

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشکده کشاورزی

گروه زراعت

عنوان پایان نامه ارشد

بررسی القاء ریشه‌های مویین در گیاه دارویی سرخارگل از طریق انتقال ژن با آگروباکتریوم  
رایزوزنز

مریم نوری

استاد راهنما

دکتر شاهرخ قرنجیک

اساتید مشاور

دکتر اکبر صفی پور افشار

مهندس مهدی رحیمی

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی

بهمن ۱۳۹۳



دانشگاه شاهرود

دانشکده: مهندسی کشاورزی  
گروه: زراعت

پایان نامه کارشناسی ارشد خانم مریم نوری به شماره دانشجویی ۹۱۰۷۷۶۴

تحت عنوان:

بررسی القاه ریشه‌های موئین در گیاه دارویی سرخارگل از طریق انتقال ژن با آگروباکتریوم رایزوزنز

در تاریخ ۹۳/۱۱/۲۸ توسط کمیته تخصصی زیر جهت اخذ مدرک کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی مورد ارزیابی و با درجه عالی مورد پذیرش قرار گرفت.

امضاء	اساتید مشاور	امضاء	اساتید راهنما
	نام و نام خانوادگی: اکبر محبی پور افشار		نام و نام خانوادگی: شایرخ قرنجیک
	نام و نام خانوادگی: مهدی رحیمی		نام و نام خانوادگی:

امضاء	نماینده تحصیلات تکمیلی	امضاء	اساتید داور
	نام و نام خانوادگی: مهدیه پارسائیان		ناصر فرخی
			مهدی رضایی

تقدیم بہ

روح پاک پدرم کہ عالمانہ بہ من آموخت تا چگونه در عرصہ زندگی، ایستادگی را تجربہ نمایم

و

بہ مادرم دریای بی کران فداکاری و عشق کہ وجودم برایش ہمہ رنج بود و وجودش برایم ہمہ مہر

## قدردانی و تشکر

شکرشایان نثار ایزدمنان که توفیق را رفیق را هم ساخت تا این پایان نامه را به پایان برسانم. به مصداق «من لم یشکر المخلوق لم یشکر الخالق» بسی شایسته است از اساتید فریخته و فرزانه جناب آقای دکتر شامخ قریحیک و جناب آقای دکتر اکبر صفی پور افتخار که با کرامتی چون خورشید سرزمین دل را روشنی بخشیدند و گلشن سرای علم و دانش را با بارانهای های کارساز و سازنده بارور ساختند؛ تقدیر و تشکر نمایم. هم چنین از اساتید محترم آقایان دکتر ناصر فرخی، مهندس مهدی رحیمی، دکتر مهدی رضایی و سرکار خانم مهدیه پاریسایان کمال تشکر و قدردانی را ابراز می دارم. و سپاس بیکران بر مهدی و بهرامی دوستان عزیزم خانم هاسیده صدیقه قریشی، مریم سینی، افسانه ابولی، مریم قلندی و اکرم ترابی که همواره همراه و بهکام من بودند.

از مادر دلوز و همسر مهربانم و خواهران و برادران عزیزم که آرامش روحی و آسایش فکری را فراهم نمودند تا با حمایت های همه جانبه در محیطی مطلوب، مراتب تحصیلی و نیز پایان نامه درسی را به نحو احسن به اتمام برسانم، سپاسگزارم.

«خدایا توفیق خدمتی سرشار از شور و نشاط و همراه و همبوعلم و دانش و پژوهش جهت رشد و شکوفایی ایران کنشال عنایت بفرما»

مریم نوری

بهمن ۹۳

## تعهد نامه

اینجانب مریم نوری دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته مهندسی کشاورزی گرایش بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود نویسنده پایان نامه بررسی القاء ریشه‌های مویین در گیاه دارویی سرخارگل از طریق انتقال ژن با آگروباکتریوم رایزوزنز تحت راهنمایی دکتر شاهرخ قرنجیک متعهد می‌شوم .

- تحقیقات در این پایان نامه توسط اینجانب انجام شده است و از صحت و اصالت برخوردار است .
- در استفاده از نتایج پژوهشهای محققان دیگر به مرجع مورد استفاده استناد شده است .
- مطالب مندرج در پایان نامه تاکنون توسط خود یا فرد دیگری برای دریافت هیچ نوع مدرک یا امتیازی در هیچ جا ارائه نشده است .
- کلیه حقوق معنوی این اثر متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می باشد و مقالات مستخرج با نام « دانشگاه صنعتی شاهرود » و یا « Shahrood University of Technology » به چاپ خواهد رسید .
- حقوق معنوی تمام افرادی که در به دست آمدن نتایج اصلی پایان نامه تأثیرگذار بوده اند در مقالات مستخرج از پایان نامه رعایت می گردد.
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه ، در مواردی که از موجود زنده ( یا بافتهای آنها ) استفاده شده است ضوابط و اصول اخلاقی رعایت شده است .
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه، در مواردی که به حوزه اطلاعات شخصی افراد دسترسی یافته یا استفاده شده است اصل رازداری ، ضوابط و اصول اخلاق انسانی رعایت شده است .

تاریخ: ۱۳۹۰/۰۳/۰۳  
امضای دانشجو

### مالکیت نتایج و حق نشر

- کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج ، کتاب ، برنامه های رایانه ای ، نرم افزار ها و تجهیزات ساخته شده است ) متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می باشد . این مطلب باید به نحو مقتضی در تولیدات علمی مربوطه ذکر شود .
- استفاده از اطلاعات و نتایج موجود در پایان نامه بدون ذکر مرجع مجاز نمی باشد.

\* متن این صفحه نیز باید در ابتدای نسخه های تکثیر شده پایان نامه وجود داشته باشد .

## چکیده

سرخارگل (*Echinacea purpurea*) از جمله گیاهان دارویی مورد استفاده در صنایع داروسازی و تقویت کننده سیستم دفاعی بدن می‌باشد. تولید ریشه‌ی موئین از طریق انتقال T-DNA پلاسمید Ri از باکتری *Agrobacterium rhizogenes* به سلول‌های گیاهی انجام می‌شود. امروزه به طور وسیع از این باکتری جهت انجام عمل تراریختی و ایجاد ریشه تراریخت استفاده می‌گردد. با توجه به اهمیت دارویی در گیاه سرخارگل ایجاد سیستم کشت ریشه‌های موئین ضرورت پیدا می‌کند. در این تحقیق تاثیر سویه‌های مختلف آگروباکتریوم رایزوزنز شامل A13، A4، 15834 و AR15834 حاوی وکتور دوگانه pBI121 بر درصد تشکیل ریشه‌های موئین در دو ریزنمونه برگ و هیپوکوتیل و نیز میزان بیوسنتز ترکیبات فنلی کل و محتوای پلی- ساکاریدی ریشه‌های موئین حاصل تراریختی با باکتری فوق در مقایسه با ریشه‌های غیر تراریخت (شاهد) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که درصد القای ریشه موئین در برگ‌های گیاه سرخارگل در اثر تلقیح با سویه‌های A13، 15834، A4 و AR15834- PBI121 به ترتیب ۶۰٪، ۴۰٪، صفر و ۵۵٪ در ریزنمونه- های هیپوکوتیل به ترتیب ۸۵٪، ۴۵٪، ۷۰٪، ۷۵٪ است که از نظر آماری اختلاف معنی‌داری بین انواع سویه باکتری و نوع ریزنمونه وجود داشت. تراریختی ریشه‌های موئین تولید شده به وسیله آزمون PCR و هم‌چنین آزمون هیستوشیمیایی GUS مورد تایید قرار گرفتند. نتایج حاصل از آزمون PCR صحت تکثیر قطعات ۷۸۰ bp برای ژن *rolB* و ۳۲۰ bp برای ژن *GUS* را در ریشه‌های تراریخت نشان داد. نتایج نشان‌دهنده افزایش معنی دار ترکیبات فنلی کل در ریشه‌های موئین حاصل از سویه‌های مورد بررسی بود. هم‌چنین محتوای پلی ساکاریدی ریشه‌های موئین در اثر القاء توسط سویه‌های 15834، A13 افزایش و در اثر القاء توسط سویه A4 نسبت به نمونه شاهد کاهش داشت. در بخش دیگر این تحقیق امکان باززایی گیاه از کالوس‌های ایجاد شده در ریشه‌های موئین مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان دادند که در محیط MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر BAP بعد از گذشت ۳ هفته کالوس‌ها تشکیل شدند، قطعاتی از این کالوس‌ها به محیط MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP جهت باززایی گیاه منتقل و بعد از گذشت ۱۰ روز باززایی

نوساقه‌ها صورت گرفت. انتقال T-DNA پلاسمید Ri و ورود ژن *GUS* به داخل ژنوم گیاه تراریخته با استفاده از آزمون PCR با پرایمرهای اختصاصی برای ژن *GUS* و همچنین آزمون هیستوشیمیایی *GUS* تایید شد.

کلمات کلیدی: ریشه‌موئین، آگروباکتریوم رایزوزنز، سرخارگل، ترکیبات فنلی، باززایی.



## لیست مقالات مستخرج از پایان نامه

- ۱- القاء ریشه‌های موئین در گیاه داروئی سرخاگل از طریق انتقال ژن با آگروباکتریوم رایزوزنز، اولین کنگره بین المللی و سیزدهمین کنگره ملی ژنتیک ایران. مریم نوری، شاهرخ قرنجیک، اکبر صفی‌پور افشار، مهدی رحیمی. ۳ الی ۵ خرداد ماه ۱۳۹۳. دانشگاه شهید بهشتی تهران.
- ۲- القاء ریشه موئین توسط آگروباکتریوم رایزوزنز توسط سویه pRi15834-GUS در گیاه داروئی سرخارگل (*Echinacea purpurea*)، دومین همایش ملی گیاهان داروئی و کشاورزی پایدار، مریم نوری، شاهرخ قرنجیک، اکبر صفی‌پور افشار، مهدی رحیمی. ۱ شهریور ۱۳۹۳. دانشگاه شهید مفتح همدان.

## فهرست مطالب

صفحه	عنوان
	<b>فصل اول: کلیات</b>
۱	۱-۱- گیاهان دارویی، اهمیت و کاربرد
۳	۱-۱-۱- روش‌های تامین مواد موثره دارویی
۴	۲-۱- گیاهشناسی سرخارگل
۶	۳-۱- اهمیت گیاه سرخارگل
۷	۴-۱- ترکیبات شیمیایی مهم موجود در سرخارگل
۸	۵-۱- متابولیت‌های ثانویه گیاهی
۹	۶-۱- ترکیبات فنلی
۹	۷-۱- پلی‌ساکاریدها
۱۰	۸-۱- انتقال ژن به سلول‌های گیاهی
۱۱	۱-۸-۱- بیوسنتز اوپین‌ها
۱۱	۲-۸-۱- طبقه‌بندی آگروباکتریوم
۱۳	۳-۸-۱- دامنه میزبانی آگروباکتریوم
۱۴	۴-۸-۱- دساختار مولکولی پلاسمیدهای Ri و Ti
۱۵	۵-۸-۱- ژن‌های تومورزا و ژن‌های ریشه‌زا
۱۶	۶-۸-۱- وقایع مولکولی دخیل در انتقال TDNA
۱۶	۱-۶-۸-۱- تجمع باکتری یا اتصال آگروباکتریوم به سلول‌های گیاهی
۱۷	۲-۶-۸-۱- القای سیستم بیماری‌زایی باکتری
۱۸	۳-۶-۸-۱- تولید کمپلکس انتقال TDNA و انتقال آن

۲۰	۱-۸-۶-۴- تلفیق TDNA در ژنوم گیاهی
۲۱	۱-۸-۷- روش‌های تایید تراریختی
۲۳	۱-۸-۷-۱- استفاده از ژن‌های نشانگر گزینشگر
۲۳	۱-۸-۷-۲- استفاده از ژن‌های گزارشگر
۲۴	۱-۸-۸- بتاگلوکورونیداز (GUS( $\beta$ - Glucoronidase)
۲۵	۱-۹- نحوه القاء ریشه‌های موئین، اهمیت و کاربردها
۲۶	۱-۹-۱- تولید متابولیت‌های ثانویه
۲۷	۱-۹-۲- کاربرد مهندسی متابولیت
۲۸	۱-۹-۳- باززایی گیاه کامل از ریشه‌های موئین
۳۰	۱-۹-۴- کاربرد در دست ورزی ژنتیکی
۳۰	۱-۹-۵- کاربرد در پالایش زیستی

## فصل دوم: مرور منابع

۳۴	۲-۱- انتقال ژن و ریشه‌های موئین گیاه داروئی سرخارگل
۳۶	۲-۲- سابقه‌ی پژوهشی تولید ریشه‌های موئین در سایر گیاهان

## فصل سوم: مواد و روش‌ها

۴۲	۳-۱- مواد آزمایشی
۴۲	۳-۱-۱- میکروارگانیزم‌ها
۴۲	۳-۲- دستگاه‌های آزمایشگاهی
۴۳	۳-۳- محیط کشت (MS ( Murashige and Skoog)
۴۳	۳-۴- کشت بذر و تهیه ریزنمونه
۴۵	۳-۵- تکثیر باکتری
۴۶	۳-۶- نگهداری باکتری‌ها در گلیسرول

۴۶	۷-۳- کشت آگروباکتریوم رایزوژنز
۴۷	۸-۳- تراریختی ریزنمونه‌های برگ و هیپوکوتیل
۴۷	۹-۳- استخراج DNA ژنومی
۴۹	۱۰-۳- بررسی کمی و کیفی DNA استخراج شده
۴۹	۱-۱۰-۳- روش اسپکتروفتومتر
۵۰	۲-۱۰-۳- الکتروفورز ژل آگاروز
۵۰	۱۱-۳- تخلیص پلاسمید
۵۱	۱۲-۳- آنالیز گیاهان تراریخت
۵۱	۱-۱۲-۳- طراحی آغازگر
۵۲	۲-۱۲-۳- تکثیر DNA با روش (PCR ( Polymerase chain reaction
۵۲	۱۳-۳- باززایی گیاه از ریشه‌های موئین
۵۴	۱۴-۳- سنجش بیوشیمیایی <i>GUS</i> در ریشه‌های تراریخته
۵۵	۱۵-۳- اندازه‌گیری ترکیبات ثانویه
۵۵	۱-۱۵-۳- عصاره‌گیری جهت استخراج ترکیبات فنلی
۵۵	۲-۱۵-۳- اندازه‌گیری میزان ترکیبات فنلی
۵۶	۳-۱۵-۳- تهیه منحنی استاندارد گالیکاسید با معرف فولین سیوکالتو
۵۶	۴-۱۵-۳- اندازه‌گیری ترکیبات پلی‌ساکاریدی
۵۶	۱-۴-۱۵-۳- روش فنل اسید سولفوریک
۵۷	۵-۱۵-۳- تهیه منحنی استاندارد گلوکز
۵۸	۱۶-۳- تجزیه آماری داده‌ها
	<b>فصل چهارم: نتایج و بحث</b>
۶۰	۱-۴- کشت بذر و تهیه ریزنمونه
۶۰	۲-۴- تراریختی ریزنمونه‌های برگ و هیپوکوتیل توسط سویه‌های A13, 15834, A4, 11325

۶۴	۳-۴- تاثیر انواع سویه باکتری و ریزنمونه در میزان القاء ریشه موئین
۶۷	۴-۴- تاثیر سن ریزنمونه در القاء ریشه‌های موئین
۶۹	۵-۴- تراریختی ریشه‌های موئین با واکنش PCR با پرایمرهای ژن <i>rolB</i>
۷۰	۶-۴- تراریختی ریزنمونه‌های هیپوکوتیل و برگ توسط سویه AR15834 حاوی وکتور دوگانه pBI121
۷۰	۷-۴- تأیید تراریختی ریشه‌های موئین حاصل از تلقیح سویه AR15834- pBI121 از طریق واکنش PCR
۷۳	۸-۴- آزمون هیستوشیمیایی GUS
۷۵	۹-۴- القاء کالوس و باززایی ریشه‌های موئین
۷۹	۱۰-۴- اندازه‌گیری متابولیت‌های ثانویه
۸۵	۱۱-۴- نتیجه گیری کلی
۸۶	۱۲-۴- پیشنهادات
۸۹	منابع

## فهرست شکل‌ها

صفحه	شکل
۵	شکل ۱-۱- گیاه دارویی سرخارگل
۲۲	شکل ۲-۱- شمایی از نحوه انتقال ژن بوسیله‌ی آگروباکتریوم رایزوزنز به ژنوم سلول گیاهی
۶۱	شکل ۱-۴- مراحل مختلف رشد گیاهچه جهت تهیه ریزنمونه
۶۳	شکل ۲-۴- تشکیل ریشه‌های موئین سه هفته بعد از تلقیح
۶۵	شکل ۳-۴- مقایسه میانگین اثر متقابل سویه باکتری و تنوع ریزنمونه بر تشکیل ریشه موئین
۶۸	شکل ۴-۴- مقایسه میانگین اثر متقابل سویه باکتری و سن ریزنمونه بر تشکیل ریشه موئین
۶۹	شکل ۴-۵- تکثیر قطعه‌ی DNA مورد انتظار (۷۸۰) در واکنش‌های PCR با آغاز گرهای اختصاصی

ژن *rolB* بر روی DNA ریشه‌های موئین سرخارگل

- شکل ۴-۶- ریشه‌های موئین تولید شده در ریزنمونه‌های برگ و هیپوکوتیل گیاه سرخارگل ، ۳ هفته بعد از تلقیح با سویه‌ی AR15834- pBI121
- شکل ۴-۷- کثیر قطعه DNAی مورد انتظار (320bp) در واکنش‌های PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن *GUS* آگروباکتریوم رایزوزنز بر روی DNA ریشه‌های موئین سرخارگل
- شکل ۴-۸- تصویر استریومیکروسکپی ریشه‌های موئین ۵-۴ هفته پس از تولید روی قطعات برگ و هیپوکوتیل پس از تیمار با سوپسترای *X-Gluc*
- شکل ۴-۹- مراحل کالوس‌زایی و باززایی گیاه سرخارگل از ریشه‌های موئین
- شکل ۴-۱۰- تکثیر قطعه DNAی مورد انتظار (320 bp) در واکنش‌های PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن *GUS* آگروباکتریوم رایزوزنز بر روی DNA گیاه تراریخت سرخارگل
- شکل ۴-۱۱- رنگ‌آمیزی برگ‌های گیاه تراریخت برای حضور محصول ژن *GUS*.
- شکل ۴-۱۲- نمودار منحنی استاندارد گالیک‌اسید به روش فولین- سیوکالتو.
- شکل ۴-۱۳- مقایسه میانگین اثر سویه‌های آگروباکتریوم رایزوزنز بر میزان ترکیبات فنلی کل ریشه- های موئین گیاه سرخارگل .
- شکل ۴-۱۴- نمودار منحنی استاندارد گلوکز به روش فنل- اسیدسولفوریک.
- شکل ۴-۱۵- مقایسه میانگین اثر سویه‌های آگروباکتریوم رایزوزنز بر محتوای پلی‌ساکاریدی ریشه‌های موئین تولیدی در گیاه سرخارگل

## فهرت جدول؛

صفحه

جدول

۱۲

۱-۱- طبقه‌بندی پلاسمیدهای Ri و Ti بر اساس نوع اوپین

۴۴

۱-۳- تهیه محلول‌های پایه موراشیک و اسکوگ

- ۵۳ ۲-۳- مشخصات آغازگرهای مورد استفاده جهت تکثیر ژنهای *GUS* و *rolB*
- ۵۴ ۳-۳- تهیه محلول رنگ آمیزی *GUS*
- ۸۰ ۱-۴- مواد و محلولهای مورد نیاز جهت رسم منحنی استاندارد گالیک اسید
- ۱۰۲ پیوست ۱- میانگین مربعات درصد القاء ریشه موئین تحت تاثیر سطوح مختلف آگروباکتریوم رایزوتنز و نوع ریزنمونه گیاهی
- ۱۰۲ پیوست ۲- مقایسه میانگین اثرات ساده درصد القاء ریشه موئین تحت تاثیر سطوح مختلف سویه‌های آگروباکتریوم رایزوتنز و ریزنمونه گیاه سرخارگل.
- ۱۰۳ پیوست ۳- میانگین مربعات درصد القاء ریشه موئین تحت تاثیر سطوح مختلف آگروباکتریوم رایزوتنز و سن ریزنمونه گیاهی
- ۱۰۳ پیوست ۴- مقایسه میانگین اثرات ساده درصد القاء ریشه موئین تحت تاثیر سطوح مختلف آگروباکتریوم رایزوتنز و سن ریزنمونه گیاهی
- ۱۰۳ پیوست ۵- میانگین مربعات محتوای پلیساکارییدی و میزان ترکیبات فنلی تحت تاثیر سطوح مختلف سویه‌های آگروباکتریوم رایزوتنز
- ۱۰۴ پیوست ۶- اجزای سازنده بافر (TAE(10X)
- ۱۰۴ پیوست ۷- ترکیبات موجود در 6X Loading dye
- ۱۰۵ پیوست ۸- ترکیبات موجود در DNA سایز مارکر

# فصل اول

## کلیات



## ۱-۱- گیاهان دارویی، اهمیت و کاربرد

گیاهان دارویی گیاهانی هستند که مواد موثره موجود در آنها به صورت مستقیم یا غیر مستقیم اثر درمانی دارند و به عنوان دارو مورد استفاده قرار می‌گیرند. امروزه به دلیل پیشرفت زیاد دانش بشر در مورد فرآیند-های متابولیسمی تولید مواد موثره در گیاهان و تاثیر مواد موثره گیاهی بر انسان و حیوانات، معیارها در گستره‌ی گیاهان دارویی دچار تغییر شده است. بطور کلی سه معیار مهم برای تعریف گیاهان دارویی وجود دارد. یک گیاه دارویی گیاهی است که از صفات زیر برخوردار باشد، مواد موثره با ارزش دارویی در آن تولید شود. هرچند تولید این مواد موثره فقط محدود به اندام‌های خاصی از گیاه نظیر ریشه، برگ، گل و ... باشد. استفاده از مواد موثره آن، مستلزم فرآیند فرآوری باشد. به عبارت دیگر، این گیاهان را نمی‌توان به صورت تازه مورد مصرف قرار داد و در موارد معدود و خاص قابل استفاده باشند و از کاربرد روزمره در جیره غذایی افراد برخوردار نباشد. بر این اساس، در سطوح زراعی نسبتاً محدودی کشت گردد (امید بیگی، ۱۳۹۰).

علی‌رغم پیشرفت‌های زیاد در زمینه سنتز مصنوعی مواد موثره گیاهی، هنوز هم استخراج از منابع گیاهی، تنها راه دستیابی به بسیاری از مواد دارویی ارزشمند است. این دسته از مواد یا به طور کلی ساختمان شیمیایی ناشناخته‌ای دارند و یا مانند آکالوئیدهای تروپانی به دلیل برخورداری از ساختمان شیمیایی بسیار پیچیده، تهیه آنها بطور مصنوعی در صنایع داروسازی مشکل و مستلزم هزینه بسیار گران است. همچنین برخی از مواد موثره گیاهی نظیر سولانین‌ها به صورت مستقیم قابل استفاده نیستند، ولی اگر در صنایع دارویی، تحت فرآوری قرار گیرند و به صورت یک فرمولاسیون نیمه طبیعی نیمه سنتزی درآیند، تبدیل به مواد فعال قابل استفاده خواهند شد. مواد دارویی حاصل از گیاهان، اگرچه که تاثیر درمانی تدریجی دارند، اما عواض جانبی آنها نسبت به داروهای سنتزی بر بدن انسان کمتر است. مواد موثره طبیعی، بعضاً با ترکیباتی همراه می‌باشند که از اثرات جانبی بسیار مفیدی برخوردارند. که این‌ها را می‌توان دلایل استفاده روز افزون مردم از گیاهان دارویی و همچنین تمایل شرکت‌های تولید کننده مواد دارویی به داروهای دارای منشا گیاهی دانست. دلایل فوق سبب شده است که گیاهان دارویی پس از مدتی رکود ناشی از ظهور داروهای

سنتزی، دومرتبه در سال‌های اخیر مورد توجه خاص قرار گیرند. به طوریکه در تمام کشورهای توسعه یافته، مراکز خاص گیاهان دارویی وجود دارد که این مراکز تحقیقاتی هر روزه مواد موثره متعددی را در گیاهان شناسایی و معرفی می‌نمایند (امید بیگی، ۱۳۹۰).

### ۱-۱-۱- روش های تامین مواد موثره دارویی

انسان هنوز برای تامین اکثر مواد گیاهی، به استخراج این مواد از بافت‌های گیاهان مولد می‌پردازد. که این گیاهان قبلاً تحت فرآوری پس از برداشت قرار گرفته اند. اما وجود مشکلات عدیده‌ای که در این فرآیند تولید وجود دارد، انسان را به فکر ایجاد روش‌های جایگزین برای تامین این مواد، وادار کرده است. دو روش جایگزین برای این منظور سنتز مصنوعی مواد موثره مشابه در آزمایشگاه و تولید در شرایط درون شیشه‌ای<sup>۱</sup> هستند. در روش سنتز مصنوعی مواد موثره مشابه در آزمایشگاه، مواد موثره دارویی مشابه انواع طبیعی، در شرایط آزمایشگاه سنتز می‌شوند اما مشکلات و تنگناهای بسیار زیاد آن موجب گردیده که اگرچه این روش با موفقیت زیادی همراه بوده است اما نتواند به عنوان جایگزینی مطمئن مطرح شود. در تکنولوژی، تولید در شرایط درون‌شیشه‌ای از کشت سلول‌ها، بافت‌ها و اندام‌های گیاهان مولد، برای تولید مواد موثره گیاهی در شرایط درون‌شیشه‌ای استفاده می‌گردد. عدم نیاز به مصرف مواد شیمیایی کشاورزی، عدم نیاز به منابع و نهاده‌های کشاورزی، عدم تاثیر تغییرات محیطی بر فرآیند تولید، حجم کم فرآیند تولید و خلوص و ثبات پایدار فرآورده، از مزیت‌های روش تولید مواد موثره گیاهی در شرایط درون‌شیشه‌ای می‌باشد که این تکنولوژی را به عنوان روشی امیدبخش برای تولید مواد مذکور مطرح ساخته است و توجه محققین زیادی را در سراسر دنیا به آن معطوف داشته است. از آنجا که سلول‌های گیاهی می‌توانند مانند میکروارگانیسم‌ها در سیستم‌های مختلف فرمانتور، کشت و پرورش یابند، کمپانی‌های متعددی در سراسر دنیا به تحقیق در زمینه استفاده از این تکنولوژی برای تولید مواد موثره گیاهی در بعد تجاری مشغول هستند. چنانچه در حال حاضر، دو شرکت ژاپنی، رنگدانه گیاه شیکونین و بیوماس سلولی جینسنگ را در بعد تجاری به ترتیب از کشت

---

<sup>۱</sup>. In vitro

سلول‌های گیاه *Lithospermum erythrorhizon* و *Panax ginseng* تولید می‌نمایند. بسیاری از داروهای ضد سرطان مهم نیز، نزدیک به ورود به عرصه تجاری می‌باشند. اگر چه که نتایج امیدبخش زیادی از تحقیقات در زمینه تولید مواد موثره گیاهی در شرایط درون‌شیشه‌ای بدست آمده است، اما نیل به هدف نهایی، یعنی تولید تجاری، در بسیاری از موارد هنوز حادث نگردیده است و موانعی وجود دارد که قبل از ورود به مرحله تجاری بایستی مرتفع گردند.

گیاه دارویی سرخارگل از جمله گیاهانی است که از مواد موثره ارزشمند فراوانی مانند اسانس، آلکیل‌آمیدها و مشتقات کافئیک اسید برخوردار می‌باشد. دستیابی به این مواد موثره در گیاه سرخارگل به دلیل دوره کشت طولانی در طبیعت و هزینه‌های فراوان مستلزم استفاده از روش‌های آزمایشگاهی، تولید در شرایط درون-شیشه‌ای می‌باشد.

#### ۱-۲- گیاهشناسی سرخارگل (*Echinacea purpurea*)

گونه‌های اکیناسه متعلق به تیره گل ستاره (Asteraceae) با ده گونه است که سه گونه مهم آن یعنی *Echinacea purpurea* و *E. angustifolia* و *E. pallida* به‌طور معمول به عنوان گیاه دارویی استفاده می‌شوند. سرخارگل (*E. purpurea*) گیاهی علفی و چند ساله از شمال آمریکا است. سرخارگل در شمال رودخانه میسوری به صورت انبوه می‌روید. ارتفاع این گیاه متفاوت است و بستگی به شرایط اقلیمی محل رویش دارد، و به ۸۰ تا ۱۵۰ سانتی‌متر می‌رسد از ریزوم کوتاه ریشه‌های بسیار منشعب می‌شود. ریشه مستقیم و کم و بیش منشعب و رنگ آن قهوه‌ای تیره تا سفید مات متفاوت است (شکل ۱-۱). ساقه این گیاه قائم و استوانه‌ای شکل بوده و رنگ آن به علت وجود آنتوسیانین سبز روشن، آبی و یا حتی قرمز رنگ می‌باشد. ساقه از انشعابات فراوانی برخوردار است و پوشیده از کرک‌های زبر می‌باشد. پای ساقه چوبی، ضخیم، صاف و بدون کرک است. برگ‌ها پهن، نیزه‌ای و یا بیضی‌شکل است. هر دو طرف برگ پوشیده از کرک‌های زبر و خشن می‌باشد. رنگ برگ‌ها سبز تیره و سطح آن کم و بیش ناصاف است. برگ‌های پایین به طول ۲۵ تا ۳۵ سانتی‌متر و پهنای آن ۷ تا ۱۲ سانتی‌متر می‌باشد. این برگ‌ها از دم‌برگ طولی برخوردارند،

که به طرف بالا از طول دمبرگ‌ها کاسته می‌شوند. گل‌ها مخروطی‌شکل و در انتهای ساقه‌های اصلی و فرعی پدیدار می‌شوند (امید بیگی، ۱۳۸۱).



شکل ۱-۱- گیاه دارویی سرخارگل  
(وبلاگ گیاهان دارویی و معطر  
ایران).

### ۱-۳- اهمیت گیاه سرخارگل

در حال حاضر در بیشتر فارماکوپه‌های معتبر از سرخارگل به عنوان گیاه دارویی مهمی یاد شده و خواص آن مورد بررسی قرار گرفته است. ترکیبات شیمیایی و فعالیت بیولوژیک سرخارگل نه تنها به گونه، بلکه به قسمت مورد مصرف گیاه، روش عصاره‌گیری، موقعیت جغرافیایی رویش گیاه و شرایط آب و هوایی بستگی دارد؛ تمام پیکر این گیاه اعم از ریشه و پیکر رویشی حاوی مواد موثره ارزشمندی است (امید بیگی، ۱۳۸۱). سرخارگل محرک سیستم دفاعی بدن، ضد التهاب، ضدسرطان، ضد میکروب و عفونت‌های معمولی، ضد عفونت‌های بالای دستگاه تنفس و ضد ویروس است. مطالعات علمی بسیار اثر این گیاه را به عنوان محرک سیستم ایمنی

ثابت کرده است و به همین علت در بسیاری از کشوها معمولاً به تنهایی یا همراه با سایر گیاهان جهت تقویت قوای دفاعی بدن در برابر این عفونت ها به کار می رود. این گیاه جهت پیش گیری و درمان سرماخوردگی های ضعیف تا متوسط و آنفولانزا مناسب است. بررسی ها نشان داده است که فرآورده های حاوی این گیاه طول و دوره سرماخوردگی را تقریباً یک چهارم تا یک سوم کاهش می دهد، بنابراین مصرف این گیاه برای افرادی که مکرراً دچار سرماخوردگی می شوند کمک کننده است. اکی ناسین<sup>۲</sup>، اسید شیکوریک و اسید کافئیک آن دارای خاصیت ضد ویروس هستند. همچنین ترکیب اکی ناکوزید<sup>۳</sup> آن دارای خاصیت ضد میکروبی است. در قدیم نیز جهت درمان گزش مار از آن استفاده می کرده اند. بیش از ۴۰۰ فرآورده جهت مشکلات ادراری، آنفولانزا، ضد التهاب، افزایش قدرت سیستم ایمنی و ضد زخم از این گیاه وجود دارد که به اشکال قرص، کپسول، قطره، شربت و آمپول می باشند. به غیر از این اشکال، فرآورده های دیگر به صورت عصاره از جمله عصاره تام به صورت خرد یا پودر شده، عصاره هیدورالکلی، و آبی از این گیاه وجود دارند. این داروها منجر به افزایش تعداد گلبول های سفید خون و سلول های طحال شده و توانایی فاگوسیتوز توسط گرانولوسیت ها را زیاد می کنند. همچنین اثبات شده است فرمولاسیون های خوراکی به اندازه تزریقی ها موثر هستند فقط شروع اثر کمتری دارند (استروم و همکاران، ۲۰۰۱؛ هو، ۱۹۹۹؛ بوسینگ، ۱۹۵۲). فرمولاسیون های موضعی نیز از گیاه وجود دارد که منجر به مهار هیالورونیداز شده و در بهبود زخم موثر هستند (بوسینگ، ۱۹۵۲؛ ویمن، ۱۹۷۸). کتاب کمیسیون اروپا استفاده خوراکی از این گیاه را در درمان حمایتی سرماخوردگی و عفونت های مزمن دستگاه تنفسی و دستگاه ادراری تحتانی و استفاده موضعی از آن را در زخم های دیر خوب شونده و مزمن (بلومنتال و همکاران، ۲۰۰۰) و سازمان بهداشت جهانی مصرف موضعی آن را علاوه بر موارد فوق، در درمان التهابات پوستی نیز تایید کرده است (هو، ۱۹۹۹).

#### ۱-۴- ترکیبات شیمیایی مهم موجود در سرخارگل

<sup>۲</sup>. Echinacein

<sup>۳</sup>. Echinacoside

ترکیبات سرخارگل از قسمت‌های مختلف گیاه بسته به نوع گونه بدست می‌آیند که در گونه *Echinacea purpurea* ترکیبات بیشتر در ریشه‌ها و سرشاخه‌ها می‌باشد (پری و همکاران، ۲۰۰۱). تحقیقات اخیر وجود ۲۱۶ ترکیب فعال دارویی در *Echinacea purpurea* را آشکار کرده است (مارچ و همکاران، ۲۰۰۶). ترکیبات مهم فعال بیولوژیکی شامل پلی ساکاریدها، فلاونوئیدها، مشتقات کافئیک اسید، اسانس، پلی‌استیلن‌ها، آلکامیدها و ترکیبات فنلیک هستند. تعدادی از محرک‌های ایمنی و ضد التهاب‌های متوسط پلی ساکاریدی در گیاه گزارش شده است، از جمله مهم‌ترین آنها اینولین به میزان ۵/۹٪ در ریشه و یا قسمت‌های هوایی وجود دارد. میزان ۰/۳-۰/۵ درصد فلاونوئیدها در گیاه وجود دارد که از همه مهمتر روتوزید<sup>۴</sup> در آن است. مشتقات اسید کافئیک<sup>۵</sup> از جمله اسید شیکوریک، اسید کلروژنیک و سینارین نیز در این گیاه مشخص شده اند از میان این مشتقات شیکوریک اسید دارای فعالیت فاگوسیتوز، آنتی هیالورینیداز (هیالورینیداز آنزیم خنثی‌ساز اسید هیالورونیک می‌باشد)، ضد ویروس و بازدارنده همانندسازی HIV-1 می‌باشد (شمینات و همکاران، ۱۹۸۸؛ فاسینو و همکاران، ۱۹۹۳؛ کینگ و همکاران، ۱۹۹۹؛ لین و همکاران، ۱۹۹۹؛ هاربرن و ویلیامز، ۲۰۰۴؛ پلاتی و همکاران، ۲۰۰۴). میزان اسانس در برگ، گل و ریشه گونه‌ها کاملاً متفاوت است و در فصول سال تغییر می‌کند. مهم‌ترین مواد موجود در اسانس‌ها شامل بورنئول و آلفا پی‌نن است. از ترکیبات دیگر می‌توان رزین‌ها، گلیکوپروتئین‌ها، استرول‌ها، اسیدهای چرب و مواد معدنی را نام برد.

## ۱-۵- متابولیت‌های ثانویه گیاهی

مسیرهای متابولیکی فراوانی در گیاهان وجود دارد که حاصل فعالیت آنها تامین ترکیبات حیاتی برای گیاه است. و گیاهان منبع طیف وسیعی از متابولیت‌های ثانویه می‌باشند. عمدتاً یکسری از واکنش‌های شیمیایی که واسطه آنزیمی دارند در گیاه زنده به عنوان متابولیسم شناخته می‌شوند. این واکنش‌های شیمیایی با هم هماهنگ شده تا مسیرهای متابولیکی که در آنها سنتز مولکول‌هایی مثل کربوهیدرات‌ها، اسیدهای آمینه، پروتئین‌ها، اسیدهای چرب عمده، نوکلئوتیدها و پلیمرهای حاصل از آنها (DNA, RNA) انجام می‌شود به

۴. Rutoside

۵. Caffeic Acid Derivatives

دست آیند. این تجمع به عنوان متابولیسم اولیه در نظر گرفته می‌شود و ترکیبات تولید شده که برای زنده ماندن و سالم ماندن گیاه لازم هستند متابولیت اولیه نامیده می‌شوند. همچنین در گیاهان مسیرهای متابولیکی دیگری نیز وجود دارد که محصول این مسیرها برای موجود کاملاً مشخص نیست و برای بقاء موجود نیز حیاتی نیستند که به این ترکیبات متابولیت‌های ثانویه اطلاق می‌گردد و به مسیر تولید آنها که به صورت نادر در حیوانات عالی و گاهی در حشرات و بندپایان یافت می‌شوند را متابولیسم ثانوی گویند. تولید متابولیت‌های ثانویه بخشی از سیستم دفاعی گیاه را تشکیل می‌دهد (حبیبی خانجانی و همکاران، ۱۳۸۴).

گیاه سرخارگل ترکیبات ثانویه فراوانی دارد که در بخش قبل توضیح داده شد. در این میان پلی‌ساکاریدها و ترکیبات فنلی به دلیل دارا بودن خواص متعدد درمانی بیشترین توجه را به خود معطوف داشته‌اند. با توجه به اینکه این مواد در این تحقیق اندازه‌گیری شده‌اند در مورد آنها توضیح داده می‌شود.

#### ۱-۶- ترکیبات فنلی

ترکیبات فنلی از دسته ترکیباتی هستند که اثرات محرک سیستم ایمنی آنها اثبات شده است. گیاهان انواع زیادی از ترکیبات ثانویه با گروه فنلی را تولید می‌کنند. (کافی و همکاران، ۱۳۸۸). ترکیبات فنلی انتشار وسیعی در گیاهان دارند و فعالیت بیولوژیک متنوع این ترکیبات از جمله آنتی‌اکسیدانی، آنتی‌میکروبی، ضد التهاب آنها در بسیاری از بررسی‌ها گزارش شده است، این مواد با داشتن خاصیت آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌رادیکالی می‌توانند نقش مهمی در نگهداری محصولات غذایی و حفظ سلامتی انسان ایفا نمایند. ترکیبات فنلی، شامل متابولیت‌های متنوعی از قبیل بسیاری از ترکیبات حلقوی مانند: فنل‌ها، فلاون‌ها، فلاونوئیدها، تانن‌ها و لیگنین‌ها می‌باشند. آنها در واکوئل سلول‌های اپیدرم به شکل آزاد یا گلیکوزیده شده تجمع می‌یابند. بیوسنتز ترکیبات فنلی گیاه از مسیر شیکمیک اسید آغاز می‌شود و آنزیم مهم بیوسنتزکننده این ترکیبات فنیل‌آلانین‌آمونیم لیاز (PAL) است (هلدت، ۲۰۰۱ و باربران و اسپین، ۲۰۰۵). پلی‌فنل‌ها ساختار شیمیایی مناسبی جهت جمع‌آوری رادیکال آزاد دارند. خصوصیت آنتی‌اکسیدانی پلی‌فنل‌ها ناشی از فعالیت بالای این ترکیبات به عنوان دهنده‌ی الکترون و شلات یون‌های فلزی سنگین مانند آهن و کادمیوم می‌باشد (رایس -

### ۷-۱- پلی ساکاریدها

پلی ساکاریدها با اندازه کاملاً بزرگ و قابلیت محلول بودن در مایعات بدن دارای خاصیت پادگنی هستند با توجه به زیاد بودن وزن مولکولی پلی ساکاریدهای سرخارگل و قابلیت انحلال آنها در آب این پلی ساکاریدها همراه آلکامیدهای سرخارگل دارای خاصیت محرک سیستم ایمنی می باشد. به طوری که باعث افزایش قدرت فاگوسیتوز، کموتاکسی و انفجار تنفسی در ماکروفاژ و همچنین نوتروفیل می شوند و در نتیجه ایمنی سلولی لنفوسیت های T را افزایش می دهد. تحقیقات جدید نشان دهنده این مطلب است که تأثیر سرخارگل در تقویت سیستم دفاعی بدن مربوط به ترکیبات پلی ساکاریدی گیاه مانند اکیناسن و اکیناکوزید و ترکیبات آلکیل آمیدی آن می باشد (مدرسی و اسدی، ۱۳۹۱).

### ۸-۱- انتقال ژن به سلول های گیاهی

از نظر تاریخی، سیستم آگروباکتریوم اولین سیستم تراریختی موفق در گیاهان است که کاربرد آن در سال ۱۹۸۳ موانع مهندسی ژنتیک گیاهی را شکست. آگروباکتریوم ها باکتری های گرم منفی خاکزی هستند که به مکان های زخمی گیاهان میزبان نفوذ نموده و سبب تولید تومورهای گال طوقه<sup>۶</sup> یا ریشه های موئین<sup>۷</sup> می شوند. این پاسخ های رشدی، نتیجه یک پدیده مهندسی ژنتیک طبیعی هستند که در آن یک قطعه DNA از یک پلاسمید القا کننده تومور (پلاسمید Ti) یا یک پلاسمید القا کننده ریشه (پلاسمید Ri) از آگروباکتریوم به سلول گیاهی منتقل می گردد. این قطعه DNA منتقل شونده که T-DNA نام دارد، در ژنوم هسته ای سلول های گیاهی تلفیق می گردد. بر روی T-DNA، ژن هایی قرار دارد که آنزیم های سنتز فیتوهورمون و یا پروتئین های موثر بر حساسیت سلول های گیاهی در قبال فیتوهورمون را کد می نمایند. بیان این ژن ها منجر به ایجاد تومورها یا ریشه های موئین می شود. T-DNA همچنین ژن هایی را حمل می نماید

---

<sup>۶</sup>. Crown gall

<sup>۷</sup>. Hairy root



که آنزیم های دخیل در تولید و ترشح یکسری مشتقات آمینواسیدی بنام اوپین ها از سلول های گیاهی تراریخته را کد می نماید. اوپین ها به عنوان منبع ازت و انرژی توسط آگروباکتریوم مورد استفاده قرار می گیرند. ژن های T-DNA در خود سلول آگروباکتریوم خاموش هستند (شیلتون و همکاران، ۱۹۸۲؛ شیلتون، ۲۰۰۱).

#### ۱-۸-۱- بیوسنتز اوپین ها

اوپین ها از سلول های گیاهی تراریخته به فضای بین سلولی تومور یا ریزوسفر ریشه های موئین که آگروباکتریوم در آنجا حضور دارد، ترشح می شوند (تمپ و همکاران، ۱۹۸۴). این ترکیبات برای سلول گیاهی، کاربردی ندارند اما منابع تامین ازت و انرژی آگروباکتریوم هستند. نوع ژن سنتز اوپینی که یک پلاسمید Ti یا Ri حمل می نماید، تعیین کننده نوع اوپینی است که توسط سلول های تومور یا ریشه موئین تولید می شوند. یک نژاد آگروباکتریوم که ژن های سنتز یک اوپین مشخص را بر روی T-DNA خود حمل می نمایند، ژن های را نیز برای کاتابولیسم آن اوپین خاص در جای دیگری بر روی پلاسمید Ri یا Ti خود جای داده است. به همین دلیل، نژادهای آگروباکتریوم و پلاسمیدهای Ti و Ri آنها اغلب بر اساس نوع اوپینی که تولید می نمایند طبقه بندی می شوند (جدول ۱-۱).

#### ۱-۸-۲- طبقه بندی آگروباکتریوم

آگروباکتریوم ها باکتری های میله ای، گرم منفی و متعلق به خانواده Rhizobiaceae می باشند. این باکتری ها غالباً در نزدیکی سطح خاک در ناحیه طوقه گیاه یافت می شوند. طبقه بندی آنها در سیستم قدیمی بر اساس خصوصیات بیماریزایی به صورت *A. tumefaciens* عامل بیماری گال طوقه، *A. rhizogenes* عامل بیماری ریشه موئین، *A. radiobacter* نژاد غیر بیماری زا می باشد. اخیراً آگروباکتریوم ها را بر اساس الگوهای رشدشان طبقه بندی مجدد نموده اند. در این روش، آگروباکتریوم ها به سه گروه مختلف (بیوتیپ) تقسیم می شوند که نژادهای متعلق به بیوتیپ های ۱ و ۲ در آزمایشات مهندسی ژنتیک در گیاهان مورد استفاده قرار

می گیرند (فارسی و ذوالعلی، ۱۳۸۸).

جدول ۱-۱ : طبقه بندی پلاسمیدهای Ti و Ri براساس نوع اوپین (پتیت و همکاران، ۱۹۸۳).

نوع اوپین	ترکیبات اوپینی موجود در بافت های نئوپلاستیک	مثال نژاد آگروباکتریوم
<b>پلاسمید های Ti</b>		
اکتوپین	اکتوپین، اکتوپینیک اسید، لایزوپین، هیستوپین	B6, ACH5
	آگروپین، آگروپینیک اسید، مانوپین، مانوپینیک اسید	C58,T37
نوپالین	نوپالین، نوپالینیک اسید، آگروسینوپین A	...
آگروپین	آگروپین، آگروپینیک اسید، مانوپین، مانوپینیک اسید، آگروسینوپین C	AT1,AT4
سوکسیناموپین <sup>۸</sup>	سوکسیناموپین، سوکسیناموپین لاکتام، سوکسینوپین لاکتام	Eu6,181
گراپوین	اکتوپین، کوکوموپین	K305,K308
<b>پلاسمید های Ri</b>		
آگروپین	آگروپین، آگروپینیک اسید، مانوپین، مانوپینیک اسید، آگروسینوپین A	A4,LBA9402
مانوپین	مانوپین، مانوپینیک اسید، آگروسینوپین C، آگروپینیک اسید	TR7,8196
کوکوموپین	کوکوموپین، میکی موپین	2655, 2657, A13

<sup>8</sup>. Succinamooopin

**بیوتیپ ۱:** وجه تمایز این نژادها از دیگر باکتری‌ها، توانایی آنها در تولید کتولاکتوز از لاکتوز است. نژادهای بسیار معروف *A. tumefaciens* نظیر C58، B6، A6، Ach5 و 15955 به بیوتیپ ۱ تعلق دارند. این باکتری‌ها تا دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قادر به تکثیر می‌باشند اما در آزمایشگاه معمولاً در دمای ۲۸ تا ۲۹ درجه سانتی‌گراد رشد داده می‌شوند. چون بعضی از پلاسمیدهای Ti در دماهای بالاتر، قدری ناپایدارند. از محیط کشت‌های مرسوم برای *E. coli* همچون محیط کشت‌های LB، NB و TY می‌توان برای کشت آنها استفاده کرد، اما در محیط کشت‌های حداقل معین مانند MM یا YMB نیز امکان رشد آنها وجود دارد (فارسی و ذوالعلی، ۱۳۸۸).

**بیوتیپ ۲:** وجه تشخیص این نژادها از دیگر آگروباکتریوم‌ها توانایی آنها در رشد بر روی اریتریتول (Erythritol) به عنوان تنها منبع کربن است. نژادهای آزمایشگاهی *A. rhizogenes* شامل نژادهای NCPPB1855، ATCC15834 و A4 متعلق به بیوتیپ ۲ می‌باشند. نژادهای بیوتیپ ۲ در دمای ۲۹-۳۰ درجه سانتی‌گراد رشد ضعیفی دارند و بنابراین در دمای ۲۸ یا ۲۹ درجه سانتی‌گراد کشت می‌شوند. در محیط کشت‌های مرسوم *E. coli* به خوبی رشد نمی‌کنند اما در عوض می‌توان آنها را در محیط کشت‌هایی نظیر TY+Ca، YMB و MM کشت نمود (فارسی و ذوالعلی، ۱۳۸۸).

### ۱-۸-۳- دامنه میزبانی آگروباکتریوم

طیف گسترده‌ای از گیاهان به تولید تومور و ریشه‌موئین القاء‌شده توسط آگروباکتریوم، مستعد هستند. گیاهان میزبان آگروباکتریوم، غالباً گیاهان دولپه هستند، اما تعدادی از بازدانگان و چند گیاه تک لپه نیز در محدوده میزبانی آنها قرار دارند (فارسی و ذوالعلی، ۱۳۸۸). اختصاصی بودن نژادهای آگروباکتریوم برای ژنوتیپ‌های گیاهی مختلف و انواع مختلف بافت‌ها به خوبی تأیید گردیده است. ماهیت برهمکنش بین باکتری‌ها و سلول‌های گیاهی، هنوز نامشخص است. برای پیدا کردن ترکیبات مطلوب نژاد-ژنوتیپ، بایستی مجموعه‌ای از نژادهای آگروباکتریوم در گستره‌ای از ژنوتیپ‌های گیاهی آزمایش شوند. علاوه بر ژنوتیپ،

سن، نوع و وضعیت فیزیولوژیکی بافت گیاهی نیز می تواند در تعیین سازگاری‌های نژاد - ژنوتیپ حائز اهمیت باشد.

فرضیه‌های متعددی در مورد عدم توانایی آگروباکتریوم برای تولید تومور یا ریشه‌موئین در اکثر گونه‌های گیاهی تک‌لپه‌ای وجود دارد که عبارتند از عدم توانایی آگروباکتریوم در اتصال به دیواره سلولی گیاه، فعالیت کاهش یافته پروموتورهای T-DNA، بازدارندگی القاء ژن های vir، تعادل غیر عادی اکسین-سیتوکنین در سلول‌های تک‌لپه و در نهایت عدم پاسخ آگروباکتریوم به زخم گیاهان تک‌لپه در اثر عدم تولید فاکتورهای علامت‌دهنده خاص توسط زخم گیاهان تک‌لپه، که بنظر می رسد مهمترین عامل باشد (فارسی و ذوالعلی، ۱۳۸۸).

#### ۱-۸-۴- ساختار مولکولی پلاسمید های Ti و Ri

پلاسمیدهای Ti و Ri، DNAهای حلقوی بزرگی به اندازه ۲۳۵-۱۴۰ کیلو جفت باز هستند. ناحیه T-DNA که به سلولهای گیاه منتقل می شود از ۱۵ تا ۴۲ kb در نژادهای مختلف متفاوت است که دو توالی حفاظت شده ۲۵ جفت بازی تکراری مستقیم به نام توالی های مرزی در طرفین آن بر روی پلاسمید حامل قرار گرفته است. هر توالی DNA ای که در فاصله این دو توالی مرزی قرار گرفته باشد می‌تواند به سلول گیاهی منتقل شود. دو منطقه مهم دیگر بر روی پلاسمیدهای Ti و Ri وجود دارد. منطقه ژن‌های بیماریزا یا منطقه vir که ژن‌های مسئول انجام مراحل انتقال T-DNA شامل برش، انتقال و تلفیق آن در ژنوم سلول‌های گیاهی در این منطقه قرار گرفته‌اند و منطقه ژن‌های کد کننده آنزیم‌های دخیل در کاتابولیسم اوپین‌ها که آگروباکتریوم را از قابلیت استفاده از اوپین‌هایی که توسط تومورها و ریشه‌های موئین تراوش می‌یابند، برخوردار می‌نماید (فارسی و ذوالعلی، ۱۳۸۸).

#### ۱-۸-۵- ژن های تومورزا و ژن های ریشه زا

کشت‌های این ویتروی تومورها و ریشه‌های موئین جدا شده از مکان تلقیح، براحتی و بدون نیاز به منابع خارجی هورمون‌های رشد، به رشد و تکثیر سلولی ادامه می‌دهند. این عدم نیاز به هورمون، به دلیل بیان پایدار ژن‌های T-DNA است. این ژن‌ها یا مسئول تولید فیتوهورمون هستند (ژن‌های *onc* سرطان زایی پلاسمید Ti) و یا مسئول افزایش حساسیت سلول‌ها به اکسین‌ها می‌باشند (ژن‌های *rol* پلاسمیدهای Ri). بافت‌های توموری، رشد خود را بصورت بافت‌های تمایز نیافته کالوس ادامه می‌دهند، درحالی‌که ریشه‌های موئین بصورت توده ای شدیداً منشعب از ریشه‌های پلاژیوتروپیک<sup>۹</sup> (عدم زمین‌گرایی)، رشد می‌نمایند (تپفر، ۱۹۹۰). توالی‌های DNA مشابهی در T-DNA نوپالینی و TL-DNA اکتوپینی مشاهده شده است. این مناطق دارای ژن‌های فیتوهورمون مولد تومور هستند که آنزیم‌های مسیر تولید AMP-ایزوپنتیل (یک سیتوکینین) و ایندول استیک اسید (یک اکسین) را کد می‌نمایند.

T-DNA پلاسمیدهای Ri دارای یک مجموعه از چهار ژن *rolA*، *rolB*، *rolC* و *rolD* معروفند. توالی نوکلئوتیدی کامل منطقه TL-DNA وجود ۱۸ ORF<sup>۱۰</sup> را مشخص می‌کند که چهار ORF آن یعنی ۱۰، ۱۱، ۱۲، ۱۵ به ترتیب متناظر با جایگاه‌های *rolA*، *rolB*، *rolC* و *rolD* می‌باشند. هم‌چنین نشان داده شده است که *rolA*، *rolB*، *rolC* نقش مهم‌تری در القای ریشه‌موئین ایفا می‌نمایند، به ویژه *rolB* که به نظر می‌رسد در فرایندهای تمایز سلول‌های تراریخته حیاتی‌تر می‌باشند در حالی‌که *rolA* و *rolC* کارکردهای فرعی دارند (پلازون و همکاران، ۱۹۹۷). انتقال این ژن‌ها به گیاه و بیان آنها در سلول‌های گیاهی، منجر به فنوتیپ ریشه‌موئین می‌شود. این ژن‌ها حساسیت سلول‌های گیاهی به اکسین‌های درون‌زا سلول‌های گیاهی را افزایش می‌دهند (شن و همکاران، ۱۹۸۸). اسپانو و همکاران (۱۹۸۷)، پیشنهاد کردند که ژن‌های مسول افزایش دادن حساسیت سلول‌های ریشه‌موئین به اکسین، در TL-DNA قرار گرفتند. TR-DNA پلاسمیدهای Ri اکتوپینی دارای ژنهای بیوسنتز اکسین است که بنظر می‌رسد نقش چندانی در ایجاد ریشه‌های موئین نداشته باشد.

<sup>۹</sup>. Plagiotropic

<sup>۱۰</sup>. Open Reading Fram

## ۱-۸-۶- وقایع مولکولی دخیل درانتقال T-DNA

فرایند انتقال ژن از آگروباکتریوم به سلول‌های گیاهی شامل مراحل ضروری زیر است ۱- تجمع باکتری ۲- القاء سیستم بیماریزایی باکتری ۳- تولید کمپلکس انتقال T-DNA و انتقال آن ۴- تلفیق T-DNA در ژنوم گیاهی (ریوا و همکاران، ۱۹۹۸). که در بخش زیر هر کدام از این مراحل توضیح داده می‌شود.

### ۱-۸-۶-۱- تجمع باکتری یا اتصال آگروباکتریوم به سلول‌های گیاهی

اولین مرحله در فرایند انتقال ژن توسط آگروباکتریوم، اتصال باکتری‌ها به دیواره سلول‌های گیاهی در نواحی زخمی است. پلی ساکاریدهای دیواره سلولی آگروباکتریوم شامل لیپوپلی ساکاریدها و پلی ساکاریدهای کپسولی (آنتی ژن های K) نقش مهمی در این فرایند دارند (واتلی و اسپایس، ۱۹۷۷)، اما ماهیت رسپتور سلول گیاهی که آگروباکتریوم به آن اتصال می‌یابد بدرستی مشخص نیست، هر چند که وجود یک رسپتور برای اتصال، بنظر می‌رسد که یک فاکتور مهم در تعیین دامنه میزبانی آگروباکتریوم باشد. سلول‌های گیاهی در عمل اتصال نقش چندانی ندارند و در مقابل، عمل اصلی را آگروباکتریوم انجام می‌دهد و بیان ساختمانی چند ژن کروموزوم باکتری شامل ژن‌های مکان att، chvA، chvB و pscA(exoC) نقش اصلی را در این فرایند ایفا می‌نمایند. لوکوس ۲۰ کیلو بازی کروموزومی att دارای ژن‌های موردنیاز برای اتصال موفق باکتری به سلول‌های گیاهی می‌باشد. این مکان بطور گسترده‌ای مورد مطالعه قرار گرفته است (ایمز و همکاران، ۱۹۹۰؛ ماتیس و همکاران، ۱۹۹۶؛ هیگینگ و همکاران، ۱۹۹۰). تحقیقات ایمز و همکاران در سال ۱۹۹۰ و ماتیس و همکاران در سال ۱۹۹۶ نشان داد که ژن‌های قرار گرفته در سمت چپ لوکوس att، در وقایع مولکولی علامت‌دهنده و ژن‌های سمت راست، در سنتز ترکیبات اساسی مورد نیاز در فرایند اتصال دخیل هستند.

اتصال آگروباکتريوم در طی یک فرایند دو مرحله‌ای صورت می‌گیرد. مرحله اول توسط یک پلی‌ساکارید کپسولی استیل‌شده میان‌جیگری می‌شود که سنتز آن مستلزم وجود یک مکان att سالم است. مرحله دوم در اتصال، شامل ساخت فیبریل‌های سلولزی توسط باکتری است که تعداد بسیار زیادی باکتری را در محل زخم درگیر می‌نماید. اگر چه که سنتز سلولز توسط باکتری برای تومورزایی در شرایط این ویترو ضروری نیست اما برای اتصال باکتری به گیاه در طبیعت بسیار حائز اهمیت است زیرا موتانت‌های ناتوان در سنتز سلولز، براحتمالی از سطح بافت گیاه جدا می‌شوند. ژن‌های کروموزومی *chvA*، *chvB* و *pscA* در سنتز، فراوری و انتقال بتا-۲و۱- گلوکان‌های حلقوی و سوکسینوگلیکان‌ها و دیگر قندها دخیل هستند و نقش آنها در فرایند اتصال از همین مسئله حدس زده می‌شود. از طرفی، باکتری‌های موتانتی که دارای نقص در این ژن‌ها هستند، در فرایند اتصال دچار مشکل می‌باشند (کانجلوسی و همکاران، ۱۹۸۹).

#### ۱-۸-۶-۲- القای سیستم بیماری زایی باکتری

منطقه *vir*، ژن‌های بیماری‌زای پلاسمیدهای *Ti* و *Ri* را در خود جای داده است. پروتئین‌های کد شونده توسط ژن‌های منطقه *vir*، عمل انتقال T-DNA به سلول گیاهی را انجام می‌دهند. منطقه *vir* یک ناحیه ۴۰-۳۰ کیلو بازی است که از ۶ اپرون ضروری (*virA*، *virB*، *virC*، *virD*، *virE*، *virG*) و ۲ اپرون غیر ضروری (*virF*، *virH*) تشکیل یافته است. تعداد ژن‌های موجود در اپرون‌ها متفاوت است. *virA*، *virG* و *virF* فقط یک ژن، *virE*، *virC* و *virH* دو ژن را در خود جای داده‌اند، در حالیکه *virD* و *virB* بترتیب دارای ۴ و ۱۱ ژن می‌باشد. از این میان فقط اپرون‌های *virA* و *virG* بصورت ساختمانی بیان می‌شوند و حاصل بیان آنها یک سیستم دو بخشی است که نسخه‌برداری از دیگر ژن‌های *vir* را فعال می‌نماید (ایوچی، ۱۹۹۳؛ نیکسون، ۱۹۸۶).

*virA* یک پروتئین حسگر غشایی دایمر است که مولکول‌های سیگنال رها شده از نواحی زخمی گیاه را شناسایی می‌نماید (پن و همکاران، ۱۹۹۳). سیگنال‌های فعال‌ساز *virA* عبارتند از pH اسیدی یا ترکیبات فنلی نظیر استوسیرینگون (وینانز، ۱۹۹۲) و گروه خاصی از مونوساکاریدها که بطور سینرژیک با ترکیبات

فنی عمل می‌نمایند (انکنبر و همکاران، ۱۹۹۰؛ شیمدا و همکاران، ۱۹۹۰ الف و ۱۹۹۰ ب؛ کانجوسی و همکاران، ۱۹۹۰؛ دتی و همکاران، ۱۹۹۶). پروتئین‌های *virA* و *virG*، یک سیستم تنظیم‌کننده مثبت دو بخشی را تشکیل می‌دهند (حس گر و فعال کننده). پروتئین *virA* همانگونه که ذکر شد یک پروتئین قرار گرفته در عرض غشاء است و بعنوان یک رسپتور اولیه عمل می‌نماید. به محض اتصال پروتئین *virA* به مولکول محرک فنی، این پروتئین فسفریله گردیده و فعال می‌گردد. *virA* فعال، از خاصیت کینازی برخوردار است و پروتئین *virG* را در سیتوپلاسم فسفریله می‌نماید. پروتئین *virG* پس از فسفریله شدن توسط *virA*، بعنوان یک فاکتور نسخه‌برداری تنظیم‌کننده بیان ژن‌های *vir* عمل نموده و آنها را فعال می‌نماید (جین و همکاران، ۱۹۹۰ الف؛ جین و همکاران، ۱۹۹۰ ب). فعال شدن سیستم *vir* به فاکتورهای خارجی نظیر درجه حرارت و pH نیز بستگی دارد. در درجه حرارت‌های بالاتر از  $33^{\circ}\text{C}$ ، ژن‌های *vir* بیان نمی‌شوند، زیرا که در این دما، پروتئین *virA* دچار تغییرات ساختاری گردیده و غیر فعال می‌شود (جین و همکاران، ۱۹۹۳).

#### ۱-۸-۶-۳- تولید کمپلکس انتقال T-DNA و انتقال آن

فعال شدن ژن‌های *vir*، تولید مولکول‌های تک‌رشته‌ای را بدنبال دارد که رونوشتی از رشته T-DNA تحتانی می‌باشند. هر قطعه DNA بی‌بی که در بین دو توالی مرزی قرار گرفته باشد، بصورت تک رشته‌ای به سلول گیاهی منتقل گردیده و در ژنوم آن تلفیق می‌شود. دو پروتئین *VirD1* و *VirD2* که توسط اپرون *virD* کد می‌شوند، دارای فعالیت اندونوکلازی هستند و رشته T-DNA را در بین سومین و چهارمین جفت باز تکرارهای مرزی برش می‌دهند. مکانهای برش، مکانهای شروع و خاتمه بازیافت T-DNA می‌باشند. *virD2*، پس از فعالیت اندونوکلازی، به انتهای T-DNA متصل باقی می‌ماند واز هضم اگرونوکلازی ssT-DNA از انتهای ۵' ممانعت می‌نماید. *virD1* نیز تعیین‌کننده انتهای ۳' رشته T-DNA می‌باشد. پس از انجام برش، عمل ساخت رشته T-DNA تحتانی بطور همزمان از ناحیه برش توالی مرزی راست شروع گردیده و در جهت ۵' - ۳' تا محل برش ایجاد شده توسط *virD1* پیش می‌رود. پس از رسیدن فعالیت



پلیمرازی به محل قرار گرفتن  $virD_1$  بدلیل شکاف ایجاد شده توسط این پروتئین در توالی مرزی سمت چپ، T-DNA جدا می‌گردد و به رهبری  $virD_2$  از انتهای ۵' به سمت سلول گیاهی حرکت می‌نماید. بر اساس پذیرفته شده ترین مدل پیشنهادی برای فرایند انتقال، کمپلکس ssT-DNA- $virD_2$  با پروتئین ۶۹ کیلو دالتونی  $virE_2$  که یک پروتئین متصل شونده به تک رشته است پوشیده می‌شود. اتصال  $virE_2$ ، از یک سو باعث حفاظت رشته T-DNA در برابر نوکلئوازها شده و از سوی دیگر، قطر کمپلکس انتقال را به 2nm تقلیل می‌دهد که عمل انتقال آن را بسیار تسهیل می‌نماید. دو پروتئین  $virE_2$  و  $virD_2$  بترتیب دارای دو، و یک علامت مکان‌یابی هسته‌ای گیاهی<sup>۱۱</sup> می‌باشند که پس از ورود کمپلکس اتصال به سلول گیاهی، نقش بسیار مهمی را در ورود آن به هسته سلول گیاه ایفا می‌نمایند. پروتئین  $virE_1$  برای انتقال  $virE_2$  به سلول گیاهی ضروری می‌باشد. اپرون  $virB$ ، حداقل ۱۱ پروتئین را کد می‌نماید که ساختارهای مرتبط با غشا را برای انتقال T-DNA به سلول گیاهی فراهم می‌آوردند. این پروتئین‌ها احتمالاً یک کانال غشایی را ایجاد می‌نمایند که کمپلکس ssT-DNA-پروتئین از طریق آن به سلول گیاه منتقل می‌گردد. سایر ژن‌های بیماریزای ضمیمه، ممکن است در پلاسمیدهای Ri یا Ti مشخصی وجود داشته باشند و در تعیین دامنه میزبانی اختصاصی به نژادهای باکتری نقش دارند. بعنوان مثال در نژادهای اکتوپینی، یک لوکوس کد کننده یک پروتئین ۲۴ دالتونی وجود دارد که برای تولید تومور در *Nicotiana glauca* ضروری می‌باشد. نژادهای نوپالینی فاقد لوکوس  $virF$  هستند، اما در عوض دارای یک ژن  $tms$  می‌باشند که بیوسنتز سیتوکینین را در آگروباکتریوم انجام می‌دهد (ریوا و همکاران، ۱۹۹۸).

#### ۱-۸-۶-۴-تلفیق T-DNA در ژنوم گیاهی

در درون سلول گیاهی، کمپلکس ssT-DNA از طریق غشاء هسته به درون هسته می‌رود. دو پروتئین  $virD_2$  و  $virE_2$  در این فرایند نقش اساسی دارند (هویکاز و شیلپروت، ۱۹۹۲). در عمل، انتقال T-DNA به هسته، تعدادی از پروتئین‌های NLS-binding اختصاصی موجود در سلول گیاهی نیز شرکت می‌نمایند (ریوا و

---

<sup>11</sup>. Plant nuclear location signal

همکاران، ۱۹۹۸). مرحله نهایی فرایند اتصال T-DNA تلفیق آن به درون ژنوم گیاهی است. این گونه بیان شده است که تلفیق T-DNA در اثر یک نوترکیبی هترولوگ رخ می دهد (گیسن و همکاران، ۱۹۹۱؛ پوچتا و همکاران، ۱۹۹۸؛ لمان و همکاران، ۱۹۹۴). بر اساس این مدل، جفت شدن تعداد اندکی باز، حداقل اختصاصی بودن را برای فرایند نوترکیبی، با موضع گیری virD<sub>2</sub> برای اتصال فراهم می آورد. انتهای ۳'، T-DNA اندکی همولوژی با DNA گیاهی پیدا نموده و اولین تماس T-DNA با DNA گیاهی برقرار می گردد. در رشته ۵'-۳'، DNA گیاهی، یک شکاف باز می شود و سپس آنزیم های اندونوکلیاز، در انتهای ۳' این شکاف، DNA گیاهی را برش می دهند. حال اولین نوکلئوتید انتهای ۵' رشته T-DNA که به virD<sub>2</sub> متصل شده است، با یک نوکلئوتید بر روی رشته فوقانی DNA گیاهی جفت می شود و دنباله جفت نشده انتهای ۳'، T-DNA به همراه DNA گیاهی خارج شده، توسط آنزیم های نوکلئاز هضم گردیده و رشته T-DNA، شکاف ایجاد شده در رشته ۵'-۳'، DNA گیاهی (رشته تحتانی) را پر می نماید. پس از قرار گرفتن T-DNA، در رشته ۵'-۳'، DNA گیاهی یک پیچ خوردگی ایجاد می شود که سبب ایجاد شکاف در رشته DNA مخالف می گردد. این وضعیت سبب فعال شدن مکانیزم ترمیم DNA سلول گیاهی گردیده و رشته مکمل T-DNA در مقابل آن بر روی رشته ۵'-۳'، DNA گیاهی سنتز می شود (تینلاند و همکاران، ۱۹۹۵).

#### ۱-۸-۷-روش های تأیید تراریختی

یکی از مراحل اصلی در فرایند انتقال ژن خارجی به گیاه، تأیید تراریختی مواد گیاهی پس از انجام آزمایش تراریختی می باشد که با هدف اطلاع از ورود ژن مورد نظر به مواد گیاهی اولیه ای که انتقال ژن بر روی آنها صورت گرفته است و همچنین در گیاهان باززایی شده از این مواد گیاهی صورت می گیرد و فقط پس از انجام این مرحله است که موفقیت یا شکست یک فرایند انتقال ژن مشخص می گردد. بدین منظور، از روش های مختلفی استفاده می شود که از متداولترین این روش ها، هیبریداسیون ساترن<sup>۱۲</sup>، واکنش زنجیره ای پلیمرز و ژن های نشانگر می باشند. با استفاده از روش هیبریداسیون ساترن، علاوه بر تشخیص توالی ژنی منتقل شده،

---

<sup>12</sup>. Southern Blotting

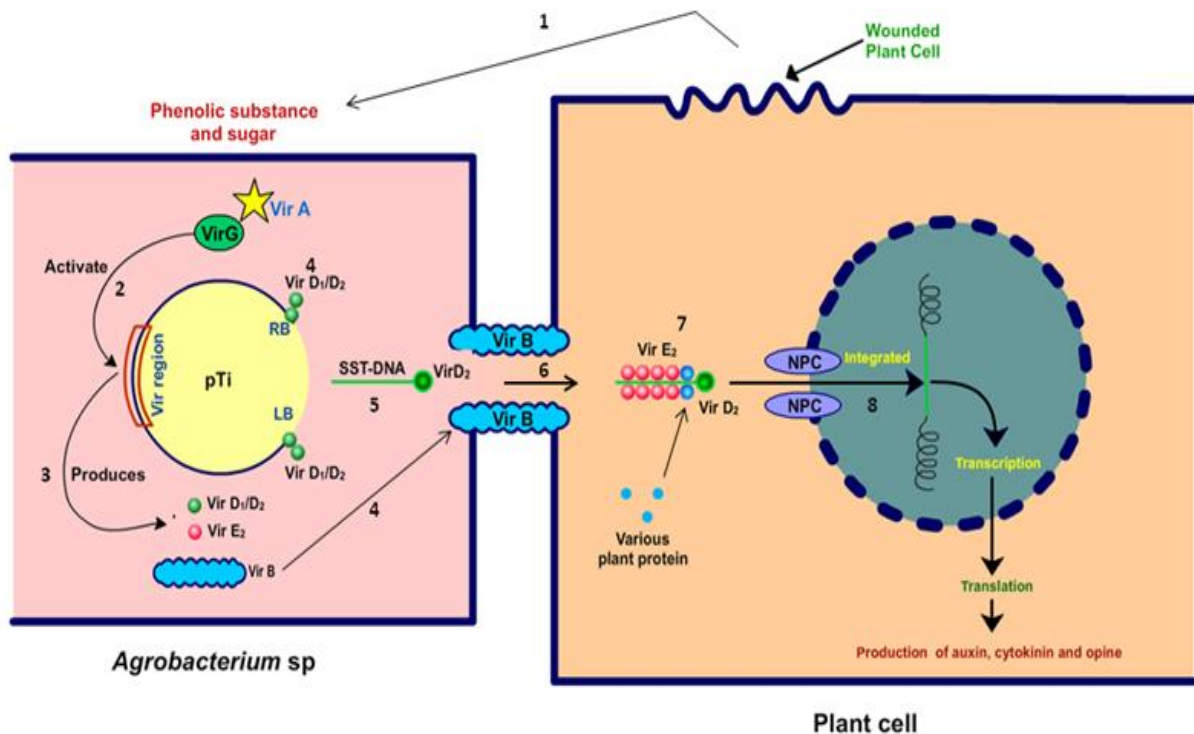
می‌توان تعداد نسخه‌های منتقل شده آن را نیز مشخص نمود. تکنیک PCR نیز روشی قوی برای پی بردن به حضور توالی ژن منتقل شده، در ژنوم مواد گیاهی، پس از انجام فرایند انتقال است. بدین منظور یک جفت آغازگر اختصاصی برای ساختار ژنی مورد استفاده در آزمایش تراریختی طراحی گردیده و پس از استخراج DNA مواد گیاهی، این آغازگر را در یک واکنش PCR برای تکثیر قطعه اختصاصی مورد نظر وارد می‌نمایند. مقدار کم DNA گیاهی مورد نیاز، سرعت و دقت از مزایای استفاده از این روش می‌باشند. ردیابی و آشکارسازی سیستم‌های ترانسفورمسیون گیاه، به منظور اطلاع از اینکه آیا DNA مورد نظر با موفقیت به درون سلول‌های میزبان منتقل شده است یا خیر به کمک مجموعه‌ای از ژن‌ها صورت می‌گیرد. ژن‌های نشانگر نیز همراه با ژن هدف در پلاسمید ناقل جای داده می‌شوند. ژن‌های نشانگر به دو گروه تقسیم می‌شوند:

ژن‌های گزینشگر<sup>۱۳</sup> و ژن‌های گزارشگر<sup>۱۴</sup>. مزیت استفاده از این ژن‌ها بررسی آسان آنهاست. چون برای تشخیص آنها به استخراج DNA، الکتروفورز و یا اتورادیوگرافی نیازی نیست.

---

<sup>13</sup>. Selectable Marker Gene

<sup>14</sup>. Reporter or Scoreable Genes



شکل ۱-۲- شمایی از نحوه ی انتقال ژن بوسیله ی اگروباکتریوم به ژنوم سلول گیاهی. از محل زخم سلول‌های گیاه مواد فنولیک و قند ترشح می‌شود (مرحله ۱)؛ که توسط Vir A حس می‌شوند و Vir A ، Vir G را فعال می‌کند و Vir G موجب بیان سایر ژن‌های Vir، پلاسمید Ri می‌شود (مرحله ۲)؛ ژن تمام Vir پروتئینی را تولید می‌کند (۳)؛ Vir D<sub>1</sub> Vir D<sub>2</sub> مسول تولید ssT-DNA از پلاسمید Ri و انتقال آن می‌باشند (مرحله ۴ و ۵)؛ (همراه با Vir D<sub>2</sub> و Vir D<sub>1</sub>) توسط Vir E<sub>2</sub> از طریق مجموعه انتقال دهنده Vir B منتقل می‌شود (مرحله ۶)؛ داخل سلول گیاهی T-DNA با Vir E<sub>2</sub> پوشیده می‌شود (مرحله ۷)؛ انواع پروتئین‌های گیاهی در انتقال کمپلکس T-DNA + Vir D<sub>1</sub> + Vir D<sub>2</sub> + Vir E<sub>2</sub> و تلفیق T-DNA به DNA هسته گیاه موثر هستند (تینلاند و همکاران، ۱۹۹۵).

(LB= left border; RB= Right border; pRi = Ri plasmid, NPC = nuclear pore complex)

## ۱-۸-۷-۱- استفاده از ژن های نشانگر گزینشگر

ژن های نشانگر گزینشگر، سلول های گیاهی تراریخته را از قابلیت زنده ماندن در محیط کشت هایی که محتوی مقادیر سمی از یک عامل گزینش می باشند، برخوردار می سازند، در حالی که سلول های غیر تراریخته در چنین محیط هایی از بین خواهند رفت. برای استفاده از یک ژن گزینشگر، آن را به روش مشابه با ژن های گزارشگر، به همراه ژن اصلی مورد نظر، در آزمایش تراریختی مورد استفاده قرار می دهند. در صورت انتقال ساختار ژنی مورد نظر به بافت گیاهی مورد آزمایش، سلول های تراریخته از فنوتیپ ژن گزینشگر برخوردار خواهند گردید. تعداد زیادی از ژن های نشانگر گزینشگر در دسترس محققین بیوتکنولوژی گیاهی وجود دارد. ژن های مقاومت به آنتی بیوتیک ها، آنتی متابولیت ها و علفکش ها، ژن های بیوسنتز هورمون و ژن های ایجاد مقاومت به مقادیر سمی از اسیدهای آمینه، ژن های نشانگر گزینشگر مورد استفاده در آزمایشات تراریختی گیاهی می باشند.

## ۱-۸-۷-۲- استفاده از ژن های گزارشگر

یک ژن گزارشگر، تحت کنترل یک پروموتور که از فعالیت مطلوب در سلول گیاهی برخوردار باشد، در بالادست ژن اصلی در ساختار ژنی منتقل شونده جاسازی می گردد. در صورت انتقال موفقیت آمیز ساختار ژنی منتقل شونده، ژن گزارشگر بیان گردیده و یک فنوتیپ قابل سنجش را بروز می دهد که بر اساس آن می توان براحتی و بدون استفاده از تکنیک هایی همچون هیبریداسیون ساترن و PCR، بطور مستقیم مواد گیاهی تراریخته را شناسایی نمود. ژن های اوپین سنتاز (OS)، کلرامفنیکول استیل ترانسفراز (CAT)، لوسیفراز باکتریایی (Lux F<sub>z</sub>)، پروتئین فلورسنت سبز (GFP)، بتاگلوکورونیداز (GUS) و ژن های تولید آنتوسیانین، ژن های معمول گزارشگر مورد استفاده در آزمایشات تراریختی گیاهی می باشند که برای پی بردن به بیان آنها در سلول های گیاهی، به ترتیب از الکتروفورز بر روی کاغذ، آشکارسازی فرآورده نشاندار واکنش آنزیمی در اتورادیوگرافی، ثبت پرتو تابی توسط لومینومتر، میکروسکوپ فلورسنت و مشاهده چشمی استفاده می شود. یک ژن گزارشگر ایده آل باید واجد خصوصیتی باشد از جمله این که با حساسیت زیادی آشکار شود، زمینه

داخلی خیلی کم داشته باشد، بررسی آن به صورت کمی ممکن باشد، بررسی آن غیر مخرب باشد، هزینه بررسی آن زیاد نباشد (فارسی و ذوالعلی، ۱۳۸۸). به دلیل استفاده از ژن گزارشگر *GUS* در این تحقیق در ادامه این نشانگر توضیح بیشتری داده می‌شود.

#### ۱-۸-۸- بتا گلوکورونیداز یا ( $\beta$ Glucuronidase) GUS

در چند سال اخیر ژن باکتریایی *Uid A* که آنزیم بتاگلوکورونیداز (*GUS*) را کد می‌کند به عنوان پرکاربردترین ژن گزارشگر مورد استفاده برای بررسی بیان ژن در گیاهان مطرح شده است. ژن *Uid A* آنزیم بتاگلوکورونیداز با وزن مولکولی ۶۸ کیلودالتون و pH مطلوب ۷-۸ را کد می‌کند. بتاگلوکورونیداز، گلوکورونید را می‌شکند و منجر به واکنش رنگی می‌شود به طوری که وجود آن قابل آشکارسازی است. دلیل اصلی مقبولیت این ژن به عنوان ژن گزارشگر، وجود یک آزمایش غیررادیواکتیو بسیار حساس با استفاده از ماده فلوروزنیک 4-MUGluc و آزمایش هیستوشیمیایی با استفاده از X-Gluc است. که امکان سنجش کمی بیان ژن *Uid A* را به طور اختصاصی در سلول و بافت گیاهی فراهم می‌آورد. مزیت اصلی این گزارشگر عدم نیاز آن به استخراج DNA، الکتروفورز و اتورادیوگرافی است (فارسی و ذوالعلی، ۱۳۸۸). این ژن از باکتری *E. coli* برای اولین بار استخراج شد. این ژن بسیار پایدار، دارای مقاومت بسیار بالا به بسیاری از مواد شوینده و متحمل به شرایط یونی بسیار متغیر است و نیز در حضور عناصر احیا کننده گوگرد (thiol) نظیر بتامرکاپتواتانول یا DDT بسیار فعال است. دارای قابلیت سنجش در pH بهینه بین ۵/۲-۸ می‌باشد. ژن *GUS* معمولاً در حالت ترکیب ژنی به کار برده می‌شود، به این معنی که توالی کدکننده *GUS* تحت کنترل توالی کدکننده ژن دیگری است که اغلب از پروموتور 35S ویروس موزاییک گل کلم استفاده می‌شود. این ژن اولین بار به عنوان ژن ترکیبی مارکر در *E. coli* و یک نماد به کار برده شده است. اما اخیراً به طور گسترده ای جهت مشاهده بیان ژن در گیاهان به کار گرفته شده است (سوون و اکسامان کالذنتی، ۲۰۰۴).

#### ۱-۹- نحوه‌ی القاء ریشه‌های موئین، اهمیت و کاربردها

باکتری خاکزی گرم منفی *A. rhizogenes* در طبیعت گیاهان را برای تامین منابع غذایی خود (اوپین ها) آلوده می نماید. این باکتری، مولکول های سیگنال منتشر شونده از سلول های نواحی زخمی گیاهان مستعد را دریافت نموده و به این مناطق متصل می گردد. آلودگی گیاهان با *A. rhizogenes* سبب ایجاد ریشه های موئین در مکان آلودگی می شود. نژادهای ریشه زای این باکتری، دارای نسخه ای از یک پلاسمید بزرگ بنام Ri هستند. در پلاسمید Ri آگروپینی، T-DNA به دو بخش، T-DNA چپ (T<sub>L</sub>-DNA) و T-DNA راست (T<sub>R</sub>-DNA) تقسیم می شود. T-DNA راست حاوی ژن هایی مشابه با ژن های تومورزائی پلاسمید Ti می باشد. ژن های دخیل در سنتز آگروپین نیز در ناحیه T<sub>R</sub>-DNA قرار گرفته اند. T-DNA به سلول های ناحیه زخمی منتقل گردیده و به طور پایدار در ژنوم سلول های میزبان تلفیق می گردد. ژن های کد شونده در T-DNA دارای منشا پروکاریوتی هستند اما از توالی های تنظیم کننده یوکاریوتی برخوردارند که بیان آنها را در سلول های گیاهی آلوده شده با آگروباکتریوم امکان پذیر می نماید. سنتز اکسین را می توان به T-DNA راست نسبت داد. اما حتی در عدم حضور سنتز اکسین تحریک و توسط T<sub>R</sub>-DNA (مانند نوع مانوپین که فاقد لوکوس aux است) نیز القاء ریشه موئین اتفاق می افتد. ژن های T<sub>L</sub>-DNA پلاسمید Ri، ماده-ای که سلول های گیاه را تحریک به تمایز ریشه موئین تحت تاثیر سنتز اکسین درون زا است را سنتز می نماید، (سینکار و همکاران، ۱۹۸۸؛ سوون و همکاران، ۲۰۰۲).

رشد سریع، ثبات ژنتیکی و بیوشیمیایی، عدم زمین گرایی و رشد در محیط کشت فاقد هورمون، خصوصیات منحصر به فرد ریشه های موئین هستند که آنها را به عنوان مواد گیاهی ارزشمندی در بیوتکنولوژی گیاهی مورد توجه قرار داده است. امروزه محققین زیادی در سراسر دنیا به تحقیق بر روی جنبه های مختلف کاربرد ریشه های موئین می پردازند. کشت های ریشه موئین به عنوان سیستم های مدل در تحقیقات متابولیسم و فیزیولوژی گیاهی مورد استفاده قرار می گیرند و از سوی دیگر به عنوان روشی جایگزین و امیدبخش برای کشت های سوسپانسیونی سلول های گیاهی در تولید این ویتروی متابولیت های ثانویه گیاهی، تحقیقات فراوانی بر روی آنها انجام می شود. کاربرد در اصلاح گونه های درختی، دست ورزی های ژنتیکی و تشخیص

فرایندهای بنیادی پدیده پالایش زیستی توسط گیاهان<sup>۱۵</sup>، از دیگر پتانسیل‌های جذاب ریشه‌های موئین می‌باشند که در بیوتکنولوژی گیاهی مد نظر قرار گرفته است (آلیزار و همکاران، ۲۰۰۸).

### ۱-۹-۱- تولید متابولیت‌های ثانویه

کشت‌های ریشه‌موئین، دارای سرعت رشد زیاد و توانایی سنتز متابولیت‌های ثانویه ریشه‌ای بالا می‌باشند. در حالت عادی، کشت‌های ریشه‌ای به منبع هورمونی بیرونی نیازمند هستند و میزان رشد و تولید آلکالوئید در آنها بسیار اندک است. استفاده از کشت‌های ریشه‌های موئین، انقلابی در تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهی در این ویترو ایجاد کرده است. این ریشه‌های موئین، در ثبات ژنتیکی و بیوسنتزی منحصر به فرد هستند. رشد سریع، زمان دو برابر شدن کوتاه، راحتی نگهداری و توانایی سنتز گستره‌ای از ترکیبات شیمیایی، مزیت‌های بیشتری را به عنوان یک منبع دائمی برای تولید متابولیت‌های ثانویه ارزشمند ایجاد می‌نماید (حسنلو و همکاران، ۱۳۸۷). برای بدست آوردن کشتی متراکم از ریشه‌های موئین، شرایط کشت باید در حد بهینه حفظ شود. تولید ترکیبات ثانویه در کشت‌های ریشه‌های موئین ممکن است وابسته به رشد نباشد. کشت‌های ریشه‌های موئین، منابع ارزشمندی برای تولید ترکیبات شیمیایی منبعث از گیاهان هستند که به عنوان مواد دارویی، آرایشی و افزودنی‌های خوراکی مورد استفاده قرار می‌گیرند. ریشه‌های موئین تراریخته گونه‌های گیاهی زیادی به طور گسترده برای تولید متابولیت‌های ثانویه در این ویترو مورد بررسی قرار گرفته‌اند. لاین-های ریشه‌موئین می‌توانند منبعی امیدوارکننده برای تولید پایدار متابولیت‌های ثانویه باشند. کشت‌های ریشه‌موئین، متابولیت‌های ثانویه را در درازمدت، بدون از دست دادن ثبات ژنتیکی تولید می‌نمایند. میزان بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه در ریشه‌های تراریخته، مبنای ژنتیکی دارد اما تحت تاثیر عوامل تغذیه‌ای و محیطی نیز قرار می‌گیرد. ترکیب محیط کشت، رشد و تولید متابولیت‌های ثانویه را تحت تاثیر قرار می‌دهد. مقدار ساکارز، هورمون رشدی بیرونی، ماهیت منبع نیتروژن و مقادیر نسبی آنها، نور، درجه حرارت و وجود مواد

---

<sup>15</sup>. Phytoremediation



شیمیایی محرک یا بازدارنده، همگی می‌توانند رشد، مقدار بیوماس، و تولید متابولیت ثانویه را متاثر سازند (سوون و اکسامان-کالدنتی، ۲۰۰۲؛ آلپیزار و همکاران، ۲۰۰۸).

### ۱-۹-۲- کاربرد مهندسی متابولیت

ریشه‌های موئین سیستم مدل ارزشمندی برای ارزیابی، توسعه و کاربرد اصول مهندسی ژنتیک در گیاهان هستند. انتقال ژن‌های گزارشگر شناخته شده یا ژن‌های گزارشگر بالقوه به ریشه‌های موئین و بررسی بیان آنها در این سیستم‌های ساده، راهبردی کارآمد برای بهینه‌سازی یا کشف گزارشگرهای جدید در سیستم-های گیاهی در اختیار محققین قرار داده است. به عنوان مثال، ژن پروتئین فلورسنت سبز، با موفقیت در ریشه‌های موئین گیاه بذرالبنج مورد آزمایش قرار گرفت (اکسامان کالدنتی و همکاران، ۱۹۹۱). ریشه‌های موئین چند گونه دو لپه نیز برای استفاده از ژن  $Sm$  ذرت به عنوان ژن گزارشگر مورد آزمایش قرار گرفتند. ژن  $Sm$ ، مسیر بیوسنتز آنتوسیانین را فعال و منجر به تولید رنگدانه قرمز رنگ می‌شود (ریوا و همکاران، ۱۹۹۸).

در فرآیند طراحی سیستم برای تولید بهبودیافته یک متابولیت خاص، یکی از موانع کلیدی برای مهندسی متابولیک، شناسایی مراحل مسیری است که باید تغییر نماید. آشکار شدن تغییرات پیوسته متابولیکی رخ دهنده در یک مسیر، یکی از اطلاعات ضروری مورد نیاز برای تحلیل یک شبکه متابولیکی برای کشف مراحل محدودکننده سرعت مسیر است. اگر چه که این سنجش‌ها در سیستم گیاهی مشکل است اما پیشرفت‌هایی در این زمینه با استفاده از ریشه‌های موئین حاصل گردیده است. ایزوتوپ‌های  $^{13}C$  و  $^{31}P$  با موفقیت برای سنجش غلظت‌های چند متابولیت اولیه (گلوکان، ملات و پیرووات) و سرعت مسیرها در ریشه‌های موئین مورد استفاده قرار گرفته‌اند. این اندازه‌گیری‌ها برای دستیابی به نقاط ایجاد محدودیت در یک شبکه متابولیکی شاخه‌ای نظیر مسیر آلکالوئیدهای ایندولی مورد استفاده قرار می‌گیرد.

### ۱-۹-۳- باززایی گیاه کامل از ریشه‌های موئین

ریشه‌های تراریخته از قابلیت باززایی گیاهان کامل برخوردارند. گیاهان باززایی شده از ریشه‌های موئین مانند خود آنها، ثبات ژنتیکی دارند. اما در بعضی موارد گیاهان تراریخته در مقایسه با گیاهان شاهد، فنوتیپ متفاوتی را نشان می‌دهند (مقاله و همکاران، ۲۰۰۴). گیاهان باززایی شده از ریشه‌های تراریخته، سندرم ریشه‌موئین را نشان می‌دهند که حاصل بیان ترکیبی لوکوس‌های *rolA*، *rolB* و *rolC* پلاسمید Ri در ژنوم گیاه است. هر یک از این مکان‌های ژنی، مسئول یک تغییر فنوتیپی خاص است. لوکوس *rolA* مسئول کوتاه شدن میانگره‌ها و چین خوردگی برگ‌ها، *rolB* مسئول برآمدگی کلاله‌های گل و کوتاه شدن طول پرچم و *rolC* عامل کوتاه شدن میانگره‌ها و کاهش غالبیت انتهایی می‌باشد (تینلاند و همکاران، ۱۹۹۸). گیاهان ممکن است از ریشه‌های موئین به صورت خودبخودی (مستقیماً از ریشه‌ها) یا با انتقال ریشه‌ها به محیط کشت محتوی هورمون باززا شوند. مزیت انتقال ژن مبتنی بر پلاسمید Ri این است که باززایی خودبخود ساقه، در بعضی از مواقع بدون فاز کالوس و تنوع سوماکلونال صورت می‌گیرد و گیاهان تراریخته را می‌توان بدون نیاز به عوامل گزینش و مواد شیمیایی که باززایی ساقه را محدود می‌نمایند، بدست آورد. علاوه بر این، تراریختی به واسطه *A. tumefaciens* باعث از دست رفتن تعداد زیادی از سلول‌ها می‌شود، درحالی‌که تراریختی با استفاده از *A. rhizogenes* سلول‌های تراریخته‌ای را بوجود می‌آورد که پس از چند دوره کشت نوک ریشه، به صورت کلون قابل استحصال هستند. این ریشه‌های موئین می‌توانند به صورت کشت‌های اندام به مدت طولانی نگهداری شوند و بعدها باززایی ساقه بدون ناهنجاری‌های سیتولوژیکی از آنها صورت پذیرد (سوون و اوکسامان کالدنتی، ۲۰۰۴).

گیاهان باززایی شده از ریشه‌های موئین، رشد سریع، تشکیل جوانه‌های جانبی فراوان، و تولید سریع برگ نشان می‌دهند. فنوتیپ‌های تغییر یافته‌ای که در گیاهان باززایی شده از ریشه‌های موئین مشاهده می‌شوند، در مواردی برای برنامه‌های اصلاحی گیاهان زینتی مفید واقع شده‌اند. تشکیل فراوان شاخه‌های جانبی، کاهش غالبیت انتهایی، شکل تغییر یافته برگ و گل، کوتولگی، تغییر زمان گلدهی و برگ‌های چین خورده، از جمله صفات مورفولوژیکی با ارزش زینتی هستند که بعضاً در گیاهان زینتی باززایی شده از ریشه‌های موئین

مشاهده می‌شوند. بعنوان مثال، پلگرینسکی<sup>۱۶</sup> و همکاران (۲۰۰۶)، کیفیت زینتی گونه‌های معطر پلارگونوم را افزایش داده‌اند. این گیاه عطر خوشبویی دارد اما میانگرهای بلند و رشد کم، آنرا غیر جذاب می‌نماید. گیاهان باززایی شده از ریشه‌های موئین این گیاه، قامت کوتاهتری دارند و از کیفیت زینتی بیشتری برخوردار می‌باشند.

#### ۱-۹-۴- کاربرد در دستورزی ژنتیکی

تراریختی گیاهان را می‌توان با استفاده از *A. rhizogenes* با روش‌های مشابه *A. tumefaciens* انجام داد. به استثنای توالی‌های مرزی، هیچ یک از توالی‌های T-DNA پلاسمید Ri برای فرایند انتقال ضروری نیستند. بدین جهت می‌توان T-DNA را با DNA خارجی جایگزین و پس از انتقال به سلول‌های گیاهی، گیاهان تراریخته را باززا نمود. علاوه بر این، هر ژن خارجی مورد نظری که در فاصله توالی‌های مرزی یک ناقل دوگانه مبتنی بر پلاسمید Ri قرار گرفته باشد را می‌توان به ریشه‌های موئین منتقل نمود. بدین ترتیب می‌توان الگوی تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهی را به طور انتخابی در ریشه‌های موئین تغییر داد و یا با انتقال ژن‌های کدکننده آنزیم‌هایی که واکنش‌های هیدروکسیلاسیون، میتیلاسیون و گلیکوزیلاسیون خاص را کاتالیز می‌نمایند، این متابولیت‌ها را مجبور به تراوش نمود. انتقال ژن ۶- بتاهیدروکسیلاز از *Hyoscyamus muticus* به ریشه‌های موئین *Atropabelladona* با استفاده از یک سیستم ناقل دوگانه مبتنی بر *A. rhizogenes*، یک مثال از دستورزی مسیرهای متابولیکی در ریشه‌های موئین با انتقال ژن است که ریشه‌های مهندسی شده فعالیت آنزیمی افزایش یافته‌ای را نشان و مقدار اسکوپولامین در آنها تا ۵ برابر افزایش یافت (هایکاس، ۱۹۹۲). ریشه‌های موئین تراریخته *Nicotiana rustica* با ژن اورنیتین دکربوکسیلاز از مخمر و ریشه‌های موئین تراریخته *Peganum harmalla* با ژن تریپتوفان دکربوکسیلاز از *Catharanthus roseus*، بترتیب افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه نیکوتین و سراتونین را نشان داده‌اند (تپفر و همکاران، ۲۰۰۱).

<sup>16</sup> Pellegrineschi

## ۱-۹-۵- کاربرد در پالایش زیستی گیاهی

پالایش زیستی گیاهی، یک تکنولوژی در حال ظهور است که گیاهان سبز را برای حذف یا بعبارت دیگر خارج کردن فلزات سنگین یا آلاینده‌های ارگانیک از خاک‌ها و حوزه‌های آب زیرزمینی مورد استفاده قرار می‌دهد. در این فن‌آوری، ریشه‌های گیاهان، مرکز واکنش پالایش هستند. کشت‌های ریشه‌موئین، سیستم مدل ارزشمندی برای روشن‌سازی واکنش‌های بیوشیمیایی فرآیند پالایش و سرنوشت آلاینده‌ها در سیستم گیاهی می‌باشند. بدین منظور، کشت‌های ریشه‌های موئین گیاهان جذب کننده، برای مطالعه جذب فلزات سنگین مورد استفاده قرار می‌گیرند (سوون و اکسامان - کالدنتی، ۲۰۰۲). حذف بی فنیل‌های پلی‌کلرینه<sup>۱۷</sup> از محیط کشت، در کشت ریشه‌های موئین *Solanum nigrum* مورد بررسی قرار گرفته است. پیشرفت‌های مهمی در زمینه کشف فرایندهای ترانسفورماسیون و تجزیه ماده منفجره ۲ و ۴- دی نیتروتولون (TNT) در گیاهان، با استفاده از ریشه‌های موئین *Catharanthus roseus* به عنوان یک سیستم مدل حاصل شده است. مشخص شده است که TNT بصورت مونوآمینو دی نیتروتولون، احیا و سپس در محل گروه‌های آمین با حداقل یک واحد ۶ کربنه، متصل گردیده و در نهایت بصورت غیر قابل برگشت در دیواره سلول‌های گیاه تثبیت می‌گردد (آلیزار و همکاران، ۲۰۰۸).

مشکلات فراوان پرورش مزرعه ای گیاهان دارویی همچون حساسیت شدید این گیاهان به آفات و بیماری- های گیاهی، حجم گسترده امکانات لازم برای پرورش مزرعه‌ای گیاهان و مدت زمان طولانی مورد نیاز برای رشد گیاهان تا رسیدن به مرحله برداشت و عصاره‌گیری، موجب شده است که تحقیقات فراوانی در زمینه تولید این ویتروی متابولیت‌ها با استفاده از روش‌های آزمایشگاهی انجام شود. لذا متابولیت‌های ثانوی گیاهی از ارزش اقتصادی و همچنین ارزش افزوده بسیار بالایی برخوردار هستند و سنتز شیمیایی این متابولیت‌ها معمولا پیچیده و پرهزینه می‌باشد. به دلیل حضور ترکیبات شیمیایی بسیار مهم در گیاه دارویی سرخارگل تاکنون تحقیقات زیادی به منظور جداسازی متابولیت‌های ثانویه و ترکیبات دارویی انجام شده است. به دلیل

<sup>17</sup> Polychlorinated Biphenyl

مدت زمان طولانی دوره رشد و محدودیت زیست محیطی، تولید دارو از این گیاه نسبتاً سخت و دشوار است. بنابراین تولید این متابولیت‌ها با روش‌های مختلف زیست‌فناوری از جمله کشت ریشه‌های موئین، می‌تواند راه جایگزین سودمندی باشد. کشت ریشه‌های موئین به دلیل سرعت رشد زیاد و نامحدود، کوتاه بودن زمان دو برابر شدن، عدم نیاز به محیط کشت حاوی هورمون و نور، پایداری ژنتیکی بالا و امکان تولید محصولات با ارزش در زمان کوتاه با بازده بالا، به عنوان سیستم جدید و بسیار امیدبخش برای تولید متابولیت‌های ثانویه ریشه‌ای در شرایط درون شیشه‌ای مطرح گردیده است. لذا هدف از انجام این پژوهش بررسی تاثیر سویه‌های مختلف باکتری اگروباکتریوم‌رایزوزنز و انواع ریزنمونه در میزان القای ریشه‌های موئین و میزان بیوسنتز ترکیبات فنولی، پلی‌ساکاریدها و اسانس تحت شرایط درون شیشه‌ای در گیاه دارویی سرخارگل می‌باشد. با ارزیابی میزان پاسخ‌دهی سرخارگل به آلودگی با اگروباکتریوم‌رایزوزنز و بهینه‌سازی شرایط بازرایی، می‌توان از آن بعنوان یک مدل بالقوه برای انتقال ژن و مهندسی ژنتیک مسیرهای متابولیکی بهره برد.

سوالات اصلی که در این آزمایش پاسخ داده می‌شود:

- آیا سویه‌های مختلف اگروباکتریوم از لحاظ قابلیت انتقال ژن و تولید ریشه‌های موئین تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نشان می‌دهند؟
- آیا ریزنمونه‌های مختلف گیاه سرخارگل در پتانسیل باکتری در تولید ریشه‌های موئین تاثیر دارند؟
- آیا سویه‌های مختلف باکتری توانسته‌اند در بیوسنتز میزان ترکیبات ثانویه تاثیرگذار باشند؟

# فصل دوم

## مرور منابع

## ۲-۱- انتقال ژن و ریشه‌های موئین گیاه داروئی سرخارگل

تکنیک‌های مهندسی ژنتیک فواید زیادی در بهبود ارزش افزوده شده محصولات دارند و هم‌چنین توانایی انتقال ژن‌های خارجی به گیاهان مسیره‌های جدیدی در مطالعه تنظیم فرایندهای نمو و سنتزی را فراهم کرده‌اند. با این حال تحقیقات در زمینه مهندسی ژنتیک سرخارگل با گزارشات اندکی از گیاهان و ریشه‌های موئین ترانسژنیک محدود شده است. تریپسین و همکاران (۱۹۹۱) اولین بار ترانسفورماسیون ریشه‌های سرخارگل با استفاده از آگروباکتریوم رایزوزنز را گزارش کردند. اما ریشه‌های موئین رشد محدودی را نشان دادند، ویژگی‌های مورفولوژیکی عمومی ریشه‌های موئین مانند رشد سریع، انشعابات فراوان، عدم زمین‌گرایی و... مشاهده نشدند و بعضی از ریشه‌ها بافت کالوس و شاخه تولید نمودند. هم‌چنین ونگ و همکاران (۲۰۰۶)، قابلیت انتقال ژن به کمک سه سویه آگروباکتریوم رایزوزنز و دو نوع ریزنمونه برگ و دم‌برگ در تولید ریشه‌های موئین گیاه سرخارگل را مورد بررسی قرار دادند. که درصد ترانسفورماسیون در ریزنمونه‌های برگ با سویه‌های A4, R1000, R1601 به ترتیب ۴۰٪، ۶۰٪، ۸۰٪، و در ریزنمونه دم‌برگ به ترتیب ۱۰٪، ۳۰٪، ۴۵٪ بود. بنابراین به این نتیجه رسیدند که انواع مختلف آگروباکتریوم رایزوزنز و ریزنمونه‌های مختلف تاثیر بسزایی در تولید ریشه‌های موئین دارند. در بررسی دیگری ریزنمونه‌های برگ گیاه سرخارگل با آگروباکتریوم رایزوزنز (سویه ATCC 43057) ترانسفورم شدند ریشه‌های موئین شکل گرفتند که حداکثر بیومس خشک در محیط MS (موراشیک و اسکوگ) جامد در یک دوره کشت ۴۰ روزه به دست آمد (عباسی و همکاران، ۲۰۰۷). رومرو و همکاران (۲۰۰۹)، طی بررسی کشت ریشه‌های موئین در سه گونه مهم خانواده *Echinacea* (*Echinacea purpurea*, *Echinacea Palliida*, *Echinacea angustifolia*) به وسیله سویه A4 آگروباکتریوم رایزوزنز ثابت کردند که میزان القای ریشه‌های موئین توسط سویه A4 به ترتیب در سه گونه ۶۱٪، ۳۳٪ و ۱۰٪ و هم‌چنین توسط سویه GV3101 به ترتیب ۵۸٪، ۲۸٪، ۱۰٪ می‌باشد. در پژوهش انجام‌شده توسط احمدی و معینی (۱۳۹۲)، اثر میواینوزیتول بر رشد ریشه‌های موئین گیاه سرخارگل از پنج غلظت آن (0، 50، 100، 150 و 200 میلی‌گرم در لیتر) در محیط کشت WPM حاوی هورمون‌های اکسین

(NAA و IBA) استفاده شد. بعد از رشد پارامترهای مختلف رشدی از جمله وزن تر، وزن خشک، درصد وزن خشک، شاخص رشد و هدایت الکتریکی محیط کشت مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. نتایج این بررسی نشان دادند که میزان رشد ریشه‌های موئین در محیط کشت دارای غلظت‌های مختلف میواینوزیتول نسبت به محیط فاقد میواینوزیتول اختلاف معنی‌داری داشت و بیشترین میزان تولید مربوط به محیط کشت دارای ۵۰ میلی‌گرم در لیتر میواینوزیتول بود که در این محیط، وزن تر و خشک به ترتیب به میزان ۳ و ۰/۵ گرم تولید شده‌است.

ریشه‌های موئین گیاه سرخارگل قادر به سنتز بسیاری از متابولیت‌های ثانویه از جمله آلکیل‌آمیدها، مواد فنلی و ترکیبات پلی‌ساکاریدی، مشتقات اسیدکافئیک می‌باشد. ونگ و همکاران (۲۰۰۶) در بررسی میزان ترکیبات فعال دارویی ریشه‌های موئین حاصل از تراریختی با آگروباکتریوم رایزوزنز در گیاه سرخارگل، ترکیبات فنلی و محتوای پلی‌ساکاریدی را استخراج کردند که به ترتیب مقادیر ۱۶/۳٪ و ۳/۳٪ بدست آورده‌اند که نسبت به نمونه شاهد افزایش نشان داد. عباسی و همکاران (۲۰۰۷)، با روش آنالیز HPLC استخراج متابولیکی در کشت‌های ریشه‌های موئین سرخارگل را در حضور نور و تاریکی بررسی کردند که وجود مشتقات کافئیک اسید فعال بیولوژیکی مهم را تایید کردند از جمله این مشتقات شیکوریک اسید، کافتاریک اسید، کلروژنیک اسید می‌باشند که در حضور نور در مقایسه با شرایط تاریکی به‌طور معنی‌داری افزایش یافتند. وو و همکاران (۲۰۰۸)، میزان مشتقات کافئیک اسید را در ریشه‌های موئین سرخارگل با استفاده از دو حلال متانول (۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰٪) و اتانول (۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰٪) به روش HPLC اندازه‌گیری و گزارش کردند که حلال اتانول ۶۰٪ بیشترین مقدار استخراج مشتقات کافئیک اسید را نشان داده است. در آزمایش انجام شده توسط فردی و همکاران (۲۰۰۹) بررسی تاثیر نوع محیط کشت و بهینه‌سازی شرایط کشت ریشه‌های موئین سرخارگل باعث افزایش همزمان میزان رشد ریشه‌ها و افزایش سنتز آلکامیدها در ریشه‌های موئین شد و هم‌چنین تاثیر تنظیم‌کننده‌های رشدی بر رشد ریشه‌های موئین و سنتز متابولیت‌های ثانویه در این گیاه بررسی شد، نتایج حاصل نشان داد که بیشترین میزان رشد ریشه‌های موئین



و سنتز آلکامیدها در تیماری با حضور ۴۰ میکرومولار جاسمونیک اسید صورت می‌گیرد (فردی و همکاران، ۲۰۰۹).

## ۲-۱۴- سابقه ی پژوهشی تولید ریشه‌موئین در سایر گیاهان

توانایی آگروباکتریوم رایزوزنز در القاء ریشه‌های موئین گستره‌ای از گیاهان میزبان، سیستم مناسبی را جهت مطالعه تولید متابولیت‌های ثانویه فراهم آورده است. سهولت به‌دست آوردن ریشه‌های موئین و قابلیت سنتز مداوم ترکیبات شیمیایی مختلف، سبب برتری آنها به‌عنوان منبع تولید متابولیت‌های ثانویه گردیده است. تعدادی از گونه‌های گیاهی از جمله بسیاری از گیاهان دارویی به وسیله آگروباکتریوم رایزوزنز تراریخته شده و نتایج منتشر شده حاکی از توان تولید متابولیت‌های با ارزش دارویی توسط این ریشه‌ها می‌باشد. هانگ و همکاران (۱۹۹۷) در گیاه سرخدار (*Taxus brevifolia*) ریشه‌موئین را تولید و میزان تاکسول آنها ۲/۹ برار کالوس‌های *T. brevifolia* کشت شده در سوسپانسیون می‌باشد. بونهام و همکاران (۲۰۰۰) گزارش نمودند که آلکالوئید تروپاتی به وسیله ریشه‌های موئین گیاه بلادون (*Atropa belladonna*) بعد از ترانسفورم نمودن با آگروباکتریوم رایزوزنز تولید شد. آرگولو و همکاران (۲۰۰۰) تنظیم تولید سولاسودین را به وسیله ریشه‌های تراریخته با آگروباکتریوم رایزوزنز در گیاه تاجریزی گونه‌ی *Solanum ariculare* نشان دادند. گیری و همکاران (۲۰۰۱) ریشه‌های موئین را در آقنیتون (*Aconitum heterophyllum*) با استفاده از آگروباکتریوم رایزوزنز ایجاد نمودند. گنگ و همکاران (۲۰۰۲) ریشه‌های موئین از گیاه تاجریزی (*photeinocarpum*) را تولید کردند. ریشه‌های موئین به سرعت رشد کردند وزن خشک آنها بعد از ۴ هفته به ۴۲۰ برابر افزایش یافت و محتویات گلیکوآلکالوئیدها و ساپونین‌ها به ترتیب ۳۱ و ۱۰۷ برابر بیشتر از ریشه‌های غیرتراریخته بود. هم‌چنین سورت و همکاران (۲۰۰۳) ریشه‌های تراریخته را از نظر درصد تولید سزکوئی‌ترین آرتمیزین نسبت به گیاه کامل بهتر دانستند. هم‌چنین در پژوهشی دیگر تولید ریشه‌های موئین در گیاه خارمریم با استفاده از آگروباکتریوم رایزوزنز به عنوان منبعی برای تولید ترکیب دارویی سیلی مارین مورد مطالعه قرار گرفته است نتایج حاصل بیانگر وجود پنج ترکیب تاکسی‌فولین، سیلی کریستین، سیلی‌دیانین،

ایزوسیلی بین و سیلی بین به ترتیب ۰/۰۰۴، ۰/۰۶۴، ۰/۱۰۳، ۰/۰۴۴، ۰/۱۴ میلی گرم در گرم ماده تر بود. عمده‌ترین فلاولیگنان موجود در این ریشه‌ها سیلی بین بود. تولید موفق این فلاولیگنان می‌تواند سیستم مفیدی برای تولید یا مطالعه بیوسنتز سیلی مارین باشد (رهنما و همکاران، ۲۰۰۷). اکرمیان و همکاران (۲۰۰۸) بیماری‌زایی پنج سویه مختلف آگروباکتریوم رایزوزنز، 15834، A4، 1724، 2659 و LBA 9402 در انتقال ژنتیکی روی ریزنمونه‌های برگ‌ی چهار گونه گیاه بذربنج (*Hyscayamus*) را در دو نوع محیط کشت MS و B5 بررسی کردند. میزان القاء ریشه‌های موئین ثبت شد. نتایج نشان دادند که انواع مختلف سویه‌های باکتری تاثیر بسزایی در تولید ریشه‌های موئین داشتند در مقابل نوع محیط کشت هیچ تاثیری در ترانسفورماسیون و تولید ریشه‌ها نداشتند. بهترین سویه از لحاظ القاء 15834، 2659، LBA 9402 و 1724 به ترتیب در گونه‌های *H. kurdicus*، *H. arachnoideus*، *H. reticulatus* و *H. squarrosus* تعیین گردید. در مطالعه انجام‌شده توسط راموات و مرین (۲۰۰۸)، میزان تولید مونومرهای ایندول آلکالوئیدها در ریشه‌های موئین گیاه پریوش (*Catharanthus roseus*) بررسی شد، در این مطالعه سویه ۱۵۸۳۴ و تیمار هورمونی متیل جاسمونات استفاده شده است، پس از تولید ریشه‌های موئین میزان ترپن ایندول آلکالوئیدها به روش کروماتوگرافی سنجیده شد که نتایج حاکی از افزایش قابل توجه میزان این ماده در اثر تیمار با باکتری و متیل جاسمونات بود. در پژوهش دیگری انتقال ژن گزارشگر بتا گالاکترونییداز از طریق باکتری آگروباکتریوم رایزوزنز در ریشه‌های موئین گیاه سنبل ختایی (*Angelica gigas*) بررسی شده است. سویه R1601 حاوی وکتور دوگانه pK2GW7-GUS در این آزمایش مورد استفاده قرار گرفته و بعد از ۶ تا ۸ هفته بعد از هم-کشتی ریشه‌های موئین در ۵۰٪ ریزنمونه‌ها گزارش شد. انتقال ژن *Gus* از طریق آزمون هیستوشیمیایی تأیید گردیده است (پارک و همکاران، ۲۰۱۰).

جیتایاساترن و همکاران (۲۰۱۱) تاثیر سویه‌های مختلف باکتری (15384, A4, K599)، ژنوتیپ گیاهی و نوع ریزنمونه (میانگره‌ها، ساقه و دم‌برگ، برگ‌ها) را در ۱۴ گونه‌ی انگور بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که سویه ۱۵۸۳۴ و A4 موفق به القاء ریشه موئین در گونه‌های مختلف شدند و سویه‌ی K599 قادر به ایجاد ریشه موئین نشد و در بررسی نوع ریزنمونه بافت‌های ساقه، دم‌برگ و میانگره‌ها

بیشترین کارایی را در القاء ریشه موئین نشان دادند. صمدی و همکاران (۲۰۱۲) با بررسی نوع ریزنمونه در گیاه کتان زرد (*Linum mucronatum*) با استفاده از سویه A13 در ریزنمونه‌های هیپوکوتیل، کوتیلدون و ریشه موفق به تولید ریشه‌موئین شدند. درصد تولید ریشه‌های موئین بسته به نوع ریزنمونه از ۰ تا ۶۰٪ متفاوت بود. مشخص شد که ریزنمونه هیپوکوتیل بیشترین فراوانی (۶۰٪) را در القاء نشان دادند. اویی و همکاران (۲۰۱۳) نیز با بررسی توانایی سویه‌های مختلف آگروباکتریوم در ایجاد ریشه‌های موئین تاجریزی (*solanum mammosum*) نشان دادند که بین سویه‌های مختلف از لحاظ کارایی و فراوانی ترانسفورماسیون تفاوت وجود دارد که از بین سویه‌های مورد مطالعه سویه A13 و A4 بالاترین درصد تراریختی را داشتند. کبیرنتاج و همکاران (۲۰۱۳)، با بهینه‌سازی شرایط القاء و کشت ریشه‌های موئین گیاه کاسنی حاصل از تلقیح آگروباکتریوم ریزوژنز موفق به القای ریشه‌موئین شدند و بر اساس شدت ریشه‌زایی حاصل از سویه‌های آگروباکتریوم در محیط کشت‌های مختلف، بهترین سویه آگروباکتریوم به همراه محیط کشت بهینه جهت تثبیت کشت ریشه‌های موئین کاسنی تعیین گردیدند. زمان‌زاده و همکاران (۱۳۸۹)، با استفاده باکتری آگروباکتریوم ریزوژنز حاوی پلاسمید pRi15834-GUS با دوژن *GUS* و ژن مقاومت به کانامایسین در گیاه تنباکو موفق به ایجاد ریشه موئین شدند.

راشد و عبدالله (۲۰۱۳)، توسط سویه R1601 در گیاه لوبیای چشم بلبلی (*Vigna radiate*) موفق به ایجاد ریشه‌های موئین از ریزنمونه‌های ساقه (۱۰۰٪) شدند، کشت‌های ریشه موئین بعد از ۴۵ روز به‌طور خودبه‌خود و بدون استفاده از هورمون کالوس تولید و برخی از آنها بعد از دو ماه در محیط مشابه باززا شدند که گیاهچه‌های حاصل از باززایی به سهولت در محیط فاقد هورمون ریشه ایجاد کردند. در تحقیق دیگری القاء ریشه‌های موئین و میزان آیریدویدها و سکوریدویدها در گیاه دارویی کوشاد (*Gentiana scabra*) در حضور استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بررسی شده است. نتایج این تحقیق نشان دادند که میزان تشکیل ریشه‌موئین در ریزنمونه‌های برگ‌های این گیاه ۲۱٪ بوده و با استفاده از هورمون زآتین به میزان ۱

میلی گرم در لیتر میزان لگنیک اسید (loganic acid) ۶/۶ برابر و مقدار gentiopicroside ۱/۸ برابر نسبت به ریشه‌های طبیعی افزایش یافته است (هانگ و همکاران، ۲۰۱۴). استامام و همکاران (۲۰۱۴) تولید ریشه‌های موئین با استفاده از سویه‌های مختلف آگروباکتریوم‌رایزوزنز در ریزنمونه‌های مختلف گونه‌های گیاهی فلفل را بررسی کردند. در این آزمایش از ریزنمونه‌های کوتیلدون، هیپوکوتیل و ریشه‌چه دو گونه فلفل دلمه‌ای *C. annuum* و *C. frutescens* استفاده شده است، که اثرات متقابل بین سویه و ریزنمونه هر دو گونه تفاوت معنی‌داری در سطح یک درصد نشان داده‌اند، و ریزنمونه کوتیلدون با بیشترین کارایی در تشکیل ریشه‌موئین به عنوان بهترین ریزنمونه مشخص شده است. سیرینی‌واسان و همکاران (۲۰۱۴)، در آزمایشی القاء ریشه‌های موئین با دو سویه MTCC-532 و MTCC-2364 آگروباکتریوم‌رایزوزنز در گیاه هویج (*carota* *Duacus*) مورد مطالعه قرار دادند. نتایج حاصل بیانگر حداکثر تولید ریشه‌موئین از ریزنمونه‌های هویج تلقیح‌یافته با سویه MTCC-532 بود. در این آزمایش تاثیر استوسرینگون نیز بررسی شده است که تیمار ۱۵۰ میکرو مولار استوسرینگون افزایش فراوانی ترانسفورماسیون ۷۵ و ۶۰ درصد به ترتیب در سویه‌های MTCC-532 و MTCC-2364 را نشان داد.

فصل سوم

مواد و روش ها

### ۳-۱- مواد شیمیایی

عصاره مخمر، تریپتون واتر، سدیم کلراید، نیتрат آمونیوم، پتاسیم نیترات، منیزیم سولفات هپتا هیدرات، کلسیم کلرید ۲آبه، پتاسیم دی هیدروژن فسفات، منگنز سولفات ۴آبه، سولفات روی ۷آبه، پتاسیم یدید، سدیم مولیبدات ۲آبه، سولفات مس ۵آبه، کلرید کبالت ۶آبه، آهن، نیکوتنیک اسید، تیامین هیدروکلرید، پیروکسین هیدروکلرید، میواینوزیتول، ساکارز، آگار، سدیم هیدروکساید، اسید کلریدریک، تریس HCl، سدیم کلرید، EDTA، پودر CTAB، آمونیوم استات، کلروفورم، ایزوآمیل الکل، بتامرکاپتاتانول، ایزوپروپانول، گلوکز، سدیم هیدروکسید، سدیم دودسیل سولفات، پتاسیم استات، استیک اسید گلایکال، متانول، اتانول، گلیسرول، آگارز، safe red، فولین سیوکالتو (خریداری شده از شرکت MERCK آلمان)، آنتی بیوتیک ریغامپیسین، آنتی بیوتیک سفوتاکسیم، ماده تحریک کننده استوسرینگون، x-glucose، (خریداری شده از شرکت sigma (هند)، 1kb DNA Ladder و X-Gluc (خریداری شده از شرکت Fermentase) تهیه شدند. و آنزیم‌های کاربردی در بیولوژی مولکولی از شرکت‌های سیناژن (تهران) و اینترون (مشهد) تهیه شد. تمامی مواد مورد استفاده دارای درجه خلوص و بیولوژی مولکولی بود. آغازگرهای مود استفاده توسط شرکت تکاپوزیست سنتز شد.

### ۳-۱-۱- میکروارگانیزم‌ها

سویه‌های باکتری آگروباکتریوم رایزوتنز شامل A<sub>4</sub>, 15834, A<sub>13</sub>, 11325 از پژوهشکده ژنتیک و زیست-فناوری کشاورزی طبرستان و سویه‌ی AR15834 حاوی وکتور دوگانه pBI121 از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های ایران خریداری شدند.

### ۳-۲- دستگاه‌های آزمایشگاهی

اتوکلاو (Rozhin Teb، تهران، ایران)، آون (Heraeus، هانوا، آلمان)، ورتکس (US-100 BM، کره)، شیکر (JKA KS4000ic، آلمان)، میکروویو (LG، سئول، کره)، ژل داک (Arash- Teb، تهران، ایران)،

میکروسکوپ نوری (Olympus، توکیو، ژاپن)، هات پلینت (Heidolph، نورنبرگ، آلمان)، سانتریفیوژ (Universal 320R، آلمان)، سمپلر ۱۰۰μl، ۱۰۰۰μl و ۱۰۰۰۰μl (Eppendorf، هامبورگ، آلمان)، pH متر (Metrohm، پلیکان کریک، آلمان)، PCR (Mastercycler gradient، کانادا، امریکا)، یخچال فریزر ۲۰- (الکترواستیل، تهران، ایران)، پتری دیش شیشه‌ای و پلاستیکی (نوبن تجهیز، تهران، ایران)، اسپکتروفتومتر (U4V/VIS، شیمادزو، ژاپن)، هود شیمیایی (JEIO TECH، کره)، ترازو (SARTORIUS، آلمان) در این پایان‌نامه مورد استفاده قرار گرفت.

### ۳-۳- محیط کشت MS (Murashige and Skoog)

ترکیب نمکی محیط کشت MS (موراشیگ و اسکوگ، ۱۹۶۲) به طور گسترده‌ای در سیستم‌های مختلف کشت کاربرد دارد. ثابت شده است در ساخت این محیط کشت و همچنین سایر محیط‌های کشت، نه فقط حضور مواد مغذی ضروری، بلکه غلظت نسبی مواد غذایی غیرآلی مختلف، اهمیت زیادی دارد محلول‌های ذخیره مواد مغذی کم‌مصرف، پرمصرف و ویتامین‌ها در آب مقطر با غلظت‌های ۱۰ برابر و ۱۰۰ برابر همانگونه که در جدول ۳-۱ نشان داده شده است، تهیه شد.

### ۳-۴- کشت بذر و تهیه ریزنمونه

به منظور تهیه ریزنمونه، بذره‌های گیاه سرخارگل (*Echinacea purpurea*) از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه شد، بذره‌های سرخارگل در الکل اتیلیک ۷۰٪ به مدت ۱ دقیقه و در محلول هیپوکلریت سدیم ۱۰٪ به مدت ۱۵ دقیقه ضدعفونی شده و سپس ۳ بار با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. پس از ضدعفونی، بذور در محیط کشت جامد MS فاقد هورمون کشت شدند. برخی از کشت‌ها در اتاقک رشد

جدول ۳-۱- تهیه محلول‌های پایه موراشیگ و اسکوگ (MS)

Constituent	Concentration in MS medium (mg/l)	Concentration in the stock solution (mg/l)	Volume to be taken/Liter of medium(ml)
<b>Macronutrient (10x)</b>			
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	16500	<b>100</b>
KNO <sub>3</sub>	1900	19000	
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370	3700	
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	440	4400	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	1700	
<b>Micronutrient (100X)</b>			
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2	620	
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	22.3	2230	<b>10</b>
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8.6	860	
KI	0.83	83	
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.25	25	
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.025	2.5	
CoCL <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.025	2.5	
Fe.EDTA-Na salt	40	Aded fresh	
<b>vitamins</b>			
Nicotinic acid	0.5	50mg/100ml	<b>1</b>
Thiamine HCl	0.1	50mg/100ml	<b>0.2</b>
Pyridoxine HCl	0.5	50mg/100ml	<b>1</b>
Myo-inositol	100	Aded fresh	
Sucrose	30000	Aded fresh	
Agar	8000	Aded fresh	
<b>pH</b>	5.8		

با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و در شرایط تاریکی و برخی در شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. جوانه زنی بذور بعد از ۴-۵ روز شروع شد. پس از رشد گیاهچه، از ریزنمونه‌های هیپوکوتیل رشد یافته در تاریکی و همچنین ریزنمونه‌های برگ رشد یافته در شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و سن ۹۰،۶۰،۲۰ روزه استفاده شد. بدین منظور ابتدا پنس، اسکارپل، قیچی و



پلیت های شیشه‌ای به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد با فشار ۱/۵ اتمسفر اتوکلاو شدند، سپس هود لامینار توسط الکل ۷۰٪ ضدعفونی شد و برای رفع آلودگی‌های ثانویه لامپ UV به مدت نیم ساعت مورد استفاده قرار گرفت، سپس محیط‌های کشت حاوی گیاهچه به زیر هود لامینار انتقال داده شد و درب شیشه‌ها باز گردید و به کمک پنس و اسکارپل نمونه‌ها بریده و برای تهیه ریزنمونه بر روی پلیت‌ها منتقل گردید.

### ۳-۵- تکثیر باکتری

برای تکثیر سویه‌های باکتریایی 15834، 11325، A4 مقاوم به آنتی‌بیوتیک ری‌فامپیسین، A13 حساس به آنتی‌بیوتیک ری‌فامپیسین، 15834 حاوی ژن *GUS* مقاوم به آنتی‌بیوتیک کانامایسین، از محیط کشت LB (LB حاوی: عصاره مخمر 5g/l، پپتون 10g/l، NaCl 10 g/l، PH:7) استفاده گردید. پس از اضافه کردن این مواد، حجم محلول با آب مقطر به ۱۰۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد و pH آن بر روی ۷ تنظیم گردید. و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و با فشار ۱/۵ اتمسفر اتوکلاو گردید. برای تهیه محیط کشت جامد به محیط فوق ۱۵ گرم آگار اضافه شد.

غلظت مورد استفاده آنتی‌بیوتیک ری‌فامپیسین در محیط کشت باکتری ۵۰mg/l بود، به این منظور مقدار ۰/۰۵ گرم از پودر ری‌فامپیسین وزن و در ۲ میلی‌لیتر متانول حل شد سپس با آب مقطر به حجم رسانده شد. و جهت جلوگیری از آلودگی‌های احتمالی فیلتر گردید. غلظت آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم استفاده شده در محیط کشت ۵۰۰mg/l بود. ابتدا مقدار ۰/۵ گرم از پودر آنتی‌بیوتیک وزن و در آب مقطر دیونیزه حل و به حجم رسانده شد. این آنتی‌بیوتیک نیز فیلتر گردید. غلظت استوسرینگون مورد استفاده ۱۰۰ میکرومولار بود. جهت آماده سازی ابتدا مقدار ۰/۰۲ گرم از این ماده توزین و در ۲ میلی‌لیتر اتانول حل شد و با آب مقطر به حجم رسانده شد.

### ۳-۶- نگهداری باکتری‌ها در گلیسرول

به منظور نگه‌داری درازمدت باکتری‌ها، کلنی‌ها در محیط مایع واجد آنتی‌بیوتیک کشت داده شدند و پس از رشد باکتری‌ها، ۷۰۰ میکرولیتر از کشت مایع باکتری با ۳۰۰ میکرولیتر گلیسرول ۹۶٪ استریل، کاملاً در یک ویال مخلوط شده و در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری گردیدند.

### ۳-۷- کشت آگروباکتریوم رایزوزنز

در این مطالعه از باکتری *Agrobacterium rhizogenes* سویه‌های A<sub>4</sub> و 15834 تیپ آگروپین (سوون و اکسامان کالدنتی، ۲۰۰۲) و سویه A<sub>13</sub> تیپ میکی‌موپین (پاکدین و همکاران، ۲۰۱۳) و سویه AR15834 حاوی وکتور دوگانه pBI121 جهت تلقیح استفاده شد. سویه‌های باکتری در محیط کشت LB مایع حاوی ۵۰ mg/l آنتی‌بیوتیک ریفامپیسین برای سویه‌های A<sub>4</sub>، 11325، 15834 (به استثنای سویه A<sub>13</sub>)، به دلیل حساسیت این سویه به آنتی‌بیوتیک) و ۵۰ mg/l آنتی‌بیوتیک کانامایسین برای سویه AR15834 حاوی وکتور دوگانه pBI121 کشت و بر روی شیکر با سرعت ۱۱۰ rpm به مدت ۲۴ ساعت و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. بعد از رشد و اندازه‌گیری ۰/۵-۰/۴ OD، سانتریفیوژ در دمای ۴ درجه‌سانتی‌گراد و ۳۸۰۰ دور در دقیقه انجام شد و رسوب حاصل جهت تلقیح مورد استفاده قرار گرفت.

### ۳-۸- تراریختی ریزنمونه‌های برگ و هیپوکوتیل

جهت تراریخت نمودن ریزنمونه‌های برگ و هیپوکوتیل از روش هم‌کشتی تحت شرایط استریل استفاده شد. از آنجایی که ماده فنلی استوسرینگون از جمله عوامل موثر در القاء ریشه موئین می‌باشد ابتدا مناسب‌ترین غلظت استفاده شده در سوسپانسیون تلقیح از طریق اعمال تیمارهای مختلف غلظتی تعیین گردید. که افزودن غلظت ۱۰۰ میکرومولار آن بیشترین پاسخ به القاء را داشت. در روش هم‌کشتی ابتدا ریزنمونه‌ها در سوسپانسیون تلقیح حاوی ۱۰ میلی‌لیتر محیط MS ½ مایع، یک میلی‌لیتر رسوب باکتری آگروباکتریوم- رایزوزنز حاوی ۱۰۰ میکرومولار ماده القاء‌کننده استوسرینگون به مدت ۵ دقیقه غوطه‌ور شدند، بعد از این مدت ریزنمونه‌های تلقیح شده روی کاغذ صافی استریل خشک و در محیط MS ½ جامد فاقد هورمون هم- کشت شدند و به مدت ۴۸ ساعت در تاریکی قرار گرفتند. نمونه‌ی شاهد نیز با آب مقطر استریل شستشو و

بدون تلقیح با باکتری در محیط کشت قرار گرفت. ۲ روز بعد از هم‌کشتی، ریزنمونه‌ها به محیط تازه  $1/2$  MS جامد حاوی ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم جهت حذف باکتری منتقل شدند و کشت‌ها در فواصل دو هفته‌ای تا حذف کامل باکتری واکشت شدند. ریزنمونه‌های فاقد باکتری که بعد از چندین واکشت ریشه‌مویین تولید کردند به محیط  $1/2$  MS جامد عاری از آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم منتقل شدند. واز نوک ریشه‌ها که در این محیط به طور کامل رشد یافتند به اندازه ۲-۱ سانتی‌متر جدا کرده و در محیط  $1/2$  MS جامد تازه کشت شدند و در فواصل یک ماهه واکشت شدند. کشت‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و شرایط ۸ ساعت تاریکی و ۱۶ ساعت نور نگهداری شدند. پس از تثبیت کشت، ریشه‌های مؤین به محیط MS مایع انتقال یافتند.

### ۳-۹- استخراج DNA ژنومی

به منظور اثبات تراریخت بودن ریشه‌ها و حضور ژن *rol b* از ریشه‌های تراریخت احتمالی بدون آلودگی باکتریایی و ریشه‌های غیر تراریخت (شاهد) DNA استخراج گردید. استخراج DNA به روش CTAB (دویل و دوپیل، ۱۹۸۷؛ کالینگ، ۱۹۹۲) انجام گردید. ترکیب اصلی در این روش یک ماده شوینده (دترجنت) به نام CTAB می‌باشد، که علاوه بر خاصیت لیزکنندگی، با دارا بودن بارهای مثبت می‌تواند اطراف ملکول‌های DNA را که بار منفی دارند بپوشاند که این عمل DNA را تا حد زیادی از سایر ترکیبات جدا می‌کند. در این روش ابتدا مقدار ۱۰۰ تا ۲۰۰ میلی‌گرم از بافت گیاهی داخل هاون استریل با استفاده از ازت مایع سابیده، و به پودر سفیدرنگی تبدیل شد. نمونه‌های پودر شده را به تیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل که نام سویه‌ها از قبل روی آن نوشته شده‌است، سپس مقدار ۵۰۰ میکرولیتر محلول بافر CTAB (ترکیبات بافر CTAB حاوی پودر CTAB ۰/۲٪، NaCl ۵ مولار، EDTA ۰/۵ مولار و -base Tris ۱ مولار با pH ۸) اضافه شد (بافر CTAB قبلاً به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد). بعد از مخلوط کردن، نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد داخل بن‌ماری قرار گرفته طی این مدت چندین بار معکوس گردیدند. سپس به مدت ۱۰ دقیقه و ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. فاز رویی به میکروتیوب‌های

جدید و استریل منتقل گردید. مخلوط کلروفرم: ایزوآمیل‌الکل به نسبت ۱:۲۴ به مقدار ۲۵۰ میکرولیتر به هر میکروتیوب افزوده شد سپس، عمل معکوس کردن ۴ تا ۵ مرتبه انجام شد. سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه و ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد انجام شد و در این مرحله سه فاز تشکیل گردید. فاز رویی (که حاوی DNA است) به آرامی و با دقت به میکروتیوب جدید منتقل و مجدد کلروفرم: ایزو آمیل الکل هم حجم با مایع فاز رویی اضافه و سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه و ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه انجام گردید. ۵۰ میکرولیتر آمونیوم استات ۷/۵ مولار به هر میکروتیوب اضافه گردید، سپس مقدار ۵۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول سرد نیز به آن افزوده و تیوب‌ها چندین مرتبه معکوس شدند تا رسوب تشکیل شود. نمونه‌ها داخل فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۶ ساعت نگهداری شد. پس از سانتریفیوژ (به مدت ۱۰ دقیقه و ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه) رسوب سفید رنگی ته تیوب دیده شد. سپس با دو مرتبه شستشو با اتانول ۷۰٪ سرد و سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه و ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه داده شد ناخالصی‌های اضافی حذف شدند. به مدت نیم ساعت میکروتیوب را به صورت معکوس و در باز روی دستمال استریل قرار داده تا خشک شوند. بعد از خشک شدن مقدار ۳۰ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه اضافه گردید تا DNA حل شود. سپس نمونه DNA استخراجی در ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد به منظور بررسی کیفیت و اندازه‌گیری غلظت نگهداری شد.

### ۳-۱۰- بررسی کمی و کیفی DNA استخراج شده

به منظور تعیین خلوص و غلظت DNA استخراج شده از روش‌های اسپکتروفتومتری و الکتروفورز ژل آگاروز استفاده گردید.

### ۳-۱۰-۱- روش اسپکتروفتومتر

این روش روشی کمی است و ساده‌ترین روش اندازه‌گیری غلظت DNA تخلیص شده تعیین میزان جذب در ۲۶۰ نانومتر می‌باشد. مراحل انجام روش اسپکتروفتومتری به این صورت است که نیم ساعت قبل از انجام آزمایش دستگاه را روشن و هم‌چنین قبل از اندازه‌گیری نمونه کالیبره گردید که این کار با حلال مورد نظر (آب مقطر) انجام شد. جهت اندازه‌گیری از کووت کوارتز استفاده گردید ابتدا مقدار ۱۰ میکرولیتر از DNA

تخلیص شده داخل کووت ریخته و به مقدار ۱۹۹۰ میکرولیتر آب مقطر استریل اضافه شد سپس جذب در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر اندازه گرفته شد و با استفاده از نسبت جذب در ۲۶۰ نانومتر به جذب در ۲۸۰ نانومتر مقدار ناخالصی محاسبه گردید. DNA خالص و عاری از هرگونه ناخالصی دارای نسبت ۱/۸ می- باشد اگر این نسبت کمتر از ۱/۸ باشد شدت آلودگی با موادی مانند فنول زیاد است و اگر این نسبت از ۱/۸ بیشتر باشد میزان پروتئین در محلول زیاد است. بعد از انجام آزمایش غلظت DNA را با استفاده از فرمول زیر اندازه گیری شد:

(رابطه‌ی ۱-۳)

$$\text{DNA (میکروگرم در میلی‌لیتر)} = \frac{A_{260} * 50}{\text{ضریب رقت}} \frac{10}{2000}$$

### ۳-۱۰-۲- الکتروفورز ژل آگاروز

جهت تائید استخراج DNA از ریشه‌های موئین، نمونه‌های DNA استخراج شده روی ژل الکتروفورز یک درصد بارگذاری شدند. ژل یک درصد در بافر TAE (EDTA, Tris base, استیک اسید، آب مقطر) (جدول پیوست ۶) تهیه و الکتروفورز در ۸۰ ولت به انجام رسید و تصاویر ژل‌ها توسط دستگاه uvitech Gel documentation تهیه گردید.

### ۳-۱۱- تخلیص پلاسمید

استخراج پلاسمید جهت استفاده به عنوان کنترل مثبت در واکنش PCR انجام گردید و استخراج به روش لیز قلیایی انجام شد. ابتدا یک تک کلون از کشت جامد سویه‌های باکتری آگروباکتریوم رایزوزنز برداشته شد و در ۲۰ میلی‌لیتر محیط LB مایع حاوی ۲۰ میکرولیتر آنتی‌بیوتیک ریفامپیسین کشت شد و داخل شیکر با دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و ۸۰ دور در دقیقه به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفت. سانتریفیوژ به مدت ۸ دقیقه در ۳۸۰۰ دور در دقیقه انجام شد. رسوب حاصل همراه با مقداری از مایع رویی به میکروتیوب جدید منتقل و در ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳۰ ثانیه سانتریفیوژ شد. سپس رسوب حاصل در ۱۰۰ میکرولیتر محلول

شماره ۱ حل شد. محلول شماره ۱ حاوی ۵۰ میلی مولار گلوکز، ۲۵ میلی مولار تریس (pH = 8.0) و ۱۰ میلی مولار EDTA تهیه شد. محلول حاصل باید اتوکلاو گردد. ۲۰۰ میکرولیتر از محلول شماره ۲ (۲۰۰ میکرولیتر؛ ۰/۲ مولار NaOH و ۱ درصد SDS<sup>۱۸</sup>) به تیوب حاوی رسوب باکتریایی اضافه گردید و جهت حل شدن ۵ مرتبه معکوس شد. این محلول به صورت تازه باید استفاده شود. در مرحله بعد ۱۵۰ میکرولیتر از محلول شماره ۳ (۵۰ میلی مولار پتاسیم استات؛ ۱۱۵ ملی لیتر گلایکال استیک اسید) افزوده مخلوط حاصل بر روی یخ تکان داده شد تا اینکه به طور کامل حل شد. پس از حل شدن کامل سانتریفیوژ در ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق انجام و حجم مساوی با مایع رویی فنول:کلروفرم اضافه شد و به مدت ۱۰ ثانیه ورتکس گردید. سانتریفیوژ در ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲ دقیقه و دوبرابر مایع رویی اتانول ۷۰٪ جهت حذف ناخالصی‌های اضافی افزوده شد. سپس به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت. بعد از این مدت در ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و مجدد اتانول ۷۰ درصد افزوده شد. تیوب‌ها روی دستمال استریل تا از بین رفتن رطوبت الکلی قرار گرفتند سپس رسوب سفید رنگ حاصل در ۳۰ میکرو لیتر آب دیونیزه حل شد. پس از تخلیص، نمونه حاوی پلاسمید از نظر کیفیت و کمیت DNA، با روش اسپکتروفتومتری ارزیابی گردید.

### ۳-۱۲- آنالیز گیاهان تراریخت

در این تحقیق جهت آنالیز ریشه‌های موئین و تایید انتقال ژن به ژنوم گیاه مورد نظر از روش PCR با پرایمرهای اختصاصی ژن‌های *rolB* و *GUS* و هم‌چنین از روش سنجش هیستوشیمیایی ژن *GUS* در ریشه-های تراریخته و گیاهان باززا شده استفاده گردید.

### ۳-۱۲-۱- طراحی آغازگر

آغازگرها با در نظر گرفتن اصول استاندارد در طراحی آغازگر از جمله طول آغازگر، دمای اتصال، درصد

---

<sup>18</sup> Sodium Dodecyl Sulfate

C+G، ایجاد دایمر، تولید لوپ یا حلقه در درون هر یک از آغازگرها و  $\Delta G$  مناسب طراحی گردید. سنتز آغازگر توسط شرکت تکاپوزیست ایران انجام شد. خصوصیات آغازگرهای مورد استفاده جهت تکثیر ژنهای *GUS* و *rolB* در جدول ۲-۳ آورده شده است.

### ۳-۱۲-۲- تکثیر DNA با روش PCR (Polymerase chain reaction)

جهت انجام واکنش PCR مواد در زیر هود لامینار به صورت Master mix برای حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر تهیه شد که مقایر استفاده شده برای ژن *rolB* شامل ۱ میکرولیتر از هر آغازگر، ۰/۵ میکرولیتر نوکلئوتیدها، ۰/۵ میکرولیتر taq DNA پلیمرز، بافر 1X PCR، ۱ میکرولیتر کلرید منیزیم، براساس OD قرائت شده DNA و آب مقطر تارسیدن به حجم بود. سیکل دمایی برای هر جایگاه عبارت بود از ۵ دقیقه در ۹۴ درجه در ادامه ۳۰ سیکل شامل ۹۴ درجه برای ۱ دقیقه، درجه حرارت اتصال ۱ دقیقه و ۵۴ درجه، دمای سنتز ۷۲ درجه برای ۱ دقیقه با یک بسط نهایی ۷۲ درجه به مدت ۱۰ دقیقه، برای ژن *GUS* نیز همین شرایط با این تفاوت که دمای اتصال ۶۲ درجه در نظر گرفته شد. محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمرز بر روی ژل آگاروز ۱ درصد جداسازی شدند.

### ۳-۱۳- باززایی گیاه از ریشه‌های موئین

ریشه‌های موئین قابلیت تشکیل کالوس و باززایی گیاهان کامل را در محیط فاقد هورمون دارند. اما این کارایی در محیط فاقد هورمون پایین می‌باشد به همین دلیل در این تحقیق از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی جهت القاء کالوس و باززایی گیاه از ریشه‌های موئین استفاده گردید. بدین منظور قطعاتی از ریشه‌های موئین جهت تولید کالوس به محیط MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر BAP انتقال یافت، بعد از تشکیل کالوس‌های اولیه، قطعاتی از این کالوس‌ها جهت باززایی به محیط کشت باززایی (MS) حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP) منتقل شدند. سپس نوساقه‌های باززاشده به محیط کشت MS فاقد هورمون جهت ریشه‌دار شدن و تولید گیاه کامل انتقال یافتند.

جدول ۲-۳ مشخصات آغازگرهای مورد استفاده جهت تکثیر ژنهای *rolB* و *GUS*<sup>+</sup>

نام آغازگر	توالی 5' - 3'	دمای Annealing (°C)	طول نوکلئوتید	طول قطعه حاصل (bp)
Rolb Forward	ATGGATCCCAAATTGCTATTCCCCACGA	54	28	
Rolb Reverse	TTAGGCTTCTTTCATTTCGTTTACTGCAGC	54	30	780
GUS Forward	GGTGGGAAAGCGCGTTACAAG	62	21	320
GUS Reverse	TGGATTCCGGCATAGTAAA	62	20	

### ۳-۱۴- سنجش بیوشیمیایی *GUS* در ریشه‌های تراریخته

با توجه به اینکه در یکی از سویه‌های مورد استفاده در این تحقیق پلاسمید pBI121 حاوی ژن *GUS* به همراه  $Kan^+$  می‌باشد لذا این آزمون برای ریشه‌های موئن حاصل از این سویه انجام شده است. جهت سنجش بیوشیمیایی *GUS* با بررسی فنوتیپ گیاهان تراریخت، بیان ژن‌های انتقال‌یافته را به اثبات می‌رساند. در این روش ریشه‌های تراریخته مورد سنجش *GUS* قرار گرفتند. محلول اختصاصی برای رنگ آمیزی *GUS* طبق دستورالعمل زیر (جدول ۳-۳) تهیه گردید (جفرسون، ۱۹۸۷).



جدول ۳-۳- تهیه محلول رنگ‌آمیزی GUS

	Stock	Whant	Final (μl)
DDW			830
NaHPO <sub>4</sub> ( NH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	1M	0.1M	100
Ferrocianid	50 mM	1mM	20
EDTA	0.5M	10mM	20
Triton X-100	10%	0.1%	10
X gluc	0.1M	2mM	20

برای تهیه محلول X- Gluc (۵-برومو-۴-کلرو-۳-ایندولیل-بتا-دی گلوکورونید<sup>۱۹</sup>)، ۲۰ میلی‌گرم از پودر X- Gluc را در ۱ میلی‌لیتر DMSO حل کرده و در اندازه‌های ۵۰ میکرولیتر در فریزر و تاریکی نگهداری شد.

پس از تهیه محلول مورد نیاز به منظور بررسی صحت عملکرد محلول GUS، کمی باکتری آگروباکتریوم نوترکیب را در یک لوله اپندورف ۱/۵ میلی‌لیتری ریخته و سپس ۲۰ میکرولیتر از محلول فوق را به آن اضافه و به مدت ۲۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. ایجاد رنگ آبی نشان‌دهنده صحت عملکرد بافر تهیه شده است. قطعاتی از برگ‌ها و ریشه‌های تراریخت را درون میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری قرار داده و سپس حدود ۱۰۰ میکرولیتر محلول حاوی X- Gluc را به آن اضافه و در تاریکی دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از زمان طی شده با الکل ۷۰٪ شستشو تا کلروفیل نمونه‌ها خارج گردد. پس از کلروفیل زدایی کامل، رنگ آبی در نمونه‌های تراریخت قابل مشاهده است.

### ۳-۱۵- اندازه‌گیری ترکیبات ثانویه

#### ۳-۱۵-۱- عصاره‌گیری جهت استخراج ترکیبات فنلی

<sup>۱۹</sup> 5-bromo,4-chloro,3-indolyl-β-D-glucuronide

جهت عصاره گیری از روش عصاره گیری گرم (حاجی مهدی پور و همکاران، ۱۳۸۸) استفاده شد. ابتدا مقدار ۰/۰۱ گرم از پودر خشک شده ریشه‌های موئین و ریشه‌های غیر تراریخته (شاهد) به دقت توزین و در داخل ۲ میلی لیتر متانول ۸۰٪ کاملاً سائیده شد، مخلوط حاصل به مدت ۲ ساعت در بن ماری با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد گذاشته شد. پس از گذشت ۲ ساعت سانتریفیوژ در ۶۰۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد و مایع رویی با حلال متانول ۸۰ درصد به حجم ۲ میلی لیتر رسانده شد. عصاره حاصله جهت اندازه‌گیری ترکیبات فنلی مورد استفاده قرار گرفت.

### ۳-۱۵-۲- اندازه گیری میزان ترکیبات فنلی

اندازه‌گیری محتوای ترکیبات فنلی کل کلون‌های ریشه‌موئین و ریشه‌های شاهد (غیرتراریخته) با استفاده از روش فولین-سیوکالتو<sup>۲</sup> انجام شد. به این منظور ۴۰۰ میکرولیتر از عصاره درون لوله آزمایش درب‌دار اضافه شد و پس از افزودن ۳ میلی لیتر معرف فولین سیوکالتو رقیق شده با آب به نسبت (۱:۱۰)، در بن ماری با دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه قرار داده شد. سپس به آن ۳ میلی لیتر محلول بی-کربنات سدیم ۶ درصد اضافه و مجدداً در بن ماری با دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ دقیقه قرار داده شد. پس از گذشت زمان ۹۰ دقیقه جذب نمونه در طول موج ۷۲۵ نانومتر در مقابل نمونه شاهد آب اندازه‌گیری شد. لازم به ذکر است که نمونه شاهد نیز مانند نمونه تهیه شد با این تفاوت که به جای عصاره، ۴۰۰ میکرولیتر آب مقطر درون لوله آزمایش افزوده شد.

### ۳-۱۵-۳- تهیه‌ی منحنی استاندارد گالیک‌اسید با معرف فولین - سیوکالتو

جهت رسم منحنی استاندارد گالیک‌اسید، هر یک از محلول‌های استاندارد اسید گالیک با غلظت‌های ۰، ۰/۰۳، ۰/۰۷، ۰/۱۱، ۰/۱۵، ۰/۱۹ و ۰/۲۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در متانول ۸۰٪ حل شدند. از هر غلظت اسید گالیک ۱۰۰ میکرولیتر به هر یک از لوله‌های حاوی ۳ میلی‌لیتر معرف فولین سیوکالتو اضافه شد و در بن ماری با دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه قرار داده شد. محلول بی‌کربنات سدیم ۶ درصد (۳ میلی‌لیتر) اضافه گردید و مجدداً در بن ماری با دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ دقیقه قرار داده شد

<sup>2</sup> Folin-Ciocalteu

پس از گذشت ۹۰ دقیقه، جذب نمونه در طول موج ۷۲۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. از لوله آزمایش فاقد گالیک‌اسید به عنوان شاهد استفاده شد. منحنی استاندارد بر اساس مقادیر مختلف گالیک‌اسید و مقادیر جذب به دست آمده رسم گردید.

### ۳-۱۵-۴- اندازه‌گیری ترکیبات پلی‌ساکارییدی

محتویات پلی‌ساکاریدها به وسیله اسپکتروفتومتری در طول موج ۴۹۰ نانومتر با استفاده از روش فنل-اسید سولفوریک (اشلیگل و همکاران، ۱۹۸۶) و منحنی استاندارد گلوکز اندازه‌گیری شد.

### ۳-۱۵-۴-۱- روش فنل-اسید سولفوریک

در این روش ابتدا مقدار ۰/۱۱ گرم پودر گیاهی را توزین و درون فالکون ۱۵ میلی لیتری اضافه گردید و مقدار ۱۵ میلی لیتر اتانول ۸۰ درصد را که قبلاً گرم شده است به فالکون‌ها اضافه و درب آنها را محکم بسته و به مدت ۲۰ ثانیه ورتکس شد. سپس به منظور جدا کردن فاز جامد از مایع، فالکون‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید (میتوان به جای سانتریفیوژ، با استفاده از قیف و کاغذ صافی نمونه‌ها را در فالکون ۵۰ میلی لیتری صاف نمود و ۵ مرتبه با اتانول ۸۰ درصد شستشو داد و حجم را به ۴۰ میلی لیتر رسانید). فالکون‌ها را به مدت ۲۴ ساعت در آون با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده تا اتانول آن تبخیر شود (جهت تسریع در کار می‌توان محتویات فالکون درون پتری دیش شیشه‌ای بزرگ ریخته، درون آون بگذاریم تا در کمتر از ۲ ساعت نمونه‌ها خشک شود). پس از تبخیر الکل، ۴۰ میلی لیتر آب مقطر به فالکون‌ها افزوده، سپس ورتکس شد. به منظور حذف رسوبات اضافی و ترکیبات دیگر، مقدار ۵ میلی لیتر از محلول ۵ درصد سولفات روی و ۴/۷ میلی لیتر از محلول هیدروکسید باریوم ۳ درصد به آن اضافه کرده، مجدداً ورتکس انجام شد. نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. مقدار ۲ میلی لیتر از عصاره شناور به یک فالکون ۱۵ میلی لیتری منتقل شد. به هر فالکون مقدار ۱ میلی لیتر محلول ۵ درصد فنل اضافه و فالکون را به شدت تکان داده تا کف کند. یک تیوب نیز به عنوان شاهد با همین محتویات آماده گردید. زیر هود و به وسیله پیتور مقدار ۵ میلی لیتر اسیدسولفوریک ۹۸ درصد به داخل هریک از نمونه‌ها افزوده شد به دلیل وجود قند رنگ نمونه به سمت رنگ نارنجی تغییر پیدا کرد. پس

از گذشت ۴۵ دقیقه و با تثبیت رنگ قهوه ای مایل به زرد، میزان جذب نور با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۹۰ نانومتر قرائت گردید

### ۳-۱۵-۵-تهیه منحنی استاندارد گلوکز

مقادیر ۰، ۰/۰۲، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۱۵، ۰/۲ میلی گرم در میلی لیتر جهت رسم منحنی استاندارد توزین و داخل آب مقطر حل شدند، حجم محلول به ۱۰ میلی لیتر رسانده شد (۱ میلی لیتر فنل و ۵ میلی لیتر سولفوریک اسید) و جذب نمونه‌ها در ۴۹۰ نانومتر در مقابل کنترل آب اندازه‌گیری شد. منحنی استاندارد بر اساس مقادیر مختلف گلوکز و مقادیر جذب به دست آمده رسم گردید.

### ۳-۱۶-تجزیه آماری داده‌ها

در بخش اول این تحقیق جهت بررسی تاثیر نوع سویه باکتری آگروباکتریوم رایزوزنز و نوع ریزنمونه گیاه سرخارگل بر میزان القاء ریشه‌های موئین، آزمایشی به صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با ۴ تکرار انجام گرفت. فاکتورهای مورد بررسی شامل سویه‌ی باکتری در سه سطح (A4, A13, 15834) و ریزنمونه در دو سطح (برگ و هیپوکوتیل) در نظر گرفته شد. همچنین این آزمایش جهت بررسی تاثیر سنین مختلف ریزنمونه هیپوکوتیل در سه سطح (۲۰، ۶۰ و ۹۰ روز) و نوع سویه‌ی باکتری در سه سطح (A4, A13, 15834) بر میزان تشکیل ریشه‌های موئین نیز انجام شد. در بخش دوم این تحقیق جهت بررسی تاثیر سویه‌های مختلف باکتری در میزان تولید ترکیبات فنلی و محتوای پلی‌ساکاریدی ریشه‌های موئین آزمایشی بر پایه طرح کاملاً تصادفی با ۴ تکرار انجام گرفت. تجزیه و تحلیل آماری کلیه داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS و رسم نمودارها نیز توسط نرم افزار Excel و مقایسات میانگین با استفاده از آزمون LSD در سطح ۵ درصد انجام شد.

# فصل چہارم

## نتیجہ و بحث

کارایی آگروباکتریوم رایزوزنز در انتقال ژن از طریق مشاهده فراوانی تشکیل ریشه‌های موئین و همچنین تایید تراریختی آن‌ها با کاربرد آزمون PCR در ریزنمونه‌های برگ و هیپوکوتیل در گیاه دارویی سرخارگل تعیین گردید. فصل حاضر نتایج حاصل را در رابطه با تراریختی انواع ریزنمونه‌های برگ و هیپوکوتیل در تیمار با سویه‌های مختلف آگروباکتریوم رایزوزنز، تاثیر این فاکتورها در درصد تشکیل ریشه‌های موئین، تاثیر سنین مختلف ریزنمونه در تشکیل ریشه‌های موئین، تولید کالوس و باززایی ریشه‌های موئین و نیز تولید متابولیت‌های ثانویه ارائه می‌نماید.

#### ۴-۱- کشت بذر و تهیه ریزنمونه

اکثر بذور، ۴-۵ روز بعد از کشت در محیط  $\frac{1}{2}MS$  فاقد هورمون‌های گیاهی شروع به جوانه‌زنی کردند. و در سنین مختلف از گیاهان رشد یافته ریزنمونه تهیه شد (شکل ۴-۱).

#### ۴-۲- تراریختی ریزنمونه‌های برگ و هیپوکوتیل توسط سویه‌های A13، 15834، A4، 11325

در این مطالعه قدرت بیماری‌زایی آگروباکتریوم رایزوزنز توسط کارایی ترانسفورماسیون (زمان تشکیل ریشه موئین بر اساس تعداد روز بعد از تلقیح با باکتری) و درصد تشکیل ریشه‌های موئین در ریزنمونه‌های برگ و هیپوکوتیل تعیین گردید. نتایج نشان داد از بین سویه‌های مورد مطالعه سویه‌های A13، 15834، A4 در ریزنمونه هیپوکوتیل و سویه‌های A13، 15834 در ریزنمونه برگ موفق به القاء ریشه موئین شدند. سویه 11325 تنها منجر به ظهور کالوس و توده تومورمانندی در محل زخم شد و به دلیل عدم القاء ریشه‌های موئین در هر دو ریزنمونه از آنالیز آماری داده‌ها حذف گردید (شکل ۴-۲). در ریزنمونه‌های هیپوکوتیل، ۷-۱۵ روز و در ریزنمونه‌های برگ ۱۵-۲۰ روز بعد از هم‌کشتی و شستشو با آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم (۵۰۰ میلی-گرم در لیتر) و انتقال به محیط فاقد هورمون ریشه‌های موئین ظاهر شدند. در این بررسی مشاهده شد که زمان تشکیل ریشه موئین بر اساس تعداد روز بعد از تلقیح با سویه‌های مختلف

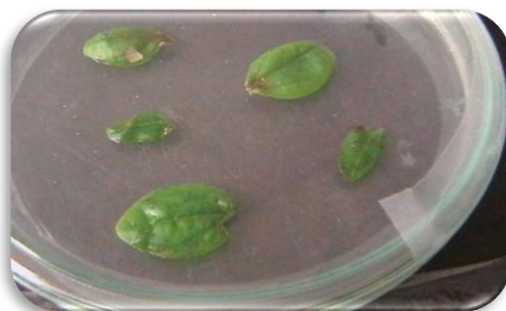
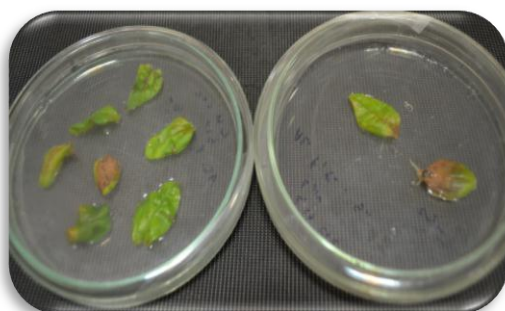


شکل ۴-۱- مراحل مختلف رشد گیاهچه جهت تهیه ریزنمونه: الف: مرحله جوانه‌زنی بذور. ب: گیاهچه‌های ۲۰ روزه. ج: گیاهچه‌های ۶۰ روزه. د: گیاهچه‌های ۹۰ روزه.

آگروباکتریوم رایزوزنز در هر دو نوع ریزنمونه برگ و هیپوکوتیل متفاوت می‌باشد، به طوریکه در ریزنمونه هیپوکوتیل تلقیح شده با سویه A4، ۷ روز و در سویه‌های A13 و 15834 به ترتیب ۱۰ و ۱۵ روز بعد از هم کشتی ریشه‌های موئین ظاهر شدند لذا کارایی ترانسفورماسیون در سویه A4 سریع‌تر از سایر سویه‌ها بود. و در ریزنمونه‌های برگ‌ی تلقیح یافته با سویه‌های A13 و 15834 به ترتیب ۱۵ و ۲۰ روز بعد از تلقیح ریشه‌های موئین مشاهده شدند در حالیکه در ریزنمونه‌های برگ‌ی تلقیح یافته با سویه A4 نیز هیچ ریشه‌ای مشاهده نگردید و بعد از گذشت یک ماه ریزنمونه‌ها قهوه‌ای شدند. لازم به ذکر است با این سویه در ریزنمونه برگ‌ی علاوه بر تلقیح به روش غوطه‌وری به روش تزریقی نیز تلقیح انجام شد ولی ریشه‌ای در هیچ کدام از روش‌ها مشاهده نگردید. بنابراین با توجه به نتایج فوق می‌توان اظهار نمود که از بین سویه‌های مورد مطالعه سویه‌ی A13 موثرترین سویه از لحاظ کارایی ترانسفورماسیون در گیاه سرخارگل بود.

در این تحقیق مشاهده گردید که از لحاظ ویژگی‌های مورفولوژی بین ریشه‌های طبیعی و ریشه‌های موئین تفاوت وجود دارد. ریشه‌های طبیعی داری الگوی رشدی ژئوتروپیک (زمین‌گرا) بودند، در حالیکه ریشه‌های موئین پاسخ رشدی پلاژیوتروپیک (عدم زمین‌گرایی) را نشان دادند که ممکن است رشد پلاژیوتروپیک به دلیل فقدان آمیلوپلاست در دانه‌های نشاسته‌ای ریشه‌های موئین باشد. آمیلوپلاست‌های نوک ریشه به عنوان حسگر ثقلی عمل کرده و رشد ریشه را به سمت پایین هدایت می‌کنند (کافی و همکاران، ۱۳۸۸). از اینرو به نظر می‌رسد که در مطالعات بعدی بهتر است به بررسی میکروسکوپی ریشه‌های موئین و مقایسه آنها با سایر ریشه‌ها پردازیم. ویژگی بارز دیگر اینکه ریشه‌های موئین در مقایسه با شاهد انشعابات بیشتری ایجاد کرده و کوتاه‌تر بودند که دلیل آن احتمالاً بیوسنتز بیشتر اکسین در ریشه‌های ترا ریخت است. در تایید این فرض، گزارش شده که افزایش غلظت اکسین در ریشه‌ها باعث ایجاد ریشه‌های فرعی بیشتر و کوتاه شدن طول ریشه‌ها می‌شود (تایز و زایگر، ۲۰۰۲) اکسین هم در مرحله شروع ریشه‌زایی و هم در طول شدن ریشه دخالت دارد (لئونگ و لی، ۲۰۰۲). ولی در این پایان‌نامه میزان اکسین سنجیده نشده که پیشنهاد می‌گردد در مطالعات آتی به اندازه‌گیری اکسین در مراحل رشدی پردازیم تا تغییرات حاصل از آن مورد مطالعه قرار گیرد.



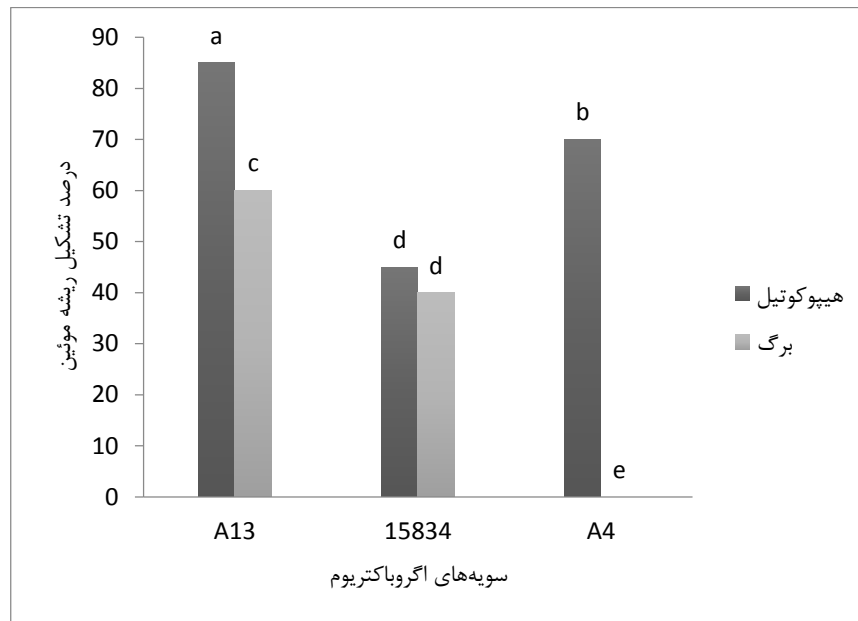


شکل ۴-۲- تشکیل ریشه‌های موئین سه هفته بعد از تلقیح. الف و ب) ریشه‌های موئین حاصل از تلقیح با سویه A13. ج) کالوس‌های ایجاد شده با سویه ۱۱۳۲۵. د) عدم تشکیل ریشه‌موئین در تلقیح با سویه A4 در ریزنمونه برگ. و) ریشه‌های موئین حاصل از تلقیح با سویه ۱۵۸۳۴. ه) عدم تلقیح (شاهد).

#### ۴-۳- تاثیر انواع سویه باکتری و ریزنمونه در میزان القاء ریشه موئین

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها (پیوست ۱) نشان داد که اثرات متقابل بین سویه‌های مختلف باکتری آگروباکتریوم رایزوتنز و انواع ریزنمونه‌های برگ و هیپوکوتیل در درصد تشکیل ریشه موئین در سطح ۱ درصد معنی دار بود. مقایسه میانگین داده‌ها (شکل ۴-۳) نشان داد که سویه A13 در ریزنمونه‌ی هیپوکوتیل بالاترین درصد تشکیل ریشه موئین (۸۵٪) را دارد و اختلاف معنی داری با ریزنمونه برگ تلقیح شده با سویه A13 (۶۰٪) نشان داد. همچنین در اثر تلقیح با سویه‌های A4 و 15834 به ترتیب ۷۰ درصد و ۴۵ درصد ریشه موئین در ریزنمونه هیپوکوتیل تولید شد. کمترین میزان درصد القای ریشه موئین از ترکیب تیماری سویه A4 و ریزنمونه برگ (صفر) بدست آمد. بین ریزنمونه‌های برگ و هیپوکوتیل تلقیح شده با سویه 15834 از نظر آماری اختلاف معنی داری وجود نداشت. انتقال T-DNA از طریق آگروباکتریوم به عوامل مختلفی نظیر ژنوتیپ و نوع ریزنمونه گیاهی، عوامل فیزیکی و شیمیایی مانند دما و دوره هم‌کشتی، سویه باکتری و مولکول‌های سیگنالی مانند استوسرینگون وابسته است (کیم و همکاران، ۲۰۰۴). لذا یکی از فاکتورهای اصلی در القاء ریشه‌های موئین نوع ریزنمونه استفاده شده می‌باشد، در این آزمایش دو نوع ریزنمونه برگ و هیپوکوتیل مورد بررسی قرار گرفت که ریزنمونه‌ی هیپوکوتیل در اثر تلقیح با تمام سویه‌ها موفق به تولید ریشه موئین شد در حالیکه در ریزنمونه‌ی برگ فقط دو سویه توانایی تولید ریشه موئین را نشان دادند. از طرفی درصد تشکیل ریشه موئین به طور میانگین در ریزنمونه هیپوکوتیل و برگ به ترتیب ۶۰٪ و ۳۳٪ بود. از این رو نتایج نشان می‌دهند که هر دو نوع ریزنمونه در القاء ریشه موئین موثر هستند ولی تاثیر ریزنمونه هیپوکوتیل بارز است. لذا پاسخ سریع ریزنمونه‌ی هیپوکوتیل سرخارگل به آگروباکتریوم رایزوتنز می‌تواند به چند دلیل باشد؛ اول اینکه ممکن است محل زخم در ریزنمونه هیپوکوتیل نسبت به ریزنمونه برگ در زمان تلقیح بیشتر در تماس با باکتری قرار گرفته باشد. ثانياً ممکن است به دلیل تفاوت در شرایط فیزیولوژیکی باشد، زیرا پتانسیل ریزنمونه‌ها در پاسخ به آگروباکتریوم رایزوتنز در بافت‌های مختلف یک گیاه متفاوت است. در ریزنمونه هیپوکوتیل به دلیل وجود سلول‌های مریستمی تقسیمات سلولی سریعتر در محل

زخم ایجاد شده آغاز می‌شوند. سلول‌های غیر فعال برگ به زمان بیشتری جهت تنظیمات سلولی نیاز دارند، همچنین فاکتورهایی مثل هورمون‌ها، فشار تورژسانس و کینازهای وابسته به سیکلین (CDKs) در گسترش و تمایز این سلول‌ها تاثیرگذار می‌باشند (تیانلی و پالین، ۲۰۰۰؛ مورل و همکاران، ۱۹۹۱).



شکل ۳-۴- مقایسه میانگین اثرات متقابل سویه باکتری و نوع ریزنمونه بر تشکیل ریشه- موئین.

در این مطالعه تأیید شده است که توانایی سویه‌های مختلف در انتقال ژن به سلول گیاهی متفاوت است. از بین سویه‌های بررسی شده در این آزمایش سویه A13 بیشترین کارایی در تشکیل ریشه‌های موئین را داشت. این تفاوت در بیماریزایی و مورفولوژی به پلاسمیدهای قرار گرفته در سویه‌های باکتری مرتبط است (ناین و همکاران، ۱۹۹۲). همچنین دلیل دیگر این تفاوت‌ها بیان متفاوت ژن‌های T-DNA ریشه‌های تراریخته، تعداد کپی‌های متعدد T-DNA وارد شده و اثرات محل ورود T-DNA به ژنوم گیاه می‌باشد

(اکرمیان و همکاران، ۲۰۰۸). تفاوت در ویژگی های رشدی و مورفولوژیکی ریشه موئین حاصل از سویه های مختلف باکتری، علاوه بر عوامل فوق به چگونگی تاثیر ژن های *rol* نیز نسبت داده می شود. بیان این ژن ها، سطوح داخلی هورمون های اکسینی و سیتوکینینی و یا میزان حساسیت سلول های گیاهی به سطوح داخلی هورمون های رشد را تغییر می دهد (شن و همکاران، ۱۹۹۸). در این میان، اکسین داخلی تاثیر ویژه ای بر رشد ریشه های موئین، ازدیاد انشعابات و توقف رشد خطی دارد. بدیهی است که نه تمامی سویه های آگروباکتریوم برای انتقال ژن به سلول گیاهی قابلیت بیماری زایی دارند، و نه تمامی گیاهان آماده پذیرش ژن بیگانه و باززایی هستند (دی داسک و همکاران، ۱۹۹۸). دلیل این پدیده چندان مشخص نیست و فقط می توان گفت که چنین حالتی در قالب اثرات متقابل گیاه پاتوژن قابل بحث است که یک گیاه پاسخ های متفاوتی را به نژادهای مختلف یک گونه بیماری زا می دهد. بنابراین، بهبود بیماری زایی باکتری و آمادگی سلول گیاهی، در افزایش احتمال انتقال T-DNA به سلول گیاهی نقش بسزایی دارد. هر گونه گیاهی دارای ساختار دیواره سلولی، وضعیت فیزیولوژیکی و مولکول های علامت دهنده متفاوتی است که ممکن است موجب تفاوت در توانایی تشکیل ریشه موئین در گونه های مختلف باشد همچنین توالی ژنوم باکتریایی و پلاسمیدی نقش بسزایی در القای ریشه موئین در گیاهان دارد. به طور مثال ژن های TL-DNA پلاسمید Ri موادی را سنتز می کنند که این مواد موجب تحریک سلول ها برای تمایز یابی به سمت تولید ریشه می شوند. عمل تمایز یابی تحت تاثیر اکسین درونی انجام می گیرد گاهی اوقات T-DNA ها شامل ژن های *tms* هستند که مستقیماً سبب سنتز اکسین و القای ریشه می شوند.

موفقیت در تولید ریشه موئین با سویه A13 آگروباکتریوم رایزوژنز در گیاهان دارویی متعددی گزارش شده است. از جمله در ریزنمونه های اپی کوتیل گرفته شده از محور جنینی بادام زمینی با سویه A13 ریشه های - موئین تولید شده است (آکاسا و همکاران، ۱۹۹۸). کبیر نتاج و همکاران (۲۰۱۳) نشان دادند که سویه A13 بالاترین کارایی در انتقال T-DNA به گیاه کاسنی را دارد. اویی و همکاران (۲۰۱۲)، تاثیر سویه های مختلف آگروباکتریوم رایزوژنز را در القای ریشه های موئین در گیاه تاجریزی (*Solanum mammosum*) بررسی و نتیجه گرفتند که از نظر کارایی ترانسفورماسیون بین سویه های مختلف مورد بررسی تفاوت وجود

دارد. از بین سویه‌های مطالعه شده در این تحقیق سویه‌های A13 و A4 بالاترین درصد تراریختی به ترتیب ۸/۱۳٪ و ۱۰/۶۰٪ را نشان دادند. پاکدین و همکاران (۲۰۱۳) سویه‌های مختلف اگروباکتریوم رایزوزنز در القاء ریشه‌های موئین سنبل الطیب استفاده کردند که سویه A13 قادر به تولید ریشه موئین در این گیاه نبود. صمدی و همکاران (۲۰۱۲) با بررسی نوع ریزنمونه در گیاه *Linum mucronatum* با استفاده از سویه A13 در ریزنمونه‌های هیپوکوتیل، کوتیلدون و ریشه نشان دادند ریزنمونه هیپوکوتیل کارایی بیشتری در تشکیل ریشه‌های موئین (۶۰٪) را دارد.

#### ۴-۴- تاثیر سن ریزنمونه در القاء ریشه‌های موئین

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها (جدول پیوست ۳) نشان داد، اثرات متقابل سویه‌های مختلف باکتری و سنین مختلف ریزنمونه‌ی هیپوکوتیل (۲۰، ۶۰ و ۹۰ روز) در درصد القاء ریشه‌ی موئین در سطح ۱ درصد معنی‌دار بود. مقایسه میانگین داده‌ها (شکل ۴-۴) نشان داد که سویه A13 در ریزنمونه‌های ۲۰ روزه بیشترین درصد تشکیل ریشه‌ی موئین (۱۰۰٪) را داشت که با سایر ترکیبات تیماری اختلاف معنی‌داری را نشان داد. در ریزنمونه‌های سنین ۶۰ و ۹۰ روزه هیپوکوتیل با استفاده از سویه 15834 و نیز ریزنمونه‌های ۹۰ روزه با استفاده از سویه A4 قادر به تشکیل ریشه‌های موئین نبودند. از طرفی القای ریشه‌های موئین در ریزنمونه‌های ۲۰ روزه در مقایسه با ریزنمونه‌های ۶۰ و ۹۰ روزه سریعتر و با کارایی بالاتری انجام شد. نتایج محققین دیگر نیز نشان داده است که سن ریزنمونه گیاهی تاثیر مهمی بر تولید ریشه‌های موئین دارند، زیرا سن سلول گیاهی تعیین‌کننده ویژگی‌های فیزیولوژیکی آن است (نتاج و همکاران، ۲۰۱۳). زمان انتخاب ریزنمونه، نکته مهمی است که در پاسخ‌دهی ریزنمونه کشت‌شده تاثیر می‌گذارد. به طور کلی بهتر است بافت‌های دارای سلول‌های زنده جوان به عنوان ریزنمونه مورد استفاده قرار گیرند، زیرا سلول‌های تشکیل‌دهنده بافت‌های جوان دارای واکوئل کوچکی هستند (نسبت هسته به کل سلول زیاد است) و بنابراین فعالیت و توانایی زیادی (در مقایسه با سلول‌های مسن) در ایجاد ریشه‌ی موئین دارند. در ریزنمونه‌ی برگ

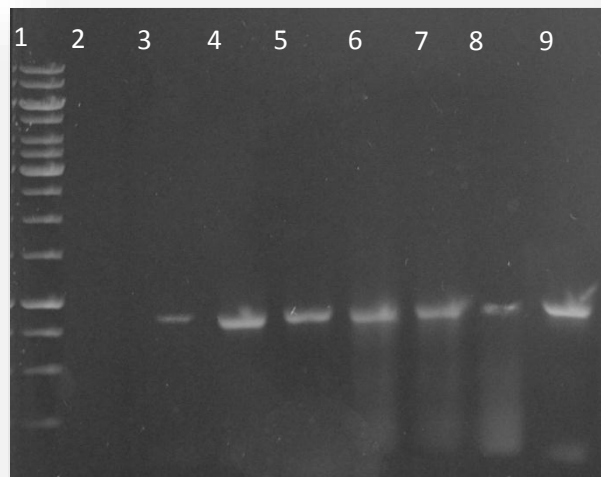
فقط سن ۲۰ روزه موفق به ریشه‌زایی شد و در بررسی سایر سنین ریشه‌ای مشاهده نگردید و بعد از مدتی بافت‌های برگ‌ی قهوه‌ای و از بین رفتند.



شکل ۴-۴- مقایسه میانگین اثر متقابل سویه باکتری و سن ریز نمونه بر تشکیل ریشه موئین.

#### ۴-۵- تأیید تراریختی ریشه‌های موئین با واکنش PCR با پرایمرهای ژن *rolB*

اگرچه مورفولوژی رشد پلاژیوتروپیک سریع با تولید انشعابات فراوان در محیط کشت فاقد هورمون، معرف ریشه‌های موئین مورد مطالعه بود، با این حال بررسی ماهیت تراریخته آنها توسط تکنیک PCR برای تکثیر قطعه ای از ژن *rolB* با استفاده از دو جفت آغازگر اختصاصی انجام شد. نتایج حاصل از تفکیک محصولات واکنش PCR و آشکارسازی باندها حضور ژن *rolB* (تکثیر قطعه مورد انتظار ۷۸۰ bp) در ژنوم سلول‌های ریشه‌های موئین را تأیید نمود (شکل ۴-۵).



شکل ۴-۵. تکثیر قطعه DNA مورد انتظار (780bp) در واکنش‌های PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن *rolB* آگروباکتریوم رایزوزنز بر روی ریشه‌های موئین سرخارگل: ۱: نشانگراندازه DNA یک کیلوبازی، ۲: عدم تکثیر قطعه مورد انتظار از DNA ریشه طبیعی، ۳ و ۴: قطعه‌ی تکثیر شده از DNA ریشه موئین حاصل از سویه‌های A4، ۵ و ۶: قطعه‌ی تکثیر شده از DNA ریشه موئین حاصل از سویه‌های A13، ۷ و ۸: قطعه‌ی تکثیر شده از DNA ریشه موئین حاصل از سویه‌های 15834، ۹: قطعه‌ی تکثیر شده از DNA باکتری آگروباکتریوم رایزوزنز سویه A13 (کنترل مثبت).

#### ۴-۶- تراستی ریزنمونه‌های هیپوکوتیل و برگ توسط سویه AR15834 حاوی وکتور دوگانه

##### pBI121

در این تحقیق علاوه بر سویه‌های A4، A13، 15834 سویه AR15834 حاوی وکتور دوگانه pBI121 استفاده شد. وکتور دوگانه pBI121 حاوی ژن *uidA* کد کننده  $\beta$ -گلوکونیداز (*Gus*) می‌باشد و توالی کد کننده GUS تحت نظر توالی کد کننده پرموتور 35s ویروس موزایک گل کلم (CaMV) می‌باشد. هر دو نوع ریزنمونه برگ و هیپوکوتیل گیاه سرخارگل موفق به تولید ریشه موئین با استفاده از سویه‌ی AR15834-pBI121 آگروباکتریوم رایزوزنز شدند (شکل ۴-۶). در ریزنمونه‌های هیپوکوتیل و برگ به ترتیب بعد از یک و دو هفته ریشه‌های موئین ظاهر شدند. درصد القاء ریشه موئین توسط این سویه در ریزنمونه هیپوکوتیل (۷۵٪) بیشتر از ریزنمونه برگ (۵۵٪) بود.

با تولید ریشه موئین با استفاده از این سویه‌ی آگروباکتریوم که حاوی وکتور دوگانه است مشخص شد که باکتری آگروباکتریوم رایزوزنز قادر است که علاوه بر T-DNA ی پلاسمید Ri خود، T-DNA ی موجود بر روی هر ناقل دوگانه دیگری را که در این باکتری حضور داشته باشد، به طور هم‌زمان به سلول گیاه هدف منتقل نماید. بدین ترتیب در طی یک فرایند تراریزش مضاعف باعث القای ریشه های موئین تراریخته می-گردد. اخیراً استفاده از ناقلین بیان دوگانه برای انتقال ژن بواسطه آگروباکتریوم رایزوزنز به گیاهان مختلفی مانند سیب زمینی (*Solanum tuberosum*) (وایسر و همکاران، ۱۹۸۹)، بلادن (*Atropa belladonna*) (ساتیو و همکاران، ۱۹۹۲) گزارش شده است.

#### ۷-۴- تأیید تراریختی ریشه‌های موئین حاصل از تلقیح سویه AR15834- pBI121 از طریق

##### واکنش PCR

صحت انتقال ژن توسط بارگذاری محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱٪ و الکتروفورز مورد تایید قرار گرفت. طول قطعه تکثیرشده برای ژن *GUS*، 320bp بود (شکل ۷-۴).

#### ۸-۴- آزمون هیستوشیمیایی *GUS*

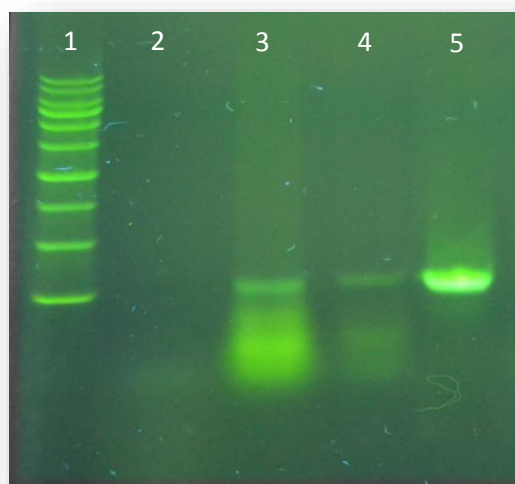
بیان ژن *GUS* در گیاه باعث تولید آنزیم بتاگلوکورونیداز می شود که باعث تبدیل سوبسترای بی رنگ X-gluc به رنگ آبی می‌گردد. با توجه به حضور ژن *GUS* که در واقع کد کننده آنزیم بتا گلوکورونیداز می‌باشد در ریشه‌های تراریخت باعث بیان این آنزیم و توانایی ریشه در مصرف سوبسترای آن شده و در نتیجه پس از افزودن سوبسترای این آنزیم به ریشه آبی رنگ شدن ریشه‌ها دلیل علمی قاطعی مبنی بر تراریخت بودن آنها می‌باشد (نرمین و تیجن، ۱۹۹۹).

همانطور که در شکل ۸-۴ (ب و ج) مشاهده می‌شود ریشه‌های تراریخت آبی رنگ شده‌اند که نشان‌دهنده بیان ژن *GUS* و در نتیجه تأیید انتقال Ri-T DNA به گیاه می‌باشد در حالیکه ریشه شاهد (غیر تراریخت) هیچ تغییر رنگی نشان نداد (شکل ۸-۴ الف). زمان‌زاده و همکاران (۱۳۸۹) نیز با استفاده از سویه



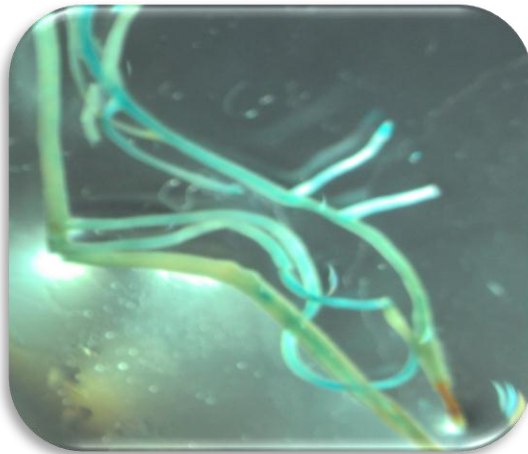
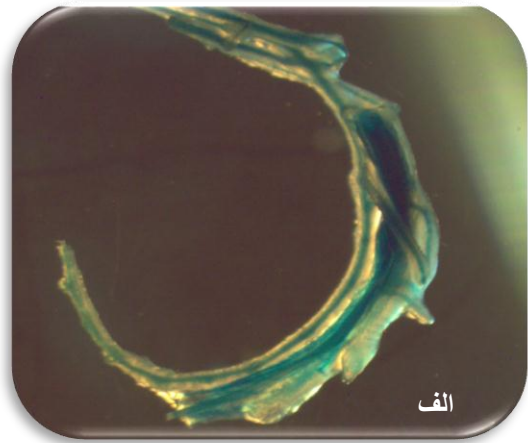
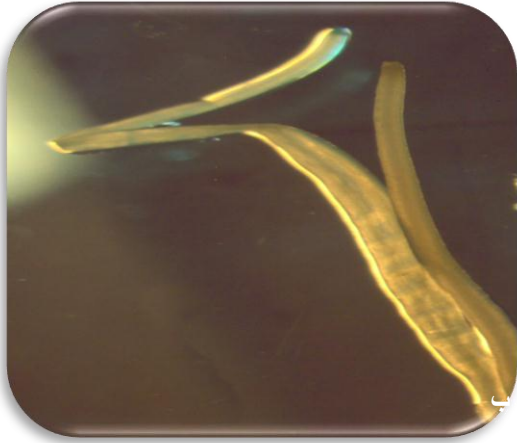


شکل ۴-۶- ریشه‌های موئین تولید شده در ریزنمونه‌های برگ و هیپوکوتیل گیاه سرخارگل ، ۳ هفته بعد از تلقیح با سویه‌ی AR15834- pBI121 الف: نمونه شاهد که ریشه‌ای مشاهده نشد. ب: ریزنمونه برگ. ج: ریزنمونه هیپوکوتیل.



شکل ۴-۷- تکثیر قطعه DNA مورد انتظار (320bp) در واکنش‌های PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن GUS اگروباکتریوم رایزوتنز بر روی DNA ریشه‌های موئین سرخارگل: ۱: نشانگر اندازه DNA یک کیلو بازی، ۲: عدم تکثیر قطعه مورد انتظار از DNA ریشه طبیعی، ۳ و ۴: قطعه‌ی تکثیر شده از DNA ریشه موئین حاصل از سویه AR15834- PBI121: ۵: قطعه‌ی تکثیر شده از DNA ی باکتری اگروباکتریوم رایزوتنز سویه AR15834- pBI121 (کنترل مثبت).

pRi15834-PRT355-GUS با دوزن *GUS* و ژن مقاومت به کانامایسین در گیاه تنباکو موفق به ایجاد ریشه موئین شدند. بنابراین بیان ژن *GUS* به خوبی تراریخته بودن ریشه‌های، ایجاد شده در این مطالعه را نشان می‌دهد. میزان شدت رنگ آبی در نوک ریشه‌ها و ریشه‌های جانبی در حال تشکیل و تارهای کشنده بیشتر بود. این بخش‌ها مناطقی می‌باشند که سلو‌ها در حال تکثیر هستند. احتمالاً بیان *GUS* و در نتیجه ژن مولد اکسین در این مناطق به دلیل فعالیت بیشتر سلول‌ها از نظر متابولیسمی بیشتر می‌باشد. با توجه به اینکه یکی از منابع مهم مولد اکسین در برگ‌های جوان در مریستم راسی انتهایی ساقه است، بنابراین می‌توان پذیرفت که در ریشه‌های تراریخت سلول‌های بخش مریستمی ریشه اکسین بیشتری تولید نمایند.



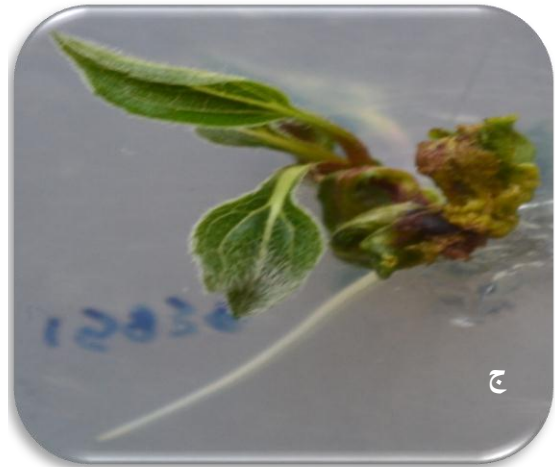
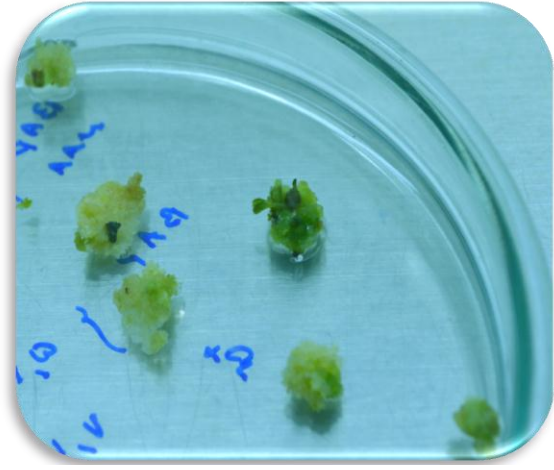
شکل ۴-۸- تصویر استریومیکروسکوپی ریشه های موئین ۵- ۴ هفته پس از تولید روی قطعات برگ و هیپوکوتیل پس از تیمار با سوبسترای *X-Gluc* الف : ریشه شاهد غیر تراریخت . ب و ج : ریشه های تراریخت، رنگ آبی نشان دهنده بیان ژن بنا گلوکورونیداز و تراریخت بودن ریشه ها است.

#### ۴-۹- القاء کالوس و باززایی ریشه‌های موئین

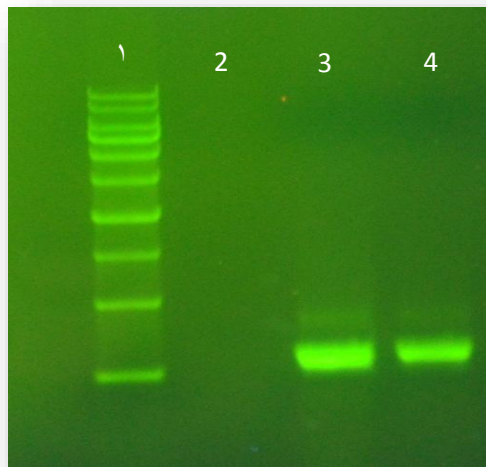
ریشه‌های تراریخته از قابلیت تولید کالوس و باززایی گیاهان کامل نیز برخوردارند. باززایی موفق گیاهان تراریخته در اغلب موارد بستگی به شرایط کشت درون شیشه ای آن گونه دارد. با این وجود، ژنوتیپ و جوان بودن قطعه جدا کشت مناسب هم بسیار مهم است. گیاهان باززایی شده از ریشه‌های موئین مانند خود آنها، ثبات ژنتیکی دارند. اما در بعضی موارد گیاهان تراریخته در مقایسه با گیاهان شاهد، فنوتیپ متفاوتی را نشان می‌دهند. گیاهان باززا از ریشه‌های تراریخته، سندرم ریشه‌موئین را نشان می‌دهند که حاصل بیان ترکیبی لوکوس‌های *rolA*، *rolB* و *rolC* پلاسمید Ri در ژنوم گیاه است. و از ویژگی‌هایی همچون رشد سریع، تشکیل جوانه‌های جانبی فراوان، و تولید سریع برگ نیز برخوردار می‌باشند. در این بررسی مشاهده شد که در ریشه‌های موئین منتقل شده به محیط کالوس‌زایی (محیط MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر BAP) پس از گذشت ۳ هفته کالوس‌ها تشکیل شدند (شکل ۴-۱۰: الف). قطعاتی از این کالوس‌ها به محیط MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP جهت باززایی انتقال یافتند و بعد از گذشت ۱۰ روز باززایی نوساق‌ها صورت گرفت. سپس نوساق‌ها به محیط کشت MS فاقد هورمون جهت ریشه‌دار شدن و تولید گیاه کامل انتقال یافتند (شکل ۴-۹: ب، ج، د). اگرچه باززایی نوساق‌ها به طور خودبه خود و بدون نیاز به هورمون در ریشه‌های موئین صورت گرفت اما فراوانی تولید در محیط فاقد هورمون خیلی پایین بود بنابراین استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی (NAA و BAP) منجر به افزایش میزان باززایی گردید. در برخی مطالعات نشان داده شده است که ورود ژن‌های خارجی به ویژه ژن مولد اکسین توسط آگروباکتریوم رایزوزنز به گیاه باعث بر هم زدن تعادل هورمون‌های گیاهی شده که خود باعث القاء ریشه در گیاهان تراریخت، کاهش غالبیت انتهایی، افزایش شاخه دهی و ایجاد برگ‌های چروکیده می‌گردد. گیاهان باززا از ریشه‌های تراریخت در مطالعات حاضر نیز از نظر شکل ظاهری کم و بیش چنین ویژگی‌هایی را نشان دادند. به عنوان مثال کوتاه شدن طول ساقه و فشرده شدن برگ‌ها قبلاً نیز در گیاهان تراریخت باززا گزارش شده است. در تحقیقی باززایی از ریشه‌های موئین ترانسفورم‌شده با سویه DCAR-2 حاوی وکتور دوگانه pBI121 در گیاه گوجه‌فرنگی (*Lycopersicon esculentum*) بررسی شده است. در این مطالعه تشکیل کالوس پس از

۲ هفته در محیط حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر کینتین آغاز شد، شاخه‌زایی از کالوس‌ها در محیط حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر GA3 و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA صورت گرفته است که بیان ژن موجود در وکتور دوگانه آگروباکتریوم رایزوزنز گیاه گوجه‌فرنگی تراریخت تولید گردید (مقاله و همکاران، ۲۰۰۴). گونجان و همکاران (۲۰۱۳) باززایی گیاه از ریشه‌های موئین تولیدی با باکتری آگروباکتریوم رایزوزنز در گیاه *Solidago nemoralis* را گزارش کردند.

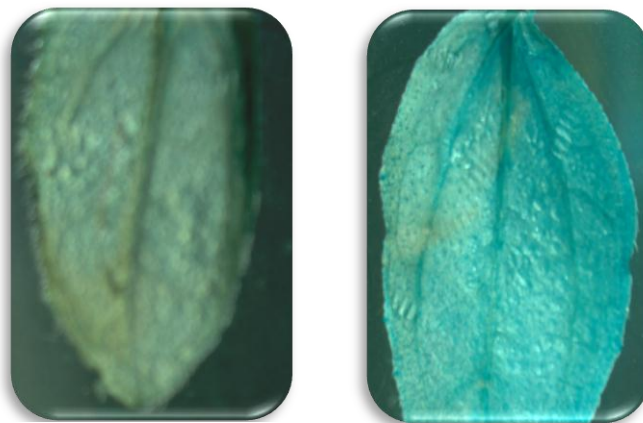
واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراس با استفاده از آغازگرهای اختصاصی برای ژن *GUS* و نیز رنگ‌آمیزی برگ‌ها با محلول *GUS* تولید گیاه تراریخت سرخارگل از ریشه‌های موئین را اثبات کرد. تکثیر قطعه ۳۲۰ جفت بازی در گیاه تراریخت موید ورود ژن *GUS* به داخل ژنوم گیاه می‌باشد (شکل ۴-۱۰). نتایج آزمون هیستوشیمیایی *GUS* بر روی برگ جدا شده از گیاه تراریخت، نشانگر بیان ژن *GUS* در آنها بود. در نمونه کنترل (گیاه غیر تراریخت) بیان ژن *GUS* مشاهده نشد و هیچ‌گونه رنگ آبی مشاهده نشد (شکل ۴-۱۱).



۴-۹- مراحل کالوس‌زایی و باززایی گیاه سرخارگل از ریشه‌های مونین. الف: تشکیل کالوس، ب و ج: مرحله آغاز باززایی نوساقه‌ها، د: انتقال به محیط فاقد هورمون.



شکل ۴-۱۰- تکثیر قطعه DNA مورد انتظار (320 bp) در واکنش‌های PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن *GUS* اگروباکتریوم رایزوزنز بر روی DNA گیاه تراریخت سرخارگل: ۱: نشانگراندازه DNA 1000bp، ۲: عدم تکثیر قطعه مورد انتظار از DNA برگ طبیعی، ۳: قطعه‌ی تکثیر شده از DNA برگ تراریخت حاصل از سویه AR15834- pBI121، ۴: قطعه‌ی تکثیری از DNA باکتری اگروباکتریوم رایزوزنز سویه AR15834- pBI121.



شکل ۴-۱۱- رنگ‌آمیزی برگ‌های گیاه تراریخت برای حضور محصول ژن *GUS*. الف: گیاه تراریخت حاوی ژن *GUS*، ب: گیاه غیر تراریخت (شاهد).



#### ۱۰-۴- اندازه‌گیری متابولیت‌های ثانویه

##### ۱-۱۰-۴- ترکیبات فنلی

مقدار ترکیبات فنلی کل به روش فولین سیوکالتو و بر مبنای منحنی استاندارد اسیدگالیک (  $y = 3.7303x + 0.0595$ ،  $R^2 = 0.9863$ ) محاسبه گردید (شکل ۴-۱۲). جذب‌های قرائت شده مربوط به غلظت‌های مختلف گالیک اسید در جدول ۴-۱ آمده است.

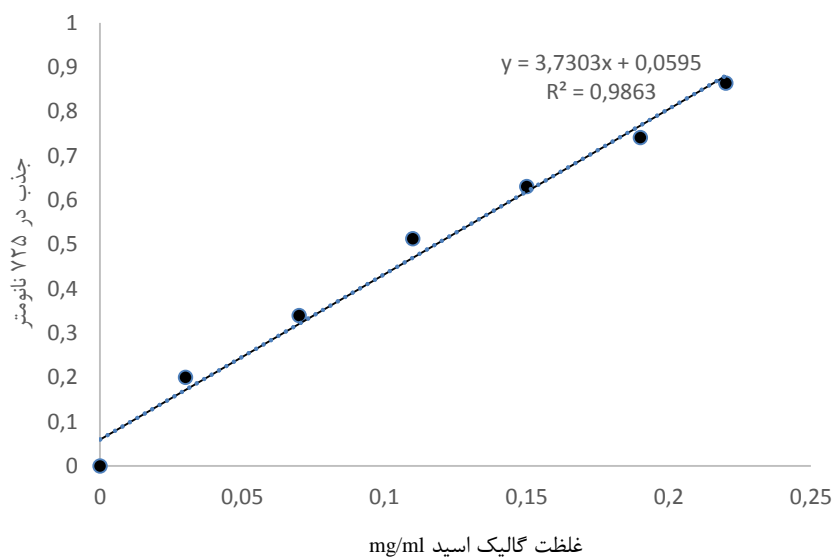
نتایج آنالیز واریانس داده‌ها نشان داد که میزان ترکیبات فنلی کل در ریشه‌های موئین نسبت به نمونه شاهد (ریشه طبیعی) بر اساس سوبه باکتری استفاده شده جهت ریشه‌های موئین، در سطح ۱ درصد معنی‌دار بود. مقایسه میانگین تیمارها نشان داد که بیشترین میزان فنل ( $20/16 \text{ mg/g DW}$ ) مربوط به کشت‌های حاصله از سوبه A13 و کمترین مقدار فنل ( $11/58 \text{ mg/g DW}$ ) مربوط به نمونه‌ی شاهد بود. در میزان ترکیبات فنلی ریشه‌های موئین حاصل از سوبه A4 و 15834 اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (شکل ۴-۱۳). ونگ و همکاران (۲۰۰۶) در بررسی میزان ترکیبات فعال دارویی ریشه‌های موئین حاصل از تراریختی با آگروباکتریوم رایزوزنز در گیاه سرخارگل، ترکیبات فنلی و محتوای پلی‌ساکاریدی را استخراج کردند که به ترتیب مقادیر  $3/16\%$  و  $3/3\%$  بدست آوردند که نسبت به نمونه شاهد افزایش نشان داد.

##### ۲-۱۰-۴- محتوای پلی‌ساکاریدی

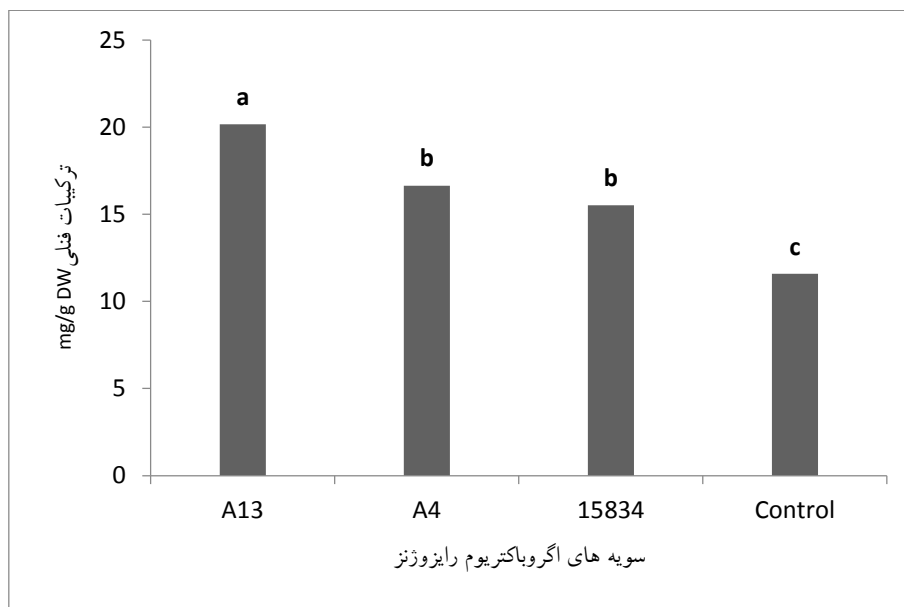
محتوای پلی‌ساکاریدی تام به روش فنل-اسیدسولفوریک و بر مبنای منحنی استاندارد گلوکز (  $y = 6.9629x - 0.0054$ ،  $R^2 = 0.9886$  ) محاسبه گردید (شکل ۴-۱۴). نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که میزان محتوای پلی‌ساکاریدی تام ریشه‌های موئین در مقایسه با نمونه شاهد (ریشه طبیعی) در سطح ۱ درصد معنی‌دار بود. مقایسه میانگین تیمارها نشان داد که بیشترین میزان پلی‌ساکاریدها (  $11/6 \text{ mg/g DW}$ ) مربوط به کشت‌های حاصل از سوبه A13 بود، در حالی که کشت‌های

جدول ۴-۱- مواد و محلول‌های مورد نیاز جهت رسم منحنی استاندارد گالیک اسید.

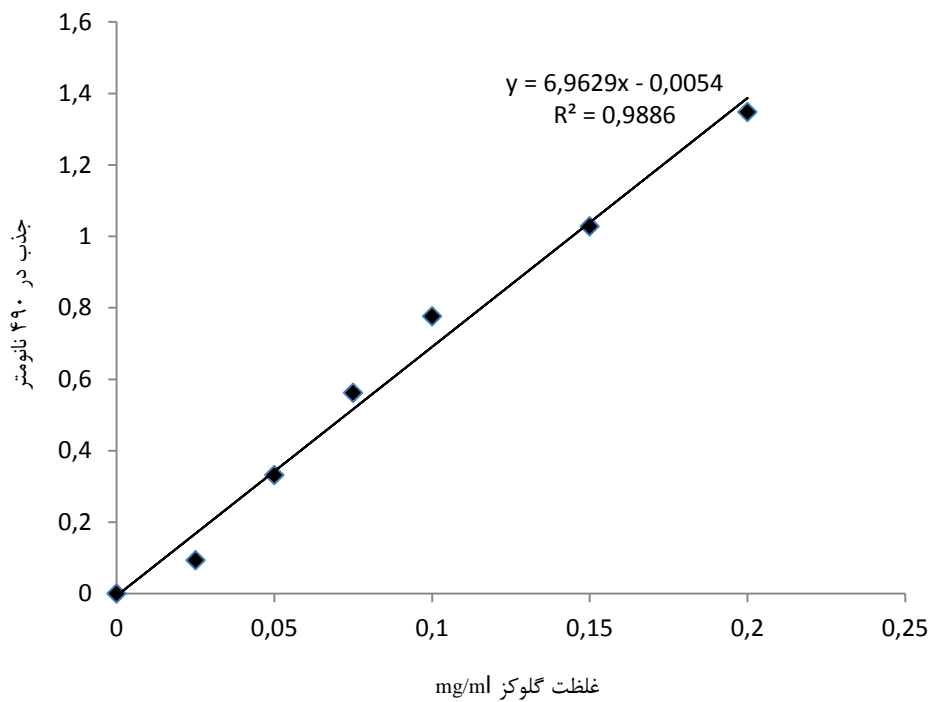
جذب در ۷۲۵					
نانومتر					
شماره لوله	محلول گالیک اسید (mg/ml)	تکرار اول	تکرار دوم	تکرار سوم	تکرار چهارم
شاهد	۰	۰	۰	۰	۰
۱	۰/۰۳	۰/۱۳۶	۰/۱۷۶	۰/۲۸۸	۰/۲
۲	۰/۰۷	۰/۴۵۹	۰/۳۴۲	۰/۲۴۲	۰/۳۴
۳	۰/۱۱	۰/۵۲۳	۰/۵۷۴	۰/۴۴۲	۰/۵۱۳
۴	۰/۱۵	۰/۵۶۹	۰/۷۸۶	۰/۵۳۹	۰/۶۳۱
۵	۰/۱۹	۰/۶۶۷	۰/۸	۰/۷۵۶	۰/۷۴۱
۶	۰/۲۲	۰/۸۷۴	۰/۸۳	۰/۸۹	۰/۸۶۴



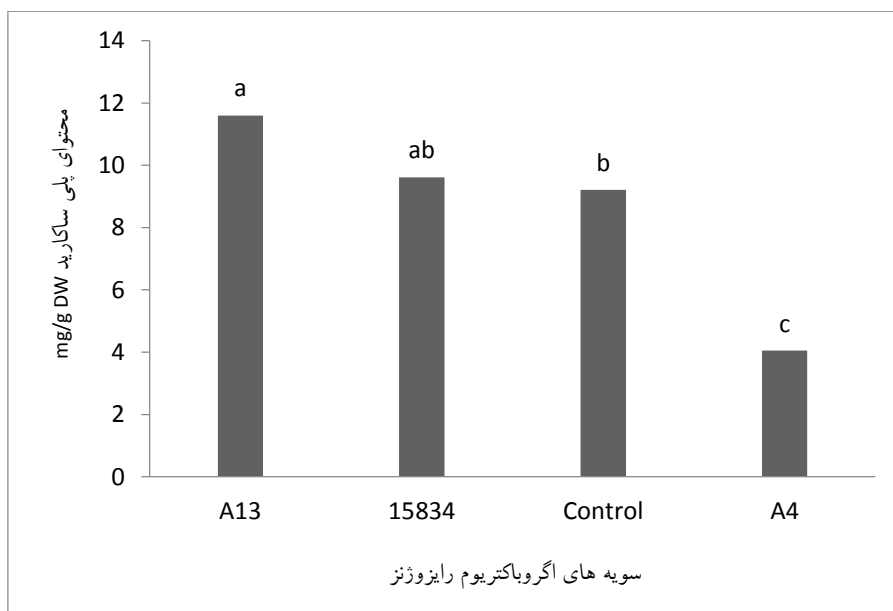
شکل ۴-۱۲- نمودار منحنی استاندارد گالیک اسید به روش فولین-سیوکالتو.



شکل ۴-۱۳ - مقایسه میانگین اثر سویه های آگروباکتریوم رایزوتنز بر میزان ترکیبات فنلی کل ریشه های مونین گیاه سرخارگل .



شکل ۴-۱۴- نمودار منحنی استاندارد گلوکز به روش فنل- اسیدسولفوریک.



شکل ۴-۱۵- مقایسه میانگین اثر سویه های آگروباکتریوم رایزوتنز بر محتوای پلی- ساکاریدی ریشه های موئین تولیدی در گیاه سرخارگل.

حاصل از سویه A4 کمترین میزان پلی ساکارید (۴/۰۵ میلی گرم بر گرم وزن خشک) را نشان داد که حتی از نمونه شاهد (۷/۶ mg/g DW) کمتر بود (شکل ۴-۱۵).

طی سال‌های اخیر کشت ریشه‌های موئین جهت تولید متابولیت‌های ثانویه و مطالعه‌ی مسیر بیوسنتز متابولیت‌ها کمک شایانی به بهبود و تقویت تحقیقات در زمینه بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه کرده است. نتایج بدست آمده از مطالعه حاضر حاکی از این است که ترکیبات فنلی در ریشه‌های موئین نسبت به نمونه شاهد افزایش معنی‌داری داشت. در بررسی‌های انجام گرفته توسط کبیرنتاج و همکاران (۲۰۱۳) در بین کلون‌های ریشه‌های موئین کاسنی حاصل از تلقیح سویه‌های مختلف آگروباکتریوم، مقدار ترکیبات فنلی تغییرات معنی‌داری نشان دادند. دلیل این تفاوت را می‌توان به علت حضور مقادیر متفاوتی از T-DNA باکتری در سلول‌های تراریخته اولیه هر کلون و یا بیان متفاوت ژن‌های T-DNA باکتری در سلول‌های کلون‌های مختلف دانست. باتوجه به عدم قطعیت در تعداد کپی و مکان ورود T-DNA به ژنوم گیاه میزبان و همچنین برهمکنش آنها با ژنهای اطراف، ریشه‌های موئین ایجاد شده اغلب الگوهای متفاوتی از تجمع متابولیت‌های ثانویه را نشان می‌دهند. پاسخ‌های دفاعی گیاه منجر به بیوسنتز و تجمع انواع ترکیبات ثانویه گیاهی می‌شود. حمله پاتوژن‌ها یا زخمی شدن گیاه منجر به القاء پاسخ‌های دفاعی و به دنبال آن بیوسنتز ترکیبات ثانویه همچون فنل و فلاونوئیدها می‌گردد. از مهم‌ترین دلایل اهمیت ترکیبات فنلی عملکرد آنها در مکانیسم‌های دفاعی می‌باشد شرایط تنشی همچون جراحت و آلودگی میکروبی سبب افزایش بیوسنتز ترکیبات فنلی می‌شود، بنابراین فاکتورهای محیطی تاثیر به‌سزایی در محتوای فنل‌ها دارند. فنل‌ها به دلیل ساختار و گروه‌های هیدروکسیلی که دارند عموماً ترکیباتی با قدرت آنتی‌اکسیدانی قوی هستند. گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) مولکول‌های کنشگر شیمیایی اکسیژن داری مانند یون‌های اکسیژن و پراکسیدها هستند که نقش مهمی در ایجاد بیماری‌های خطرناکی چون سرطان و بیماری‌های قلبی- عروقی ایفاء می‌کنند و خنثی‌سازی اثر آنها توسط آنتی‌اکسیدان‌ها و سیستم‌های جاروب کننده رادیکال‌ها صورت می‌گیرد. همچنین مشاهده شده که

بیان آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز (PAL) نیز در اثر زخم و محل پاتوژن افزایش ی و منجر به سنتز محصولات فنلی بیشتری می شود. از آنجا که استفاده از آگروباکتریوم به منظور تلقیح و ایجاد ریشه موئین خود می تواند به عنوان نوعی عامل پاتوژن برای گیاه عمل کند، به نظر می رسد که گیاه با به کارگیری سیستم دفاعی خود اقدام به مقابله با باکتری می کند و در پی آن مقادیر فنل تولید شده بالا می رود. در این پایان نامه نیز مشاهده گردید که میزان ترکیبات فنلی در تیمار با سویه های مختلف آگروباکتریوم ریزوژنز افزایش یافت.

مشخص شده است که شش اپرون در سمت چپ ناحیه T-DNA (ژنهای *Vir*) وجود دارد که عملکرد آنها برای انتقال ژنوم باکتری به ژنوم گیاه الزامی است. نواحی *Vir G* و *Vir A* با هم پروتئینی را رمزگذاری می کنند که رونویسی از سایر ژنهای *Vir* را فعال و به دنبال آن انتقال ژن صورت می گیرد. عوامل فعال کننده ناحیه *Vir A* شامل pH اسیدی، ترکیبات فنلی مانند استوسیرینگون و گروه های مشخصی از منوساکاریدها می باشد. این منوساکاریدها با ترکیبات فنلی به صورت سینرژیک (تشدیدکننده) عمل می کنند (آنکبر و نستری، ۱۹۹۰). بنابراین احتمال می رود ازدیاد تولید ترکیبات فنلی توسط گیاه که به منظور دفاع در مقابل عامل پاتوژن صورت می گیرد خود به عنوان عاملی برای تلقیح بهتر عمل کند و از آنجا که ریشه های موئین ایجاد شده دارای پایداری ژنتیکی هستند تولید مداوم ترکیبات فنلی را در بر خواهند داشت. در این مطالعه مشاهده شد که سویه های مختلف آگروباکتریوم ریزوژنز مقادیر متفاوتی از فنل را تولید نمودند که می تواند ناشی از تفاوت در مکان جایگیری T-DNA در ژنوم سلول ترا ریخت باشد. انتقال ترکیب مناسبی از ژنهای *rol* از باکتری به گیاه برای تشکیل ریشه های موئین لازم است و انتقال تنها یکی از این ژن ها نمی تواند همه ویژگی های سندرم ریشه موئین را نشان دهد. آذر مهر و همکاران (۱۳۹۱) گزارش کردند که میزان ترکیبات فنلی در دودمان های مختلف ریشه های موئین گیاه کاسنی تفاوت معنی داری را نشان داد که این گزارش با یافته های مطالعه حاضر مطابقت دارد.

کربوهیدرات های محلول به فراوانی در ریشه گیاه سرخارگل دیده می شود. به همین منظور محتوای پلی ساکارییدی ریشه های موئین به دست آمده از سویه های مختلف در این تحقیق مورد بررسی قرار گرفتند. بر

اساس نتایج بدست آمده از این تحقیق محتوای پلی ساکاریدهای تام در ریشه‌های القاء شده توسط سوبه-های A13، 15834 افزایش و این ترکیبات در کشت‌های حاصل از سوبه A4 کاهش یافتند. احتمالاً نوع ترانسفورماسیون این ریشه‌ها به گونه‌ای بوده است که باعث بیان بالا و افزایش عملکرد آنزیم‌های دخیل در متابولیسم کربوهیدرات‌ها و در نهایت افزایش تولید آنها شده است. با وجود ثبات ژنتیکی در ریشه‌های موئین می‌توان با کنترل و ثابت نگه داشتن عوامل محیطی دیگر و واکشت مداوم ریشه‌ها در دراز مدت و یا با انتقال آنها به بیوراکتور تولید کربوهیدرات و سایر متابولیت‌ها را در حد تولید تجاری آنها گسترش داد. نتایج موجود تثبیت پایداری کشت‌های ریشه موئین با افزایش سرعت رشد و نیز تولید متابولیت‌های ثانویه در این گیاه را نشان دادند. رشد پایدار ریشه‌های تراریخته و وجود طیف گسترده‌ای از تولیدات ثانویه مهم از جمله مشتقات اسید کافئیک، ترکیبات فنلی، آلکامیدها بیانگر این است که کشت ریشه‌های موئین سرخارگل پتانسیل مناسبی به عنوان یک سیستم تولیدی سودمند دارند. این ریشه‌ها می‌توانند منبعی نوید بخش در تولید پایدار و متوازن متابولیت‌ها تحت شرایط کنترل شده باشند، بدون اینکه توانایی بیوسنتزی و ژنتیکی خود را از دست بدهند (گیری و ناراسو، ۲۰۰۲) و هم‌چنین می‌توان اظهار داشت که آنها انتخاب مناسبی در مهندسی متابولیک مسیرهای متابولیت‌های ثانویه در افزایش تجمع و ترشح متابولیت‌های با ارزش بالا خواهند بود (آروو و همکاران، ۲۰۰۲). حتی در مورد گیاهانی که متابولیت‌های ثانویه آنها در بخش هوایی انباشته می‌شوند در کشت‌های ریشه موئین این گیاهان نیز تجمع متابولیت‌ها دیده شده است (بکالی و همکاران، ۱۹۹۷؛ ودرز و همکاران، ۲۰۰۵).

#### ۴-۱۱- نتیجه‌گیری کلی

در این مطالعه ریزنمونه‌های برگ و هیپوکوتیل استفاده شده موفق به تولید ریشه‌موئین شدند. سنین مختلف ریزنمونه‌های هیپوکوتیل نیز در ریشه‌زایی موثر بودند. نتایج نشان داد که اثر متقابل معنی‌داری میان دونوع ریزنمونه (برگ و هیپوکوتیل) و سوبه‌های مختلف باکتری از نظر درصد تشکیل ریشه‌موئین در سطح یک درصد وجود دارد. فرایند انتقال T-DNA از آگروباکتریوم به درون ژنوم سلول‌های گیاه میزبان

مستلزم مشارکت دو سویه باکتری و سلول گیاهی است. تشخیص سلول‌های گیاهی مستعد توسط باکتری با مکانیسم کموتاکسی صورت می‌پذیرد. در گام بعدی، T-DNA دیواره سلولی گیاهی اهمیت ویژه‌ای در اتصال باکتری به سلول گیاه دارد. از طرفی بیان ژن‌های توالی مرزی راست T-DNA ژن‌های ناحیه *vir* پلاسمید و کروموزم باکتری نقش موثری در عمل انتقال T-DNA از پلاسمیدها دارند. بنابراین فرایند انتقال یک رابطه دوجانبه میان باکتری و گیاه است از این رو لازم است به منظور یافتن ترکیب مطلوب سویه‌های باکتری و ژنوتیپ گیاهی، مجموعه‌ای از سویه‌های باکتریایی بر روی ژنوتیپ مورد نظر آزمون گردند. داده‌های بدست آمده در این تحقیق افزایش میزان ترکیبات فنلی کل و نیز محتوای پلی‌ساکاریدی در ریشه‌های تراریخت را نسبت به غیر تراریخت تأیید می‌کند از این یافته می‌توان استنباط کرد که سویه‌های مختلف باکتری آگروباکتریوم رایزوزنز در بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه تأثیرگذار می‌باشند. بنابراین می‌توان با انتخاب سویه مناسب تولید این ترکیبات را در کشت‌های ریشه موئین افزایش داد.

#### ۴-۱۲- پیشنهادات

- ۱- تولید گیاهان کامپوزیت در گیاه سرخارگل با استفاده از آگروباکتریوم رایزوزنز؛ گیاهان کامپوزیت دارای اندام هوایی طبیعی با ریشه‌های موئین ترانسژنیک هستند که به وسیله آگروباکتریوم رایزوزنز ترانسفورم شده‌اند این گیاهان جایگزین مناسب برای کشت ریشه‌های موئین مشتق شده از کشت بافت برای مطالعات ژنتیکی می‌باشند زیرا یکی از محدودیت‌های مهم ریشه-های موئین فقدان اندام هوایی است.
- ۲- استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی در محیط کشت تلقیح و القاء ریشه‌های موئین؛ توصیه می‌شود غلظت‌های مختلف از تنظیم‌کننده‌های رشد در تولید ریشه‌های موئین این گیاه بررسی گردد چرا که مشخص شده است که هورمون‌های رشدی هم در افزایش القاء ریشه‌های موئین و هم‌چنین در بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه تأثیر گذار بودند.



۳- استفاده از ایسیتورهای زیستی و غیر زیستی جهت افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهی؛ دست‌ورزی محیط‌های کشت سلولی با استفاده از ایسیتورهای زیستی از راهکارهای مهم جهت القای متابولیسم ثانویه و افزایش تولید متابولیت‌های ارزشمند می‌باشد. ایسیتورهای زیستی از طریق فعال‌سازی مکانیسم‌های دفاعی باعث القای تشکیل متابولیت‌های ثانویه و پاسخ‌های فوق‌حساسیتی می‌شوند. پیشنهاد می‌شود جنبه‌های مختلف امکان‌افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در کشت ریشه‌های موئین گیاه سرخارگل با استفاده از ایسیتورهای زیستی مورد بررسی قرار گیرد.

۴- با توجه به افزایش جمعیت کره زمین و عدم کفایت وسعت زمین‌های کشاورزی برای کشت انواع گیاهان به منظور تامین مواد اولیه دارویی، کشت ریشه‌های موئین می‌تواند به عنوان روشی جایگزین به کار رود. به این منظور بهتر است تلقیح قطعات جداکشت با سویه‌های آگروباکتریوم رایزوزنز بارها صورت گرفته و دودمان‌هایی از ریشه موئین با صفات برتر غربال شوند.

۵- تنظیمات سلولی، سلول‌های ریزنمونه برگ یکی از دلایل پاسخ کند این ریزنمونه به تلقیح با آگروباکتریوم رایزوزنز است بنابراین پیشنهاد می‌شود فاکتورهای همچون هورمون‌ها، فشار تورژسانس و کینازهای وابسته به سیکلین‌ها که منجر به گسترش و تمایز این سلول‌ها می‌شوند در مطالعات بعدی مورد آزمایش قرار گیرند.

# منابع

۱. امیدبگی، ر. تولید و فرآوری گیاهان دارویی، چاپ ششم، ۱۳۹۰، شرکت به نشر، مشهد. جلد اول.
۲. امیدبگی، ر. ۱۳۸۱. بررسی کشت و سازگاری سرخارگل در شمال تهران. مجله علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی ایران. ۶(۲): ۲۴۰-۲۳۱.
۳. اکبری، ز.، قادری، ا.، کلاته جاری، س.، مهرآفرین، ع.، نقدی بادی، حسنعلی. ۱۳۹۱. "تغییرات بیوسنتز تریگونلین تحت تأثیر ترکیبات نیتروژنه در کشت ریشه های موین سنبليله (*Trigonella foenum-graecum* L.) ایرانی". فصلنامه گیاهان دارویی. ۱۱(۲): ۱۲۸-۱۳۵.
۴. حبیبی خانیانی، ب. معینی، ا. عبدالهی، م. ۱۳۸۴. تولید متابولیت‌های ثانویه و مواد دارویی از طریق کشت بافت و سلول‌های گیاهی. فصلنامه گیاهان دارویی. ۴(۱۴): ۶-۱.
۵. حسنلو، ط.، رضازاده، ش. رهنما، ح. ۱۳۸۷. ریشه‌های موئین منبعی برای تولید ترکیبات با ارزش دارویی. فصلنامه گیاهان دارویی. ۸(۱): ۱۷-۱.
۶. فارسی، م. ذوالعلی، ج. اصول بیوتکنولوژی گیاهی (ترجمه)، چاپ چهارم، ۱۳۸۸، انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد، ۴۹۵ صفحه.
۷. کافی، م.، زند، ا.، کامکار، ب.، مهدوی دامغانی، ع.، عباسی، ف. شریفی، ح. فیزیولوژی گیاهی (ترجمه)، چاپ اول، ۱۳۸۸، انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد، ۷۳۲ صفحه.
۸. مدرسی، م. اسدی، ص. ۱۳۹۱. بررسی تاثیر عصاره هیدروالکلی سرخارگل بر پارامترهای خون در موش کوچک آزمایشگاهی. فصلنامه علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی لرستان. ۴(۲): ۴۹-۴۳.

۹. زمان زاده، ز.، احسان‌پور، ع.ا.، امینی، ف. ۱۳۹۰. " بررسی میزان اکسین در گیاهان باززائی شده

از ریشه های تراریخت تنباکو (*Nicotiana tabacum* L.) حاوی " Ri -T DNA" مجله علمی

پژوهشی سلول و بافت، ۱۱(۲): ۱-۷.

۱۰. حاجی مهدی‌پور، ه.، خانوی، م.، شکرچی، م.، عابدی، ز.، پیرعلی همدانی، م. ۱۳۸۸. بررسی

بهترین روش استخراج ترکیبات فنلی موجود در گیاه سرخارگل. فصلنامه گیاهان دارویی (۴) ۸

: ۱۴۵-۱۵۲.

11. **Abbasi, B.H., Tian, CH.L., Murch, S.J., Liu, CH.Z. and Saxena, P.K. 2007.** Light-enhanced caffeic acid derivatives biosynthesis in hairy root cultures of *Echinacea purpurea* . Plant Cell Rep , 26:1367–1372.
12. **Akasaka, Y., Mii, M. and Daimon, H. 1998.** Morphological alterations and root nodule formation in *Agrobacterium rhizogenes*-mediated Transgenic hairy roots of peanut (*Arachis hypogaea* L.). Ann Bot. 81:355-362.
13. **Akramian, M., Fakhr Tabatabaei, S.M., Mirmasoumi, M. 2008.** Virulence of Different Strains of *Agrobacterium rhizogenes* on Genetic Transformation of Four *Hyoscyamus* Species. American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci., 3 (5): 759-763.
14. **Alpizar, E., Dechamp, E., Lapeyre-Montes, F., Guilhaumon, C., Bertrand, B., Jourdan, C., Lashermes, P. 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: 929–940.
15. **Ames, G., Mimura, C.S. and Shyamala, V. 1990.** Bacterial periplasmic permeases belong to a family of transport proteins operating from *Escherichia coli* to human: traffic ATPases. FEMs Microbiological Review 75:429-446.
16. **Ankenbauer, R. G. and Nester, E. W. 1990.** Sugar-mediated induction of *Agrobacterium tumefaciens* virulence genes: structural specificity and activities of monosaccharides. Journal of bacteriology. 172: 6442-6446.

17. **Arroo, R.R.J., Alfermann, A.W., Medarde, M., Petersen, M., Pras, N. and Woolley, J.G . 2002.** Plant cell factories as a source for anti-cancer lignans. *Phytochem Rev* 1:27-35.
18. **Bakkali, T., Jaziri, M., Foriers, A., Vander, H.Y., Vanhaelen, M. and Homes, J. 1997.** Lawsone accumulation in normal and transformed cultures of henna, *Lawsonia inermis*. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 51:83-87.
19. **Barberan, T. F., Espin, Y.C. 2001.** Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. *Journal of Agricultur and Food Chemistry*. 81: 853-876.
20. **Blumenthal, M., Goldberg, A. and Brinckmann, J. 2000.** Herbal Medicin, Expanded Commission E Monographs. Integrative medicine communications. Austin. pp: 96 - 7.
21. **Bochu, W., Guangqiu, Z., Liancai, Z., Lingxi, Ch., Yali, Z. 2006.** Genetic transformation of *Echinacea purpurea* with *Agrobacterium rhizogenes* and bioactive ingredient analysis in transformed cultures". *Biointerfaces* 53 : 101–104.
22. **Bonhomme, V., Laurain-Matter, D., Lacoux, J., Fliniaux, M.A. and Jacquin-Dubreuil, A. 2000.** Tropan alkaloid production by hairy roots of *Atropa belladonna* obtained after transformation with *Agrobacterium rhizogenes* 15834 and A *Agrobacterium tumefaciens* containing *rol A, B, C* genes only. *J. of Biotechnol*, 81: 151 - 8.
23. **Busing, K.H. 1952.** Hyaluronidase inhibition by Echinacin. *Arzneimittel-Forschung*. 2: 467 -9.
24. **Cangelosi, G.A., Ankenbauer, R.G. and Nester, E.W. 1990.** Sugars induce the *Agrobacterium* virulence genes through a periplasmic binding protein and a transmembrane signal protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 87:6708-6712.
25. **Cangelosi, G.A., Martinetti, G., Leigh, J.A., Lee, C.C., Theines, C. and Nester, E.W. 1989.** Role of *Agrobacterium tumefaciens* *chvA* protein in export of  $\beta$ -1,2 glucan. *Journal of Bacteriology* 171:1609-1615.
26. **Cheminat, A., Brouillard, R., Guerne, P., Bergmann, P., Rether, B. 1989.** Cyanidin 3-malonylglucoside in two *Echinacea* species. *Phytochemistry* 28:3246–3247.
27. **Chilton, M.D. 2001.** *Agrobacterium*. A Memoir. *Plant Physiol*. 125: 9-14.

28. **Chilton, M.D., Tepfer, D.A., David, C., Casse-Delbart, F., Tempe, J. 1982.** *Agrobacterium rhizogenes* inserts T-DNA into the genomes of the host plant root cells. *Nature*. 295:432-4
29. **Cullings, K.W. 1992.** Design and testing of a plant-specific PCR primer for ecological and evolutionary studies. *Molecular Ecology* 1:233-240.
30. **Doty, S.L., Yu, N.C., Lundin, J.I., Heath, J.D. and Nester, E.W. 1996.** Mutational analysis of the input domain of the VirA protein of *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Bacteriology*. 178:961-970.
31. **Doyle, J.J. and J.L. Doyle. 1987.** A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemistry Bulletin* 19:11-15.
32. **Facino, R.M., Carini, M., Aldini, G., Marinello, C., Arlandini, E., Franzo, L., Colombo, M., Pietta, P., Mauri, P. 1993.** Direct characterization of caffeoyl esters with antihyaluronidase activity in crude extracts from *Echinacea angustifolia* roots by fast atom bombardment tandem mass spectrometry. *Farmaco*. 48:1447–1456.
33. **Galambosi, B. 2004.** Cultivation in Europe. In: S Miller (ed) *Echinacea*. The genus *Echinacea*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp: 29–52.
34. **Ghedira, K., Goetz, P., Lejeune., R. and Wuyts., D. 2008.** *Echinacea* spp. (Asteraceae). *Phytotherapie* 6: 306–311.
35. **Gheysen, G., Villarroel, R. and Van Montagu, M. 1989.** Illegitimate recombination in plants: a model for T-DNA integration. *Genes Development*. 5:287-297.
36. **Giri, A. and Narasu, M.L. 2002.** Transgenic hairy roots recent trends and applications. *Biotechnol Adv* 18:1-22.
37. **Giri, A., Ravindra, S.T., Dhingra and Narasu, M.L. 2001.** Influence of different strains of *Agrobacterium rhizogenes* on induction of hairy roots and artemisinin production in *Artemisia annua*. *Current Sci*; 81: 378 - 82.
38. **Gong, Y.L. Shi, H.P. Lin, L. and Pan, R.Z. 2002.** Induction of *Solanum phteinocarpum* hairy roots and production of secondary metabolites, *J. Trop. Subtrop. Bot.* 10 : 58–62.
39. **Harborne , J.B., Williams, C.A. 2004.** Phytochemistry of the genus *Echinacea*. In: Miller SC (ed) *Echinacea*. The genus *Echinacea*. CRC, Boca Raton, pp: 55–71.

40. **Heldt, H.W. 2005.** Phenyl alanine ammonia lyase catalyzes the initial reaction of phenyl propanoid metabolism. *Plant Biochemistry* . 10: 437-454.
41. **Higgings, C.F., Hyde, S.C., Mimmack, M.M., Gileadi, U., Gill, D.R. and Gallagher, M.P. 1990.** Binding protein-dependent transport systems. *Journal of Bioenergy and Biomembranes*. 22:571-592.
42. **Hooykaas, P.J.J. and Shilperoort, R.A. 1992.** *Agrobacterium* and plant genetic engineering. *Plant Molecular Biology*. 19:15-38.
43. **Huang, Sh.H., Vishwakarma, R.K., Lee, T. T., Chan, H.S. and Tsay, H. S. 2014.** Establishment of hairy root lines and analysis of iridoids and secoiridoids in the medicinal plant *Gentiana scabra*. *Botanical Studies*, 55:17.
44. **Huang, Z.X., Mu, Y.L., Zhou, Y.M., Chen, W.J. 2014.** Xu, K. Yu, YZ.X. Bian, Y.P. Yang, J.X. 1997. Transformation of *Taxus brevifolia* by *Agrobacterium Rhizogenes* and taxol production in hairy roots culture, *Acta Bot. Yunanica* 19 : 292–296.
45. **Iuchi, S. 1993.** Phosphorylation/dephosphorylation of the receiver module at the conserved aspartate residue controls transphosphorylation activity of histidine kinase in sensor protein ArcB of *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*. 268:23972-23980.
46. **Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A. and Bevan, M.W. 1987.** GUS fusions: Glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO*. 6: 3901-3907.
47. **Jin, S., Prusti, R.K., Roitsch, T., Ankenbauer, R.G. and Nester, E.W. 1990a.** The VirG protein of *Agrobacterium tumefaciens* is phosphorylated by the autophosphorylated VirA protein and this is essential for its biological activity. *Journal of Bacteriology*. 172: 4945-4950.
48. **Jin, S., Roitsch, T., Christie, P.J. and Nester, E.W. 1990b.** The regulatory VirG protein specifically binds to a *cis* acting regulatory sequence involved in transcriptional activation of *Agrobacterium tumefaciens* virulence genes. *Journal of Bacteriology*. 172:531-562.
49. **Jin, S., Song, Y., Pan, S. and Nester, E.W. 1993.** Characterisation of a *virG* mutation that confers constitutive virulence gene expression in *Agrobacterium tumefaciens*. *Molecular Microbiology*. 7:555-562.

50. **Jittasothorn, Y. Yang, Y. chen, S. Wang, X. and Zhong, G. Y. 2011.** Influences of *Agrobacterium rhizogenes* strains, plant genotypes, and tissue types on the induction of transgenic hairy roots in *Vitis* species. *Vitis* 50 (3):107–114 .
51. **Kabirnataj, S., Zolala, J., Nematzadeh, G. A., Shokri, E . 2013.** Optimization of hairy root culture establishment in Chicory plants (*Cichorium intybus*) through inoculation by *Agrobacterium rhizogenes*. *Crop Biotech*, 4: 61-75.
52. **Kim, K.H., Lee, Y.H, Kim, D., Park, Y.H., Lee, J.Y., Hwang, Y.S. and Kim, Y.H. 2004.** *Agrobacterium* mediated genetic transformation of *Perilla frutescens*. *Plant Cell Reports* 23: 386-390.
53. **King, P.J., Ma, G., Miao, W., Jia, Q., McDougall, B.R., Reinecke, M.G., Cornell, C., Kuan, J., Kim, T.R. and Robinson, W.E. 1999.** Structure– activity relationships: analogues of the *dicafeoylquinic* and *dicafeoyltartaric* acids as potent inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 integrase and replication. *J Med Chem* .42:497–509.
54. **Krolicka, A., Stanszewska, I., Bielawski, K., Malinski, E., Szafranek, J. and Lojkowska, E. 2001.** Establishment of hairy roots of *Ammimajus*. *Plant Science* 160: 259-264.
55. **Lee, S.Y., Kim, S.G., Song, W.S., Kim, Y.K., Park, N.I., Park, S.U. 2010.** Influence of different strains of *Agrobacterium rhizogenes* on hairy root Induction and production of alizarin and purpurin in *Rubiaakane Nakai*. *Rom Biotech Lett* 15:5405-5409.
56. **Lehman, C.W., Trautman, J.K. and Carroll, D. 1994.** Illegitimate recombination in *Xenopus*: characterisation of end-joined junctions. *Nucleic Acid Research*. 22:434-442.
57. **Leung, D.W.M. and Li, M.2002.** Root induction in radiate pine using *Agrobacterium rhizogenes*. *Electronic J. of Biotech*. ISSN. 6(3): 251-258.
58. **Lin, Z., Neamati, N., Zhao, H., Kiryu, Y., Turpin, J.A., Aberham, C., Strebels, K., Kohn, K., Wityrouw, M., Pannecouque, C., Debyser, Z., De Clercq, E., Rice, W.G., Pommier, Y. and Burke, R.T. 1999.** Cichoric acid analogues as HIV-1 integrase inhibitors. *J Med Chem* .42:1401–1414 .
59. **Matthysse, A.G., Yarnall, H.A. and Young, N.1996.** Requirement for genes with homology to ABC transport system for attachment and virulence of *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Bacteriology* .178:5302-5308.



60. **Maurel, C., Barbier-Brygoo, H., Spena, A., Tempe, J., Guern, J. 1991.** Single *rol* genes from the *Agrobacterium rhizogenes* TL-DNA alter some of the cellular responses to auxin in *Nicotiana tabacum*. *Plant Physiol.* 97:212–216.
61. **Melchart, D., Linde, K., Worku, F., Bauer, R. and Wagner, H. 1994.** Immunomodulation with *Echinacea*-a systematic Review of controlled clinical trials. *Phytomed.* 1: 245 - 54.
62. **Mercuri, A., Bruna, S., Benedetti, L.D., Burchi, G. and Schiva, T. 2001.** Modification of plant architecture in *Limonium* ssp. induced by *rol* genes. *Plant Cell Tiss. and Org. Culture.* 65: 247-253.
63. **Merillon, J.M. and Ramawat, K.G. 2008.** Bioactive Molecules and Medicinal Plants. Springer-Verlag Berlin Heidelberg .
64. **Murashige, T. and Skooge, F.1962.** A revised medium for rapid growth and bioassays with *tobacco* tissue cultures. *Physiol. Plantarum.* 15: 473-497.
65. **Murch, S. J., Peiris, S. E., Shi, W. L., Zobayed, S. M. A. and Saxena, P. K. 2006.** Genetic diversity in seed populations of *Echinacea purpurea* controls the capacity for regeneration, route of morphogenesis and phytochemical composition. *Plant Cell Rep.*25:522–532.
66. **Nermin, G., Tijen, T. 1999.** Expression and inheritance of *GUS* in transgenic *tobacco* plants. *Turkish J. of Botany.* 23: 297-301.
67. **Nguyen, C., F. Bourgaud, P. Forlot and A. Guckert, 1992.** hairy root cultures of *Psoralea* species. *Plant Cell Rep.*, 11: 42-47.
68. **Nixon, B.T., Ronson, C.W. and Ausubel, F.M. 1986.** Two-component regulatory systems responsive to environmental stimuli share strongly conserved domains with the nitrogen assimilation regulatory genes *ntrB* and *ntrC*. *Proceedings of National Academy of Sciences of the USA.* 83:7850-7854.
69. **Oksaman- Caldentey, K. M., Kivela, O. and Hiltunen, R. 1991.** Spontaneous shoot organogenesis and plant regeneration from hairy root culture of *Hyoscyamus*. *Plant Science.* 78: 129-136.
70. **Ooi, C.T., Syahida, A., Stanslas, J., Maziah, M. 2013.** Efficiency of different *Agrobacterium rhizogenes* strains on hairy roots induction in *Solanum mammosum*. *World J Microbiol Biotechnol.* Mar;29(3):421-30.

71. **Pakdin, A., Farsi, M., Nematzadeh, G-A. and Mirshamsi, A. 2013.** Effect of different *Agrobacterium rhizogenes* strains on hairy root induction in *Valeriana officinalis* L. *ontinental J. Biological Sciences* 6 (2): 9- 15.
72. **Palazon, j., cusido, R.M., Roig, C., Pinol, M.T. 1997.** Effect of rol genes from *Agrobacterium rhizogenes* TL-DNA on nicotine production in *tobacco* root cultures *plant phisiol Biochem.* 35:155-62.
73. **Pan, S.Q., Charles, T., Jin, S., Wu, Z.L. and Nester E.W. 1993.** Pre-formed dimeric state of the sensor protein VirA is involved in plant-*Agrobacterium* signal transduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA.* 90:9939-9943.
74. **Park, N. I., Park, J. H., Lee, Ch. Y., Lee, S.Y. and Park, S. U. 2010.** *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of  $\beta$ -glucuronidase reporter gene in hairy roots of *Angelica gigas* Nakai. *POJ .3(4):115-120.*
75. **Pellati, F., Benvenuti, S., Magro, L., Melegari, M. and Soragni, S. 2004.** Analysis of phenolic compounds and radical scavenging activity of *Echinacea* species. *J Pharm Biomed Anal.* 35:289–301.
76. **Perry, B., Burges, E. and Glennie, V. 2001.** *Echinacea* standardization: analytical methods for phenolic compounds and typical levels in medicinal species. *J Agric Food Chem.*49:1702–1706.
77. **Petit, A., David, G, Dahl, G., Ellis, J., Guyon, P., Casse-Delbart, F. and Tempe, J. .1983.** *Mol. Gen. Genet.*, 190, 204. *Physiologia Plantarum.* 79: 140–146.
78. **Puchta, H. 1998.** Repair of genomic double-strand breaks in somatic cells by one-side invasion of homologous sequences. *Plant Journal* 13:331-339.
79. **Rahnama, H., Hasanloo, T., Shams, M.R. and Sepehrifar, R. 2007.** Hairy root induction in *Silybum marianum (L.) Gaertn* as a source of silymarin. Oral presentation. The 5th National Biotechnology Congress of Iran. 23 - 26 Nov, Tehran, Iran..
80. **Rashed, J., H. and Abdullah, R., M.2013.** Recovery of transgenic cowpea, *Vigna radiate* plants from hairy roots muduced by *Agrobacterium rhizogenes* R1601 *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 7(12): 192-196.

81. **Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Bolwell, G.P., Bramley, P.M., Pridham, J.B. 1995.** The relative antioxidants activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Research*. 22: 375-383.
82. **Romero, F.R., Delate, K., Kraus G.A., Solco, A.K., Murphy, P.A. and Hannapel, D.J. 2009.** Alkamide production from hairy root cultures of *Echinacea*. *In Vitro Cell.Dev.- Plant*. 45: 599–609.
83. **Samadi, A., Carapetian, J., Heidari, R., Jafari, M., Hassanzadeh ghortapeh, A. 2012.** Hairy Root Induction in *Linum mucronatum* ssp. *mucronatum*, an Anti-Tumor Lignans Producing Plant Not Bot Horti Agrobo, 40(1):125-131 .
84. **Setamam, M.d., Jaafar Sidik, N., Abdul Rahman, N. Z. and Che Mohd Zain, Ch.R. 2014.** Induction of hairy roots by various strains of *Agrobacterium rhizogenes* in different types of *Capsicum* species explants. *BMC Research Notes*. 7:414.
85. **Saito. K., Yamazaki, M., Anzai, H., Yoneyama, K. and Murakoshi, I. 1992.** Transgenic herbicides-resistant *Atropa belladonna* using an Ri binary vector and inheritance of the transgenic trait. *Plant Cell Rep* 11: 219-224.
86. **Sevon, N. and Oksman-Caldentey, K.M. 2002.** *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation: Root cultures as a source of alkaloids. *Planta Med*. 68:859-868.
87. **Sheligl, H. Q. 1986.** Die verwertung orgngischer souren durch chlorella lincht.
88. **Shen, W.H., Petit, A., Guern, J., Tempe, J. 1988.** Hairy roots are more sensitive to auxin than normal roots. *Proceeding of the National Academy of Sciences*. 85: 3417-3421.
89. **Shimoda, N., Toyoda-Yamamoto, A., Nagamine, J., Usami, S., Katayama, M., Sakagami, Y. and Machida Y. 1990a.** Control of expression of *Agrobacterium tumefaciens* genes by synergistic actions of phenolic signal molecules and monosaccharides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 87:6684-6688.
90. **Sinkar, V. P., Pythoud, F., White, F. F., Nester, E. W. and Gordon, M. P. 1988.** *rolA* locus of the Ri plasmid directs developmental abnormalities in transgenic *tobacco* plants. *Genes Dev*. 2: 688-697.
91. **Souret, F.F, Yoojeong, Kim., Barbara, E.W., Kristin, K.W., Pamela, J.W. 2003.** Scale-up of *Artemisia annua* L. hairy root cultures produces complex

- patterns of terpenoid gene expression. *Biotechnology and Bioengineering*. 83: 653 - 67.
92. **Spanol., marioti D, Pezzotti M, Damiani F, Arcionis. 1987.** Hairy root transformation in *alfalfa (MEDICAGO SATIVA)*. *Theor APPI Genet*. 73:523-30.
  93. **Srinivasan, M., Kumar, K., Kumutha, K. And Marimuthu, P. 2014.** Influence of acetosyringone concentration on induction of *carrot* hairy root by *agrobacterium rhizogenes*. *African journal of Microbiologi Research*. 8(26): 2486-2491.
  94. **Stotzem, C.D., Hungerland, U. and Mengs, U. 1992.** Influence of *Echinacea purpurea* on the phagocytosis of human granulocytes. *Med. Sci. Res*. 20:719 - 20.
  95. **Taiz L, Zeiger E. Plant Physiology. Sunderland, Massachusetts. 2002.** 42517.
  96. **Tempe, J., Petit, A. and Farrand, S. K. 1984.** in *Plant Gene Research* (eds D. P. S. Verma and Th. Hohn) (Springer-Verlag/Wien.) p. 271.
  97. **Tepfer, D. 1990.** Genetic transformation using *Agrobacterium rhizogenes*.
  98. **Tien-li, S. and Pauline, M.D. 2000.** Root hairiness: effect on fluid flow and oxygen transfer in hairy root cultures. *J Biotechnol* . 83:199–210.
  99. **Tinland, B., Schoumacher, F., Gloeckler, V., Bravo, Angel, A.M. and Hohn, B. 1995.** The *Agrobacterium tumefaciens* virulence D2 protein is responsible for precise integration of T-DNA into the plant genome. *EMBO Journal*. 14:3585-3595.
  100. **Trypsteen, M., Van Lijsebettens, M., Van Severen, R. and Van Montagu, M. 1991.** *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of *Echinacea purpurea*. *Planta Journal*. 47-51.
  101. **Venkatachalam, L., Lokesh, V. and Bhagyalakshmi, N. 2011.** A rare eueut of *Agrobacterium rhizogenes* assisted genetic transformation of "silk" *Banana* (genotype AAB). *J. Microbiol. Biochem. Technol.*, 3: 13-17.
  102. **Viehmann, P. 1978.** Results of treatment with an *Echinacea*-based ointment. *Erfahrungsheilkunde*. 27 (6): 353 - 8.
  103. **Visser, R.GF., Jacobsen, E., Witholt, B., Feenstra, W.J .1989.** Efficient transformation of *potato (Solanum tuberosum L.)* using binary vector in *Agrobacterium rhizogenes*. *Theor. Appl. Genet* 78: 594-600.

104. **Wang, B., Zhang, G., Zhua, L., Chena, L. and Zhang, y. 2006.** Genetic transformation of *Echinacea purpurea* with *Agrobacterium rhizogenes* and bioactive ingredient analysis in transformed cultures. *Biointerfaces* 53 : 101–104.
105. **Whatley, M.H. and Spiess, L.D.1977.** Role of bacterial lipopolysaccharide in attachment of *Agrobacterium* to moss. *Plant Physiology* 60:765-766.
106. **Wheathers, P.J., Bunk, G. and McCoy, M.C. 2005.** The effect of phytohormones on growth and artemisinin production in *Artemisia annua* hairy roots. *In vitro Cell Dev-Pl* 41:47-53.
107. **Whit, f.f., taylor, b.h., hufman, g.a., Gordon, m.p. and nester, e.w. 1985.** molecular and genetic analysis of the transferred dna regions of the root-inducing plasmid *agrobacterium rhizogenes*. *J bacterial*. 164:33-44.
108. **WHO, U.1999.** Monographs on Selected Medicinal Plants. Vol. 1., World Health Organization. Geneva. pp: 136 - 44.
109. **Winans, S.C. 1992.** Two-way chemical signalling in *Agrobacterium*-plant interactions. *Microbiology Reviews* .56:12-31.
110. **Wu, Ch.H., Murthy, H. N., Hahn, E.J., Lee, H.L. and Paek, K. Y. 2008.** Efficient Extraction of Caffeic Acid Derivatives from Adventitious Roots of *Echinacea purpurea*. *Czech J. Food Sci*, 4: 254–258.
111. **WWW.mdplant.blogfa.com.** (وبلاگ گیاهان دارویی و معطر ایران).

پوست

جدول پیوست ۱- میانگین مربعات درصد القاء ریشه موئین تحت تاثیر سطوح مختلف سویه‌های آگروباکتریوم رایزوزنز و نوع ریزنمونه گیاهی

میانگین مربعات	درجه آزادی	منابع تغییرات
۰/۰۱	۳	تکرار
۰/۳۱**	۲	باکتری
۰/۶۶**	۱	ریزنمونه
۰/۲۲**	۲	ریزنمونه * باکتری
۰/۰۰۴	۱۵	خطا
۱۲/۶۴		ضریب تغییرات (%)

NS و \* و \*\* به ترتیب معنی دار در سطح ۵ و ۱ درصد می باشد.

جدول پیوست ۲- مقایسه میانگین اثرات ساده درصد القاء ریشه موئین تحت تاثیر سطوح مختلف سویه‌های آگروباکتریوم رایزوزنز و ریزنمونه گیاه سرخارگل.

تیمار	درصد تشکیل ریشه موئین
سویه باکتری	
A13	۷۲ a
A4	۳۵ b
15834	۴۲ c
LSD5%	۰/۰۶۷
ریزنمونه	
برگ	۶۶a
هیپوکوتیل	۳۳ b
LSD5%	۰/۰۵۵

حروف غیر مشترک در هر ستون بیانگر اختلاف معنی دار می باشد.

جدول پیوست ۳- میانگین مربعات درصد القاء ریشه‌موئین تحت تاثیر سطوح مختلف آگروباکتریوم رایزوزنز و سن ریزنمونه گیاهی

میانگین مربعات	درجه آزادی	منابع تغییرات
۰/۰۰۵	۳	تکرار
۰/۳۰۱**	۲	باکتری
۱/۷۵**	۲	سن ریزنمونه
۰/۰۳۷**	۴	سن ریزنمونه * باکتری
۰/۰۰۴	۲۴	خطا
۲۰/۵۴		ضریب تغییرات (%)

ns و \* و \*\* به ترتیب معنی دار در سطح ۵ و ۱ درصد می باشد.

جدول پیوست ۴- مقایسه میانگین اثرات ساده درصد القاء ریشه‌موئین تحت تاثیر سطوح مختلف آگروباکتریوم رایزوزنز و سن ریزنمونه گیاهی

درصد تشکیل ریشه‌موئین	تیمار
	سویه باکتری
۴۸ a	<b>A13</b>
۳۳ b	<b>A4</b>
۱۶ c	<b>15834</b>
۰/۰۵۶	LSD5%
	سن ریزنمونه



۷۶ a	۲۰
۱۵ b	۶۰
۶ c	۹۰
۰/۰۵۶	LSD5%

حروف غیر مشترک در هر ستون بیانگر اختلاف معنی دار می باشد.

جدول پیوست ۵- میانگین مربعات محتوای پلی ساکاریدی و میزان ترکیبات فنلی تحت تاثیر سطوح مختلف سویه های آگروباکتریوم رایزورنز .

میانگین مربعات		درجه آزادی	منابع تغییرات
میزان ترکیبات فنلی	محتوای پلی ساکارید		
۰/۰۶۸**	۰/۱۸**	۳	باکتری
۰/۰۰۵**	۰/۰۰۷**	۱۲	خطا
۱۱/۳۹	۱۴/۳۶		ضریب تغییرات (%)

- مواد و وسایل لازم جهت الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگاروز:
- بافر الکتروفورز 10x TAE
- Saf read
- آگارز ۱٪
- مارکر (Fermentase)
- تانک الکتروفورز، پلیت و شانه ژل
- تامین جریان الکتریسیته OC

-تهیه محلول ها و بافرهای مورد نیاز در الکتروفورز

جدول پیوست ۶ - اجزای سازنده بافر TAE(10X)

مواد مورد نیاز	مقدار مصرف در بافر
Tris base [tris(hydroxymethyl) aminomethane]	48.4g
Glacial acetic acid (17.4M)	11.4ml
EDTA	3.7g
Deionized Water	Dilute the buffer to 1 L

### - بافر نمونه 6X Loding dye

جدول پیوست ۷- ترکیبات موجود در 6×Loding dye

Tris Hcl (pH=7.6)	10 mM
Bromo phenol blu	0.03%
Xylen cyanol FF	0.03%
Glycerol	60%
EDTA	60mM

### - DNA سایز مارکر Gen ruler™ 1Kb DNA Ladder

جدول پیوست ۸- ترکیبات موجود در DNA سایز مارکر

EDTA	10 mM
Tris Hcl	10 mM
Bromo phenol blue	0.005%
Xylene cyanol FF	0.005%
Glycerol	10%

## ABSTRACT

*Echinacea (Echinacea purpurea)* is an important medicinal plants used in pharmaceutical industry and immunostimulants. hairy roots, the results of genetic transformation by *Agrobacterium rhizogenes* bacterial DNA (T- DNA) from the bacterial Ri (Root inducing) plasmid in plant genom. now these bacteria are widely used to perform the transformation and development of transgenic roots. reference the importance of medicinal plants *Echinacea purpurea* hairy root growing systems is necessary. In this research the amount of phenolic compound, contents of polysaccharides and induce hairy root percentage of the leave and hypocotyle explants were determined in hairy root induced by A4, A13, 15834 and 15834 containing the binary vector pbi121-GUS strains of *A. rhizogenes*, as well as the control (untransformed) roots. The results showed that the induction of hairy roots of *Echinacea purpurea* herb leaves of inoculated strains A13,15834, A4 and AR15834- PBI121 respectively 60%, 40%, 55% and 0, and at hypocotyl explants of 85%, 45%, 70% and 75% respectively and the significant difference is between types strain bacterial and explants hairy roots was performed in PCR reactions and GUS histochemical localisation confirmed. The accuracy of the results of the PCR test for gene amplification 780 bp *rolB* and 320 bp to the GUS reporter gene in transgenic roots showed. The results indicated a significant increase of total phenolics in hairy roots of strains was investigated. As well significant increase of polysaccharide content in hairy root induced by strains 15834, A13 and significant decrease of these compounds in hairy roots induced by A4 strain. In this research we studied the efficiency of regeneration of root hairy. Results showed that MS medium containing 2 mg.l<sup>-1</sup> NAA and 0/25 mg.l<sup>-1</sup> BAP after 3 weeks of callus formed. Ri plasmid T-DNA transfer and entry *GUS* gene into the genome of transgenic plants using PCR with primers specific for the *GUS* gene and the histochemical GUS assay was confirmed.

**Keywords:** Hairy root, *Agrobacterium rhizogenes*, *Echinacea purpurea*, Total phenolics, regeneration.



**Shahrood University**  
**Faculty of Agriculture**  
**Department of Agronomy**

**M. Sc. Thesis**

**Study on hairy root induction in *Echinacea purpurea* by *Agrobacterium rhizogenes*- mediated gene transformation.**

**Maryam Noori**

Supervisors

**Sh. Gharanjik**

Advisors

**A. Safipur afshar**

**M. Rahimi**

**February 2014**