶۲-۸۳۷	دو ژن <i>rolB_{TL}</i> و <i>rolB_{TR}</i> از نظر توالی تا حدی مشابه هم هستند. β -Glucosidase را کد می‌کنند. غیر فعال کردن <i>rolB</i> منجر به عدم بیماری‌زایی آگروباکتریوم می‌شود. ژن <i>rolB_{TR}</i> قادر به القای ریشه‌های موئین در دیسک‌های برگ‌ی توتون نمی‌باشد. <i>rolB_{TL}</i> در ریشه زایی و تغییر استیل کلها نقش دارد. نقش مهم در تشکیل ریشه‌های نابجا و جانبی گیاه توتون تراریخته شده با ژن <i>rolB</i> خصوصیتی 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
<i>rolC</i>	۵۴۰	<i>rolC</i> بر روی TL-DNA پلاسمید Ri قرار گرفته و به ژن <i>rolB</i> متصل است و بصورت ترانسژن در القای ریشه موئین با <i>rolB</i> اثر همکاری دارند. گیاهان توتونی که ژن <i>rolC</i> در آن‌ها بیان می‌شود، فنوتیپ پرپشت و قد کوتاهی دارند. طول میان‌گره‌ها کم شده و تعداد ساقه‌ها و برگ‌ها (برگ‌های نوک تیز و کوتاه) افزایش می‌یابد. گیاهان تراریخته با <i>rolC</i> به دلیل فتوستت کمتر برگ‌ها به رنگ سبز متمایل به زرد و کلروزه دیده می‌شوند. ریشه‌های القا شده با ژن <i>rolC</i> به‌صورت مستقیم رشد می‌کنند فعال کردن پاسخ‌های دفاعی گیاه
<i>rolD</i>	۱۰۲۳	جهش در ژن <i>rolD</i> باعث القای طبیعی ریشه‌های موئین 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

تولید ریشه موین در گیاه پروانش است. این ژن علاوه بر القای ریشه موین همبستگی مستقیمی با بیوستز آلکالوئیدها دارد (Moyano 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 موزایک گل کلم گرفته شده‌است. ترمیناتور به‌کار رفته در آن هم 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 آماده‌سازی باکتری *A. tumefaciens* سویه LBA4404 جهت تراریزش ریزنمونه‌ها، ابتدا ناقل نو ترکیب 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

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 سرپتین 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 موین 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

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.

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 °C) جهت تلقیح و تراریزش به روی ریزنمونه‌ها اضافه شد.

تلقیح ریزنمونه‌ها با آگروباکتریوم و بررسی القای ریشه موین 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

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	MS	MS1	MS2	MS3	MS4
2,4-D	-	۱	۲	-	-
NAA	-	-	-	۰/۵	۱
BAP	-	۱	۱	۱	۱
Cefotaxime	۳۵۰	۳۵۰	۳۵۰	۳۵۰	۳۵۰

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) ضد عفونی 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 موین در ریزنمونه‌های برگ گیاه پروانش: حدود ۶ هفته بعد از جوانه‌زنی بذره‌ای این گیاه، ریزنمونه‌های برگ آن تحت شرایط استریل تهیه شدند. بررسی القای ریشه از این ریزنمونه‌ها تحت تأثیر تیمارهای مختلف صورت گرفت. برای این منظور بخشی از این ریزنمونه‌ها تراریخت 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 تراریخت) در این محیط قرار گرفت و بخشی نیز جهت بررسی اثر ترکیب‌های هورمونی مختلف در ریشه‌زایی از ریزنمونه‌های برگ گیاه این 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 برگ 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

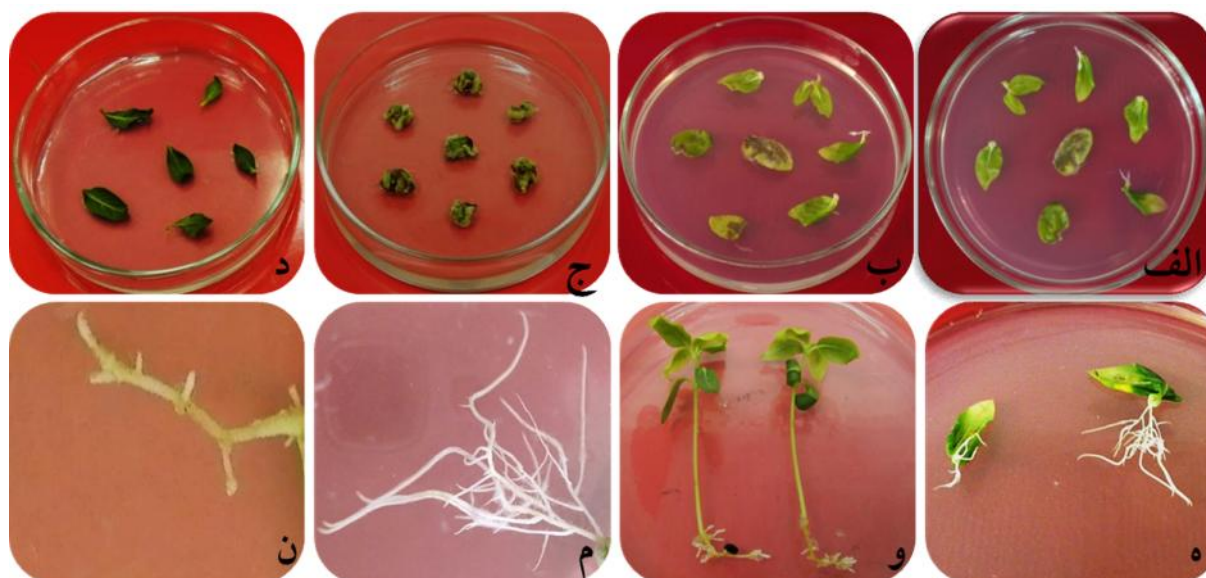
این ریزنمونه‌ها کمتر دچار سیاه‌شدگی شدند (شکل ۱- و)، این ریزنمونه‌ها ماندگاری خود را تا ۵ هفته بعد از تراریخت حفظ کرده و بطور کامل به کالوس تبدیل شدند. این امر بیانگر این موضوع است که هورمون 2,4-D در برابر فعالیت بیش از حد مواد فنلی ممانعت کرده و از طرفی با توجه به تشکیل کالوس و ترمیم سریع ریزنمونه‌های برش یافته در محیط حاوی هورمون 2,4-D میزان سنتز مواد فنلی نیز کمتر شده در نتیجه ریزنمونه‌ها کمتر دچار سیاه‌شدگی 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 تراریخت 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 سیاه‌شدگی 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 با توجه به اینکه تبدیل به کالوس شدند ریشه‌هایی از آن‌ها ظاهر نشد، قسمت بیشتر این ریزنمونه‌ها در انتهای 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).



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

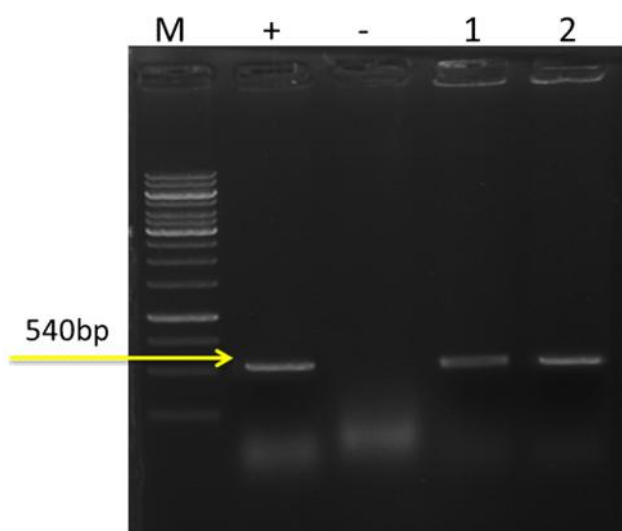


شکل ۲- ریزنمونه‌های برگ کامل گیاه پروانش، القای ریشه در ریزنمونه‌های تلقیح یافته با آگروباکتریوم حامل ژن *rolC* ۹ روز بعد از تلقیح (الف، ب)، القای کالوس در ریزنمونه‌های موجود در محیط حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP بعد از ۴ هفته (ج)، سیاه‌شدگی ریزنمونه‌های موجود در محیط MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP بعد از ۴ هفته (د). ریشه‌های موین 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 موین 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

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 موبین است (شکل ۳).

در یکی از تحقیقاتی که در این زمینه انجام شده است ریز نمونه‌های 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 موبین 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 موبین (۱)، و DNA استخراج شده از ریشه معمولی (-).

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

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 موبین نسبت به ریشه‌های حاصل از جوانه‌زنی بذر این گیاه بود، اندازه‌گیری وزن این ریشه‌ها نشان داد که میزان رشد ریشه‌های موبین 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 موبین (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 پروانش 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 ریشه‌های 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 بافت‌های 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 ریزنمونه‌های 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 تایید وجود T-DNA پلاسمید Ti آگروباکتریوم در داخل ژنوم ریشه‌های القا شده و حضور ژن *rolC* در آنها (تایید تراریختی ریشه‌ها القا شده) از واکنش PCR با آغازگرهای اختصاصی طراحی شده برای ژن

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 موثرتر می‌باشد.

در مطالعه دیگری به منظور القای ریشه موثر 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 B5 ۱/۲ کشت داده شدند. این ریزنمونه‌ها بعد از دو روز به محیط B5 جامد منتقل شدند. ۲ تا ۳ هفته بعد از تلقیح اولین ریشه‌های موثر 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 تراریخت پروانش و بدست آوردن ترکیب هورمونی مناسب برای کالزایی و باززایی این گیاه،

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 miniprep: 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, Bezverbnny 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).

- 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.

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

Amin Sahandi Khalifeh-Kandy¹, Maghsoud Pazhouhandeh^{2*} and Hanieh Mohajjel-Shoja³

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

ABSTRACT

C*atharanthus 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.

Key Words

Catharanthus, Root, Transformation, *rolC*