

افزایش ترکیبات دارویی در گیاهان به واسطه تراریختی با *Agrobacterium rhizogenes*

Enhancing pharmaceutical compounds in plants through genetic transformation using *Agrobacterium rhizogenes*

مینا امانی^{۱*}، محمدرضا جلالی^۲، محسن سبزی نوجه‌ده^۳

۱. دانشجوی دکتری تخصصی گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران، (نگارنده مسئول)

۲. دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

۳. دانشیار گروه علوم طبیعی و جنگلداری، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی اهر، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۵/۰۱/۱۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۵/۰۴/۰۱ - شناسانه برنمود رقمی: 10.22092/mpt.2026.372468.1219

چکیده

امانی، م.، جلالی، م.، ر.، سبزی نوجه‌ده، م.، . افزایش ترکیبات دارویی در گیاهان به واسطه تراریختی با *Agrobacterium rhizogenes*
نشریه علمی فناوری گیاهان دارویی ایران، دوره ۷- شماره ۲- پیاپی ۱۳- پائیز و زمستان ۱۴۰۳ صفحه: ۵۸-۷۱

القای ریشه‌های موین توسط *Agrobacterium rhizogenes* و باززایی گیاهان از ریشه‌های تراریخته **Ri** در گونه‌های گیاهی مختلفی گزارش شده است. کشت‌های تراریخته **Ri** (ریشه، کالوس) ویژگی‌های خود را در مقایسه با کشت‌های غیرتراریخته تغییر داده‌اند. چهار ژن *rol* (*rolA*، *rolB*، *rolC*، *rolD*) از T-DNA از پلاسمید **Ri** مسئول این پدیده شناخته شده‌اند. علاوه بر این، تأثیر *A. rhizogenes* بر تولید متابولیت‌های ثانویه در تعداد زیادی از گونه‌های گیاهان دارویی به خوبی مطالعه شده است. مقالات متعددی در طول زمان منتشر شده است که تأثیر *rol* را بر تجمع متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی بررسی می‌کنند و در مورد پیشرفت در این زمینه تحقیقاتی، بحث می‌کنند. با این حال، تحقیقات مربوط به تأثیر ژن‌های *rol* منفرد، نسبتاً کمتر است و به مطالعات بیشتری نیاز است؛ بنابراین، در این مطالعه به تفصیل درباره آثار هر یک از چهار ژن *rol* به صورت جداگانه یا ترکیبی بر ریخت‌زایی درون‌شیشه‌ای و تجمع متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی بحث شده است. جستجوی سیستماتیک در پایگاه‌های **PubMed**، **Scopus**، **Web of Science**، **Google Scholar** و **ScienceDirect** با استفاده از کلیدواژه‌های «*A. rhizogenes*»، «**Hairy root culture**»، «*genes rol (rolA, rolB, rolC, rolD)*»، «**Secondary metabolites**» و «**Medicinal plants**» انجام شد. بازه زمانی جستجو از سال ۱۹۸۶ تا ۲۰۲۴ در نظر گرفته شد. معیارهای ورود شامل مقالات اصیل مرتبط با تراریختی القاشده توسط *A. rhizogenes* ژن‌های *rol*، کشت ریشه‌های موین و نقش آن‌ها در تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی بود. مطالعات نامرتب با موضوع، مقالات تکراری و گزارش‌هایی که داده‌های کافی درباره نوع ژن‌های درگیر، پاسخ‌های مورفوفیزیکی یا تغییرات متابولیتی ارائه نمی‌کردند، از تحلیل حذف شدند.

واژه‌های کلیدی: *Agrobacterium rhizogenes*، ژنها، گیاهان دارویی، متابولیت‌های ثانویه.

آدرس پست الکترونیکی نگارنده مسئول: Minaamani@phd.tabrizu.ac.ir

مقدمه

گیاهان به واسطه توانایی بالای سلول‌هایشان در باززایی بافت‌ها و اندام‌های جدید و نیز باززایی گیاه کامل از سلول‌های آسیب‌دیده شناخته می‌شوند (Badr Hadad *et al.*, 2017; Sabzi Nojadeh *et al.*, 2021; Ghorbanzadeh *et al.*, 2022; Sabzi Nojadeh *et al.*, 2024). ریخت‌زایی درون شیشه‌ای نیز تحت تأثیر عوامل درونی و بیرونی قرار می‌گیرد که در نهایت توانایی اندام‌زایی را در فرایند توسعه القا می‌کنند (Sarkar & Jha, 2017). مطالعات نشان می‌دهد که نوع و غلظت اکسین و سیتوکینین در محیط کشت بر ریخت‌زایی تأثیر زیادی دارند. نسبت‌های بالای اکسین به سیتوکینین، به‌طور کلی به باززایی ریشه و نسبت‌های بالای سیتوکینین به اکسین، باعث افزایش باززایی شاخساره و قابلیت منحصربه‌فردی برای ایجاد «ریشه موین» در گیاهان آوندی در محل آلودگی دارد. سویه‌های مختلف *Agrobacterium rhizogenes* برای القای ریشه‌های موین از سلول‌های گیاه میزبان با انتقال DNA (T-DNA انتقالی) از پلاسمید محرک ریشه (Ri) به ژنوم میزبان شناخته شده‌اند (Aazami *et al.*, 2020; Ghorbanzadeh *et al.*, 2022). مطالعات متعدد نشان داده‌اند که تنها چهار شکل قرائت دوباره (ORF^۱) از T-DNA برای القا، رشد و مورفولوژی ریشه‌های موین در گیاهان آلوده حیاتی هستند؛ بنابراین این ژن‌ها، ژن‌های سرطانی *rol* یا مکان القای ریشه و با نام‌های *rolA* (ORF 10) *rolB* (ORF 11) *rolC* (ORF 12) و *rolD* (ORF 15) نام‌گذاری

^۱ Open Reading Frame

شده‌اند. این ریشه‌های تراریخته را می‌توان از محل زخم جدا کرد و در محیط بدون هورمون کشت داد. ریشه‌های موین رشد سریع و منشعبی را نشان می‌دهند که با انشعاب جانبی فراوان و کشیدگی سریع نوک ریشه در محیط عاری از هورمون‌ها، در مقایسه با ریشه‌های غیر تراریخته مشخص می‌شود، درحالی‌که در برخی از گونه‌های گیاهی، ریشه‌های تراریخته Ri، «سندروم ریشه موین» را نشان می‌دهند. در گیاهان دیگر، ریشه‌های Ri فاقد ریشه‌های موین هستند (Roychowdhury *et al.*, 2015a; Badr Hadad *et al.*, 2017; Ghorbanzadeh *et al.*, 2022). علاوه بر تنوع بین گونه‌ها، تنوع در رشد و مورفولوژی نیز در بین ریزوکلون‌های مختلف یک گونه مشاهده شده است (Roychowdhury *et al.*, 2020; Aazami *et al.*, 2015a).

تنوع در مورفولوژی ریشه موین شامل تغییر در ضخامت ریشه اولیه، تراکم جانبی ریشه‌ها و وجود کالوس ریشه‌دار است. این تغییرات در بین ریزوکلون‌های تراریخته به دلیل تنوع در ماهیت، مکان و تعداد ادغام T-DNA در ژنوم میزبان نسبت داده شده است. تنوع مولکولی در بین ریزوکلون‌ها، از نظر درج T-DNA و تأثیر TL-DNA و TR-DNA بر مورفولوژی ریشه توسط گروه‌های مختلف بررسی شده است (Roychowdhury *et al.*, 2015a; Sharifpour *et al.*, 2020)؛ درحالی‌که، مورفولوژی ریشه‌های موین در بسیاری از گونه‌ها به خوبی مشخص شده است، ولی آناتومی آنها به طور کامل کشف نشده است. آناتومی ریشه‌های تراریخته توسط *A. rhizogenes* کم و بیش شبیه به ریشه‌های نوع

جدول ۱- باززایی در کشت ریشه موین گونه های مختلف گیاهی

ریخت زایی در کشت ریشه موین			
۱. القاشده توسط فیتوهورمون ها		۲. خود به خودی	
۱.۱. غیرمستقیم از طریق تشکیل کالوس	۲.۱. اندام زایی مستقیم شاخه	۱.۲. غیرمستقیم از طریق تشکیل کالوس	۲.۲. اندام زایی مستقیم شاخه
۱. خیار (Trulson <i>et al.</i> , 1986) ۲. جینسینگ (Yang & Choi, 2000)	۱. شایبزی (Aoki <i>et al.</i> , 1997) ۲. علف دندان (Satheeshkumar <i>et al.</i> , 2009)	۱. تیلوفرای هندی	۱. ناز باتلاقی (Majumdar <i>et al.</i> , 2011) ۲. قاصدک (Lee <i>et al.</i> , 2004)

وحشی با برخی استثناءهای قابل توجه است (Badr Hadad *et al.*, 2017; Ghorbanzadeh *et al.*, 2022). علاوه بر تغییرات ذکر شده در بالا، توانایی ریخت زایی ژنتیکی *A. rhizogenes* با سویه های مختلف در یک گونه متفاوت است (Thwe *et al.*, 2016). در مطالعه ای، باززایی گیاه تیلوفرای هندی (*Tylophora indica*) (Roychowdhury *et al.*, 2015a; b) تراریخته شده با Ri از طریق کشت ریشه موین بررسی شد. ریخت زایی در کشت های ریشه موین می تواند به صورت خودبه خودی یا القاشده توسط فیتوهورمون ها رخ دهد و در هر دو حالت ممکن است از مسیر مستقیم یا غیرمستقیم، از جمله از طریق تشکیل کالوس، به اندام زایی ساقه ای یا جنین زایی سوماتیکی منجر شود. این الگوها بسته به گونه گیاهی، ترکیب هورمونی محیط کشت و وضعیت ژنتیکی ریشه های تراریخته متفاوت هستند و می توانند مبنای مناسبی برای بهینه سازی باززایی و تولید متابولیت های ثانویه در سامانه های کشت ریشه موین باشند (جدول ۱) (Roychowdhury *et al.*, 2017; Badr Hadad *et al.*, 2017).

چنین گیاهانی در مقایسه با گیاهان نوع وحشی، فنوتیپ های متفاوتی مانند برگ های چروکیده، میانگره های کوتاه، کاهش غالبیت رأسی، تغییر مورفولوژی گل، افزایش تعداد شاخه ها، کاهش تولید گرده و دانه و تولید فراوان ریشه های موین تراریخته بسیار منشعب نشان دادند. نشان داده شده است که این صفات مورفولوژیکی غیرطبیعی به دلیل اعمال ترکیبی ژن های *rolA*, *rolB*, *rolC* و *rolD* است؛ زیرا هر یک از ژن های *rol* با تغییرات فنوتیپی خاص مرتبط هستند. اکثر ریشه های موین و گیاهان تراریخته شده Ri در کشت طولانی مدت پایدار هستند، اگرچه برخی ناپایداری ها نیز مشاهده می شود (Roychowdhury *et al.*, 2015a, b).

به طور کلی نشان داده شده است که پاسخ ریخت زایی در ریشه های موین تراریخته شده نوع وحشی *A. rhizogenes* به دلیل وجود ژن های *rol* است. با این حال، نقش ژن های *rol* منفرد در ریخت زایی هنوز به خوبی مستند نشده است؛ بنابراین، در این مقاله، آثار هر یک

از چهار ژن *rol* به صورت جداگانه یا ترکیبی بر ریخت‌زایی درون شیشه‌ای بر روی گیاهان دارویی خلاصه شده است.

مواد و روش‌ها

این مطالعه یک جستجوی سیستماتیک را برای شناسایی مقالات مرتبط با نقش ژن‌های *rol* (*rolA*، *rolB*، *rolC* و *rolD*) از T-DNA پلاسمید Ri و همچنین اثر *A. rhizogenes* بر ریخت‌زایی درون شیشه‌ای و تجمع متابولیت‌های ثانویه در کشت‌های ریشه موین در گونه‌های گیاهی دارویی انجام داد. جستجو در پایگاه‌های Google، Web of Science، Scopus، PubMed و Scholar با ScienceDirect استفاده از کلیدواژه‌های ترکیبی شامل:

Hairy root culture، *A. rhizogenes*، *rol* genes (*rolA*، *rolB*، *rolC*، *rolD*)، Medicinal plants و Secondary metabolites، انجام شد. بازه زمانی جستجو از سال ۱۹۸۶ تا ۲۰۲۴ در نظر گرفته شد. معیارهای ورود شامل مقالات اصلی مرتبط با تراریختی/القاشدگی توسط *A. rhizogenes*، تمرکز بر ژن‌های *rol* و گزارش نقش آن‌ها در ریخت‌زایی (مانند تشکیل ریشه موین و/یا کالوس یا سایر شاخص‌های مورفولوژیکی درون‌شیشه‌ای) و نیز ارائه داده‌های کافی درباره تغییرات متابولیتی و/یا تجمع متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی بود. مقالات نامرتبط با موضوع، موارد تکراری و همچنین گزارش‌هایی که اطلاعات کافی درباره نوع ژن‌های درگیر، پاسخ‌های مورفولوژیکی یا جزئیات تغییرات متابولیکی (در حدی که امکان استخراج نتیجه وجود

داشته باشد) ارائه نمی‌کردند، از مطالعه حذف شدند. علاوه بر مقالات اصلی، مقالات مروری نیز برای تکمیل چارچوب نظری بررسی شدند و برای آن‌ها نیز بازه زمانی جستجو، پایگاه‌های ذکر شده و کلیدواژه‌های اصلی استفاده شده ثبت گردید؛ در این دسته از مقالات، تمرکز بر جمع‌بندی شواهد موجود درباره «اثر *rol*» بر تجمع متابولیت‌های ثانویه و پیشرفت‌های پژوهشی در این حوزه بود. فرایند غربالگری به ترتیب شامل حذف رکوردهای تکراری، بررسی عنوان و چکیده و سپس ارزیابی متن کامل براساس معیارهای ورود/خروج انجام شد، و در نهایت مطالعات واجد شرایط برای استخراج داده‌ها انتخاب شدند؛ داده‌های استخراج شده شامل گونه گیاهی، نوع کشت (ریشه، کالوس یا ریشه موین)، سویه/روش تراریختی، ژن‌های *rol* بررسی شده (منفرد یا ترکیبی)، شاخص‌های ریخت‌زایی و نوع/سطح متابولیت‌های ثانویه گزارش شده بود.

تأثیر ژن *rolA* بر ریخت‌زایی

ریزنمونه‌های مختلف آلوده به سویه‌های *Agrobacterium tumefaciens* حاوی ژن *rolA*، القای جوانه‌های شاخساره را از محل زخم در محیط‌های حاوی هورمون به طور مستقیم یا غیرمستقیم از طریق تشکیل کالوس در گیاهان درمنه (*Artemisia dubia*) (Amanullah et al., 2016)، گوجه فرنگی (*Solanum lycopersicum*) (Bettini et al., 2016b) و تنباکو (*Nicotiana glauca*) (Badr Hadad et al., 2017) نشان دادند. در همه مطالعات انجام شده، چنین محیط‌های مکمل هورمونی می‌توانند باعث

تشکیل جوانه‌های ساقه در ریزنمونه‌های غیر تراریخته شوند. شاخه‌های درحال رشد از جوانه‌های ساقه در محیط‌های بدون هورمون (Bettini *et al.*, 2016b) یا حاوی هورمون برای تولید گیاهان تراریخته ریشه‌دار شدند (Amanullah *et al.*, 2016). تغییر فنوتیپ گیاهان تراریخته *rolA* مانند برگ‌های چروکیده، درصد ریشه‌زایی کمتر، گلدهی زود هنگام، کاهش طول جوانه‌های گل، میوه‌های کوچک فاقد دانه و کاهش زنده‌مانی گرده گیاه درمنه گزارش شده است (Amanullah *et al.*, 2016; Bettini *et al.*, 2016b; Ghorbanzadeh *et al.*, 2022). با این حال، مشخص شد که این تغییرات فنوتیپی به سطح بیان تراریخته شده وابسته است. هنگامی که این ژن تحت پروموتور خود بیان شد، باعث کوتاهی، چین و چروک شدید برگ‌ها، کوتاه شدن میانگره‌ها، برگ‌های کوچک و گل آذین متراکم شد. این فنوتیپ‌ها در گیاهان تراریخته شده با *S:rolA* ۳۵ دارای رشد کند با برگ‌های کوچک، سبز تیره و به شدت چروکیده، تأخیر در گلدهی با تعداد گل‌های کم بودند. در درمنه تراریخته شده با *rolA* تأخیر در گلدهی و نیز درصد ریشه‌زایی کمتری گزارش شده است (Amanullah *et al.*, 2016)؛ بنابراین، مشخص شد که ژن *rolA* یک گونه خاص است. با این حال، تغییرات فنوتیپی گونه‌های گیاهان باززایی شده با کلون‌های مختلف تراریخته شده با *rolA* مشاهده شد. محققان پیشنهاد کرده‌اند که این ممکن است به دلیل تعداد کمی از ژن تراریخته شده باشند (Bettini *et al.*, 2016a, b).

تأثیر ژن *rolB* بر ریخت‌زایی

محققان برای اولین بار مشخص کردند که ژن *rolB* در تشکیل ریشه‌های فرعی از ریزنمونه‌های مختلف پس از آلودگی نقش مهمی دارد. محققان نشان دادند که سازه‌های ناقل گیاهی که فقط ژن *rolB* را حمل می‌کنند، به مقدار مختلف به ایجاد تمایز ریشه در بافت‌های مختلف گیاهی قادر هستند. زمانی که ژن *rolB* تحت پروموتورهای مختلف بیان شد، زمان تشکیل ریشه به طور متفاوتی تحت تأثیر قرار گرفت. شکل‌گیری ریشه با *pPCV002-B1100* (که در آن *rolB* تحت کنترل توالی‌های کناری ۵' خود است) نسبت به *pPCV002-B300* (شامل تنها ۳۰۰ جفت باز از توالی‌های کناری ۵' *rolB*) شدیدتر و زودتر مشاهده شد. علاوه بر آن، ژن *CaMVBT* (جایی که *rolB* تحت کنترل پروموتور ویروس موزاییک گل کلم ۳۵S است) نسبت به *pPCV002-B1100* پاسخ ضعیف‌تری نشان داد که احتمالاً به دلیل بیان بیش از حد رونوشت *rolB* است که به القای ریشه منجر نمی‌شود. برعکس، این ژن زمانی که به تنهایی تلقیح شود به القای ریشه روی دیسک‌های کاروت قادر نیست. علائم ریشه موین تقریباً مشابه علائم ناشی از نوع وحشی *A. rhizogenes* است، زمانی که دیسک‌ها با ژن *rolB* به همراه ناحیه بالادست به طول ۱۲۰۰ جفت باز و TR-DNA تلقیح شدند. ریشه‌های القاشده به واسطه *rolB* دارای رشد سریع و بسیار منشعب بودند. در طی سالیان، *rolB* به عنوان یک ژن القاکننده ریشه در نظر گرفته شده است که قادر است یک برنامه ریخت‌زایی خاص را در گیاهان آوندی فعال کند. علاوه بر تشکیل مستقیم ریشه، تشکیل غیرمستقیم ریشه

نیز در ریزنمونه برگ رونا س هندی (*Rubia cordifolia*) گزارش شده است (Bulgakov *et al.*, 2002). مورفولوژی ریشه‌های تراریخته شده با *rolB* بسیار شبیه به ریشه‌های موین تراریخته شده با نوع وحشی *A. rhizogenes* بود. *rolB* یک ژن T-DNA است که در پلاسمید Ri باکتری *A. rhizogenes* قرار دارد و پس از انتقال به گیاه، در ژنوم گیاه ادغام می‌شود. در مقایسه با ریشه‌های غیرتراریخته، ریشه‌های ناشی از *rolB* القا شده، رشد سریع و بسیار منشعبی داشتند که نتیجه افزایش حساسیت اکسین در سلول‌های گیاهی تراریخته شده توسط این آنکوژن بود. اندام‌زایی ساقه و استقرار گیاهان تراریخته شده با *rolB* از ریزنمونه‌های آلوده در محیط‌های حاوی هورمون، مستقیم یا غیرمستقیم از طریق کالوس در گیاهان درمنه (Amanullah *et al.*, 2016)، گوجه فرنگی (Bettini *et al.*, 2016b) و تنباکو (Badr Hadad *et al.*, 2017) گزارش شده است. افزایش درصد ریشه‌زایی و تعداد ریشه تراریخته شده با *rolB* در غیاب اکسین، نشان می‌دهد که سطح اکسین درونی در تراریختی‌های *rolB* برای ریشه‌زایی کافی است. در حضور اکسین در محیط، شاخساره‌های تراریخته شده در پایه ساقه، کالوس فراوانی ایجاد کردند و درصد ریشه‌زایی و تعداد ریشه‌ها را به طور چشمگیری کاهش دادند که احتمالاً به دلیل افزایش حساسیت به اکسین بود. مورفولوژی ریشه‌ها حتی در جایی که ریشه‌ها در محیط حاوی اکسین کوتاه‌تر و ضخیم‌تر شدند، تغییر یافت. با این حال، چندین نسخه از درج ژن *rolB* در ژنوم گیاه نیز بر ریشه‌زایی تأثیر

منفی گذاشت. کشت کالوس گیاه ماکیا آموری (*Maackia amurensis*) غیرتراریخته یا تراریخته شده با وکتور خالی (وکتور فاقد ژن خارجی)، شکننده، آبکی و دارای رشد خوب با رنگ زرد روشن یا قهوه‌ای بود، اما کالوس‌های تراریخته شده با *rolB* تنوع مورفولوژیکی را نشان می‌دهند و می‌توانند با سطح بیان *rolB* مرتبط باشند. کالوس‌های با سطح رونویسی پایین، شکننده، کروی و به رنگ زرد متمایل به سفید تا قهوه‌ای روشن بودند. درمقابل، کالوس فشرده، غیرآبی، قهوه‌ای کم رنگ تا قهوه‌ای تیره با رشد فعال در سطح بالایی از خطوط کالوس بیان‌کننده ژن *rolB* به دست آمد (Grishchenko *et al.*, 2016). گزارش شده است که رنگ کالوس‌های تراریخته *rolB* از برگ رونا س هندی به سطح بیان ژن *rolB* بستگی دارد (رنگ زرد در کالوس با بیان کم، رنگ نارنجی در کالوس با بیان متوسط و رنگ نارنجی-قرمز در کالوس با بیان بالا به دلیل تجمع حداکثر آنتراکینون‌ها^۲). برخی از کالوس‌های رونا س هندی تراریخته شده با ژن *rolB* به طور خودبه‌خود، ریشه‌های کوچکی را تشکیل دادند (Bulgakov *et al.*, 2002).

تأثیر ژن *rolC* بر ریخت‌زایی

ژن *rolC* تحت پروموتور CMV35S و همچنین تحت پروموتور خود، قادر به القای ریشه مستقیم از ریزنمونه‌های برگ شاییزک (*Atropa belladonna*) بود (Bonhomme *et al.*, 2000). از سوی دیگر، القای ریشه موین از کالوس‌های تراریخته شده *rolC* در غیاب یا حضور اکسین گزارش شده است که تحت

^۲ Anthraquinones

شدند، ویژگی‌هایی مانند کاهش شدید غالبیت رآسی و طول میانگره، برگ‌های بسیار کوچک با شکل تغییر یافته، انشعاب جانبی بیشتر، ظرفیت ریشه‌زایی بیشتر، افزایش جوانه‌های جانبی، افزایش گلدهی، کاهش گل آذین، گل‌های کوچکتر و گل‌های نر عقیم تولید کردند. در شاییزک اگرچه اکثر گیاهان تراریخته شده به واسطه *rolC* دارای فنوتیپ‌های معمولی تغییر یافته را نشان دادند، ولی دو احیاکننده غیرمعمول، ظاهر بد شکلی را نشان دادند که حاشیه برگ‌ها به شدت چروکیده و تیره‌تر از ناحیه مرکزی برگ بود (Bettini *et al.*, 2000). (a; b) و همکاران (2016) در گوجه فرنگی گزارش کردند که نسبت بالاتر اسید آبسزیک^۵ به اسید ایندول-۳-استیک (ABA/IAA)^۶ ممکن است باعث رشد کم این گیاهان شود.

کشت کالوس تراریخته شده با *rolC* در برخی از گونه‌ها با استفاده از *A. tumefaciens* حاوی ژن *rolC* ۳۵S در محیط‌های حاوی هورمون‌های رشد گزارش شده است (Bourgau *et al.*, 2001; Grishchenko *et al.*, 2016; Badr Hadad *et al.*, 2017; Soheilvand *et al.*, 2022). مشخص شد که ادغام ژن *rolC* به تغییر قابل توجهی در فنوتیپ، رشد و تجمع زیست‌توده در مقایسه با کشت کالوس غیرتراریخته منجر شد. ناقل فاقد ژن خارجی کالوس تراریخته شده ماکیا آموری (Grishchenko *et al.*, 2016) و روناس هندی شکننده و آبکی بود؛ درحالی که کالوس

پروموتر قوی CMV35S در جینسینگ (*Panax* Yang & Choi, 2000) (*ginseng*) و روناس هندی (Bulgakov *et al.*, 2002) بیان میشود.

ورود ژن *rolC* به کالوس به تمایز مورفولوژیکی برای تشکیل جوانه‌های شاخه در غیاب هورمون منجر شد. اکثر شاخساره‌های باززایی شده، مریستم‌های رآسی شاخساره و آغازهای^۳ برگ به هم چسبیده را نشان دادند. تشکیل جوانه‌های شاخساره ناخواسته تراریخته شده با *rolC* از ریزنمونه‌های مختلف روی محیط‌های حاوی هورمون به طور مستقیم از طریق القای کالوس در گیاهان تیلوفورای هندی (Dilshad *et al.*, 2006)، درمنه (Chaudhuri *et al.*, 2015a) (*Lactuca sativa* L.)، کاهو (*et al.*, 2016) (Ismail *et al.*, 2017) (*Citrus aurantifolia*) و لیموترش (*al.*, 2021) (Soheilvand *et al.*, 2021) (L.) گزارش شده است. گیاهان تراریخته شده‌ای که ژن *rolC* را از پروموتر درونی^۴ بیان میکنند نسبت به انواع گیاهان وحشی غالبیت رآسی، ارتفاع بوته، فاصله میانگره، تعداد گره و سطح برگ، افزایش انشعاب، تغییر مورفولوژی برگ، گل‌های کوچک، میوه‌های کوچک، تعداد میوه و بذر کمتری دارند (Bettini *et al.*, 2016a). با این حال، گیاه شاییزک تراریخته شده با *rolC* هنگامی که تحت پروموتر خود بیان شدند، هیچ تغییر مورفولوژیکی نشان ندادند و شبیه به گیاهان نوع وحشی بودند. هنگامی که *rolC* تحت پروموتر قوی ۳۵S CaMV بیان

۵ Abscisis acid

۶ Indole-3-acetic acid

۳ Primordia

۴ Endogenous

تراریخته شده با *rolC* فشرده و غیرآبکی بود. ژن *rolC* همچنین بر رشد و تجمع زیست‌توده کشت‌های کالوس تراریخته بسته به گونه‌های گیاهی مورد استفاده تأثیر می‌گذارد. هر دو وکتور خالی (وکتور فاقد ژن خارجی) و کشت کالوس تراریخته شده ماکیا آموری با *rolC* رشد فعالی را نشان دادند، اما مقدار زیست‌توده خشک در دومی دو برابر بیشتر از اولی بود (Grishchenko et al., 2016).

تأثیر ژن *rolD* بر ریخت‌زایی

تا به امروز، برخلاف سایر ژن‌های *rol*، ژن *rolD* به طور کامل بررسی نشده است، اگرچه به عنوان یک منبع ریشه، شناسایی شده است. با این حال، زمانی که ژن *rolD* در ساقه‌های تنباکو تحت کنترل نسخه بلند پرموتر معرفی شد، تشکیل ریشه در محیط بدون هورمون به دست آمد، اما در تولید ریشه ناخواسته، مورفولوژی ریشه و الگوی رشد آن بین *rolD* و گیاهان آلوده به mock (گیاهانی که به صورت کاذب تلقیح شده‌اند یا کنترل منفی) هیچ تفاوتی مشاهده نشد. گیاهان تراریخته شده با *rol* (ژن *rolD* تحت کنترل ۵۷۸ جفت باز از ناحیه بالا دست غیر کدکننده آن) در آراییدوپسیس (Falasca et al., 2010) (*Arabidopsis*) ایجاد شده‌اند. در گوجه‌فرنگی، گیاهان تراریخته شده حاوی ژن *rolD* در محیط‌های حاوی هورمون، پس از آلودگی تولید شدند. با این حال، گیاهان غیرتراریخته نیز زمانی که ریزنمونه‌ها در محیط غیرانتخابی کشت شدند، به دست آمدند (Bettini et al., 2016 a; b) و همکاران (2010) Falasca گیاهان آراییدوپسیس تراریخته و

غیرتراریخته با *rolD* مشتق شده از بذر را در محیط بدون هورمون ایجاد کرد.

تأثیر ژن *rolABC* بر ریخت‌زایی

در کیوی، ظهور برخی از ریشه‌ها از کالوس‌های القاشده از برگ با *rolABC* مشتق از *A. rhizogenes*، هنگام کشت در محیط القای کالوس حاوی اکسین مشاهده شد. از سوی دیگر، غلظت بالای اکسین در این محیط، مانع تشکیل ریشه از کالوس‌های شاهد شد که نشان می‌دهد ریخت‌زایی ریشه توسط ژن‌های *rol* در سلول‌های تراریخته هدایت می‌شود. در مقایسه با ریشه‌های غیرتراریخته، ریشه‌های تراریخته با *rolABC* می‌توانند به خوبی در محیط‌های بدون هورمون رشد کنند و فنوتیپ ریشه موین معمولی را که در ریشه‌های تراریخته شده با *A. rhizogenes* نوع وحشی مشاهده شد، نشان دادند (Soheilvand et al., 2021).

تأثیر ژن *rol* بر متابولیت‌های ثانویه در

گیاهان دارویی

مشخص شده است که ریشه‌های موین، گیاهان تراریخته شده با Ri و کشت‌های کالوس تراریخته شده با Ri، فعال شدن متابولیت‌های ثانویه را در بیش از ۱۰۰ گونه گیاه دارویی از نظر طبقه‌بندی متنوع نشان دادند (Bonhomme et al., 2000; Roychowdhury et al., 2015a, b; Aazami et al., 2020; Neycee et al., 2023). به عنوان مثال، اثر ژن *rolC* در شاییزک (Bonhomme et al., 2000)، سنبل‌الطیب (*Valeriana officinalis* L.) (Aazami et al., 2020) و تیلوفورای هندی (Roychowdhury et al., 2015a, b) بر القای ریشه موین و پایداری

وجود داشت. در کشت‌های تراریخته با *rolA* گیاه درمنه، آرتمیزینین و ترکیبات مشتق از آن، با گیاهان غیرتراریخته قابل مقایسه بودند (Amanullah *et al.*, 2016)؛ بنابراین، از یک طرف، *rolA* افزایش متابولیت‌های ثانویه را در گیاهان تراریخته تنباکو (Palazón *et al.*, 1997) و روناس هندی (Shkryl *et al.*, 2007) نشان داد و از طرف دیگر، سطوح تولید متابولیت‌های ثانویه را در مقایسه با گیاه درمنه (Amanullah *et al.*, 2016) غیرتراریخته حفظ کرد.

تأثیر ژن *rolB* بر تجمع متابولیت‌های

ثانویه گیاهان دارویی

ژن *rolB* یک تنظیم‌کننده اصلی در تجمع متابولیت‌های ثانویه در اکثر مطالعات بوده است (Bandyopadhyay *et al.*, 2007; Dilshad *et al.*, 2016; Grishchenko *et al.*, 2016; Soltaninejad *et al.*, 2024). وجود ژن *rolB* با افزایش محتوای متابولیت ثانویه در گیاهان تراریخته شده نسبت به گیاهان غیرتراریخته و گیاهان تراریخته با ژن‌های *rolA*، *rolC* و *rolABC* مرتبط است. کشت کالوس تراریخته روناس هندی در مقایسه با کشت کالوس غیرتراریخته، افزایش ۱۵ برابری را در سطوح آنتراکینون نشان داد. در این مطالعه، تحریک ژن Isochorismate synthase (ICS) با افزایش محتوای آنتراکینون، همبستگی مثبت داشت؛ زیرا ICS یک ژن کلیدی در گیر در بیوسنتز آنتراکینون‌ها است. خطوط کالوس تراریخته که سطوح پایین *rolB* را بیان می‌کنند، آنتراکینون بیشتری تولید می‌کنند، درحالی‌که گیاهان تراریخته که سطوح متوسط و بالاتر ژن *rolB* را بیان می‌کنند، به ترتیب ۲/۸ برابر و ۴/۳

خطوط ریشه تراریخته شده گزارش شده است. اولویت سیستم گیاه یا ریشه‌های موین یا کالوس‌های تراریخته شده با *Ri* برای تولید متابولیت‌های ثانویه، به دلیل سرعت رشد بالای آنها بود که به عنوان کارخانه‌های برای ادامه تولید مقادیر بالای ترکیبات مهم و پایداری در تجمع متابولیت‌ها در کشت طولانی مدت عمل میکند (Roychowdhury *et al.*, 2015a; b; Badr, 2017). بر تجمع متابولیت‌های ثانویه عوامل مختلفی تأثیر می‌گذارند که شامل ترکیب محیط و pH، تأثیر هورمون‌ها، سویه باکتریایی مورد استفاده برای تلقیح، دما، نور و تأثیر القاگرها است (Sivanandhan *et al.*, 2016; Neycee *et al.*, 2023).

تأثیر ژن *rolA* بر تجمع

متابولیت‌های ثانویه گیاهان دارویی

در مورد تأثیر ژن *rolA* بر تولید متابولیت ثانویه گزارش‌های بسیار کمی وجود دارد (Amanullah *et al.*, 2016; Aazami *et al.*, 2020; Soheilvand *et al.*, 2021). Palazón و همکاران (۱۹۹۷) اولین مطالعه را در مورد استفاده از *rolA* برای تحریک تولید نیکوتین در خطوط ریشه تراریخته تنباکو ارائه کردند. Shkryl و همکاران (۲۰۰۷) گیاه روناس هندی را با *A. tumefaciens* سویه GV3101 که دارای ساختار pPCV002-A است و توسط پروموتور بومی خود کنترل می‌شود، تراریخته کردند. در این مطالعه تأثیر ژن *rolA* بر تجمع آنتراکینون بررسی شد. در محتوای آنتراکینون‌ها در کالوس‌های تراریخته با *rolA* در مقایسه با نوع وحشی غیرتراریخته افزایش ۲/۸ برابری

برابر آنتراکینون تولید می کنند (Shkryl et al., 2007). (و همکاران 2016 Grishchenko). کشت کالوس تراریخته شده با *rolB* را از ماکیا آموری ایجاد کردند و بازده ایزوفلاونوئیدها در کالوس های تراریخته مطالعه شد. تجمع ایزوفلاونوئید در کالوس های تراریخته با *rolB* بین ۱/۴ تا ۲/۱ وزن خشک در مقایسه با ۱/۲۲ درصد وزن خشک در کنترل ناقل خالی بود. در گیاهان تراریخته درمنه کارو توسط ژن *rolB* افزایش در سطح فلاونوئید مشاهده شد (Dilshad et al., 2015a).

تأثیر ژن *rolC* بر تجمع متابولیت های

ثانویه گیاهان دارویی

چندین گزارش وجود دارد که نقش *rolC* را به عنوان تعدیل کننده تولید متابولیت ثانویه در میان گروه های مختلف گیاهان دارویی ارائه می دهد (Alpizar et al., 2008; Dilshad et al., 2015a, b, 2016; Ismail et al., 2016; Soltaninejad et al., 2024). میزان آرتمیزینین^۷ در گیاه تراریخته درمنه با *rolC* افزایش چهار تا ۴/۶ برابری را نشان داد (Dilshad et al., 2015b). در همین مطالعه، آرتسونات^۸ و دی هیدرو آرتمیزینین^۹ نیز به ترتیب تا ۹/۱ برابر و دو برابر افزایش یافت. تحقیقات مشابهی با گونه دیگری از درمنه انجام شد (Dilshad et al., 2015a) که در آن محتوای آرتمیزینین ثبت شده در گیاهان تراریخته تا شش برابر بیشتر از مقدار تعیین شده در گیاهان غیرتراریخته بود. افزایش محتوای آرتسونات، دی هیدرو

^۷ Artemisinin

^۸ Artesunate

^۹ Dihydroartemisinin

آرتمیزینین و آرتمتر^{۱۰} به ترتیب تا ۸/۹، ۳/۲ و پنج برابر اندازه گیری شد. Dilshad و همکاران (۲۰۱۶) در گیاهان تراریخته با *rolC* در گونه درمنه در مقایسه با شاهد غیرتراریخته افزایش دو برابری اسید کافئیک^{۱۱} را گزارش کردند. علاوه بر این، گیاهان تراریخته با *rolC* سطوح کوئرستین^{۱۲} (چهار برابر)، ایزو کوئرستین^{۱۳} (۱/۶ برابر) و روتین^{۱۴} (۱/۶ برابر) را نسبت به شاهد افزایش دادند. گیاهان تراریخته با *rolC* از کاهو افزایش محتوای فلاونوئید را در محدوده ۷/۵ تا ۸/۲ میکروگرم در میلی لیتر در مقایسه با شاهد (۵/۱ میکروگرم در میلی لیتر) نشان دادند (Ismail et al., 2016). Grischenko و همکاران (۲۰۱۳) کشت کالوس تراریخته شده *rolC* گیاه ماکیا آموری را در مقایسه با شاهد با بهره وری ایزوفلاونوئید بیشتر گزارش کرد. همچنین در کشت کالوس *rolC*، افزایش محتوای شش ایزوفلاونوئید به دست آمد و از طرف دیگر تولید جنیستین^{۱۵} نسبت به شاهد کاهش یافت. این تأثیر *rolC* بر تولید ایزوفلاونوئید به مدت چهار سال پایدار بود؛ بنابراین، ژن *rolC* هم اثر محرک (Dilshad et al., 2015a, b, 2016; Ismail et al., 2016; Neycee et al., 2023; Soltaninejad et al., 2024) و هم اثر مهارى بر سطوح تجمع متابولیت های ثانویه هدف نشان داد.

تأثیر هم افزایی ژن *rolABC* بر تجمع

^{۱۰} Artemether

^{۱۱} Caffeic acid

^{۱۲} Quercetin

^{۱۳} Isoquercetin

^{۱۴} Rutin

^{۱۵} Genistin

rolABC (al., 1998). با این حال، اثر تحریکی ژن *rolABC* بر روی روناس هندی تراریخته (Shkryl et al., 2007) نسبتاً ضعیفتر از تنباکو بود که از نظر افزایش برابری متابولیت‌های هدف، اندازه‌گیری شد.

نتیجه‌گیری

یافته‌ها نشان می‌دهند که از میان ژن‌های *rol* منفرد، *rolC* بیشترین توجه را در زمینه تجمع متابولیت‌های ثانویه به خود جلب کرده و فیل پروپانویدها رایج‌ترین گروه هدف بوده‌اند. *rolA* عمدتاً اثر تحریکی دارد، درحالی‌که *rolB* و *rolC* نقش‌های پویا و افتراقی در تنظیم متابولیت‌ها ایفا می‌کنند. همچنین ترکیب ژن‌های *rolABC* نسبت به هر یک از آن‌ها به تنهایی تأثیر بیشتری بر سنتز متابولیت‌های ثانویه دارد. با وجود بیش از سه دهه تحقیق، هنوز شکاف‌های قابل توجهی در شناخت عملکرد دقیق هر یک از ژن‌های *rol* منفرد وجود دارد. چشم‌انداز آینده شامل مهندسی متابولیک هدفمند با استفاده از ژن‌های *rol* (تکی یا ترکیبی) برای افزایش انتخابی متابولیت‌های ارزشمند دارویی، بهینه‌سازی پروفایل ژنی برای گونه‌های خاص، توسعه ریشه‌های موین پایدار با تولید بلند مدت بالا و مقیاس‌پذیری در بیوراکتورها برای تولید صنعتی است. در مجموع، پتانسیل بالای ژن‌های *rol* در مهندسی متابولیت‌های ثانویه هنوز به طور کامل بهره‌برداری نشده و نیازمند تحقیقات گسترده‌تری است.

متابولیت‌های ثانویه گیاهان دارویی

ژن‌های *rol* به‌طور جداگانه نشان داده‌اند که یک اثر خنثی یا تحریک‌کننده و همچنین منفی بر متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی درمنه کارو (Dilshad et al., 2015a; b)، درمنه دیا (Amanullah et al., 2016)، ماکیا آموری (Grishchenko et al., 2016)، گل آفتابگردان (Neycee et al., 2023) و جینسینگ هندی (*Withania somnifera*) دارند (Soltaninejad Palazon et al., 2024) و همکاران (۱۹۹۸) خطوط ریشه تراریخته *rolABC* با تنباکو را ایجاد کرد که در آن میانگین سطح نیکوتین افزایش شدید (۸۶ میلی‌گرم) در مقایسه با خطوط ریشه غیرتراریخته (۰/۸ میلی‌گرم) نشان داد. Shkryl و همکاران (۲۰۰۷) مطالعه‌ای را با کشت‌های کالوس تراریخته شده با *rolABC* از روناس هندی برای نظارت بر تأثیر تجمع آنتراکینون انجام دادند. محتوای کل آنتراکینون در کالوس‌های تراریخته شده با *rolABC* تقریباً دو برابر سطوح آنتراکینون ثبت شده در کالوس غیرتراریخته و ۱/۴ برابر سطوح آنتراکینون در کالوس‌های تراریخته نوع وحشی (A4) اندازه‌گیری شد. Bonhomme و همکاران (۲۰۰۰) در تجمع محتویات کل آلکالوئید در خطوط ریشه تراریخته با Ri و *roABC* تراریخته شایزک در مقایسه با ریشه‌های غیرتراریخته افزایش مشابهی گزارش کردند که نشان می‌دهد ژن‌های *rolABC* برای افزایش محتوای آلکالوئید تروپان در این گیاه کافی است. از این رو، *rolABC* بر افزایش بهره‌وری متابولیت ثانویه گیاهان تراریخته تنباکو تأثیر قابل توجهی نشان داد (Palazon et

References :

- Aazami, M. A., Ghafury, S., and Hassanpouraghdam, M. B. 2020. Effect of different strains of *Agrobacterium rhizogenes*, type and age of explant on hairy root production in *Valeriana officinalis* L. Crop Biotechnology, 10(1): 31-44. <https://doi.org/10.30473/cb.2020.54411.1816>.
- Alpizar, E., Dechamp, E., Lapeyre-Montes, F., Guilhaumon, C., Bertrand, B., Jourdan, C., and Etienne, H. 2008. *Agrobacterium rhizogenes* transformed roots of coffee (*Coffea arabica*): conditions for long-term proliferation, and morphological and molecular characterization. Annals of Botany, 101(7): 929-940. <https://doi.org/10.1093/aob/mcn027>.
- Amanullah, B. M., Rizvi, Z. F., and Zia, M. 2016. Production of artemisinin and its derivatives in hairy roots of *Artemisia dubia* induced by *rolA* gene transformation. Pakistan Journal of Botany, 48(2): 699-706. <http://142.54.178.187:9060/xmlui/handle/123456789/14886>.
- Aoki, T., Matsumoto, H., Asako, Y., Matsunaga, Y., and Shimomura, K. 1997. Variation of alkaloid productivity among several clones of hairy roots and regenerated plants of *Atropa belladonna* transformed with *Agrobacterium rhizogenes* 15834. Plant Cell Reports, 16: 282-286. <https://doi.org/10.1007/bf01088281>.
- Badr Hadad, A., Nazarian Firouzabadi, F., Ismaili, A., and Bagheri, H. 2017. Cloning and expression of an omiganan pentahydrochloride (MBI226) antimicrobial peptide in tobacco (*Nicotiana tabacum*) confers resist to bacterial pathogens. Crop Biotechnology, 7(1): 1-13. <https://dor.isc.ac/dor/20.1001.1.22520783.1396.7.19.1.2>.
- Bandyopadhyay, M., Jha, S., and Tepfer, D. 2007. Changes in morphological phenotypes and withanolide composition of Ritransformed roots of *Withania somnifera*. Plant Cell Reports, 26: 599-609. <https://doi.org/10.1007/s00299-006-0260-0>.
- Bettini, P. P., Marvasi, M., Fani, F., Lazzara, L., Cosi, E., Melani, L., and Mauro,

- M. L. 2016a. *Agrobacterium rhizogenes rolB* gene affects photosynthesis and chlorophyll content in transgenic tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants. Journal of plant Physiology, 204: 27-35. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2016.07.010>.
- Bettini, P. P., Santangelo, E., Baraldi, R., Rapparini, F., Mosconi, P., Crinò, P., and Mauro, M. L. 2016b. *Agrobacterium rhizogenes rolA* gene promotes tolerance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in transgenic tomato plants (*Solanum lycopersicum* L.). Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology, 25: 225-233. <https://doi.org/10.1007/s13562-015-0328-4>.
- Bonhomme, V., Laurain-Mattar, D., and Fliniaux, M. A. 2000. Effects of the *rolC* gene on hairy root: induction development and tropane alkaloid production by *Atropa belladonna*. Journal of natural Products, 63(9): 1249-1252. <https://doi.org/10.1021/np990614l>.
- Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., and Gontier, E. 2001. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. Plant Science, 161(5): 839-851. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(01\)00490-3](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(01)00490-3).
- Bulgakov, V. P., Tchernoded, G. K., Mischenko, N. P., Khodakovskaya, M. V., Glazunov, V. P., Radchenko, S. V., and Zhuravlev, Y. N. 2002. Effect of salicylic acid, methyl jasmonate, ethephon and cantharidin on anthraquinone production by *Rubia cordifolia* callus cultures transformed with the *rolB* and *rolC* genes. Journal of biotechnology, 97(3): 213-221. [https://doi.org/10.1016/s0168-1656\(02\)00067-6](https://doi.org/10.1016/s0168-1656(02)00067-6).
- Chaudhuri, K. N., Ghosh, B., Tepfer, D., and Jha, S. 2006. Spontaneous plant regeneration in transformed roots and calli from *Tylophora indica*: changes in morphological phenotype and tylophorine accumulation associated with transformation by *Agrobacterium rhizogenes*. Plant Cell Reports, 25: 1059-1066. <https://doi.org/10.1007/s00299-006-0164-z>.

- Dilshad, E., Cusido, R. M., Estrada, K. R., Bonfill, M., and Mirza, B. 2015a. Genetic transformation of *Artemisia carvifolia* Buch with *rol* genes enhances artemisinin accumulation. PLoS One, 10(10): e0140266. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140266>.
- Dilshad, E., Cusido, R. M., Palazon, J., Estrada, K. R., Bonfill, M., and Mirza, B. 2015b. Enhanced artemisinin yield by expression of *rol* genes in *Artemisia annua*. Malaria Journal, 14(1): 1-10. <https://doi.org/10.1186/s12936-015-0951-5>.
- Dilshad, E., Ismail, H., Haq, I. U., Cusido, R. M., Palazon, J., Ramirez-Estrada, K., and Mirza, B. 2016. *Rol* genes enhance the biosynthesis of antioxidants in *Artemisia carvifolia* Buch. BMC Plant Biology, 16: 1-9. <https://doi.org/10.1186/s12870-016-0811-7>.
- Falasca, G., Altamura, M. M., D'Angeli, S., Zaghi, D., Costantino, P., and Mauro, M. L. 2010. The *rolD* oncogene promotes axillary bud and adventitious root meristems in *Arabidopsis*. Plant Physiology and Biochemistry, 48(9): 797-804. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.06.002>.
- Ghorbanzadeh, Z., Kazemi Alamouti, M., Pourhang, L., Mousavi Pakzad, S. M., Moatamed, E., Mapar, M., Ebadi, A., Ghaffari, M. R., Hosseini Salekdeh, G., Ghareyazie, B., and Mohsenpour, M. 2022. Identification and investigation of DRO1 gene in rice cultivar Hashemi and its simultaneous transfer with OsCKX4 gene to improve root structure. Crop Biotechnology, 11(2): 49-62. <https://doi.org/10.30473/cb.2022.62378.1866>.
- Grishchenko, O. V., Kiselev, K. V., Tchernoded, G. K., Fedoreyev, S. A., Veselova, M. V., Bulgakov, V. P., and Zhuravlev, Y. N. 2016. *RolB* gene-induced production of isoflavonoids in transformed *Maackia amurensis* cells. Applied Microbiology and Biotechnology, 100: 7479-7489. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7483-y>.
- Ismail, H., Dilshad, E., Waheed, M. T., Sajid, M., Kayani, W. K., and 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. *Biotechnology*, 6: 1-11. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0533-4>.
- Lee, M. H., Yoon, E. S., Jeong, J. H., and Choi, Y. E. 2004. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of *Taraxacum platycarpum* and changes of morphological characters. *Plant Cell Reports*, 22: 822-827. <https://doi.org/10.1007/s00299-004-0763-5>.
- Majumdar, S., Garai, S., and Jha, S. 2011. Genetic transformation of *Bacopa monnieri* by wild type strains of *Agrobacterium rhizogenes* stimulates production of bacopa saponins in transformed calli and plants. *Plant Cell Reports*, 30: 941-954. <https://doi.org/10.1007/s00299-011-1035-9>.
- Neycee, M. A., Mohsenpour, M., and Rahnama, H. 2023. Investigating the increase of oleic acid in safflower plant by changes in Fatty Acid Desaturase-2 gene after using CRISPR-Cas9 method. *Crop Biotechnology*, 12(1): 69-83. <https://doi.org/10.30473/cb.2023.66349.1895>.
- Palazón, J., Cusidó, R. M., Roig, C., and Piñol, M. T. 1997. Effect of *rol* genes from *Agrobacterium rhizogenes* TL-DNA on nicotine production in tobacco root cultures. *Plant Physiology and Biochemistry*, 35(2): 155–162.
- Roychowdhury, D., Basu, A., and Jha, S. 2015a. Morphological and molecular variation in Ri-transformed root lines are stable in long term cultures of *Tylophora indica*. *Plant growth Regulation*, 75: 443-453. <https://doi.org/10.1007/s10725-014-0005-y>.
- Roychowdhury, D., Chaubey, B., and Jha, S. 2015b. The fate of integrated Ri T-DNA *rol* genes during regeneration via somatic embryogenesis in *Tylophora indica*. *Journal of Botany*, 2015. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/707831>.
- Sabzi Nojadeh, M., Aharizad, S., and Amani, M. 2024. Analyzing grain yield stability of bread wheat recombinant inbred lines. *Journal of Agricultural*

- Science and Sustainable Production, 34(3): 181-192. <https://doi.org/10.22034/saps.2023.55895.3014>.
- Sabzi-Nojadeh, M., Niedbała, G., Younessi-Hamzekhanlu, M., Aharizad, S., Esmailpour, M., Abdipour, M., and Niazian, M. 2021. Modeling the essential oil and trans-anethole yield of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill. var. *vulgare*) by application artificial neural network and multiple linear regression methods. *Agriculture*, 11(12): 1191.
- Sarkar, S., and Jha, S. 2017. Morpho-histological characterization and direct shoot organogenesis in two types of explants from *Bacopa monnieri* on unsupplemented basal medium. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 130(2): 435-441. <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1231-6>.
- Satheeshkumar, K., Jose, B., Soniya, E. V., and Seeni, S. 2009. Isolation of morphovariants through plant regeneration in *Agrobacterium rhizogenes* induced hairy root cultures of *Plumbago rosea* L. *Indian Journal of Biotechnology*, 8(4): 435-441.
- Sharifpour, R., Aazami, M. A., and Hassanpouraghdam, M. B. 2020. Optimization of hairy root production for *Stevia rebaudiana* Bertoni through inoculation by *Agrobacterium rhizogenes*. *Crop Biotechnology*, 9(4): 15-29. <https://doi.org/10.30473/cb.2020.53538.1809>.
- Shkryl, Y. N., Veremeichik, G. N., Bulgakov, V. P., Tchernoded, G. K., Mischenko, N. P., Fedoreyev, S. A., and Zhuravlev, Y. N. 2008. Individual and combined effects of the *rolA*, B, and C genes on anthraquinone production in *Rubia cordifolia* transformed calli. *Biotechnology and Bioengineering*, 100(1): 118-125. <https://doi.org/10.1002/bit.21727>.
- Sivanandhan, G., Selvaraj, N., Ganapathi, A., and Manickavasagam, M. 2016. Elicitation approaches for withanolide production in hairy root culture of *Withania somnifera* (L.) Dunal. *Biotechnology of Plant Secondary Metabolism: Methods and Protocols*, 1-18. [۸۶](https://doi.org/10.1007/978-1-</p></div><div data-bbox=)

4939-3393-8_1.

- Soheilvand, S., Mousavi, A., and Safarnejad, M. 2021. Assessment of factors affecting *Agrobacterium*-mediated transformation of *Citrus aurantifolia* L. to increase transformation efficiency and reduce chimeric transgenic shoots. *Crop Biotechnology*, 10(2): 37-53. <https://doi.org/10.30473/cb.2021.57688.1832>.
- Soltaninejad, N., Sadat-Noori, A., Izadi-Darbandi, A., Fadavi, A., Amini, F., and Mirjalili, M. H. 2024. Study of agronomic and phytochemical characteristics of transgenic Indian ginseng plant (*Withania somnifera*) by inplanta transformation method. *Modern Genetics Journal*, 19(2): 6-15. <http://mg.genetics.ir/article-1-1835-en.html>.
- Thwe, A., Valan Arasu, M., Li, X., Park, C. H., Kim, S. J., Al-Dhabi, N. A., and Park, S. U. 2016. Effect of different *Agrobacterium rhizogenes* strains on hairy root induction and phenylpropanoid biosynthesis in tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn). *Frontiers in Microbiology*, 7: 318. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00318>.
- Trulson, A. J., Simpson, R. B., and Shahin, E. A. 1986. Transformation of cucumber (*Cucumis sativus* L.) plants with *Agrobacterium rhizogenes*. *Theoretical and Applied Genetics*, 73: 11–15.
- Vatankhah, A., Reezi, S., Izadi, Z., Motamedi, A., and Ghasemi Varnamkhasti, M. 2022. Detection of tms2 gene causing crown gall in two commercially cut flower Roses (“Pearl” And “Angelina”) by a Nano Biosensor. *Journal of Crops Improvement*, 24(3): 995-1005. <https://doi.org/10.22059/jci.2022.327046.2580>.
- Yang, D. C., and Choi, Y. E. 2000. Production of transgenic plants via *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation of *Panax ginseng*. *Plant Cell Reports*, 19: 491–496. <https://doi.org/10.1007/s002990050761>.

Enhancing pharmaceutical compounds in plants through genetic transformation using *Agrobacterium rhizogen*

Mina Amani^{1*}, Mohammad-Reza Jalali², Mohsen Sabzi-Nojadeh³

1. Ph.D. Student, Department of Horticultural Science and Engineering, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran. (Corresponding author)
2. Master's Graduate, Department of Horticultural Science and Engineering, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran.
3. Associate Professor, Department of Natural Sciences and Forestry, Faculty of Agriculture and Natural Resources of Ahar, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

Received: March 2026 Accepted: June 2026 - DOI: 10.22092/mpt.2026.372468.1219

Abstract

Amani, M., Jalali, M. R., Sabzi Nojaadeh, M., Enhancing pharmaceutical compounds in plants through genetic transformation using *Agrobacterium rhizogen*
Iranian Medicinal Plants Technology, Vol 7, No. 2, 2025 11-12: 71-58 (in Persian)

Abstract

Hairy root induction by *Agrobacterium rhizogenes* and regeneration of modified plants from Ri-transformed roots have been reported in a wide range of plant species. Ri-transformed cultures (roots and calli) have been shown to exhibit altered characteristics compared with non-transformed cultures. Four *rol* genes (*rolA*, *rolB*, *rolC*, and *rolD*) within the T-DNA region of the Ri plasmid are known to be responsible for this phenomenon. In addition, the effects of *A. rhizogenes* on the production of secondary metabolites have been well studied in many medicinal plant species. Based on such studies, numerous papers have been published over time examining the “*rol* effect” on secondary metabolite accumulation in medicinal plants and discussing progress in this research area. However, investigations on the effects of individual *rol* genes are relatively limited and require further study. Therefore, this review discusses in detail the effects of each of the four *rol* genes, individually or in combination, on in vitro morphogenesis and secondary

Email address of the corresponding author: Minaamani@phd.tabrizu.ac.ir

metabolite accumulation in medicinal plants. A systematic search was conducted in PubMed, Scopus, Web of Science, Google Scholar, and ScienceDirect databases using the keywords “*Agrobacterium rhizogenes*”, “Hairy root culture”, “*rol* genes (*rolA*, *rolB*, *rolC*, *rolD*)”, “Secondary metabolites”, and “Medicinal plants.” The search timeframe was set from 1986 to 2024. Inclusion criteria comprised original articles related to transformation induced by *A. rhizogenes*, *rol* genes, hairy root culture, and their roles in the production of secondary metabolites in medicinal plants. Studies unrelated to the topic, duplicate articles, and reports that did not provide sufficient data on the type of genes involved, morphogenetic responses, or metabolic changes were excluded from the analysis.

Keywords: *Agrobacterium rhizogenes*, Genes, Medicinal plants, Secondary metabolites.