Journal of Cell and Tissue 14(3) (2023) 264-276

Journal of Cell and Tissue
https://jct.araku.ac.ir
ISSN: 2345-3567

Optimization of hairy root induction and producing high vindoline and catharanthine clones in *Catharanthus roseus* through Transformation by *Agrobacterium rhizogenes*

Kardoost Parizi V [a], Mahmoodnia Meimand M [b*]

[a] Faculty of Agriculture, Vali-e-Asr University of Rafsanjan. Iran
[b] Department of Genetics and Plant Production, Faculty of Agriculture, Vali-e-Asr University of Rafsanjan. Iran

Original Article

Use your device to scan and read the article online

Citation: Kardoost Parizi V, Mahmoodnia Meimand M. Optimization of hairy root induction and producing high vindoline and catharanthine clones in Catharanthus roseus through Transformation by Agrobacterium rhizogenes. Journal of Cell and Tissue . 2023; 14(3): 264

https://10.61186/JCT.14. 3. 264

KEYWORDS

Agrobacterium rhizogenes
Catharanthus roseus
HPLC
Secondary metabolites

ABSTRACT

Aim: Hairy roots induced by inoculation with *Agrobacterium rhizogenes* are suitable for the production and accumulation of plant secondary metabolites. Genetically modified hairy roots produce valuable secondary metabolites to a greater amount and with more genetic stability than cell suspension cultures and normal roots. *Catharanthus roseus* is one of the most important medicinal plants that produces valuable secondary metabolites such as indole alkaloids. The purpose of this research was to investigate the effect of factors influencing the induction of hairy roots and to investigate the amount of production of secondary metabolites (vindoline and catharanthine) in the hairy roots produced by inoculation of *C. roseus* plant with *A. rhizogenes*.

Material and Methods: In order to produce sterile *C. roseus* seedlings and to prepare explants, seeds cultured on MS culture medium. The effect of the type of culture medium (MS, 1/2 MS and B5), the type of explant (leaf and stem), the type of bacterial strain (A4, 1132 and 2656) and the type of plant genotype (white and red) on the amount of hairy root induction in a completely randomized design was investigated. Extraction of samples was done using methanol solvent, then the amount of indole alkaloids was calculated using HPLC method and standard curve. The nature of transgenic hairy roots was confirmed after DNA extraction from different samples using PCR method with specific primers (*rolB* and *virD*).

Results: According to the results, the most efficient strain in transferring T-DNA to the explants and the appearance of hairy roots was related to A4 strain (53.8%). 1/2 MS culture medium with 77.69% of root induction was the best medium combination for the appearance of hairy roots. Also, white genotype (62% rooting) and leaf explant (77% rooting) were identified as the best genotype and explant for the production of hairy roots. After the specific amplification of the rolB gene and the lack of amplification of the virD gene in the PCR reaction in the samples, the molecular confirmation of the transgenic nature of the hairy root clones was done. Based on the results of HPLC experiment, the average amount of vindoline and catharanthine in hairy roots (0.24 and 0.615 mg/g dry weight) is higher than aerial parts (0.106 and 0.488 mg/g dry weight) and normal root (0.021 and 0.013 mg/g dry weight). The amount of these alkaloids in the aerial parts was higher than in the normal roots of the plant.

Conclusion: The production of hairy roots in response to the inoculation of plant explants with *A. rhizogenes* is influenced by various factors such as the type of explant, the genotype of the plant, the strain of bacteria and the composition of culture medium. These factors must be optimized to establish effective hairy root cultur in a plant. It seems that with the introduction of *rol* genes from

* Corresponding author. Tel.: +98-3431312041, Fax: +98-3431312041
E-mail address: m.mahmoodnia@vru.ac.ir
DOI: https://10.52547/JCT.14.3.264
Received: 23 Nov. 2023; Received in revised form: 28 Nov. 2023; Accepted: 11 Dec. 2023
Original Article
©Author

bacteria to the plant genome (hairy root) and as a result of the change in the amount of endogenous hormone production and the response of the plant cell to the entry of bacterial genes, the amount and profile of the production of the secondary metabolites of the plant will change. As a result, by selecting clones with increased production of medicinally important alkaloids and optimizing the conditions of large scale production of secondary metabolites in bioreactors, we can move towards the commercial production of these compounds through cell and plant tissue culture.

سلول و بافت، دوره ۱۴، شماره ۳، سال ۱۴۰۲صفحات ۲۶۴ تا ۱۲۷۶

سلول و بافت

شاپا الکترونیکی: ۳۵۶۷-۲۳۴۵

بهینه‌سازی القای ریشه مویین و تولید کلون‌های ریشه مویین با میزان بالای وین‌دولین و کاتارانتین در گیاه *Catharanthus roseus* از طریق تراریختی توسط *Agrobacterium rhizogenes*

وجیهه کاردوست پاریزی ، محسن محمودنیا میمند[۲*]

[۱]کارشناسی ارشد، گروه ژنتیک و تولید گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی‌عصر (عج) رفسنجان، ایران، kardoost.v@gmail.com

[۲]دکتری تخصصی، گروه ژنتیک و تولید گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی‌عصر (عج) رفسنجان، ایران، m.mahmoodnia@vru.ac.ir

واژگان کلیدی

آگروباکتریوم رایزوژنز

پروانش

ریشه مویین

متابولیت‌های ثانویه

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۸/۲۲

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۹/۰۷

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۹/۲۰

چکیده

هدف: هدف از این تحقیق بررسی اثر عوامل تاثیرگذار بر القای ریشه مویین و بررسی میزان تولید آلکالوئیدهای ایندولی در ریشه‌های مویین تولید شده در اثر تلقیح گیاه پروانش با *Agrobacterium rhizogenes* بود.

مواد و روش‌ها: از گیاهچه استریل پروانش جهت تهیه ریزنمونه استفاده شد. اثر نوع محیط کشت، ریزنمونه، سویه باکتری و ژنوتیپ گیاه بر میزان القای ریشه مویین بررسی شد. میزان آلکالوئیدهای ایندولی با استفاده از دستگاه HPLC اندازه‌گیری شد. ماهیت تراریختگی ریشه‌های مویین با استفاده از روش PCR و پرایمرهای اختصاصی تایید گردید.

نتایج: سویه A4 به‌عنوان بهترین سویه *A. rhizogenes* جهت القای ریشه مویین و محیط کشت MS به‌عنوان بهترین محیط کشت برای توسعه و استقرار کشت ریشه مویین در ژنوتیپ سفید پروانش تعیین شدند. نتایج حاصل از تکثیر اختصاصی ژن‌های *rolB* و *virD* نشان دهنده ماهیت تراریختی ریشه‌های مویین بود. به‌طور کلی مقدار وین‌دولین و کاتارانتین ریشه‌های مویین بیشتر از ریشه معمولی و اندام هوایی گیاه پروانش بود. از طرفی، مقدار این آلکالوئیدها در اندام هوایی گیاه از ریشه معمولی بالاتر بود.

نتیجه‌گیری: به‌نظر می‌رسد با ورود ژن‌های *rol* از باکتری به ژنوم گیاه و ایجاد ریشه مویین و در نتیجه تغییر در میزان تولید هورمون‌های درونزا و پاسخ‌های سلول گیاهی به ورود ژن‌های باکتری، میزان و پروفایل تولید متابولیت‌های ثانویه گیاه تغییر پیدا می‌کند و در نتیجه می‌توان با گزینش کلون‌هایی با افزایش تولید آلکالوئیدهای مهم دارویی و بهینه سازی شرایط تولید انبوه متابولیت‌ها در بیوراکتورها، به سمت تولید تجاری این ترکیبات از طریق کشت سلول و بافت گیاهی حرکت کرد.

۱- مقدمه

در پیکر گیاهان دارویی مواد خاصی ساخته و ذخیره می‌شود که دارای خواص متعددی هستند و می‌توانند به‌عنوان مواد موثره برای مداوای برخی از بیماری‌ها مورد استفاده قرار گیرند. مواد فعال مذکور که در طی یک سلسله فرایندهای ویژه و پیچیده

* نویسنده مسئول؛ تلفن: ۰۳۴۳۱۳۱۲۰۴۱؛ فکس: ۰۳۴-۳۱۳۱۲۰۴۱

آدرس پست الکترونیک: m.mahmoodnia@vru.ac.ir

بیوشیمیایی، به مقدار بسیار کم، معمولا کمتر از یک درصد وزن خشک گیاه ساخته می‌شوند به متابولیت‌های ثانویه معروف‌اند (۱).

پروانش (*Catharanthus roseus*) یکی از گیاهان دارویی مهم و از تیره خرزهره (Apocynaceae) می‌باشد. مهم‌ترین ترکیبات ثانویه در گیاه پروانش، آلکالوئیدهای نوع ایندولی هستند که با توجه به ساختمان مولکولی‌شان به دو دسته آلکالوئیدهای مونومر (کاتارانتین، وین‌دولین و ...) و دیمر (وین‌بلاستین و وین‌کریستین) تقسیم می‌شوند. مقادیر بسیار پایین آلکالوئیدها در گیاه و اهمیت آن‌ها به‌عنوان داروهای پر مصرف ضدسرطان سبب شده است که این ترکیبات از قیمت بسیار بالایی برخوردار گردند. ارزش دارویی و اقتصادی این آلکالوئید، موجب تشویق محققان برای بررسی روش‌های جدید سنتز و مطالعه راه‌های بیوتکنولوژیکی برای تولید این ماده مهم در گیاه شده است (۲). عوامل موثر بر افزایش بیوسنتز وین‌بلاستین و وین‌کریستین و یا مونومرهای آنها نظیرکاتارانتین و وین‌دولین همواره از اهداف مهم تحقیقاتی محسوب می‌شود. بهبود فعالیت و جهت‌دهی مسیر بیوسنتز متابولیت‌ها در سلول‌های گیاهی، از اهداف اصلی دانش مهندسی متابولیک محسوب می‌شود. تکمیل، ترسیم و تفسیر جامع نقشه‌های متابولیکی، امکان دستورزی و مطالعه بهتر مسیرهای بیوسنتزی در گیاهان را برای محققان فراهم می‌کند (۳). تکنولوژی DNA نوترکیب و انتقال ژن به‌واسطه *Agrobacterium* عمده‌ترین تکنیک‌هایی هستند که در مهندسی متابولیک برای ایجاد گیاهان هدف واجد صفات مورد نظر استفاده می‌شوند.

باکتری *Agrobacterium rhizogenes* یک باکتری خاک‌زی است که موجب تولید ریشه مویین در محل زخم می‌شود. انتقال T-DNA از پلاسمید Ri این باکتری به سلول‌های گیاهی باعث تولید ریشه‌های مویین می‌شود (۴). یکی از روش‌هایی که امروزه در زمینه بررسی متابولیت‌های گیاهی مورد توجه قرار دارد، روش کشت اندام، بافت یا سلول گیاهی است. محققان با استفاده از این روش سعی کرده‌اند تا تولید متابولیت‌های با ارزش درگیاهان را افزایش دهند. در کشت سلول و بافت، به ویژه در مراحل قبل از تمایز بافت‌ها و اندام‌ها، ممکن است میزان تشکیل برخی از متابولیت‌ها با گیاه کامل تفاوت داشته باشد و آنزیم‌هایی که مسیر بیوسنتزی متابولیت‌ها را در گیاه کنترل می‌کنند، در کشت سلول در مقایسه با گیاه فعالیت یکسانی نداشته باشند. از آنجایی که محل بیوسنتز تعدادی از آلکالوئیدها ریشه است، دستورزی ژنتیکی با استفاده از *A. rhizogenes*، در فنون کشت بافت و بیوتکنولوژی، برای تولید این متابولیت‌ها از اهمیت زیادی برخوردار است (۵). استفاده از *A. rhizogenes* و کشت ریشه‌های مویین به‌علت رشد سریع، کاهش زمان تولید، سهولت نگه‌داری و توانایی سنتز گستره‌ای از ترکیبات شیمیایی، مزیت‌های بیشتری را به‌عنوان یک منبع پیوسته برای تولید متابولیت‌های ثانویه ارزشمند ایجاد می‌نماید. علاوه بر این، ریشه‌های مویین یک سیستم مدل ارزشمند برای ارزیابی، توسعه و کاربرد اصول مهندسی ژنتیک در گیاهان هستند (۶). ریشه‌های تراریخته از قابلیت باززایی گیاهان کامل برخوردارند. با وجود این که گیاهان باززایی شده دچار تغییرات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی متعددی از جمله برگ‌های چروکیده و کوچک‌تر، کاهش غالبیت انتهایی و کوتاه شدن میان گره‌ها می‌شوند، اما ثبات ژنتیکی آن‌ها بسیار مطلوب است (۷). برای استفاده از *A. rhizogenes* در انتقال ژن به گیاهان، موارد آزمایشی مختلفی باید بهینه شوند. این موارد عبارتند از شرایط محیط کشت، پیدا نمودن یک نژاد *Agrobacterium* که ژنوتیپ گیاهی مورد نظر را به‌نحو مطلوب آلوده نماید، طراحی و ساخت T-DNA تغییریافته‌ای که امکان بیان ژن در سلول‌های گیاهی را فراهم نماید، انتقال T-DNA تغییریافته به نژاد *Agrobacterium* انتخاب شده، انتقال T-DNA توسط *Agrobacterium* به گیاه با فراوانی زیاد و در نهایت گزینش سلول‌های گیاهی تراریخته و باززایی گیاه از آنها (۸). فرایند ترانسفورماسیون بافت‌های گیاهی و القا ریشه مویین در آن‌ها تحت تاثیر عوامل مختلفی قرار می‌گیرد که شامل گونه، سن و نوع بافت گیاهی و وضعیت فیزیولوژیکی آن، نوع نژاد *Agrobacterium* و غلظت سوسپانسیون باکتریایی است. امروزه کشت ریشه‌های مویین به‌دلیل سرعت رشد بالا و افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در برخی از گونه‌های گیاهی جهت تولید متابولیت‌های ثانویه مورد استفاده در صنایع داروسازی، آرایشی و بهداشتی و افزودنی‌های خوراکی انجام می‌گیرد (۹). در تحقیق حاضر تاثیر سویه‌های مختلف باکتری *A. rhizogenes* و محیط هم کشتی برای القا و رشد ریشه‌های مویین در دو ژنوتیپ و دو ریزنمونه از گیاه دارویی پروانش بررسی شد و میزان تولید آلکالوئیدهای وین‌دولین و کاتارانتین در بافت‌های مختلف تعیین گردید. تثبیت کشت ریشه‌های مویین در این گیاه، از نظر بررسی قابلیت‌های بیوسنتزی

ریشه‌های مویین آن حائز اهمیت است.

۲- مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و تهیه ریزنمونه: به‌منظور تهیه گیاه‌چه استریل، بذور پروانش پس از ضدعفونی با الکل ۷۰ درصد به‌مدت ۳۰ ثانیه و شستشو با آب مقطر استریل و سپس ضدعفونی کردن با هیپوکلریت سدیم یک درصد به‌مدت ۱۵ دقیقه و شستشو با آب استریل، در محیط کشت MS حاوی ۳ درصد ساکاروز و ۰/۸درصد آگار کشت شدند و سپس در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگه‌داری شدند. ریزنمونه‌های برگ و ساقه حاصل از گیاهچه‌های استریل (۲۸روزه) که به مرحله چهار برگی رسیدند، به‌منظور تلقیح با باکتری مورد استفاده قرار گرفتند.

سویه‌های باکتری و آماده سازی جهت تلقیح : به‌منظور القای ریشه‌های مویین، از باکتری *A. rhizogenes* سویه‌های ۲۶۵۶، ۱۱۳۲۵ و A4 (اهدایی از طرف دکتر علی پاکدین از پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان) استفاده شد. به‌منظور تهیه‌ی سوسپانسیون تلقیح، سویه‌های باکتری در محیط کشت LB (Luria–Bertani) مایع حاوی ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر آنتی‌بیوتیک ریفامپسین در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به‌صورت شبانه رشد داده شدند. کشت باکتریایی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و سرعت ۴۵۰۰ rpm به‌مدت ۱۰ دقیقه رسوب داده شد و پلیت باکتری در محیط کشت B5 حاوی ۱۰۰ میکرومولار استوسرینگون به‌آرامی حل شد. سپس ریزنمونه‌های برگ و ساقه پس از جدا شدن از گیاهچه در سوسپانسیون تلقیح به‌مدت ۲ دقیقه غوطه‌ور و پس از خشک شدن روی کاغذ صافی استریل، بر روی سه محیط کشت MS، MS و B5 با pH=۵/۷ کشت $\frac{1}{2}$ گردیدند. ظرف‌های کشت حاوی ریزنمونه‌های گیاهی در تاریکی، به‌مدت ۴۸ ساعت و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. ۴۸ ساعت پس از انجام تلقیح، به‌منظور حذف باکتری، ریزنمونه‌ها به محیط ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم منتقل شدند. عمل انتقال، چند مرتبه تا حذف کامل باکتری از اطراف ریزنمونه‌ها تکرار شد.

بررسی اثر نوع محیط کشت و سویه باکتری و ژنوتیپ و ریزنمونه بر میزان القا و رشد ریشه‌های مویین: پس از ظهور ریشه‌های مویین از ریزنمونه‌های گیاه پروانش، میزان ریزنمونه‌هایی که موفق به تولید ریشه مویین شدند برای هر تیمار (محیط کشت، سویه باکتری، ریزنمونه و نوع ژنوتیپ) محاسبه و با نرم افزار SAS در قالب طرح کاملا تصادفی مورد بررسی قرار گرفت.

میزان رشد (وزن) ریشه‌های مویین در ۳ مرحله اندازه‌گیری شد. مرحله اول، زمانی که طول ریشه‌های مویین پس از تلقیح به اندازه ۵ تا ۱۰ سانتی‌متر رسیده بود و از محیط جامد به محیط مایع داخل ارلن منتقل شدند (وزن تر اولیه)، دومین مرحله پس از گذشت سه ماه از رشد ریشه‌ها وزن آن‌ها اندازه‌گیری شد (وزن تر نهایی) و بعد از آن ریشه‌ها در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴۸ ساعت در آون خشک شد و سپس وزن خشک آن‌ها اندازه‌گیری شد.

استخراج DNA و تایید تراریختی ریشه‌های مویین: استخراج DNA از نمونه‌های ریشه مویین و ریشه معمولی به‌روشCTAB (۱۰) و همچنین استخراج پلاسمید به‌روشMinipreps (۱۱) از باکتری انجام شد. سپس برای تایید انتقال و حضور قطعه T-DNAی موجود در پلاسمید Ri *A. rhizogenes* به سلول‌های ریشه مویین، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *rolB* و *virD* و دستگاه PCR مدل Bio-Rad T100 انجام شد (جدول ۱).

جدول ۱: مشخصات آغازگرهای مورد استفاده جهت تایید تراریختی ریشه‌های مویین

نام آغازگر	توالی آغازگر (′۳ → ′۵)	طول آغازگر	دمای ذوب	طول قطعه تکثیری
رفت *rolB*	GCTCTTGCAGTGCTAGTTT	۱۹	۵۵	٤۲۱
برگشت *rolB*	GAATGCAAGCTACCTCTC	۱۸	۵۲	
رفت *virD*	ATGTCGCAAGGCAGTAAGCCCA	۲۲	٦۵	٤۳۸
برگشت *virD*	GGAGTCTTTCAGCATGGAGCAA	۲۲	٦۱	

تعداد چرخه‌های واکنش، ۳۵ چرخه و حجم نهایی واکنش ۲۵ میکرولیتر در نظر گرفته شد. واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به‌مدت ۴ دقیقه و ۳۵ چرخه (واسرشت‌سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴۵ ثانیه، اتصال آغازگر در دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد به‌مدت یک دقیقه و مرحله بسط آغازگر در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و به یک مدت) انجام شد. ۵ میکرولیتر محصول واکنش PCR با یک میکرولیتر رنگ بارگذاری بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد با بافر TBE (نیم درصد) با ولتاژ ۷۰ ولت به‌مدت ۹۰ دقیقه تفکیک شد. سپس ژل حاوی رنگ Red sefe در دستگاه عکس برداری ژل مدل UVITEC مشاهده شد.

استخراج آلکالوئیدها از ریشه‌های مویین و اندام هوایی و ریشه گیاه پروانش: نمونه‌هایی شامل ریشه مویین، ریشه معمولی و اندام هوایی در آون در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد و به‌مدت ۴۸ ساعت خشک شدند. ۱۰۰ میلی‌گرم پودر از هر نمونه توزین و به میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی لیتری منتقل شد. از حلال متانول برای استخراج نمونه‌ها استفاده شد. به این‌صورت که به هرکدام از میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری ۱ میلی‌لیتر متانول خالص اضافه شد و به‌مدت ۲۰ ساعت بر روی شیکر در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس میکروتیوب‌ها در سانتریفوژ به‌مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه قرار گرفتند. در نهایت فاز رویی که حاوی آلکالوئیدهای استخراجی بود به میکروتیوب‌های جدید منتقل شد (۱۲).

اندازه گیری وین‌دولین و کاتارانتین توسط HPLC: از دستگاه HPLC مدل D-14163 ساخت شرکت Knauer آلمان با آشکار ساز UV و حجم بارگذاری ۲۰ میکرولیتر برای اندازه‌گیری وین‌دولین و کاتارانتین استفاده شد. فاز متحرک شامل استونیتریل: فسفات بافر: استیک اسید خالص به نسبت ۳۸: ۶۲: ۰/۳ بود. از ستون C18 با قطر داخلی ۴ میلی‌متر و طول ۳۰۰ میلی‌متر به‌عنوان فاز ثابت استفاده شد. سرعت جریان فاز متحرک یک میلی‌لیتر بر دقیقه و زمان حرکت هر نمونه ۸ دقیقه و طول موج به کار برده شده ۲۵۴ نانومتر بود (۱۲). جهت رسم منحنی استاندارد، استانداردهای وین‌دولین و کاتارانتین (خریداری شده از شرکت Sigma-Aldrich) با متانول به نسبت ۱۰: ۹۹۰ رقیق و سری رقت ۲، ۴، ۸ و ۱۶ برابر تهیه و به دستگاه تزریق شد و نهایتا پس از تنظیم و بهینه‌سازی شرایط مختلف، منحنی استاندارد رسم شد.

۳- نتایج

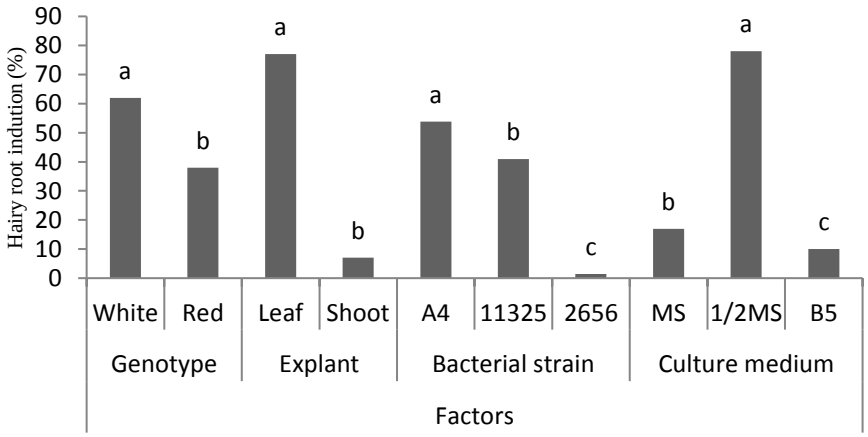
مقایسه کارایی سویه‌های مختلف A. rhizogenes، نوع محیط کشت، ژنوتیپ و ریزنمونه گیاهی در تراریزش پروانش

اولین ریشه‌های مویین پس از گذشت ۱۲-۱۰ روز از زمان تلقیح با باکتری ظاهر شدند. در مورفولوژی ریشه‌های حاصل از سویه‌های مختلف تفاوت بارزی دیده شد. به‌طوری‌که ریشه‌های مویین حاصل از سویه A4، سفید رنگ، کرکی، منشعب و دارای رشد سریع بودند. ریشه‌های حاصل از تلقیح سویه‌های دیگر در مجموع انشعابات کمتر و رشد بسیار کندتری داشتند (شکل ۱). اغلب ریشه‌های مویین به‌دست آمده از دیگر سویه‌ها بعد از گذشت دو تا سه هفته بعد از ظهور، رنگ قهوه‌ای پیدا کرده و بیشتر آن‌ها به سمت کالوسی و ضخیم شدن پیش می‌رفتند. مشاهده کالوس در ریشه‌های مویین در مطالعات قبلی نیز گزارش شده است و علت آن تولید هورمون اکسین در اثر ورود برخی از ژن‌های پلاسمید باکتری به ژنوم گیاه می‌باشد (۱۳).

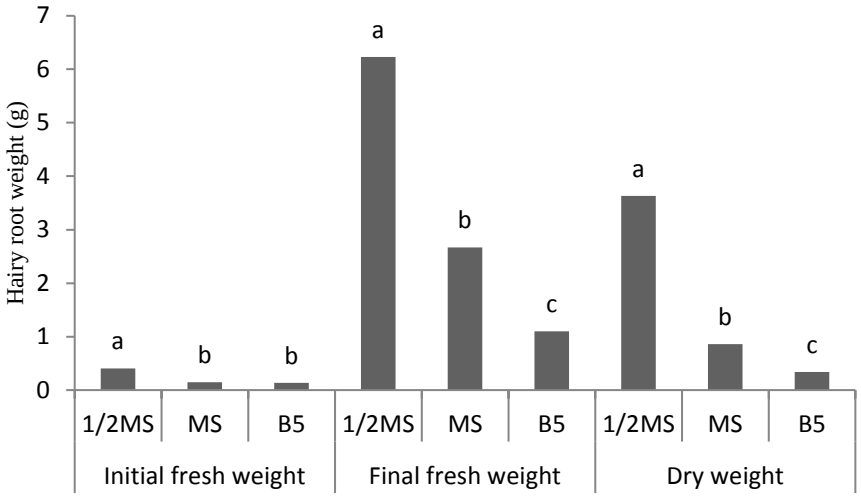
بر اساس نتایج تجزیه واریانس اثر تمام عامل‌های مورد بررسی در سطح یک درصد معنی‌دار شد. نتایج مقایسه میانگین اثر سویه باکتری، محیط کشت، ریزنمونه و ژنوتیپ بر القای ریشه مویین در شکل ۲ آورده شده است. القای ریشه مویین در ریزنمونه برگ (۷۷ درصد) نسبت به ریزنمونه ساقه (۷ درصد) برتری داشت. همچنین ژنوتیپ سفید با ۶۲ درصد ریشه‌زایی نسبت به ژنوتیپ قرمز با ۳۸ درصد ریشه‌زایی، ژنوتیپ برتر جهت القای ریشه مویین مشخص شد. سویه A4 با ۵۳/۸ درصد ریشه‌زایی نسبت به سویه ۱۱۳۲۵ و ۲۶۵۶ (به‌ترتیب ۴۱ و ۱/۴ درصد) کارایی بیشتری از خود نشان داد. سویه A4 در محیط کشت MS، بالاترین کارایی در انتقال T-DNA به ریزنمونه‌های برگ با ژنوتیپ سفید را نشان داد. محیط کشت MS با ۷۸ درصد ریشه‌زایی، بهترین ترکیب محیطی جهت ظهور ریشه‌های مویین پروانش بود. محیط کشت MS و B5 سهم کمتری در ریشه‌زایی داشتند (به ترتیب ۱۷ و ۱۰ درصد). نتایج بدست آمده از این بررسی نشان داد که ریشه‌های مویین در پاسخ به تلقیح *A. rhizogenes* به برگ‌های جداسازی شده از گیاه، تولید می‌گردند. لیکن همه نژادهای باکتری در ایجاد این تراریزش طبیعی از کارآیی یکسانی

برخوردار نبوده و برخی از سویه‌ها مانند A4 مؤثرتر عمل می‌کنند. نتایج حاصل از بررسی قابلیت سه محیط کشتMS ، MS و B5 در حمایت از القا و تثبیت ریشه‌های مویین، حاکی از تاثیر کاملا متفاوت این محیط کشت‌ها به نفع محیط کشت MS بود. این مشاهدات نشان می‌دهد که ترکیبات محیط کشت تاثیر بسزایی بر القای ریشه‌های مویین و فراوانی آن‌ها دارد (شکل ۲). با توجه به نتایج اندازه‌گیری وزن ریشه‌های مویین در سه محیط کشت، بیشترین وزن تر و خشک ریشه‌ها مربوط به محیط کشت MS و بعد از آن، محیط MS و B5 بود (شکل ۳).

شکل ۱: الف) ظهور اولین ریشه‌های مویین پس از گذشت ۱۰ تا ۱۲ روز بعد از تلقیح با *A. rhizogenes* اثر سویه باکتری بر سرعت رشد و ظاهر ریشه‌های مویین، ب: ریشه‌های مویین حاصل از تلقیح با سویه A4، ج: ریشه‌های مویین حاصل از تلقیح با سویه ۲۶۵۶، د: ریشه‌های مویین حاصل از تلقیح با سویه ۱۱۳۲۵



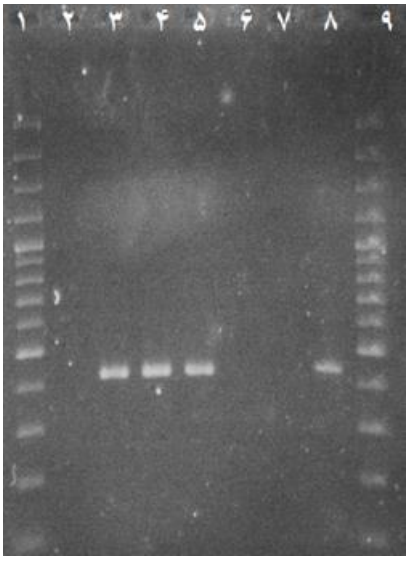
شکل ۲: مقایسه میانگین میزان القای ریشه مویین تحت تاثیر نوع ژنوتیپ، ریزنمونه، سویه باکتری و محیط کشت. میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک در هر عامل اختلاف معنی‌داری با آزمون LSD در سطح ۰/۰۱ ندارند.



شکل ۳: مقایسه رشد (وزن) ریشه‌های موئین در سه محیط کشت MS, B5 و MS. میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک در هر گروه اختلاف معنی‌داری با آزمون LSD در سطح ۰/۰۱ ندارند.

تایید مولکولی تراریختگی ریشه‌های مویین از طریق واکنش زنجیره‌ای پلی مراز (PCR)

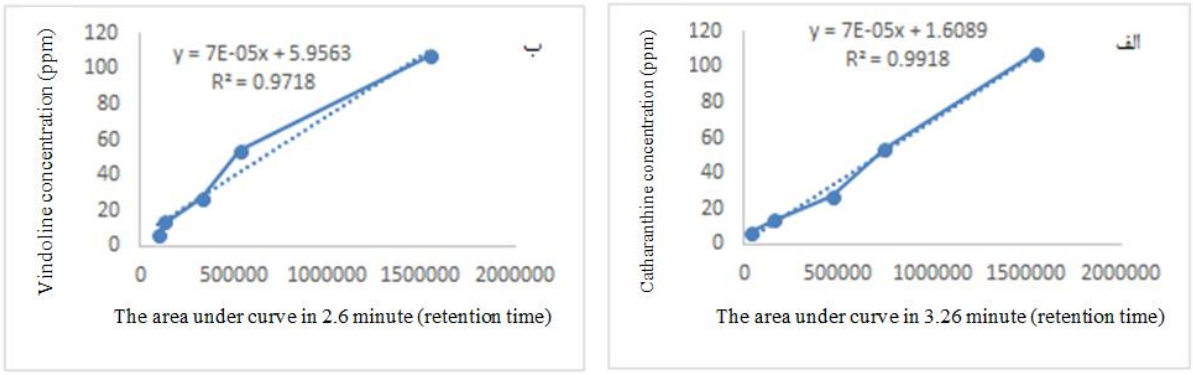
در آزمون PCR با آغازگرهای اختصاصی، مشاهده باند مرتبط با ژن *rolB* (قطعه ۴۲۱ جفت بازی) در باکتری (کنترل مثبت) و ریشه‌های مویین نشان از صحت طراحی آغازگرهای مورد استفاده و تراریختی ریشه‌های مویین داشت. عدم رویت باند (۴۳۸ جفت بازی) مرتبط با ژن *virD* (خارج از T-DNAی پلاسمید Ri است و در ژنوم گیاه درج نمی‌شود) در نمونه‌های حاصل از PCR ریشه‌های مویین، حاکی از عدم آلودگی ریشه‌های مویین به باکتری و حذف موفق باکتری است. عدم حضور ژن *virD* و حضور ژن *rolB* گویای این مطلب است که ریشه‌های مویین تراریخته بودند (شکل ۴).



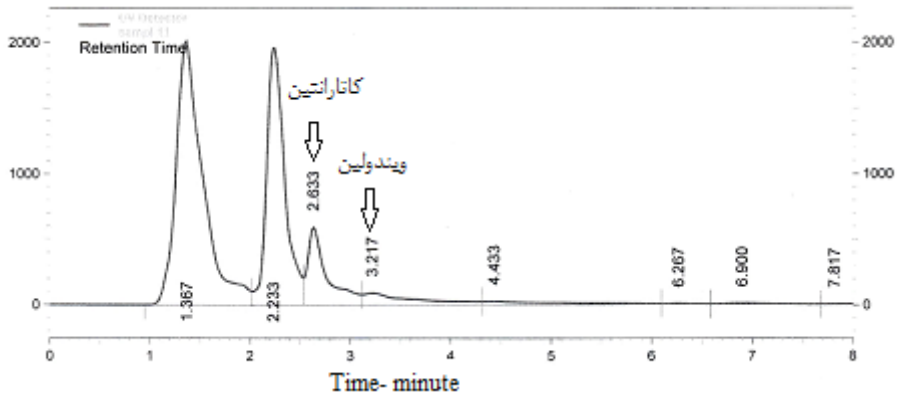
شکل۴: آنالیز PCR جهت تایید تراریختگی ریشه‌های مویین. چاهک ۱ و ۹: سایز مارکر (GeneRuler 100 bp Plus)، چاهک ۲، ۳، ۴ و ۵ تکثیر ژن *rolB* به ترتیب مربوط به ریشه معمولی، ریشه موئین ۱، ریشه موئین ۲ و باکتری، چاهک ۶، ۷ و ۸: تکثیر ژن *virD* به‌ترتیب مربوط به ریشه مویین ۱، ریشه مویین ۲ و باکتری

مقایسه مقدار آلکالوئیدهای ریشه‌های مویین با ریشه معمولی و اندام هوایی

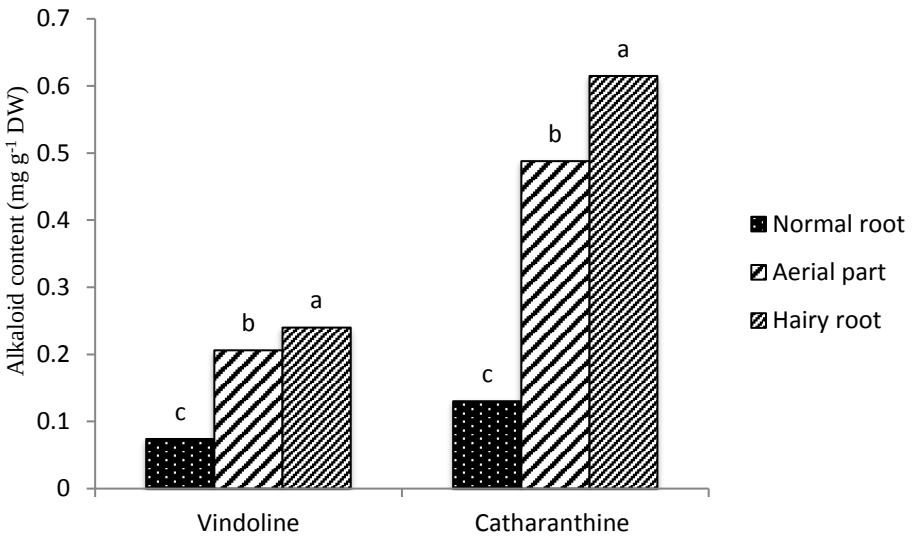
با استفاده از سری رقت استاندارد و سطح زیر منحنی مربوطه، معادله خط رسم و غلظت وین‌دولین و کاتارانتین نمونه‌های مجهول بر اساس سطح زیر منحنی (در زمان نگه‌داری هر متابولیت) و معادله خط محاسبه گردید (شکل ۵ و ۶). بر اساس محاسبات انجام شده میانگین مقدار وین‌دولین در ریشه معمولی ۰/۰۲۱ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک، اندام هوایی ۰/۱۰۶ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک و ریشه مویین ۰/۲۴۰ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک ریشه برآورد شد (شکل۷). مقدار وین‌دولین موجود در یکی از کلون‌های ریشه مویین ۱۱/۵ برابر کلون ریشه معمولی و ۲/۱ برابر اندام هوایی بود. میانگین کاتارانتین موجود در کشت‌های ریشه معمولی ۰/۱۳۰ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک، اندام هوایی ۰/۴۸۸ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک و در ریشه مویین ۰/۶۱۵ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک برآورد شد (شکل۷). مقدار کاتارانتین موجود در ریشه‌های مویین ۴/۷۳ برابر ریشه معمولی و ۱/۲۶ برابر اندام هوایی بود.



شکل۵: منحنی استاندارد. الف) وین‌دولین ب) کاتارانتین



شکل ۶: گراف HPLC کاتارانتین و وین‌دولین در عصاره یکی از کلون‌های ریشه مویین به ترتیب در زمان نگه‌داری ۲/۶۳ و ۳/۲۱ دقیقه



شکل۷: مقایسه میانگین میزان وین‌دولین و کاتارانتین در ریشه مویین، اندام هوایی و ریشه معمولی. میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک در هر متابولیت اختلاف معنی‌داری با آزمون LSD در سطح ۰/۰۱ ندارند.

٤- بحث

انتقال T-DNA از آگروباکتریوم به ژنوم گیاهی فرایند پیچیده‌ای است که تحت تأثیر عوامل مختلفی نظیر سویه باکتری، دوره‌ی پیش کشتی، ژنوتیپ و نوع ریز نمونه گیاهی می‌باشد (۱۴). بدیهی است نه تمامی سویه‌های *Agrobacterium* برای انتقال ژن به سلول گیاهی قابلیت بیماری‌زایی دارند و نه تمامی گیاهان آماده پذیرش ژن بیگانه هستند. دلیل این پدیده چندان مشخص نیست و فقط می‌توان گفت که چنین حالتی در قالب اثرات متقابل گیاه ـ پاتوژن قابل بحث است که یک واریته گیاهی پاسخ‌های متفاوتی را به نژادهای مختلف یک گونه بیماری‌زا می‌دهد. بنابراین، بهبود شرایط بیماری‌زایی، سویه مناسب باکتری و آمادگی سلول و ریزنمونه گیاهی، در افزایش احتمال انتقال T-DNA به سلول گیاهی نقش به سزایی دارد (۱۵). یکی از عوامل مهم در القای ریشه مویین نوع سویه و خاصیت بیماریزایی باکتری است که در مطالعات قبلی نیز این موضوع ثابت شده است (۱۶ و ۱۷). در تحقیق حاضر سویه A4 بیشترین تاثیر در القای ریشه مویین داشت و پس از آن به ترتیب سویه ۱۱۳۲۵ و ۲۶۵۶ قرار داشتند. در مطالعات قبلی نیز سویه A4 بیماریزایی بالا و سویه ۱۱۳۲۵ بیماریزایی متوسط نشان داد (۱۶). این تفاوت در بیماریزایی را می‌توان به تفاوت در ژنوم باکتری و ژن‌هایی از باکتری که در هنگام حمله باکتری به گیاه نقش دارند ولی وارد ژنوم گیاه نمی‌شود، دانست (۱۴). در فرایند تراریختی مکان‌های ژنی مختلفی همچون ژن‌های پلاسمید Ri (ناحیه T-DNA و ژن‌های vir) و ژن‌های بیمایزایی کروموزوم باکتری (*chv*) دخالت دارند. ژن‌های *vir* و *chv* به ژنوم گیاه وارد نمی‌شوند ولی عملکرد متفاوت این ژن‌ها در سویه‌های مختلف باکتری بر قدرت تراریزش باکتری موثر است (۱۸).

یکی دیگر از عوامل موثر بر القای و تولید ریشه مویین نوع محیط کشت است. مشاهدات ما نشان داد که ترکیبات محیط کشت تاثیر بسزایی بر القای ریشه‌های مویین و فراوانی آنها دارد. دینی‌ترکمانی و همکاران نیز گزارش دادند که نوع ترکیبات محیط کشت بر میزان رشد ریشه‌های موئین تاثیر معنی‌دار دارد (۱۹). به نظر می‌رسد که محیط کشت MS به دلیل رقیق‌تر بودن و کاهش غلظت نمک‌ها، محیط مناسب‌تری برای رشد و استقرار ریشه‌های مویین است.

اثر نوع ریزنمونه و ژنوتیپ بر القای ریشه مویین در چندین پژوهش بررسی شده است. از جمله در تحقیقی مشخص شد در گیاه پروانش ریزنمونه برگ نسبت به ساقه جهت القای ریشه مویین (به ترتیب ۸۸ درصد و ۱۴ درصد) مناسب‌تر است (۲۰). این موضوع می‌تواند به دلیل نوع بافت برگ و بهتر قرار گرفتن آن روی محیط کشت و استفاده بهتر از مواد مغذی محیط و پاسخ

بهتر به پاتوژن باکتری باشد که در این تحقیق برتری ریز نمونه برگ بر ریز نمونه ساقه تایید شد. همچنین در پژوهشی اثر ژنوتیپ گیاهی و سویه باکتری و اثر متقابل آنها بر تولید ریشه مویین گیاه پروانش بررسی شد که مطابق با تحقیق حاضر اثر این عوامل معنی‌دار شد (۲۱).

در تحقیقات قبلی سه نوع مورفولوژی ریشه موئین شامل، ریشه ضخیم و رشد آهسته، ریشه نازک با رشد سریع و ریشه‌هایی با ساختار معمولی و رشد متوسط مشاهده شد، با این حال، ریشه‌های نوع دوم فراوان‌تر از سایر انواع بودند (۱۹ و ۲۰). در این تحقیق نیز تنوع زیادی در مورفولوژی کلون‌های ریشه موئین وجود داشت که می‌توان آن را به این واقعیت نسبت داد که هر کلون ریشه موئین از یک رویداد تاریخی مستقل به‌وجود آمده است. این تفاوت در مورفولوژی ریشه‌های حاصل از سویه‌های متفاوت، در آزمایش‌های قبلی نیز گزارش شده است (۱۳ و ۲۲).

مطابق با تحقیق حاضر، افزایش مقدار آلکالوئیدها در کشت ریشه مویین پروانش در گزارشات قبلی نیز گزارش شده است. در تحقیقی مقدار وین‌کریستین در بهترین کلون ریشه موئین پروانش (۴۴۲ نانوگرم بر میلی‌گرم وزن تر)، ۱۴۷۳ برابر ریشه معمولی (۰/۳ نانوگرم بر میلی‌گرم وزن تر) گزارش شد و مقدار کاتارانتین در ریشه‌های موئین از ۰/۳ تا ۰/۷ متغیر بود ولی در ریشه شاهد کاتارانتین قابل اندازه‌گیری، مشاهده نشد (۲۰). بر حسب محل درج ژن‌های ناحیه T-DNA در ژنوم گیاه و نوع ژن انتقال یافته (*rolA, rolB, rolC* و *rolD*) و تاثیری که این ژن‌ها بر تغییر الگوی بیان ژن‌های گیاه میزبان می‌گذارند، میزان تولید متابولیت‌های ثانویه در کلون‌های ریشه مویین نیز متفاوت است (۲۳-۲۷). در اکثر پژوهش‌های انجام شده اثر مثبت انتقال ژن‌های *rol* پلاسمید Ri به گیاه میزبان و القای ریشه مویین بر افزایش میزان متابولیت‌های ثانویه گیاهی گزارش شده است (۲۸-۳۱) که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد.

۵- نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که القای ریشه مویین به فاکتورهایی مانند ژنوتیپ گیاه، نوع ریزنمونه، نژاد باکتری و محیط کشت مورد استفاده وابسته است. ظهور ریشه مویین تقریبا ۱۰ روز پس از تلقیح ریزنمونه گیاهی با باکتری *A. rhizogenes* و از محل برش ریزنمونه صورت گرفت. سویه A4 و محیط کشت 1/2MS به‌ترتیب به‌عنوان بهترین سویه جهت القای ریشه مویین در گیاه پروانش و بهترین محیط کشت برای توسعه و استقرار کشت ریشه‌های مویین در ژنوتیپ سفید و ریزنمونه برگ پروانش تعیین گردید.

در حال حاضر روش‌های سنتزی و نیمه سنتزی در مقیاس صنعتی برای تولید آلکالوئیدهای پروانش (از جمله وین‌بلاستین، وین‌کریستین و مونومرهای آن‌ها نظیر وین‌دولین و کاتارانتین) به دلیل پیچیدگی ساختار شیمیایی آن‌ها مناسب نیستند و بخش عمده این ترکیبات از طریق استخراج از این گیاه حاصل می‌شود (۳۲). از آنجا که تقاضای بسیاری برای این ترکیبات وجود دارد و میزان آنها در مواد خام اولیه استخراج شده از گیاه پروانش کم است، اهمیت مطالعه بر روی روش‌هایی که تولید این ترکیبات را در گیاه افزایش دهد، چند برابر می‌شود. ریشه‌های مویین نسبت به اندام‌های هوایی و کشت کالوس متابولیت‌های ثانویه را با عملکرد بیشتر، سریع‌تر و پایدارتر تولید می‌کنند (۱۲ و ۳۳) لذا توسعه ریز ازدیادی پروانش در محیط درون شیشه و به‌دنبال آن ایجاد و کشت ریشه‌های مویین اهمیت فراوانی دارد و شاید راه حل مناسبی برای جمع آوری مواد خام جهت بازیافت این آلکالوئیدها باشد. ریشه‌های مویین دارای شرایط اختصاصی از جمله رشد سریع و منشعب، رشد در محیط بدون هورمون، پایداری از لحاظ تولید بیشتر متابولیت‌ها نسبت به ریشه معمولی است (۱۳). در این تحقیق با توجه به اهمیت دارویی و تجاری فوق العاده کاتارانتین و وین‌دولین به بررسی مزیت تولید این ترکیبات از طریق کشت ریشه مویین پرداخته شد که نتایج به‌دست آمده نشان دهنده افزایش تولید این آلکالوئیدها از طریق کشت ریشه مویین در این گیاه است. بنابراین در تحقیقات آتی می‌توان با بهینه‌سازی شرایط کشت در مقیاس بالا در بیوراکتورها به سمت تولید تجاری این ترکیبات از طریق کشت ریشه مویین حرکت کرد.

٦- تشکر و قدردانی

نویسندگان از دانشگاه ولی عصر (عج) رفسنجان به دلیل در اختیار قرار دادن امکانات آزمایشگاهی و منابع مالی و از آقای دکتر علی پاکدین از پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان به‌دلیل اهدای سویه‌های باکتری مورد استفاده در این پژوهش سپاس‌گزاری می‌کنند.

۷- منابع

1. Omidbaigi R. Approarches to production and processing of medicinal plants. Behnashr Co. (the Publication of Astan Quds Razavi). 2018; 346 pp. (In Persian)
2. Oksman-Caldentey KM, Inzé D. Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. Trends in Plant Science. 2004; 9(9): 433-40.
3. Bourgaud F, Gravot A, Milesi S, Gontier E. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. Plant Science. 2001; 39: 158-61.
4. Giri A, Narasu ML. Transgenic hairy roots: recent trends and applications. Biotechnology Advances 2000; 18: 1-22.
5. Dechaux C, Boitel Conti M. A strategy for overaccumulation of scopolamine in Datura innoxia hairy root cultures. Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica. 2005; 47(1): 101-7.
6. Hildebrand E. Life history of the hairy root organism in relation to its pathogenesis on nursery apple trees. Technology & Engineering. 1934; 110 pp.
7. Tepfer D. Transformation of several species of highplants by Agrobacterium rhizogenes: Sexual transmission of the transformed genotype and phenotype. Cell. 1984; 37(3): 959- 67.
8. Hu Z, Du M. Hairy root and its application in plant genetic engineering. Plant Biology. 2006; 48: 121-7.
9. Norouzi R, Babalar M, Mirmasoumi M. Investigation of hairy root induction in some Salvia L. species. Nova Biologica Reperta. 2017; 4(2): 173-80. (In Persian)
10. Doyle JJ, Doyle JL. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical Bulletin. 1987; 19(1): 11-15.
11. Green MR, Sambrook J. Preparation of Plasmid DNA by Alkaline Lysis with Sodium Dodecyl Sulfate: Minipreps. Cold Spring Harbor Protocols. 2016; 10: 911-6.
12. Tikhomiroff C, Jolicoeur M. Screening of Catharanthus roseous secondary metabolites by high-performance liquid chromatography. Journal of Chromatography A. 2002; 955: 87-93.
13. Pietrosiuk A, Furmanowa M, Lata B. Catharanthus roseus: Micropropagation and in vitro techniques. Phytochemistry Rrviews. 2007; 6: 459-73.
14. Sevon N, Oksman Caldentey KM. Agrobacterium rhizogenes mediated transformation: root cultures as a source of alkaloids. Planta Medica. 2002; 68: 859–68.
15. De Buck S, Jacobs A, Van Montagu M, Depicker A. Agrobacterium tumefaciens transformation and cotransformation frequencies of Arabidopsis thaliana root explants and tobacco protoplasts. Molecular Plant-Microbe Interactions. 1998; 11: 449-57.
16. Mohammadi S, Haddad R, Mohammadi V. Assessment of hairy roots induction in Echium khuzistanicum by different strains of Agrobacterium rhizogenes. Agricultural Biotechnology Journal. 2020; 12(1): 63-80. (In Persian)
17. Vanhal L, Hiltunen R, Oksman caldenty KM. Virulence of different Agrobacterium strains on hairy root formation of Hyoscyamus muticus. Plant Cell. 1995; 14: 236-40.
18. Biswas D, Chakraborty A, Mukherjee S, Ghosh B. Hairy root culture: a potent method for improved secondary metabolite production of Solanaceous plants. Frontiers in Plant Science. 2023; 14: 1197555.
19. Dini Torkamani MR, Abaspour N, Jafari M, samadi A. Induction and Optimization of Hairy Root Growth Condition for Valeriana officinalis L. Through Inoculation by Agrobacterium rhizogenes. Journal of Cell & Tissue. 2014; 5(1): 23-30. (In Persian)

20. Hanafy MS, Matter MA, Asker MS, Rady MR. Production of indole alkaloids in hairy root cultures of Catharanthus roseus L. and their antimicrobial activity. South African Journal of Botany. 2016; 105: 9-18.
21. Toivonen L, Balsevich JW, Kurz WG. Indole alkaloid production by hairy root cultures of Catharanthus roseus. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 1989; 18: 79-93.
22. Zolala J, Farsi M, Gordan HR, Mahmoodnia M. Producing a high scopolamine hairy root clone in Hyoscyamus muticus through transformation by Agrobacterium rhizogenes. Journal of Agricultural Science and Technology. 2007; 9 (4): 327-39.
23. Bulgakov VP, Veremeichik GN, Shkryl YN. The rolB gene activates the expression of genes encoding microRNA processing machinery. Biotechnology Letters. 2015; 37: 921-5.
24. Bulgakov VP, Veremeichik GN, Grigorchuk VP, Rybin VG, et al. The rolB gene activates secondary metabolism in Arabidopsis calli via selective activation of genes encoding MYB and bHLH transcription factors. Plant Physiology and Biochemistry. 2016; 102: 70-9.
25. Bulgakov VP, Vereshchagina YV, Bulgakov DV, Veremeichik GN, et al. The rolB plant oncogene affects multiple signaling protein modules related to hormone signaling and plant defense. Scientific Reports. 2018 8(1): 2285.
26. Gutierrez-Valdes N, Häkkinen ST, Lemasson C, Guillet M. et al. Hairy root cultures— a versatile tool with multiple applications. Frontiers in Plant Science 2020; 11: 33.
27. Sahandi A, Pazhouhandeh M, Mohajjel Shoja H. The effect of rolC gene on the medicinal plant Catharanthus roseus. Genetic Engineering and Biosafety Journal 2016; 5(1): 41-50. (In Persian)
28. Chandra S. Natural plant genetic engineer Agrobacterium rhizogenes: role of T-DNA in plant secondary metabolism. Biotechnology Letters. 2012; 34: 407-15.
29. Faraz R, Gokhale M, Gothalwa R. Hairy root culture through Agrobacterium rhizogenes for enhancement of secondary metabolites production in medicinal plants: a review. Journal of Applied Microbiology. 2020; 4: 45-58.
30. Zhang B, Chen M, Pu S, Chen L, et al. Identification of secondary metabolites in Tripterygium wilfordii hairy roots and culture optimization for enhancing wilforgine and wilforine production. Industrial Crops and Products. 2020; 148: 112276.
31. Veremeichik GN, Bulgakov VP, Shkryl YN, Silantieva SA. et al. Activation of anthraquinone biosynthesis in long-cultured callus culture of Rubia cordifolia transformed with the rolA plant oncogene. Journal of Biotechnology. 2019; 306: 38-46.
32. Hisiger S, Jolicoeur M. Analysis of Catharanthus roseus alkaloids by HPLC. Phytochemistry Reviews. 2007; 6: 207-34.
33. Miura Y, Hirata K, Kurano N. Isolation of vinblastine in callus culture with differentiated roots of Catharanthus roseus. Agricultural and Biological Chemistry. 1987; 51(2): 611-4.