





دانشگاه صنعتی شاهرود

دانشکده کشاورزی

پایان نامه کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی

بررسی میزان تولید رزمارینیک اسید و بیان ژن مهار کننده *smMYB39*

در ریشه های مویین القا شده در گیاه *Mentha aquatica*

نگارنده:

فاطمه احمدی نیک

اساتید راهنما

دکتر شاهرخ قرنچیک

دکتر تهمینه لهراسبی

شهریور ۱۳۹۷

شماره: ۱۰۴۱
تاریخ: ۲۴ / ۷ / ۱۳۹۷

باسمه تعالی



مدیریت تحصیلات تکمیلی

فرم شماره (۳) صورتجلسه نهایی دفاع از پایان نامه دوره کارشناسی ارشد

با نام و یاد خداوند متعال، ارزیابی جلسه دفاع از پایان نامه کارشناسی ارشد خانم / آقای فاطمه احمدی نیک با شماره دانشجویی ۹۳۰۳۸۹۴، رشته مهندسی کشاورزی، گرایش بیوتکنولوژی کشاورزی، تحت عنوان بررسی میزان تولید رزمارینیک اسید و بیان ژن مهارکننده smMYB39 در ریشه های موئین القا شده در گیاه (Mentha aquatica)، که در تاریخ ۹۷/۶/۲۱ با حضور هیأت محترم داوران در دانشگاه صنعتی شاهرود برگزار گردید به شرح ذیل اعلام می گردد:

قبول (با امتیاز ... درجه ...) مردود
نوع تحقیق: نظری عملی

امضاء	مرتبه علمی	نام و نام خانوادگی	عضو هیأت داوران
	استادیار	آقای دکتر شاهرخ فرنجیک	۱- استاد راهنمای اول
	استادیار	خانم دکتر تهمنه لهراسی	۲- استاد راهنمای دوم
			۳- استاد مشاور
	استادیار	دکتر پرویز حیدری	۴- نماینده تحصیلات تکمیلی
	استادیار	خانم دکتر مهدیه پارسائیان	۵- استاد ممتحن اول
	استادیار	خانم دکتر امین ابراهیمی	۶- استاد ممتحن دوم

نام و نام خانوادگی رئیس دانشکده: آقای دکتر محمدرضا عامریان

تاریخ و امضاء و مهر دانشکده:

تبصره: در صورتی که کسی مردود شود حداکثر یکبار دیگر (در مدت مجاز تحصیل) می تواند از پایان نامه خود دفاع نماید (دفاع

مجدد نباید زودتر از ۴ ماه برگزار شود).

تقدیم به آنان که آموختند تا بیاموزم
استادان گرامی؛ جناب آقای دکتر قرنجیک
و سرکار خانوم دکتر لهراسبی

تقدیم به پدر و مادر عزیزم
که در سایه درخت پربار وجودشان زندگی کردم،
از ریشه آن‌ها شاخ و برگ گرفتم و
از نعمت وجودشان در راه کسب علم و دانش بهره مند گشتم.

تقدیم به همسر مهربانم
که مسیح وار با صبرش در تمامی لحظات رفیق راهم بود...

تعهد نامه

اینجانب فاطمه احمدی نیک دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی کشاورزی دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود نویسنده پایان نامه بررسی میزان تولید رزمارینیک اسید و بیان ژن مهار کننده smMYB39 در ریشه های مویین القا شده در گیاه *Mentha aquatica* تحت راهنمایی جناب آقای دکتر قرنچیک و سرکار خانم دکتر لهراسبی متعهد می شوم.

- 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 بافت های آن ها) 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

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.

چکیده

گیاه نعناع آبی (*Mentha aquatica L.*) از خانواده نعناعیان (Lamiaceae) یکی از گونه‌های مهم از گیاهان آروماتیک است که به سبب دارا بودن خواص دارویی فراوان شناخته شده است. اثرات درمانی این گیاه به دلیل وجود روغن‌های ضروری و پلی فنول‌ها است. ترکیبات فنولی اصلی در خانواده نعناعیان، فنولیک اسیدها به ویژه رزمارینیک اسید (RA) است که به عنوان متابولیت ثانویه در این گیاهان تولید می‌شود. جهت دست یابی به متابولیت‌های ثانویه در مقادیر بالا، ریشه‌های مویین القا شده توسط اگروباکتریوم رایوزنز (*Agrobacterium rhizogenes*) گزینه بسیار مناسبی هستند. در این آزمایش ۵ سویه متفاوت از اگروباکتریوم (۱۵۸۳۴، ۹۵۳۴، ۴A، ۱۳A، ATCC، ۳۱۸) جهت القای ریزنمونه‌های برگ و ساقه نعناع آبی استفاده شدند و درصد ریشه زنی و رشد ریشه‌ها در ریز نمونه‌های برگ و ساقه مورد بررسی قرار گرفت. از میان سویه‌های باکتری، سویه ۱۵۸۳۴ بیشترین درصد ریشه زنی را داشت و از میان ریز نمونه‌ها، ساقه بهترین گزینه برای القای ریشه‌های مویین انتخاب شد. ریشه‌های ظاهر شده در محیط‌های متفاوت رشد داده شدند و میزان تولید متابولیت ثانویه رزمارینیک اسید در این ریشه‌ها با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) اندازه‌گیری شد. میزان تولید رزمارینیک اسید در تمامی محیط‌ها (CO_2 ، PH ، N ، P^+ ، P^-) نسبت به محیط کنترل افزایش یافت. در این بین محیط حاوی بیشترین میزان فسفر بیشترین مقدار رزمارینیک اسید را دارا بود ($0.27^{ng}/\mu\text{l}$ ، ۲۶۶۴۷).

در مطالعات بخش مولکولی، جهت تایید صحت اقدامات انجام شده، DNA ریشه‌های مویین استخراج و واکنش PCR با ژنوم هسته‌ای انجام شد و پس از الکتروفورز محصولات PCR، تلفیق موفق T-DNA در ژنوم ریشه‌های مویین اثبات شد. همچنین به منظور بررسی نقش کنترلی ژن *SmMYB39* در گیاه نعناع آبی و نیز دستورزی مسیر بیوستز رزمارینیک اسید، این ژن از گیاه نعناع آبی جدا، همسانه سازی و توالی یابی شد. در نهایت با بررسی ژن همولوگ مهارکننده‌ی *SmMYB39* و با استفاده از PCR نیمه کمی، میزان بیان ژن *SmMYB39* و تاثیر الیسیتورها بر آن به عنوان تنظیم کننده متابولیت رزمارینیک

اسید در محیط کشت *in vitro* به اثبات رسید. نتایج مقایسه میانگین داده ها نشان داد که تغییر در محیط رشدی ریشه های مویین سبب افزایش بیان نیمه کمی ژن *SmMYB39* شده است. از طرفی میزان تولید رزمارینیک اسید در این محیط ها افزایش داشته است. با بررسی های انجام شده انتظار می رفت با افزایش میزان متابولیت رزمارینیک اسید تولیدی، بیان ژن هدف کمتر شود اما نتایج به دست آمده، نشان دهنده افزایش میزان بیان ژن *SmMYB39*، به عنوان کنترل کننده رزمارینیک اسید بود.

کلمات کلیدی: نعنای آبی، ریشه مویین، آگروباکتریوم رایزوژنز، الیسیتور و ژن مهار کننده *SmMYB39*

مقاله‌های مستخرج از پایان نامه:

دو مقاله با عناوین زیر در دومین همایش بین المللی و دهمین همایش ملی بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران که در موسسه تحقیقات اصلاح بذر و تهیه نهال تهران انجام گرفت، به صورت پوستر ارائه شد.

- جداسازی توالی ژن *SmMYB39*، مهار کننده مسیر بیو سنتز رزمارینیک اسید از گیاه نعناع آبی (*Mentha aquatica L.*)

- بررسی شرایط القا و تثبیت کشت ریشه های مویین گیاه نعناع آبی (*Mentha aquatica L.*) حاصل از تلقیح آگروباکتریوم رایزوزنز

فهرست مطالب

فصل اول مقدمه و کلیات ۱

۱-۱. مقدمه.....	۲
۲-۱. کشت بافت گیاهی.....	۳
۳-۱. متابولیت های ثانویه.....	۴
۴-۱. کشت بافت در نعنایان.....	۵
۵-۱. نعنایان.....	۶
۱-۵-۱. نعنای آبی.....	۸
۲-۵-۱. گیاه شناسی نعنای آبی.....	۸
۳-۵-۱. دلایل استفاده از گیاه نعنای.....	۹
۶-۱. روغن های ضروری.....	۱۰
۷-۱. پلی فنول ها.....	۱۱
۸-۱. رزمارینیک اسید.....	۱۳
۱-۸-۱. نقش و کاربرد.....	۱۴
۲-۸-۱. مسیر واکنش.....	۱۵
۹-۱. پروتئین MYB.....	۱۸
۱-۹-۱. ساختار پروتئین MYB.....	۱۹
۲-۹-۱. عملکرد MYB.....	۲۰
۱۰-۱. ریشه مویین ۱.....	۲۱
۱۱-۱. آگروباکتریوم رایزوزنز.....	۲۲
۱۲-۱. هدف از تحقیق.....	۲۳

فصل دوم مروری بر منابع ۲۵

۱-۲- مطالعات پیشین.....	۲۶
-------------------------	----

فصل سوم مواد و روش ها ۳۵

۲. مواد و روش ها.....	۳۶
۱-۳. مواد مورد نیاز.....	۳۶
۱-۱-۳. مواد شیمیایی.....	۳۶
۲-۱-۳. توالی آغازگرهای استفاده شده.....	۳۶
۱-۲-۳. تلقیح ریزنمونه ها.....	۳۸
۲-۲-۳. کشت ریز نمونه ها.....	۳۸
۳-۲-۳. رشد ریشه ها در محیط های متفاوت.....	۳۹
۳-۳. کشت باکتری.....	۳۹

۳۹	۴-۳. بررسی اثر سویه باکتری بر میزان القا و رشد ریشه های مویین
۴۰	۵-۳. آنالیز داده ها
۴۰	۶-۳. تأیید مولکولی ماهیت تراریختی ریشه های مویین
۴۰	۳-۶-۱. استخراج DNA ژنومی از ریشه های مویین
۴۴	۳-۸. کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا
۴۷	۳-۸-۱. ساخت cDNA

فصل چهارم نتایج و بحث ۵۵

۵۶	۴-۱. انتخاب ریزنمونه مناسب
۵۹	۴-۳. اثبات مولکولی ماهیت تراریختی ریشه های مویین
۵۹	۴-۳-۱. استخراج DNA
۶۰	۴-۳-۲. واکنش PCR با آغازگرهای rol B
۶۰	۴-۴. کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا
۶۰	۴-۴-۱. خطی بودن روش آزمون
۶۱	۴-۴-۲. محاسبه میزان رزمارینیک اسید
۶۳	۴-۵. استخراج RNA
۶۴	۴-۶. واکنش های PCR انجام شده
۶۵	۴-۷. خالص سازی DNA
۶۶	۴-۸. Ligation
۶۶	۴-۹. Clony PCR
۶۷	۴-۱۰. استخراج پلاسمید
۶۷	۴-۱۱. نتایج حاصل از تعیین توالی ژن SmMYB39
۶۸	۴-۱۲. واکنش PCR با آغازگرهای اختصاصی بر اساس ژن توالی یابی شده
۶۹	۴-۱۳. بررسی بیان نیمه کمی ژن ها
۶۹	۴-۱۳-۱. واکنش PCR با آغازگرهای ژن اکتین و ژن SmMYB39
۶۹	۴-۱۳-۲. اندازه گیری بیان ژن ها
۶۹	۴-۱۳-۳. تحلیل آماری داده ها
۷۱	۴-۱۴. بررسی همبستگی میان بیان ژن SmMYB39 و رزمارینیک اسید
۷۳	۴-۱۵. آنالیزهای بیوانفورماتیک
۷۳	۴-۱۵-۱. انتخاب توالی های رمز کننده MYB39 برای آنالیزهای بیوانفورماتیکی
۷۳	۴-۱۵-۲. مقایسه توالی های ژن MYB39 در گیاهان مختلف با ژن کلون شده
۷۵	۴-۱۵-۳. مقایسه توالی های پروتئین گزارش شده از ژن MYB39 با توالی پروتئین ژن کلون شده
۷۶	۴-۱۵-۴. مقایسه دندروگرام DNA با دندروگرام پروتئین
۷۷	پیشنهادات
۷۸	منابع
۸۳	پیوست ها

فهرست اشکال

- شکل ۱-۱. گیاه نعناع آبی (*Mentha aquatica* L.) ۹
- شکل ۱-۲. ساختار پایه فلاونوئید ۱۲
- شکل ۱-۳. نمایی شماتیک از ترکیب رزمارینیک اسید ۱۳
- شکل ۱-۴. مسیر واکنش رزمارینیک اسید. مراحل چندگانه آنزیمی با فلش ها نشان داده شده است ۱۷
- شکل ۱-۵. ساختار پروتئین MYB، تقسیم بندی شاخه های متفاوت پروتئین MYB و عملکرد آنها که به تعداد تکرارهای MYB (R) بستگی دارد (اموات، ۲۰۱۳) ۲۰
- شکل ۱-۶. نمایی شماتیک از پلاسمید اگروباکتریوم رایزوزنز (ایلکر، ۲۰۱۴) ۲۳
- شکل ۱-۳. گیاه نعناع آبی (*Mentha aquatica*) ۳۷
- شکل ۱-۴. ریز نمونه های برگ و ساقه تلقیح شده توسط سویه های اگروباکتریوم رایزوزنز و ریشه های ایجاد شده حاصل از آن ۵۷
- شکل ۲-۴. مقایسه میانگین سویه های باکتری و نوع ریزنمونه بر تشکیل ریشه موپین ۵۸
- شکل ۳-۴. نتایج حاصل استخراج DNA از ریشه های موپین تلقیح شده گیاه نعناع آبی ۵۹
- شکل ۴-۴. نتایج حاصل از واکنش PCR در اثبات تراریختی ریشه های موپین ۶۰
- شکل ۴-۵. کروماتوگرام حاصل از تزریق ۵۰ میکرولیتر از استاندارد به دستگاه در طول موج ۳۳۰ نانومتر .. ۶۱
- شکل ۴-۶. منحنی کالیبراسیون رزمارینیک اسید در ۳ غلظت ۱M، ۳، ۵ و ۷ از استاندارد ۶۱
- شکل ۴-۷. مقایسه داده های حاصل از میزان رزمارینیک اسید در ریشه های موپین کشت داده شده در محیط های رشدی متفاوت با استفاده از آزمون توکی ۶۲
- شکل ۴-۸. الف. RNA استخراج شده از گیاه *Mentha aquatica* به روش CTAB. چاهک های ۱ و ۲ مربوط به نمونه های با شرایط مشابه از گیاه *M. aquatica* است. ۶۴
- شکل ۴-۹. تصویر حاصل از واکنش های PCR انجام گرفته برای ژن اکتین و SmMYB39 ۶۵
- شکل ۴-۱۰. تصویر حاصل از خالص سازی (precipitation) محصول PCR که مشابه باند ۴۰ ng از مارکر ۱۰۰ bp است. ۶۵
- شکل ۴-۱۱. تصویر حاصل از Clony PCR که برای ۳ کلنی تکرار شد. تنها نمونه کلنی شماره ۲، ۶۶
- شکل ۴-۱۲. تصویر حاصل از پلاسمید استخراج شده ۶۷
- شکل ۴-۱۳. توالی به دست آمده از ژن SmMYB39 ۶۷
- شکل ۴-۱۴. آزمون آغازگر اختصاصی طراحی شده بر اساس توالی ژن ۶۸
- شکل ۴-۱۵. تصویر حاصل از باندهای مربوط به واکنش PCR اکتین و ژن SmMYB39 ۶۹
- شکل ۴-۱۶. مقایسه میانگین داده های حاصل از بیان نیمه کمی ژن در محیط های مختلف رشدی ۷۰
- شکل ۴-۱۷. مقایسه داده های حاصل از میزان رزمارینیک اسید و بیان ژن ۷۱
- شکل ۴-۱۸. نمودار درختی حاصل از مقایسه توالی های ژن MYB39 در گیاهان مختلف با ژن کلون شده از گیاه نعناع آبی ۷۴
- شکل ۴-۱۹. نمودار درختی حاصل از مقایسه توالی های پروتئین گزارش شده از ژن MYB39 در گیاهان مختلف با ژن کلون شده از گیاه نعناع آبی ۷۵

فهرست جداول

جدول ۱-۱. مقایسه میزان رزمارینیک اسید موجود در برخی گونه‌های خانواده نعناعیان (شکارچی، ۲۰۱۲).....	۱۴
جدول ۱-۲. برخی از پروتئینهای MYB و عملکرد آن در گیاهان مختلف.....	۲۱
جدول ۱-۳. مواد مورد نیاز و شرکت‌های سازنده.....	۳۶
جدول ۲-۳. توالی آغازگرهای استفاده شده.....	۳۷
جدول ۳-۴. برنامه واکنش PCR جهت تایید تراریختی ریشه های موپین.....	۴۲
جدول ۳-۵. برنامه واکنش PCR.....	۴۸
جدول ۳-۶. مواد و مقادیر مورد نیاز برای Ligation.....	۵۰
جدول ۳-۷. مواد و مقادیر مورد نیاز برای Clony PCR.....	۵۲
جدول ۴-۱. میانگین مربعات درصد القای ریشه موپین تحت تاثیر سویه‌های مختلف اگروباکتریوم رایزوزنز بر ریز نمونه برگ و ساقه.....	۵۸
جدول ۴-۲. میانگین مربعات حاصل از میزان رزمارینیک اسید موجود در نمونه‌های رشد کرده در.....	۶۲
محیط های مختلف رشدی.....	۶۲
جدول ۴-۳. میانگین مربعات بیان ژن SmMYB39 در محیط های مختلف رشدی.....	۷۰
جدول ۴-۴. بررسی همبستگی میان بیان ژن SmMYB39 و رزمارینیک اسید.....	۷۱
جدول ۴-۵. اسامی گیاه و شماره دسترسی توالی ژن MYB39 د پایگاه NCBI.....	۷۳

فهرست شکل پیوست

- شکل ۱. نقشه حامل پلاسمیدی PTZ57R/T ۸۳
- شکل ۲. توالی فاکتور رونویسی MYB (MYB39)R2R3 از گیاه *Salvia miltiorrhiza* ۸۷

فهرست جداول پیوست

- جدول ۱. مواد و مقادیر مورد نیاز جهت تهیه ۱۰۰۰ ml محلول مادری ۱۰x عناصر پرمصرف ۸۴
- جدول ۲. مواد و مقادیر مورد نیاز جهت تهیه ۱۰۰۰ ml محلول مادری ۱۰۰x عناصر کم مصرف ۸۴
- جدول ۳. مواد و مقادیر مورد نیاز جهت تهیه ۱۰۰ ml محلول مادری ۱۰x آهن ۸۵
- جدول ۴. مواد و مقادیر مورد نیاز جهت تهیه ۵۰۰ ml محلول مادری ۱۰۰x ویتامین ۸۵

فصل اول

مقدمه و کلیات

۱-۱. مقدمه

استفاده از گیاهان دارویی به منظور درمان، با تاریخ زندگی بشر هم زمان بوده است. انسان در تمام دوران تاریخی برای رفع نیازهای مختلف چاره‌ای جز توسل به گیاهان نداشت. آن‌ها از گیاهان به عنوان دارو، سم، مواد پاک کننده و رنگ استفاده می‌کردند. در این راستا انسان به مرور زمان و در اثر آزمایش و خطا و نیز تجربه‌های فراوان، موفق به کشف برخی ویژگی‌ها در بعضی از گیاهان شد و براساس این گونه ویژگی‌ها گیاهان را شناسایی و طبقه بندی کرد و ترکیبات شیمیایی موجود در گیاهان را شناخت. اگرچه برخی از ترکیبات شیمیایی موجود در گیاهان دارای ساختمان پیچیده‌ای است که سنتز آن در آزمایشگاه یا غیر ممکن و یا با صرف زمان و هزینه امکان پذیر است. در قرن هجده و اوایل قرن نوزدهم، محققان پیشرفت قابل توجهی در خالص سازی و شناسایی ترکیبات شیمیایی موجود در گیاهان داشته و موادی را به صورت فرآورده‌های دارویی برای مصرف عرضه کردند (حبیبی و همکاران ۱۳۸۴).

از طرفی دیگر استفاده از گیاهان دارویی و فرآورده‌های حاصل از آن‌ها نقش این گیاهان را در چرخه اقتصادی پراهمیت کرده است. به طوری که مصرف رو به افزایش آن تنها به کشورهای پیشرفته محدود نشده بلکه اخیراً در کشورهای در حال توسعه نیز جایگاه ویژه‌ای را به خود اختصاص داده است. و طی دهه‌های گذشته، نگاه جوامع به گیاهان دارویی و اثرات شفابخش آن‌ها کاملاً تغییر کرده و به نوعی می‌توان رویکرد مجدد جوامع صنعتی به گیاهان دارویی و داروهای گیاهی را مشاهده کرد. کشور ما به علت تنوع اقلیمی و ویژگی‌های خاص ژئومرفولوژیک مناطق مختلف، تنوع گونه‌ای و ذخایر ژنتیکی دارای توانمندی‌ها و پتانسیل‌های فراوانی است که باید شناسایی شوند و زمینه‌های مناسب بهره برداری از آن‌ها فراهم آید. گفته می‌شود حدود ۸۰۰۰-۱۰۰۰۰ گونه گیاهی در ایران وجود دارد که بیش از ۹۰٪ گونه‌های دارویی جهان را شامل می‌شود. از این تعداد بیش از ۲۰۰ گونه دارای ارزش دارویی و اقتصادی هستند (ابراهیمی، ۲۰۰۸). با این حال، سهم ایران در فرآوری، تولید و تجارت جهانی این محصولات ناچیز می‌باشد و تنها دو درصد از تجارت جهانی گیاهان دارویی را به خود اختصاص داده است (نوری، ۱۳۹۲). این در حالی است که بر اساس گزارش سازمان خواربار جهانی، ارزش تجارت جهانی گیاهان دارویی هم

اکنون حدود صد میلیارد دلار در سال است که در سال ۲۰۵۰ میلادی به رقم پنج تریلیون دلار خواهد رسید. بنابراین افزایش بهره‌وری از گیاهان دارویی در کشور ضروری به نظر می‌رسد (کشفی، ۲۰۱۰). لذا تمهیدات لازم برای احیاء و بازگرداندن این رسالت فراموش شده و ارتقاء اهداف طب ایرانی که گیاهان دارویی سنگ بنای آن را تشکیل داده امری اجتناب ناپذیر است.

اما نکته قابل توجه این است که متأسفانه سودآوری‌های کلان اقتصادی و توجه روز افزون به تجارت جهانی گیاهان دارویی، مشکلات و مسائل ناگواری را برای این منابع به وجود آورده و نسل گونه‌های گیاهی را با خطر انقراض مواجه ساخته است. چرا که بخش عظیمی از تجارت گیاهی دارویی مربوط به گونه‌هایی است که از طبیعت جمع آوری شده و بعضاً با شیوه‌های نادرست، نه تنها به انقراض نسل گونه‌ها می‌انجامد بلکه تنوع زیستی جهان را نیز با خطر نابودی مواجه می‌سازد. استفاده مطلوب، منطقی و بهینه از این منابع که به لحاظ فناوری بسیار کم هزینه‌تر و ساده‌تر از صنایع دارویی شیمیایی است، می‌تواند ضمن تأمین بخشی از نیازهای عمده بهداشتی و درمانی جامعه از خروج مقادیر زیاد ارزی جلوگیری نموده و مانع گسترش وابستگی به کشورهای دیگر شود (امجدیان، ۱۳۹۲).

۱-۲. کشت بافت گیاهی

افزایش جمعیت جهان و کاهش منابع تولید فرآورده‌های گیاهی یک مشکل جدی و اساسی است که دانشمندان را از دهه‌های گذشته تاکنون به این فکر ترغیب نموده تا دست به تولید بهتر و بیشتر محصولات گیاهی بزنند. یکی از این روش‌ها استفاده از فن آوری کشت سلول و بافت‌های گیاهی است (امیدی، ۱۳۹۴).

کشت بافت سلول گیاهی براساس نظریه اشلیدن و شوان، در سال ۱۸۳۸ مبنی بر دارا بودن خاصیت توتی پتنسی سلول‌ها پایه گذاری شد. توتی پوتنسی خاصیتی است که براساس آن هر سلول از یک موجود پرسلولی دارای توان تبدیل شدن به موجود کامل را دارد. شوان در عمل موفق به رفع مشکلات تکنیکی برای اجرای کار نشد. در سال ۱۹۰۲ هابرنند، موفق شد اولین گام را در کشت آزمایشگاهی برداشته و در محیط کربوهیدرات مبادرت به کشت سلول‌های منفرد نماید که علی‌رغم زنده ماندن قادر

به تکثیر نبود. در سال ۱۹۳۹ گاترت موفق به تولید کالوس هویج و نگهداری برای زمان طولانی شد. وایت نخستین کسی بود که در سال ۱۹۵۴ مساله کشت سلولی را به روشنی بیان کرد. وی اذعان داشت که تفاوت‌های بین سلول‌های یک ارگانیسم ناشی از واکنش سلول به محیط خود و نسبت به سلول‌های دیگر است. لذا امکان دارد بتوان با جدا نمودن سلول، پتانسیل نهفته توتی پتنسی را به آن‌ها بازگردانید. البته احتمال دارد این خاصیت برای همیشه از دست رفته باشد. نهایتاً در سال ۱۹۵۸ راینرت برای اولین بار موفق به تولید ساقه و ایجاد گیاه از طریق کالوس شد. در سال ۱۹۶۲، موراشیک و اسکوگ محیط کشت مناسبی از نظر عناصر پرمصرف و کم مصرف، فشار اسمزی، کربوهیدرات‌های لازم، هورمون و غیره ارائه نمودند که به عنوان محیط کشت MS (موراشیک و اسکوگ) در بسیاری از موارد استفاده می‌شود. در دهه ۱۹۷۰، کشت سلول و بافت‌های گیاهی وارد مرحله نوینی از تکامل خود شد. طبق نظر موراشیک تا سال ۱۹۷۷، بیش از ۶۰۰ گونه از گیاهان زینتی به طریق کلون تکثیر شدند. استفاده از روش ایجاد کلون‌های آزمایشگاهی در گیاهان چوبی، روغنی، باغی و بسیاری از محصولات زراعی نیز گسترش یافت. در حال حاضر نیز کشت بافت به عنوان پیش‌نیاز مهندسی ژنتیک از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. به طوریکه این تکنیک، نقش کلیدی در دومین انقلاب سبز دارد که در آن تغییر ژن و بیوتکنولوژی در جهت اصلاح و بهبود کیفیت محصولات زراعی بکار می‌رود (فرشادی، ۱۳۹۰).

عمده‌ترین موارد استفاده از فن‌آوری کشت بافت‌های گیاهی در کشاورزی شامل ایجاد گیاهان دورگه، ازدیاد غیر جنسی گیاهان به روش رویشی، تولید گیاهان عاری از عوامل بیماری‌زا و ایجاد بانک ژن از گیاهان دارویی می‌باشد. در حال حاضر با استفاده از کشت بافت گیاهی، امکان تولید متابولیت‌های ثانویه‌ای که از نظر صنعتی مورد توجه می‌باشند، مانند آنتی‌بیوتیک‌ها، ترکیبات آلكالوئیدی ضد سرطان، ویتامین‌ها، آنزیم‌ها، ادویه‌جات و حشره کش‌ها میسر گردیده است (نوری قنبلانی، ۱۳۷۱).

۱-۳. متابولیت‌های ثانویه

عمدتاً یکسری از واکنش‌های شیمیایی که واسطه آنزیمی دارند در گیاه زنده به عنوان متابولیسم شناخته می‌شوند. این واکنش‌های شیمیایی با یکدیگر هماهنگ شده تا مسیرهای متابولیکی که در آن‌ها سنتز

مولکول‌هایی مثل قندها، اسیدهای آمینه، اسیدهای چرب عمده، نوکلئوتیدها و پلیمرهای حاصل انجام می‌شود، به دست آیند. تجمع DNA و RNA به عنوان متابولیسم اولیه در نظر گرفته می‌شود و ترکیبات تولیدشده که برای زنده ماندن و سالم ماندن گیاه لازم هستند، متابولیت اولیه نامیده می‌شود. همچنین در گیاهان، مسیرهای متابولیکی دیگری نیز وجود دارد که محصول این مسیرها برای رشد و نمو گیاه کاملاً ضروری نیست، به این ترکیبات متابولیت‌های ثانویه اطلاق می‌گردد و به مسیر تولید آن‌ها متابولیسم ثانویه گویند. تولید متابولیت‌های ثانویه بخشی از سیستم دفاعی گیاه را تشکیل می‌دهد (سهیلی خواه، ۱۳۸۸).

متابولیت‌های ثانویه جزء گران‌بهارترین ترکیب شیمیایی گیاهی هستند که دسته‌ای از مواد مانند لاکتون-ها، فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌ها را شامل می‌شوند و به صورت عصاره یا پودرهای گیاهی در درمان بسیاری از بیماری‌های شایع به کار برده می‌شوند. سلول‌ها و یا بافت‌های گیاهی توان تولید این ترکیبات را حتی تحت شرایط آزمایشگاهی در خود نگاه می‌دارند و این مسئله باعث شده که برای ساخت مواد مورد نیاز بشر در مقیاس صنعتی، نه تنها کاشت و تکثیر سلول‌ها و بافت‌های گیاهی در شرایط آزمایشگاهی از مباحث نوید بخش امروز زیست فناوری گیاهی باشد، بلکه استحصال آنزیم‌های گیاهی و بکارگیری آن‌ها در مسیر متابولیکی، سنتز یک متابولیت ثانویه مورد توجه خاصی قرار گیرد

۱-۴. کشت بافت در نعنایان

تکنیک کشت بافت و فن‌آوری DNA نو ترکیب ابزارهای قدرتمندی هستند که می‌توانند تکمیل کننده روش‌های اصلاحی رایج برای اصلاح نعنایان باشند. کشت بافت گیاهی می‌تواند تنوع موجود در ارقام نعنایان که از طریق روش‌های سوماکلونال، هیبریدهای سوماتیکی یا گیاهان ترانسژنیک ایجاد شده اند را معرفی کند. کشت درون شیشه‌ای نعنایان شامل گونه‌های *M. spicata*، *M. aquatica*، *M. arvensis*، *M. viridis*، *M. suaveolens*، *M. suaveolens hybrid*، *M. pulegium*، *M. piperita* به طور موفقیت آمیزی بوده که از دیسک برگ، گره، میانگره و مریستم نوک ساقه به عنوان ریزنمونه به کمک اندام زایی مستقیم یا از طریق کالوژنیز (Kalogenesis) استفاده شده است (ریچ و پیپر، ۱۹۸۶؛ وان، ۱۹۹۲؛

کایسارد، ۱۹۹۶). براساس مطالعات آهیراتا و همکارانش در سال ۱۹۹۰، محیط مایع B5 با مقادیر بالای اکسین NAA (۴۰۲ میلی گرم در لیتر) عاملی برای کالوس زایی در گیاه نعناع اعلام شد. ایموت و ساتو نیز طی تحقیقی تکثیر گونه‌های متفاوتی از نعناع را از طریق کشت پرتوپلاست گزارش کردند و با استفاده از هورمون‌های رشد، شاخه زایی و ریشه زایی نعناع را بررسی کردند (ایموت و ساتو، ۱۹۹۳). گرچه این بررسی نشان داد که اندام زایی در بعضی گیاهان تیره نعناع به سختی صورت می‌گیرد. کیتو و وان یک نیز در سال ۱۹۹۰ گزارشی از کشت نعناع در محیط کشت MS ارائه دادند که از جنین بالغ و نابالغ، دانه و قطعات گل جهت کشت استفاده شده بود. در این گزارش ریشه زایی و شاخه زایی قطعات ذکر شده گیاهی با استفاده از مقادیر متفاوت هورمون‌های رشدی بررسی شد اما آن‌ها نتوانستند به گیاه کامل باززا شده دست یابند (کیتو و وان یک، ۱۹۹۰). در بررسی دیگری که توسط سادیا و همکارانش بر روی گیاه نعناع فلفلی به عنوان منبع ریزنمونه در حضور تیمارهای هورمونی مختلف انجام شد، نشان داد با توجه به نوع ریزنمونه و تنظیم کننده‌های رشد در محیط کشت، تنوع زیادی در رشد وجود دارد. در این گزارش هم چنین عنوان شده که مریستم شاخساره بیشترین باززایی را دارد و دیسک‌های برگی تنها باززایی ۱۰ درصدی را نشان می‌دهند (سادیا، ۲۰۰۱).

۵-۱. نعناعیان

در میان گیاهان دارویی، خانواده نعناعیان (*Labiatae = Lamiaceae*) با تولید متابولیت‌های ثانویه متفاوت و فراوان مورد توجه‌اند. این گیاهان غنی از ترکیبات پلی فنولی بوده و تعداد زیادی از آن‌ها به دلیل خواص آنتی‌اکسیدانی‌شان شناخته شده‌اند.

پراکندگی این گیاهان به صورتی است که در غالب نواحی کره زمین مانند مناطق اروپا و نواحی مدیترانه و شمال آمریکا کشت می‌شوند و بومی بالکان، شمال و غرب ترکیه هستند (مجیدی، ۱۳۸۰). نعناع در ایران، در نواحی شمالی، شمال غربی و نواحی مختلف بلوچستان به طور وحشی می‌روید (فاطمی و قاسمی، ۱۳۷۱؛ زرگری، ۱۳۷۲).

نعناعیان معمولا علفی، درختچه‌ای و به ندرت درختی یا بالارونده‌اند (گوود، ۱۹۷۴؛ زرگری، ۱۳۷۲). از ویژگی‌های مهم آن‌ها، داشتن گل‌های لب‌دیزی با پرچم‌های خاص می‌باشد که برای گرده افشانی توسط حشرات سازش یافته‌اند. در گیاهان تیره نعناعیان فرمول کلی اجزای گل به صورت ۲ برچه، ۴ پرچم، ۵ کاسبرگ و ۵ گلبرگ می‌باشد (زرگری، ۱۳۷۲).

طبق بررسی‌های بعمل آمده گیاه نعناع دارای ۳۳۰۰ گونه است که در ۲۲۰ جنس جای داده شده است (نیکاو، ۲۰۰۸). به این صورت که از میان جنس‌های مهم این خانواده، منتا شامل حدود ۲۰ گونه، دراکوسفالوم حدود ۵۰ گونه، ماروبیوم حدود ۵۰ گونه، آویشن (تیموس) حدود ۷۰ گونه و مریم گلی (سالویا) حدود ۶۰۰ گونه م باشند (نفر، ۱۳۹۲).

بین گیاهان این خانواده، *Mentha* یکی از مهمترین جنس‌ها از لحاظ وجود متابولیت‌های ثانویه، با توزیع وسیع و اهمیت تجاری قابل ملاحظه‌ای است در هر پنج قاره جهان کشت می‌شود (تایاجی و ادهم، ۱۹۸۹). بری کوآت تنها ۱۵ گونه را شناسایی کرده است که بیشتر این گونه‌ها در فرم هیبرید بودند (بری کوآت، ۱۹۸۷). در طبقه بندی تاکسونومی جدید، این جنس به پنج قسمت تشکیل شده است که شامل ۱۹ گونه و ۱۳ هیبرید می‌باشد (چمبرز و هومر، ۱۹۹۴؛ مورتون ۱۹۵۶). اولین بخش، *Audibertia* با پایه کروموزومی ۹ است که شامل یک گونه *M.requienii* با ۱۸ کروموزوم و دومین بخش *Eriodontes* با پایه کروموزومی ۱۲، ۱۰، ۵ می‌باشد. یکی از گونه‌های این جنس *M.australis* با $n_{2}=27$ کروموزوم است. گونه‌های دیگر این جنس شامل *M.cunninghami*، *M.japonica*، *M.diemenica* بوده و به ترتیب ۷۲، ۵۰ و ۶۰ کروموزوم دارند. کوکینی به این بخش به عنوان بخشی که دربرگیرنده یک تعداد گونه با روابط غیر مشخص کروموزومی است، اشاره نموده است (کوکینی، ۱۹۹۲).

سومین بخش از این جنس، شامل بخش *Preslia* بوده و دارای عدد کروموزومی ۱۲، ۱۰ است. سه نمونه از گونه *M.cervina* بر پایه وجود برگچه‌های لب دار و کاسه چهار دندانه‌ای و ویژگی‌هایی که در دیگر گونه‌های *mentha* یافت نمی‌شوند، در یک جنس مجزا قرار گرفته‌اند (هارلی، ۱۹۷۲).

چهارمین بخش، *Pulegium* است و دارای پایه کروموزومی ۱۲، ۱۰ می‌باشد. مورتون گزارش کرد این بخش گونه‌های *M.gattefossei* و *M.pulegium* را دربرگرفته و دارای سه سطح پلوئیدی ۲۰، ۳۰، ۴۰ n است. این گونه با ویژگی‌های بی نظیر غیر ایستا بودن و محتوای بالای پولیگون شناسایی شده است (زینلی، ۱۳۷۵)

آخرین بخش از این جنس، شامل بخش *Mentha* است که از بزرگترین و پیچیده‌ترین جنس نعناع می‌باشد (زرگری، ۱۳۶۹). شناسایی اعضای این بخش به علت انعطاف پذیری فنوتیپی و ژنتیکی از طریق دو رگه شدن با مشکل مواجه است. این بخش شامل گونه‌های با اهمیت اقتصادی مانند *M.spicata*، *M.longifolia* و *M.arvensis* می‌باشد (هومر و چمبر، ۱۹۹۴؛ پاترا، ۲۰۰۰)

۱-۵-۱. نعناع آبی

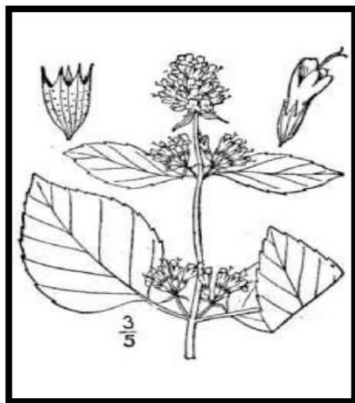
گونه *Mentha aquatica L.* متعلق به جنس *Mentha* و از خانواده نعناعیان، با نام عمومی *Water Mint* یا *Common mint* (جمشیدی، ۱۳۸۹) است که با نام‌های *Mentha hirsuta*، *Mentha acuta*، *Mentha acutata* نیز خوانده می‌شود (world flowering plants.com).

در منطقه ناتالی آفریقا این گیاه وحشی را با عناوین *Imbozisa* (-amabunu)، *Umayime* و *Umnukani* می‌شناسند. این گیاه در باتلاق‌ها و مناطق پست، از امریکای جنوبی تا آفریقا و اروپا نیز یافت می‌شود (جاگر و همکاران، ۲۰۰۷).

۱-۵-۲. گیاه شناسی نعناع آبی

از نظر گیاه شناسی، نعناع آبی گیاهیست چندساله یا دائمی که از طریق دانه یا ریزوم تکثیر می‌شود و حدود ۹۰ سانتیمتر ارتفاع دارد. برگ‌های این گیاه سبز رنگ، گاهی بنفش و تخم مرغی شکل بوده و بین ۰/۷۹ تا ۲/۴ اینچ (۲ تا ۶ سانتیمتر) طول و ۰/۳۹ تا ۱/۶ اینچ (۲ تا ۴ سانتیمتر) عرض دارند، این برگ‌ها به صورت متقابل روی ساقه قرار گرفته، کرک دار یا بدون کرک و حاشیه آن‌ها دندانه دار است. ساقه‌های نعناع آبی نیز مربعی، دارای کرک یا بدون آن و به رنگ سبز یا بنفش می‌باشند. ریزوم دارای گستردگی وسیع و ریشه گوشتی و فیبری است. گل‌ها به رنگ‌های صورتی و یاسی، به صورت کوچک،

متراکم و لوله ای شکل است که مجموعاً گل آذینی نیمکره در انتهای ساقه به وجود می‌آورد. شکوفایی گل‌ها از اواسط تا انتهای تابستان ادامه دارد (جاگر و همکاران، ۲۰۰۷). شکل ۱-۱، تصویری از گیاه نعناع آبی را نمایش می‌دهد.



USDA United States Department of Agriculture
Natural Resources Conservation Service

شکل ۱-۱. گیاه نعناع آبی (*Mentha aquatica* L.)

۱-۵-۳. دلایل استفاده از گیاه نعناع

آنچه استفاده از گیاهان خانواده نعناعیان را از نظر دارویی به یک گیاه استراتژیک تبدیل کرده است، اسانس موجود در این گیاهان است. از خواص این اسانس در بخش‌های مختلف گیاه، برای رفع خستگی، ضعف، افسردگی، تقویت حافظه، بهبود گردش خون، تقویت عروق خونی شکننده، التهاب، عفونت، سوء

هاضمه و ورم معده استفاده می‌شود. محققان ثابت کرده‌اند که این گیاهان منبع ترکیباتی با خواص آنتی‌اکسیدانی، ضد التهاب، ضد حساسیت، ضد افسردگی، ضد قند خون و ضد میکروبی هستند. این فعالیت‌ها عمدتاً به محتوای ترکیبات فنلی آن‌ها برمیگردد. امروزه صنایع داروسازی، عصاره‌ی برخی گونه‌های نعناع را که دارای اثر بسیار قوی می‌باشند به قطره‌های خوراکی تبدیل نموده است تا با توجه به مایع بودن، به سرعت و در عرض چند دقیقه جذب شده و اثر نماید. محصولات حاصله از این گیاهان ضمن اثرات سریع، از عارضه‌ی جانبی برخوردار نمی‌باشند و با داروها و غذاها تداخل نمی‌نمایند. روغن یا اسانس نعناع در مواد غذایی تجاری بویژه در آدامس و دهان‌شویه‌ها نیز استفاده می‌شود. محصولات غیرخوراکی مانند لوسیون موضعی منتا نیز برای درمان موضعی سردرد و درمان دردها و کشیدگی‌های عضلانی و استئوآرتریت زانو استفاده می‌شوند (شکارچی، ۲۰۰۲).

۱-۶. روغن‌های ضروری

روغن‌های ضروری و ترکیبات ترپنوئیدی روغن در بسیاری از گونه‌های نعناع وجود دارد که در گونه‌های مختلف مقادیر متفاوتی را نشان می‌دهند، دلیل این تفاوت، میزان متفاوت ترکیبات تشکیل دهنده موجود در روغن‌هاست. مقالات متعددی این ترکیبات ثانویه را از گیاهان مختلف مانند نعناع استخراج کرده‌اند. برای مثال گوک دایی و همکارانش، با تقطیر روغن موجود در گیاه نعناع آبی که از مناطق مختلف جهان جمع‌آوری شده بود، اجزای تشکیل دهنده روغن‌های ضروری این گیاه را بیان کردند. در میان نمونه‌ها، ریزنمونه‌های بخش‌های هوایی گیاهی که از ایران گرفته شده، به ترتیب مقدار دارای ۸۱ سینئول (۲۷٪/۲)، منتوفوران (۲۳٪) و بتا کاریوفیلین (۱۲٪/۸) بود. ساقه‌های این گیاه دارای بتا کاریوفیلین (۲۲٪/۴) و ویریدیفلورول (۱۱٪/۳) و برگ‌ها دارای پیپریتون اکسید (۲۵٪/۷)، بتا کاریوفیلین (۱۲٪/۱)، ۸۱ سینئول (۱۰٪/۳) بوده است (گوک دایی، ۲۰۱۵).

در آزمایش دیگری گراسیندو و همکارانش ژنوتیپ‌های نعناع را در مناطق مختلف برزیل ارزیابی و مقایسه کردند. آن‌ها ۲۱ ژنوتیپ را شناسایی و ترکیبات روغن‌های فرار و درصد ترکیبات روغن‌های ضروری را بررسی کردند. ترکیبات اساسی و مهم روغن‌های ضروری گونه نعناع آبی که از مناطق مختلف

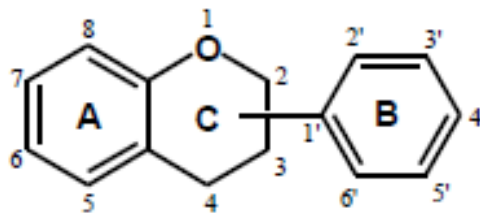
برزیل با نام های مخصوص جمع آوری شد شامل: نمونه ۱CM با عنوان Lime mint، دارای ترکیبات لیمونن با بیشترین مقدار، ۸۱ سینئول و کارون، نمونه ۱۳CM با عنوان Orange mint دارای لینالول با بیشترین مقدار، لیمونن، ۸۱ سینئول و لینالیل استات است. همچنین نمونه ۱۸CM با عنوان Common mint دارای بیشترین مقدار پیپریتون اکسید و مقادیر متفاوتی از لیمونن، منتیل استات، ۸۱ سینئول و کارون را دارد. در نهایت نمونه ۱۹CM نیز با عنوان Mintlavender دارای بیشترین مقدار لینالول و مقادیر کمتر ۸۱ سینئول، منتول، کارون و لینالیل استات را در خود نشان می دهد (گراسیندو، ۲۰۰۶).

این ترکیبات به دلیل داشتن عطر و طعم متفاوت و منحصر به فرد خود مورد توجه بازار تجاری قرار گرفته و در صنایع مختلفی مورد استفاده قرار می گیرند. برای مثال منتول در صنعت شیرینی سازی، عطر سازی و تولید سیگار استفاده می شود. همچنین در تولید داروهای ضعیف بیهوشی و ضد عفونی کننده ها کاربرد دارد. این ماده طبعاً دارای خاصیت ضد نفخ و مسکن معده نیز می باشد. کارون به عنوان چاشنی برای طعم دادن به نوشابه های الکلی، محصولات بهداشتی دهانی مانند خمیر دندان و دهانشویه ها و در عطر سازی به کار گرفته می شود (باوور، ۱۹۹۷). لیمونن یک آنتی اکسیدانت است و می تواند به عنوان حلال یا شوینده استفاده شود. از طعم و عطر پیپریتون نیز مانند کارون در ساخت خمیردندان استفاده می کنند. همچنین لینالول، پلیگون و متیل استات به دلیل عطر خوبی که دارند در صنایع عطر سازی به کار برده می شوند (ویند هولز، ۱۹۸۳).

۷-۱. پلی فنول ها

پلی فنول ها یکی از گسترده ترین گروه های مواد شیمیایی شناخته شده در گیاهان را تشکیل می دهند و تخمین زده می شود که بیش از ۸۰۰۰ ترکیب فنولی از سلسله گیاهی جداسازی و بررسی شده باشد (یزدانی ۱۳۸۱). به دلیل ویژگی های منحصر به فرد این ترکیبات است که توجهات زیادی را در دهه اخیر به خود معطوف کرده اند، چرا که با ورود این ترکیبات به رژیم غذایی و مکمل ها تاثیر مثبتی بر سلامت انسان داشته اند. پلی فنول ها در واقع ترکیبات شیمیایی پلی هیدرکسیله هستند که براساس

تعداد حلقه فنلی در ساختارشان، عناصر ساختاری که این حلقه‌ها را به هم متصل می‌کند و استخلاف-هایی که به حلقه متصل است، به دو گروه فلاونوئیدها و غیرفلاونوئیدها طبقه بندی می‌شوند. اکثر ترکیبات جداسازی شده به زیرکلاس فلاونوئیدها تعلق دارد. فلاونوئیدها با داشتن دو یا چند حلقه آروماتیک شناسایی می‌شوند که هر کدام از این حلقه‌ها دارای یک یا تعداد بیشتری گروه هیدروکسیل فنولی هستند که به یک پل کربنی متصل است. یک حلقه آروماتیک (حلقه A) با پل کربنی که شامل سه اتم کربن است به حلقه آروماتیک دوم (حلقه B) متصل می‌شود. هنگامی که زنجیره سه کربنه به گروه هیدروکسیل از حلقه A متصل می‌شود، ساختار حاصل حلقوی شده و به صورت یک حلقه‌ی شش‌عضوی درمی‌آید (شکل ۱-۲). اکثر فلاونوئیدها این ساختار را دارند و بر اساس موقعیت حلقه B و حضور یک پیوند دوگانه به گروه‌های متفاوتی تقسیم بندی می‌شوند (آتاناسوا، ۲۰۱۱).



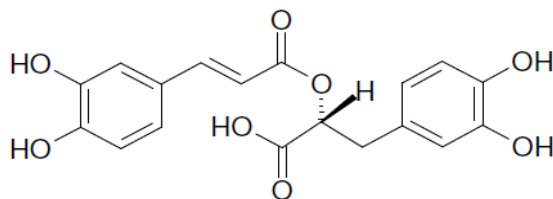
شکل ۱-۲. ساختار پایه فلاونوئید

گروه غیرفلاونوئیدها شامل فنولیک اسیدها و پلی فنولیک آمیدها است. فنولیک اسیدها معمولاً به دو گروه عمده تقسیم می‌شوند. این ترکیبات از بنزوئیک اسیدها که دارای هفت اتم کربن هستند و یا از سینامیک اسیدها که دارای نه اتم کربن هستند، مشتق می‌شوند. تمام این ترکیبات هیدروکسیله‌اند. پلی فنولیک آمیدها نیز نوعی از پلی فنول‌ها، حاوی استخلاف‌های عملکردی حاوی نیتروژن هستند. علاوه بر فلاونوئیدها و فنولیک آمیدها چندین غیر فلاونوئید دیگر نیز وجود دارد که برای سلامتی انسان مهم می‌باشند. در این میان Resveratrolها واحدهای منحصر به فرد در انگور و شراب قرمز است.

Ellagic acid و مشتقات آن در میوه هایی چون توت فرنگی و تمشک یافت شده است. Lignanها نیز در کتان، کنجد و بسیاری از دانه ها وجود دارد (آتاناسوا، ۲۰۱۱).

تمام پلی فنول هایی که در گیاهان یافت شده اند با گلوکز و دیگر کربوهیدراتها (گلیکوزیدها) استری می شوند و یا به صورت گلیکوژن های آزاد وجود دارند. این امر منجر به پیچیدگی آنها شده و تعداد زیادی از ترکیبات منفرد جداسازی و شناسایی شده اند. پلی فنول های موجود در رژیم غذایی، از میوه ها شامل انواع توتها، سیب، مرکبات و گیلاس، گیاهان دارویی، ادویه جات شامل زردچوبه و درخت شجرالمعبد، چای سبز یا سیاه و شراب قرمز جداسازی شده اند.

مشخص شده است که مصرف فلاونوئیدهای موجود در غذاها، بخصوص میوه ها و سبزیجات به سلامت انسان کمک می کند. مطالعات اپیدمیولوژیک نشان می دهد که ارتباط زیادی بین سطح پایین بیماری های قلبی، سرطان دستگاه گوارش، بیماری های کبدی، تصلب شرایین و آلرژی و میزان مصرف پلی فنول ها دارد (تی ساوو، ۲۰۱۰).



شکل ۱-۳. نمایی شماتیک از ترکیب رزمارینیک اسید

۸-۱. رزمارینیک اسید

رزمارینیک اسید (RA) یکی از این پلی فنول هاست که در واقع یک استر کافتیک اسید است (شکل ۱-۳). بیوسنتز رزمارینیک اسید با مولکول های پیش ساز L- فنیل آلانین و L- تیروزین شروع و از طریق مسیر فنیل پروپانوئید سنتز می شود (بوک کیم، ۲۰۱۳).

این ترکیب با نام شیمیایی ۳،۴-دی هیدروکسیل فنیل لاکتیک اسید و فرمول $C_{18}H_{16}O_8$ شناخته می شود (آیدی، ۲۰۱۶) و برای اولین بار در سال ۱۹۵۸ توسط دو شیمیدان ایتالیایی به نام های اسکارپاتی

و اورینته از رزماری (*Rosmarinus officinalis*) جدا شد. رزمارینیک اسید معمولا در حسن یوسف، مریم گلی، بادرنجیویه، آویشن، پونه کوهی، نعنای فلفلی و رزماری نیز یافت می‌شود (فدال، ۲۰۱۰). تحقیقات نشان داده است که در بین پلی فنول های موجود در خانواده نعنائیان، رزمارینیک اسید دارای سهم بالایی است (شکارچی، ۲۰۱۲). جدول ۱-۱ میزان متابولیت رزمارینیک اسید را در برخی گونه‌های متفاوت نعنای نشان می‌دهد.

جدول ۱-۱. مقایسه میزان رزمارینیک اسید موجود در برخی گونه‌های خانواده نعنائیان (شکارچی، ۲۰۱۲).

Plant name	Collection area	RA Concentration (mg g ⁻¹)*
<i>Mentha aquatica</i>	Golestan, Gorgan	24.6 ± 0.2
<i>Mentha crispa</i>	Golestan, Gorgan	19.3 ± 0.2
<i>Mentha longifolia</i>	Golestan, Gorgan	26.6 ± 0.3
<i>Mentha piperita</i>	Golestan, Gorgan	28.2 ± 0.3
<i>Mentha pulegium</i>	Golestan, Gorgan	23.4 ± 0.3
<i>Mentha spicata</i>	Golestan, Gorgan	58.5 ± 1.4
<i>Origanum vulgare</i>	Mazandaran, Salmanshahr	25.0 ± 0.1

۱-۸-۱. نقش و کاربرد

اعتقاد بر این است که رزمارینیک اسید به عنوان بخشی از سیستم دفاعی گیاه در برابر قارچ و عفونت‌های باکتریایی و یا شکارچیان محسوب می‌شود. فعالیت بیولوژیکی رزمارینیک اسید به عنوان آنتی اکسیدانت، ضد باکتری، ضد ویروسی و ضد التهابی شرح داده شده است. این ترکیب به صورت تجاری برای نگهداری غذا نیز استفاده می‌شود. بسیاری از محصولات حاوی RA هستند، اما به تازگی این ترکیبات خالص سازی شده و به عنوان داروی تجاری استفاده می‌شوند. در بررسی‌های متعددی، فعالیت‌های دارویی این ترکیب مورد مطالعه قرار گرفته است. به عنوان مثال با جلوگیری از اکسیداسیون لیپو پروتئین‌هایی با چگالی کم، از تکثیر زیاد سلول‌های موش‌های آزمایشگاهی جلوگیری می‌کند. این ترکیب با داشتن خاصیت آنتی اکسیدانی و ضد التهابی در زخم‌های گوارشی، ورم مفاصل و دردهای رماتیسمی، آب مروارید، سرطان و آسم‌های برونشیتی و همچنین خاصیت ضد ویروس HIV-1 نقش ایفا می‌کند

(گزنگو، ۲۰۱۳). فعالیت آنتی اکسیدانی رزمارینیک اسید قوی تر از ویتامین E است. این ماده همچنین به بهبود سلول‌های آسیب دیده توسط رادیکال‌های آزاد کمک می‌کند و بدینوسیله خطر ابتلا به سرطان و تصلب شرایین را کاهش می‌دهد. نقش مهم دیگر رزمارینیک اسید، کمک به کاهش التهاب در مناطق آسیب دیده است و این کار را با جلوگیری از تجمع پروتئین‌های درگیر در فعالیت‌های التهابی انجام می‌دهد. چرا که تداوم التهاب ممکن است باعث آسیب به سلول‌های مجاور بافت آسیب دیده شود و رزمارینیک اسید با خاصیت ضد التهابی خود این خطر را کاهش می‌دهد (پارک، ۲۰۰۸).

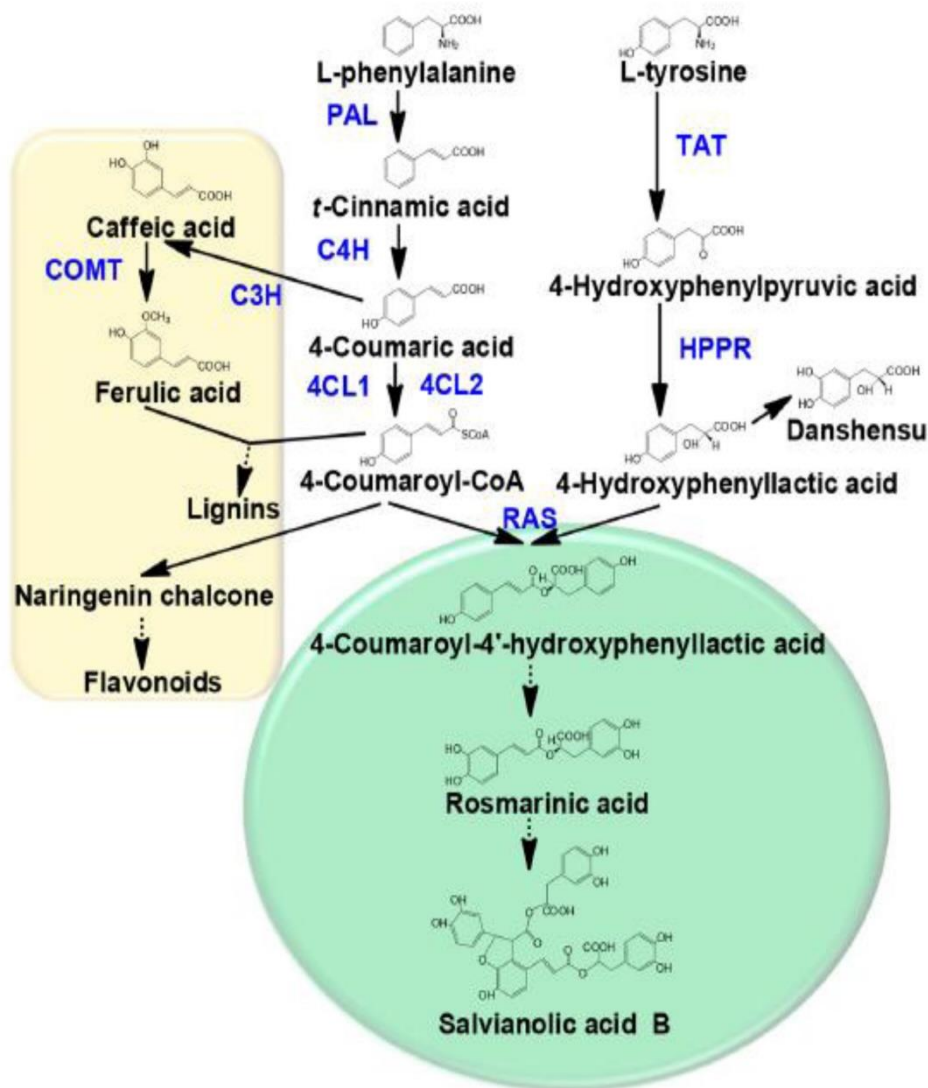
گیاه Perilla یا نعناع ارغوانی به دلیل اینکه غنی از رزمارینیک اسید است در فعالیت‌های ضد آلرژیک استفاده می‌شود. مطالعاتی که توسط سانبورجی و همکارانش انجام شد نشان می‌دهد که خوردن این گیاه، یک روش نفوذی موثر برای مقابله با آسم‌های آلرژیک است (سانبورجی، ۲۰۰۴). مطالعه دیگری توسط یان در سال ۲۰۰۳ انجام شد که نشان می‌دهد رزمارینیک اسید باعث سرکوب ورم غشایی موش‌های آزمایشگاهی شده است و این امر ممکن است برای درمان دردهای رماتیسمی مفید باشد (یان، ۲۰۰۳).

۱-۸-۲. مسیر واکنش

در مسیر واکنش‌های بیوسنتز RA، این ماده از طریق مسیر فنیل پروپانویید سنتز می‌شود. فنیل آلانین آمونیا لیا (PAL) تبدیل فنیل آلانین به سینامات را کاتالیز می‌کند. PAL همچنین در تبدیل تیروزین به P-کومارات، البته با بهره‌وری پایین‌تر شرکت می‌کند. سینامات ۴-هیدروکسیلاز (C4H) سنتز P-هیدروکسی سینامات از سینامات را انجام می‌دهد و ۴-کوماراروئیل کوانزیم-آ لیگاز (4CL) تبدیل P-کومارات به استر کوانزیم-آ را جهت فعال شدن آن برای واکنش با مالونیل کوانزیم آ برعهده دارد. در مسیر منجر به RA، تراکم ۴-هیدروکسی فنیل لاکتیک اسید با ۴-کوماراروئیل-کوانزیم آ توسط هیدروکسی سیناموئیل کوانزیم آ (یا هیدروکسی فنیل لاکتات هیدروکسی سیناموئیل ترانسفراز) (RAS) کاتالیز می‌شود. که در آخرین مرحله، این واکنش‌ها توسط دو متمایز کاتالیز P450s سیتوکروم: ۳-هیدروکسی سیناموئیل (H-۳) و ۳۹-هیدروکسی سیناموئیل (H-۳۹) کاتالیز می‌شود. آنزیم مهم در

این واکنش ها، PAL (phenylalanine ammonia-lyase) است. البته در برخی منابع آنزی های مهم دیگری مانند هیدروکسی فنیل پیرووات ردوکتاز و رزمارینیک اسید سنتاز نیز مورد بررسی قرار گرفته است. آنزیم اول واکنش کاهش ۴- هیدروکسی فنیل پیرویک اسید یا ۳و۴- دی هیدروکسی فنیل پیرویک اسید به لاکتیک اسیدهای مربوط به آن انجام می دهد. و آنزیم رزمارینیک اسید سنتاز (3,4-dihydroxyphenyllactic acid caffeoyl transferase : caffeoyl-Coenzyme A) که بخش کافئوئیل را از کافئوئیل- کوآنزیم آ به ۳ و ۴- دی هیدروکسی فنیل لاکتیک منتقل می کند (بوک کیم، ۲۰۱۳). شکل ۱-۴ مسیر بیوسنتز رزمارینیک اسید را نشان می دهد.

در این مسیر، ژن *SmMYB39* از خانواده ی پروتئین های MYB^۱ که یکی از بزرگترین خانواده های عامل رونویسی در گیاهان هستند، در بیان بالا، چند ژن آنزیم کلیدی در مسیر فنیل پروپانویید مانند C4H_{4CL}₁، 4CL₂ و TAT را کاهش می دهد (پیترسن، ۱۹۹۸). این ژن ها متعلق به زیر خانواده ی MYB-R₂ ، با نام MYBs R2R3 هستند که دامنه N-ترمینال متصل به DNA (در تکرارهای R2 و R3) آن ها، به شدت حفاظت شده اما توالی اسید آمینه ای C-ترمینال آن متنوع است و مسئول عملکردهای مختلف تنظیمی در نظر گرفته می شوند (تاهیرا، ۲۰۱۰).



TAT: tyrosine aminotransferase

PAL: phenylalanine ammonia-lyase

C4H: cinnamate 4-hydroxylase

4CL: 4-coumaroyl-CoA ligase : coenzyme A ligase

HPPR: hydroxylphenylpyruvate reductase

HPPD: hydroxylphenylpyruvate dioxygenase

RAS: hydroxycinnamoyl-CoA : hydroxyphenyllactate hydroxycinnamoyl transferase

شکل ۱-۴. مسیر واکنش رزمارینیک اسید. مراحل چندگانه آنزیمی با فلش‌ها نشان داده شده است. اشکال مربع و

دایره ارتباط بین مسیر سنتز رزمارینیک اسید و متابولیسم سایر فنیل پروپانویدها را نشان می‌دهد (ژانگ، ۲۰۱۳).

۹-۱. پروتئین MYB

فاکتورهای رونویسی^۱ نقش مهمی در کنترل جریان‌های مختلف مانند پاسخ به تنش‌های زیستی یا غیر زیستی، رشد و توسعه، تمایز، متابولیسم و مقابله با استرس‌ها ایفا می‌کنند. به همین دلیل فاکتورهای مناسبی در تغییر و اصلاح ویژگی‌های پیچیده گیاهان محسوب می‌شوند. تکنولوژی مبتنی بر فاکتورهای رونویسی بخش عمده‌ای از نسل جدید مهندسی ژنتیک در حوزه گیاهی است. کشت سنتی گیاهان به دلیل تنوع ژنتیکی در ژرم پلاسما برخی گیاهان خاص محدود شده است. تکنولوژی تراریخت از موانع ژنتیکی عبور کرده و اجازه بهبود مسیرهای کنترلی را در یک گیاه با استفاده از TFهای گیاهان دیگر داده است (سنتوری، ۲۰۰۸).

پروتئین‌های MYB یک خانواده بزرگ و با عملکرد گوناگون هستند که در تمام یوکاریوت‌ها وجود دارند. این پروتئین‌ها در نقش‌های تنظیمی و متابولیکی عمل می‌کنند که با شماره‌های متفاوتی از تکرارها، قابلیت اتصال به DNA را دارند. آن‌ها به طور گسترده در گیاهان وجود دارند و با دیگر فاکتورهای رونویسی در ارتباط‌اند. مطالعات سیر تکامل ژن MYB بر اساس توالی‌های این ژن از چند موجود زنده نشان می‌دهد که اجداد MYBهای گیاهی سه تکرار MYB بوده است که اولین تکرار آن مشخص نیست. مدلی از سیر تکاملی این پروتئین‌ها نیز گزارش شده است. براساس این گزارش، ژن R1R2R3MYB با نسخه برداری‌های متوالی دوگانه و سه گانه در یوکاریوت‌های ابتدایی تشکیل شده است و تاکنون تکرارهای دوگانه (R2R3-MYB) و سه گانه (R1R2R3-MYB) را در گیاهان و جانوران ایجاد کرده است (امبوات، ۲۰۱۳). همچنین اولین ژن MYB به عنوان *v-MYB* از ویروس Myeloblastosis طیور شناسایی شده است. این ژن دارای ۳ عضو A-MYB، B-MYB و C-MYB می‌باشد. اولین MYB شناخته شده، ژن C1 از گیاه *Zea mays* است (پاز آرس، ۱۹۸۷).

خانواده ژن‌های MYB با تنها ۵ R3-MYB از میان ژن‌های R2R3-MYB در گیاه آرابیدوپسیس دیده شده است (استراک، ۲۰۰۱؛ یان هویی، ۲۰۰۶). اخیراً دوو و همکارانش طرح کلی ژنوم R2R3-MYB

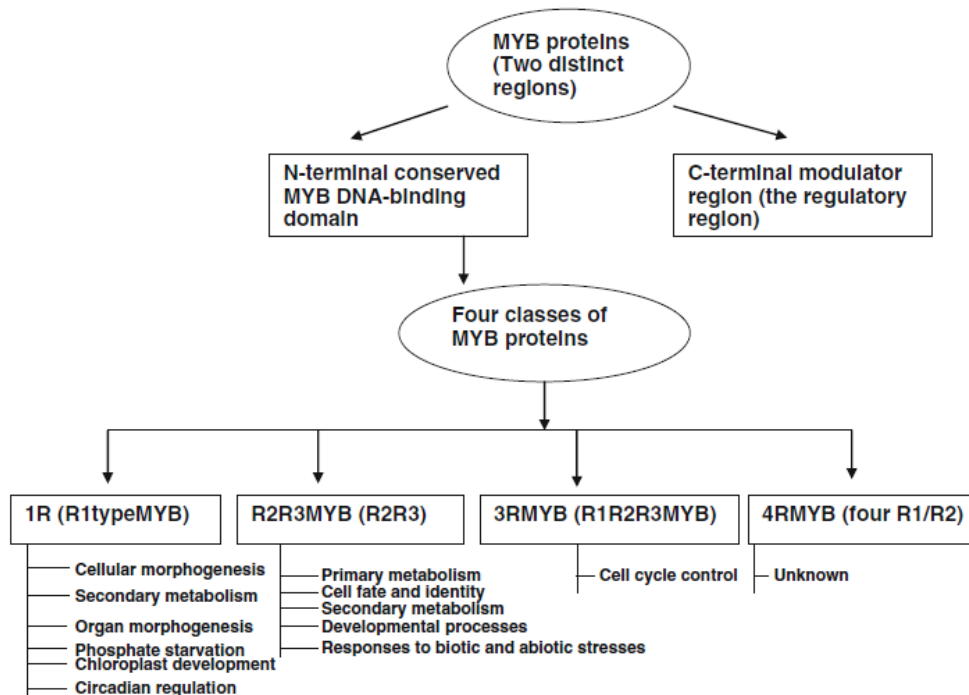
را در ذرت به نمایش گذاشتند و مجموعه کامل این ژن ها را در ژنوم این گیاه شناسایی کردند (دوو، ۲۰۱۲). همچنین سوپریا (۲۰۰۶) و شارما (۲۰۱۰) نیز فاکتورهای رونویسی MYB را در گونه های Brassica گزارش دادند.

۱-۹-۱. ساختار پروتئین MYB

برخلاف حیوانات، گیاهان دارای زیر خانواده پروتئینی MYB هستند که توسط ناحیه R2R3 شناسایی می شوند. این پروتئین ها دارای دو بخش مجزا هستند. ناحیه حفاظت شده N-ترمینال که به DNA متصل خواهد شد و ناحیه C-ترمینال که متنوع بوده و مسئول عملکردهای تنظیمی در گیاهان است. ناحیه MYB شامل ۴ تکرار آمینواسیدی ناقص (R)، متشکل از حدود ۵۲ آمینواسید است که هر کدام از این تکرارها ۳ آلفاهلیکس را تشکیل می دهند.

دومین و سومین هلیکس از هر تکرار، یک ساختار هلیکس دور هلیکس (HTH) را با ۳ تریپتوفان با فاصله و منظم تشکیل می دهند (اوگاتا، ۱۹۹۶). براساس شماره ناحیه ها در پروتئین MYB، این پروتئین به ۴ زیرشاخه تقسیم می شود: 1R، 3R، 4R و R2R3 (امبوات، ۲۰۱۳) (شکل ۱-۵). پروتئین های R2R3 مختص گیاهان هستند و با بیش از ۱۰۰ عضو در گیاهان تک لپه و دو لپه به وفور یافت می شوند (ژیانگ، ۲۰۰۴؛ ویلکینز، ۲۰۰۹).

همچنین براساس ناحیه حفاظت شده متصل به DNA و موتیف های آمینواسید در ناحیه C-ترمینال، پروتئین های MYB به چند زیر گروه تقسیم می شوند: زیر گروه A که اعضای آن مشابه با پروتئین های c-Myb و سایر پروتئین های حیوانی MYB است. زیر گروه B که کوچک ترین گروه محسوب می شود (۴ عضو از پروتئین های آرابیدوپسیس) و زیر گروه C که ۷۰ عضو از پروتئین های آرابیدوپسیس را شامل می شود (دوبوس، ۲۰۱۰؛ استراک، ۲۰۰۱).



شکل ۱-۵. ساختار پروتئین MYB، تقسیم بندی شاخه‌های متفاوت پروتئین MYB و عملکرد آن‌ها که به تعداد تکرارهای MYB بستگی دارد (امبوات، ۲۰۱۳).

۱-۹-۲. عملکرد MYB

بزرگ بودن خانواده MYB در گیاهان، اهمیت آن را در کنترل متابولیسم‌های گیاهی نشان می‌دهد. اگرچه در توالی این پروتئین‌ها، نواحی حفاظت شده وجود دارد و موجب می‌شود بخشی از توالی آن‌ها مشابه هم باشد اما عملکرد آن‌ها در گیاهان، گونه‌های مختلف گیاهی و حتی اندام‌های مختلف در یک گیاه متفاوت است (لیبی، ۲۰۰۴؛ سینگ، ۲۰۰۲؛ ویلکینز، ۲۰۰۹). در حال حاضر عملکرد بسیاری از فاکتورهای MYB ناشناخته مانده است. بنابراین کلون کردن ژن‌های MYB ضروری به نظر می‌رسد، تا بتوان به عملکرد آن‌ها در گیاهان و همچنین ارتباط آن‌ها با تنظیم متابولیت‌های ثانویه و پاسخ به هورمون‌ها و تنش‌های محیطی پی برد (یانگ، ۲۰۱۶). پژوهشگران تاکنون توالی ژن MYB را از گیاهان متفاوتی مانند *Arabidopsis thaliana* (ژان، ۲۰۱۳)، گیاه *Petunia hybrida* (گواتروچیو، ۱۹۹۹)، گیاه *Perilla frutescens* (سومپورن پایلین، ۲۰۰۲)، گیاه *Garcinia mangostana* (پالاپول، ۲۰۰۹)، گیاه *Vitis vinifera* (کوبایاشی، ۲۰۰۲) و *Zea mays* (پاز آرس، ۱۹۸۷) کلون کرده‌اند. در دهه اخیر، ژن‌های R2R3-MYB به طور اختصاصی مورد مطالعه قرار گرفت و مشخص شد اعضای این خانواده در عملکردهای بیولوژیکی

متعددی مانند متابولیسم فنیل پروپانوئید (گروتی ولد، ۱۹۹۴؛ هیچری، ۲۰۱۱)، تنش‌های زنده و غیر زنده (سگارا، ۲۰۰۹؛ لیپولد، ۲۰۰۹)، تمایز (کانگ، ۲۰۰۹؛ زی، ۲۰۱۰) و پاسخ‌های هورمونی (اوراوو، ۱۹۹۳) دخیل هستند. عملکرد برخی از پروتئین‌های MYB و کارکرد آن‌ها در گیاهان مختلف در جدول ۱-۲ آورده شده است.

جدول ۱-۲. برخی از پروتئین‌های MYB و عملکرد آن در گیاهان مختلف

پروتئین MYB	گونه گیاهی	عملکرد	منبع
AtMYB021/ AtMYB033/ AtMYB065	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Stamen development/ Anther development (tapetum), Filament length, GA- and JA- mediated	Mandaokar et al. 2006
AtMYB068/ AtMYB084	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Root elongation, Axillary meristem regulation/ Lateral organ formation	Feng et al. 2004
OsMYB2P-1	<i>Oryza sativa</i>	Root system architecture	Dai et al. 2012
GmMYB-G20-1	<i>Glycine max</i>	Flower color	Takahashi et al. 2013
AtMYB011/AtMYB012/ AtMYB111	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Phenylpropanoid pathway / Flavonol biosynthesis	Stracke et al. 2007
AmMYB305/ AmMYB340	<i>Antirrhinum majus</i>	Phenylpropanoid metabolism	Jackson et al. 1991
AtMYB003/AtMYB007/ AtMYB032	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Phenylpropanoid metabolism	Dubos et al. 2008
EsMYB	<i>Epimedium sagittatum</i>	Flavonoid biosynthesis	Huang et al. 2013
ZmMYBP1	<i>Zea mays</i>	Anthocyanin synthesis	Grotewold et al. 1994; Du et al. 2012b
OsGAMYB	<i>Oryza sativa</i>	Hormone response (GA signaling)	Gubler et al. 1997
AtMYB002	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Drought response	Urao et al. 1993
AtMYB015	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Cold stress tolerance	Agarwal et al. 2006
AtMYB030	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Abiotic stress response, SA-mediated pathway	Li et al. 2009

۱-۱۰. ریشه مویین

ریشه های مویین ساختار متفاوتی از ریشه های ترانسفرم شده هستند که با آلودگی زخم‌ها توسط اگروباکتریوم رایزوزنز تولید شده و گسترش می‌یابد. این پاتوژن باعث ایجاد بیماری ریشه مویین می‌شود که منجر به رشد نئوپلاستیک ریشه های القا شده می‌شود. فنوتیپ ریشه های مویین ایجاد شده، از طریق رشد سریع و مستقل از هورمون، نداشتن زمین گرایی، ریشه زایی جانبی و پایداری ژنتیکی شناسایی می‌شوند (پستلی، ۲۰۱۰). ریشه های مویین جدا شده از گیاهان ترانسفورم شده با پلاسمید Ri،

توانایی رشد درون شیشه در شرایط استریل را دارند، به صورت ژنتیکی پایدارند و توانایی سنتز فراوان متابولیت‌هایی که به صورت نرمال در ریشه‌ها و اندام‌های دیگر یافت می‌شوند را دارند (لی، ۱۹۹۶).

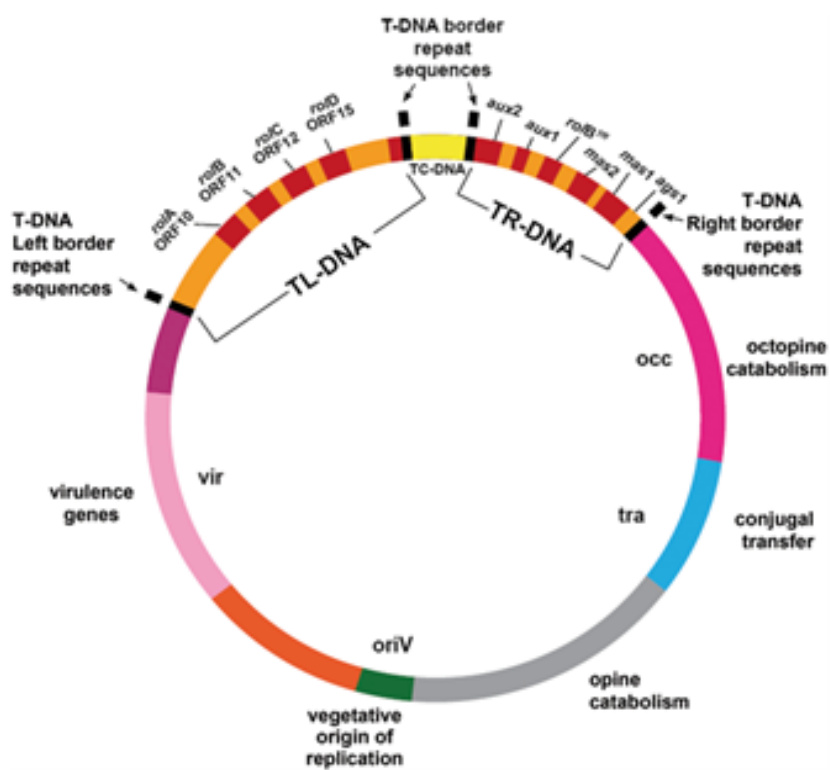
۱-۱۱. آگروباکتریوم رایزوژنز

دست‌ورزی ژنتیکی گونه‌های مولد ترکیبات ثانویه هدف با استفاده از سیستم ناقل طبیعی به نام آگروباکتریوم رایزوژنز (*Agrobacterium rhizogenes*) انجام پذیر است. این باکتری گرم منفی خاک، از خانواده Rhizobiaceae می‌باشد که مولد بیماری ریشه موپین در گیاهان است. این پاتوژن قطعه‌ای از DNA (منطقه T-DNA که با تکرارهای الیگونوکلوئوتیدی ۲۵bp احاطه شده است) که حاوی پلاسمید Ri است را به ژنوم گیاه آلوده منتقل می‌کند (شکل ۱-۶). پلاسمید T-DNA مجموعه‌ای از ژن‌ها را حمل می‌کند که آنزیم‌های لازم برای کنترل فیتوهورمون اکسین، بیوسنتز سیتوکینین و اپین را کد می‌کنند. ورود بخش T-DNA از پلاسمید Ri باکتری *A. rhizogenes* به ژنوم گیاهی و ایجاد تعادل هورمونی جدید، باعث ایجاد تظاهر مورفولوژیکی رشد بافت ریشه‌های موپین ترا ریخت از قسمت‌های آلوده شده گیاه می‌شود که ریشه‌های موپین نامیده می‌شوند. در میان ۱۸ Orf قرار داده شده در Ri T-DNA، چهار Orf با لوکوس‌های ژنتیکی همراه است (*rolA, B, C, D*) که با انتقال آن و ایجاد ویژگی بیماری ریشه موپین به واسطه غیر فعال کردن جهش ترانسفرماسیون شناسایی می‌شود (شکری، ۱۳۹۱). کشت ریشه‌های موپین ضد عفونی شده، در بیش از ۲۰۰ گونه از گیاهان عالی به دست می‌آید که به توانایی آن‌ها در سنتز متابولیت‌های ثانویه متفاوت و تنظیم فعالیت‌های متابولیکی گیاهان به تنش‌های زنده و غیر زنده بستگی دارد. پیشرفت‌های اخیر اطلاعات جدیدی از مکانیسم مولکولی درگیر در انتقال DNA-T به گیاه در دسترس ما قرار داده است. اخیراً استفاده از ناقلین بیان دوگانه، برای انتقال ژن

بواسطه آگروباکتریوم رایزوژنز به گیاهان مختلفی مانند سیب زمینی (*Solanum*

tuberosum) (ویسر، ۱۹۸۹)، بلادن (*Atropa belladonna*) (ساتیو، ۱۹۹۲)، سیب زمینی شیرین (اتانی،

۱۹۹۳) و گیاه *Scoparia dulcis* (یامازاکی، ۱۹۹۶) گزارش شده است (شکری، ۱۳۹۱).



شکل ۱-۶: نمایی شماتیک از پلاسمید آگروباکتریوم رایزوژنز (ایلکر، ۲۰۱۴).

۱۲-۱. هدف از تحقیق

در تحقیق پیش رو میزان تولید متابولیت ثانویه رزمارینیک اسید در ریشه های مویین القا شده در گیاه نعنای آبی که در محیط های متفاوت رشد کرده اند، بررسی شد. همچنین ژن همولوگ مهارکننده *SmMYB39* با استفاده از PCR نیمه کمی بررسی و تاثیر اِلیسیتورها بر این ژن در محیط کشت *in vitro* مطالعه شد. علاوه بر این توالی ژن مورد مطالعه جدا، همسانه سازی و توالی یابی گردید.

فصل دوم

مروری بر منابع

۲. مرور منابع

۲-۱- مطالعات پیشین

همانطور که گفته شد، رزمارینیک اسید به عنوان دومین استر مهم کافئیک اسید در سلسله گیاهی، به دلیل خواص منحصر به فرد خود مورد توجه پژوهشگران و محققان قرار گرفته و از سال‌ها قبل تاکنون آزمایشات بسیاری از تشکیل این متابولیت ثانویه در بخش‌های مختلف گیاهی مانند ریشه های مویین القا شده توسط آگروباکتریوم، افزایش میزان متابولیت‌ها و بررسی واکنش‌های مسیر تولید آن انجام شده است (شکارچی، ۲۰۱۲).

در بررسی تولید ریشه مویی در گیاه مریم گلی (*Salvia officinalis*) از طریق آلوده کردن گیاهچه‌های استریل با آگروباکتریوم رایزوتنز سویه ATCC 15834، تولید متابولیت‌های ثانویه رزمارینیک اسید، لیتوسپرمیک اسید و دیگر ترکیبات فنولی تایید شد (چن، ۱۹۹۹). همچنین در آزمایشات دیگری، گونه‌های دیگر نعناع مانند *Mentha pulegium* (استریچارز، ۲۰۰۲) و *M. piperita* (اینو، ۲۰۰۳) که گیاهانی با سطح بالایی از فنولیک اسیدهای درون‌زا است، با آگروباکتریوم تلقیح شدند و سطوح بالاتری از ترکیبات فنلی و فعالیت پراکسیداز را نشان دادند. در سال ۲۰۰۶، ژینگرژیک بعد از کشت بذور گیاه *Salvia officinalis* و تلقیح در دومین گره ساقه و برآمدگی برگ گیاهچه رشد کرده، به وسیله سرنگ آلوده به باکتری سویه‌های A4 و ATCC15834 ریشه‌های مویینی را به دست آوردند و عملکرد ریشه‌زایی و رشد ریشه‌ها را در محیط‌های MS و WP مایع بررسی کردند. مناسب‌ترین محیط در این مقاله محیط MS و بهترین سویه 15834 انتخاب شد (ژینگرژیک، ۲۰۰۶). مشابه همین آزمایش را کبیرنتاج و همکارانش بر روی گیاه کاسنی (*Cichorium intybus*) انجام دادند. آن‌ها تلقیح را با سویه‌های A13، A4 و 15834 بر روی ریزنمونه‌های لپه‌ای گیاه کاسنی انجام داده و ریشه‌های ظاهر شده را در ارلن‌های حاوی محیط مایع MS بر روی شیکر قرار دادند و ریشه‌های رشد کرده را جهت تعیین ترکیبات فنلی با آزمون HPLC مورد استفاده قرار دادند (کبیرنتاج، ۲۰۱۳). همچنین باوور در سال ۲۰۰۴ همین کار را بر روی کالوس‌های حاصل از حسن یوسف و فاتاک در سال ۲۰۰۲ بر روی *Mentha*

arvensis آزمون کرد (باوور، ۲۰۰۴). موکاری و همکاران ریشه های ترانسفرم شده ی زوفا توسط باکتری اگروباکتریوم رایزوتنز را تولید کردند. ریشه های القا شده در محیط کشت مایع بدون هورمون قرار داده شد و سطوح بالایی از ترکیبات فنلی مانند رزمارینیک اسید (حداکثر ۸/۰۳٪ از وزن خشک) و لیتوسپرمیک اسید (حداکثر ۳/۸۹٪ از وزن خشک) به دست آمد. بالاترین میزان RA در ریشه های مویین رشد کرده در محیط کشت مایع B5 Gamborg حاوی ۱۰٪ سوکروز به دست آمد. این سطح حداقل ۶۰٪ بالاتر از مقداری است که در کالوس، کشت سوسپانسیون سلولی و ریشه های گیاهان یکساله به دست آمده بود (موکاری، ۱۹۹۸).

در آزمایش دیگری، کیم و همکاران با افزودن متیل جاسمونات (با غلظت مناسب ۵۰ mM) به محیط کشت حاوی ریز نمونه های *Agastache rugosa*، میزان رزمارینیک اسید تولید شده را اندازه گیری کردند و نتیجه گرفتند، ژن های درگیر در بیوسنتز جاسمونیک اسید، باعث القای متابولیت های ثانویه، دیواره سلولی و پروتئین های دفاعی گیاه می شود (کیم، ۲۰۱۳). در آزمایشی مشابه نوروزی و همکاران (۲۰۱۴) استفاده از محرک های زنده (مانند عواملی با ریشه های گیاهی و پاتوژنی) و غیر زنده (شامل مواد معدنی، شیمیایی و فیزیکی) را که منجر به افزایش رشد و تولید متابولیت های ثانویه در ریشه های مویین می شوند، بررسی کردند. سالیسیلیک اسید و کیتوزان از جمله این عوامل غیرزنده هستند که در غلظت های مناسب (سالیسیلیک اسید ۴۰ g/L و کیتوزان ۵۰ mg/L) باعث افزایش رشد ریشه های مویین می شوند و بیشترین رشد در برگ های یک ماهه و القا شده با سویه A4 به دست آمده است.

در آزمون والیمهر و همکارانش سویه های ATCC 15834، LBA9402، A4، A13 و MSU440 در محیط مایع LB کشت و بر روی ریزنمونه های ساقه و برگ گیاه *Nepeta pogonosperma*، تلقیح کردند. این ریزنمونه ها پس از خشک شدن در محیط های MS تعدیل شده با حذف برخی مواد کشت شدند. پس از گذشت حدود یک ماه از ریشه دهی نمونه ها و واکشت هفتگی آن ها در محیط های حاوی سفوتاکسیم، سویه MSU440 و ATCC15834، ریز نمونه ساقه و محیط فاقد NH_4NO_3 ، KH_2PO_4 ،

CaCl₂ و KNO₃ به ترتیب به عنوان بهترین سویه، ریز نمونه و محیط برای تراریختی *N. Pogonosperma* شناخته شد (والیمهر، ۲۰۱۴).

بزنجانی در سال ۲۰۱۴، تاثیر مقادیر متفاوت عصاره مخمر (Yeast extract) بر تجمع رزمارینیک اسید و بیان ژن تیروزین آمینو ترانسفراز (TAT) را در گیاه بادرنجبویه (*Melissa officinalis*) مورد آزمون قرار دادند. در این آزمایش پس از تیمار ریزنمونه ها با عصاره مخمر، محتوای فلاونوئید و میزان بیان ژن TAT با افزایش میزان عصاره مخمر تا ۰/۲٪ افزایش یافت. از نظر مورفولوژیکی نیز، بیشترین جوانه زنی در محیط حاوی ۰/۰۵٪ از عصاره مخمر به دست آمد. رشد ریشه های گیاهچه با افزایش میزان عصاره مخمر کاهش و رشد ساقه ها افزایش یافته است (بزنجانی، ۲۰۱۴).

در بررسی عملکرد متابولیت های ثانویه در ریشه های مویین، چندین فاکتور شامل گونه گیاهی، انتخاب لاین مناسب از ریشه های مویین ایجاد شده، مواد غذایی محیط و شرایط محیطی رشد ریشه های مویین مورد مطالعه قرار گرفت (کیم، ۲۰۰۲؛ بنساک، ۲۰۰۸؛ زارات، ۲۰۱۳).

در میان ترکیبات مغذی موجود در محیط کشت، علاوه بر کربن، نیتروژن و فسفر نیز به عنوان عامل تعیین کننده رشد گیاهی و تشکیل متابولیت های ثانویه شناخته شده اند. بسیاری از محیط هایی که در کشت درون شیشه استفاده می شوند، نیتروژن را به صورت نیترات و یون های آمونیوم دارا می باشند. غلظت نهایی نیتروژن، نیترات و یون های آمونیوم در این محیط ها تاثیرات متعددی بر تولید متابولیت های ثانویه در کشت درون شیشه دارند. برای مثال افزایش NO₃⁻ و کاهش NH₄⁺ باعث تولید ترکیبات شیکونین، بتاسیانین و جنسینگ در کشت سوسپانسیون سلولی شده است (بوهم و رینک، ۱۹۹۸؛ فوجیتا، ۱۹۸۵). مشابه این نتایج برای ترکیبات بیواکتیو مهمی در کشت ریشه های نابجا از گیاهان *Glycyrrhiza* *Panax ginseng uralensis* و *Eleutherococcus koreanum* به دست آمد (کیم، ۲۰۰۵؛ لیبی و پاک، ۲۰۱۲). پژوهش های دیگر نیز نشان می دهد که کاهش میزان نیتروژن کل و یا حذف کامل نیترات از کشت سلولی تولید متابولیت های ثانویه را بهبود می بخشد (راوو و راوینشکار، ۲۰۰۲).

فسفر نیز در محیط های کشت گیاهی اغلب به صورت فسفات موجود است. میزان فسفات می تواند تاثیر مهمی در تولید متابولیت های ثانویه در کشت های درون شیشه داشته باشد و غلظت بالاتر آن نیز باعث افزایش رشد سلولی شود. اما اغلب تاثیر منفی بر تولید متابولیت های ثانویه را نیز به دنبال دارد. راوو و راویشنکار در سال ۲۰۰۲ اذعان داشتند کاهش سطوح فسفات، تولید فنولیک اسیدها را در کشت سلولی گیاهان *Catharanthus roseus*، تولید کافئوئیل را در *Nicotiana tabacum* و تولید آلکالوئیدها را در گیاه *Peganum harmala* القا می کند (راوو و راویشنکار، ۲۰۰۲).

بین و همکارانش نیز مشابه این نتایج را با بررسی تولید زیست توده و پلی ساکارید در ریشه های نابجا از گیاه *Glycyrrhiza uralensis* به دست آوردند. آن ها همچنین بیان کردند، سطوح پایین تر فسفات جهت تولید فلاونوئیدها و گلیسریدیک اسیدها مناسب تر است (بین، ۲۰۱۴).

لو و همکارانش در سال ۲۰۱۶ تاثیر غلظت های متفاوت فسفر (۱۲/۴، ۱/۲۴، ۰/۱۲۴، ۰/۰۱۲۴) بر زیست توده گیاهی و تجمع فنولیک اسیدها در گیاه *Salvia miltiorrhiza* را مورد آزمون قرار دادند. آن ها به این نتیجه رسیدند که میزان ۰/۰۱۲۴ mM از فسفات جهت رشد گیاه مناسب بوده است. علاوه بر این مقادیر بالاتر فسفات میزان فنولیک اسیدهایی مانند رزمارینیک اسید، سالویانولیک اسید و کافئیک اسید را محدود کرده و کاهش آن تاثیر بهتری بر تجمع این ترکیبات دارد. همچنین نتایج نشان داد که کمبود فسفات، بیان ژن های درگیر در بیوسنتز رزمارینیک اسیدها مانند PAL, C₄H, 4CL, TAT, HPPR و RAS را القا می کند. بیان ژن های PAL و TAT در روز اول تا ششم رشد ریشه ها در محیط حاوی فسفات کم، زیاد بود اما به میزان قابل توجهی در روز نهم کاهش یافت. همچنین ژن های پایین دستی مانند HPPR و C₄H در روزهای ابتدایی تیمار تجمع بالایی داشتند. البته تغییر در میزان بیان ژن های بالادستی دیرتر و با سرعت کمتری نسبت به ژن های پایین دستی اتفاق افتاد (لو، ۲۰۱۶).

کوچان و همکارانش در سال ۲۰۱۶ ریشه های مویین حاصل از ریزنمونه های تلقیح شده گیاه *Panax quinquefolium* با سویه ۱۵۸۳۴ را در بیوراکتور کشت دادند و در زمان های معین، محیط B5 حاوی

مقادیر متفاوت به شکل‌های نیتروژن و فسفر را به ریشه‌ها اسپری کردند و میزان رشد زیست توده ریشه‌ها را در این محیط‌ها بررسی کردند. نتایج نشان داد، محیط B5 حاوی $12/4 \text{ mM/L}$ نیتروژن، $0/5 \text{ mM/L}$ آمونیوم و $0/83 \text{ mM/L}$ فسفر بهترین محیط جهت رشد زیست توده ریشه‌ها و تولید متابولیت جینسین سایید انتخاب شدند (کوچان، ۲۰۱۶).

پژوهش‌های انجام شده به منظور بررسی میزان تولید متابولیت‌های ثانویه به وسیله کروماتوگرافی مایع با فشار بالا، توسط محققان در گیاهان خانواده نعناعیان به انجام رسیده است. مطالعات ابتدایی مربوط به شناسایی برخی ویژگی‌های ترمودینامیکی انحلال رزمارینیک اسید و همچنین کارایی برخی حلال‌ها جهت یافتن مناسب‌ترین حلال برای این ماده بوده است. به عنوان مثال در سال ۲۰۱۶، آیدی و همکارانش نشان دادند استخراج رزمارینیک اسید از برگ‌های گیاه رزماری با روش‌های مختلفی امکان‌پذیر است که مهم‌ترین آن‌ها استخراج و خالص‌سازی به وسیله حلال‌هایی فوق بحرانی است. این روش بسیار گران‌قیمت و برای آزمون‌ها دشوار است. به نظر می‌رسد استخراج با حلال‌های آلی به مراتب بهتر و مناسب‌تر باشد. با این حال، انتخاب حلال مناسب، گامی تعیین‌کننده محسوب می‌شود چرا که حلال انتخاب شده باید برخی معیارها را دارا باشد و از نظر قیمت و در دسترس بودن نیز به صرفه باشد. اگرچه انتخاب روش مناسب برای به دست آوردن رزمارینیک اسید، بر مقدار ماده استخراج شده تاثیر دارد اما حلال مورد استفاده و شرایط آزمایشگاه نیز در به حداکثر رساندن نتایج کار، تاثیرگذار خواهد بود. انتخاب مناسب حلال جهت به دست آوردن ترکیبات با ارزشی مانند رزمارینیک اسید، به داده‌های آزمایش در مورد میزان حلالیت آن در حلال‌های مختلف بستگی دارد. از اینرو آیدی و همکارانش اتیل و متیل استات و مخلوط آن‌ها با آب را برای استخراج رزمارینیک اسید انتخاب کردند تا میزان انحلال ترکیبات خالص در حلال‌ها را بررسی کنند. در این آزمایش حلال‌ها و پودر عصاره رزمارینیک اسید خالص از Sigma-Aldrich (USA) تهیه شد. انحلال رزمارینیک اسید در این حلال‌ها و در دماهای متفاوت (293.15 K تا 313.15) بررسی شد. آن‌ها نهایتاً به این نتیجه رسیدند که انحلال‌پذیری

این ماده در حلال‌های مخلوط با افزایش دما بیشتر می‌شود. اما با افزایش میزان آب در این مخلوط‌ها، انحلال پذیری کاهش می‌یابد (آیدی و همکاران، ۲۰۱۶).

جهت بررسی میزان رزمارینیک اسید در عصاره استخراج شده از نعناعیان، گزنکو با استفاده از اتانول ۵۰٪، این ماده را از نعناع فلفلی (*Mentha piperita*) استخراج کرده و برای انجام HPLC ذخیره کرد. در این آزمایش، آنالیز عصاره به دست آمده در کروماتوگرافی با برنامه شست و شوی گرادپانت و در طول موج ۳۳۰ نانومتر انجام شد. فاز متحرک متشکل از دو محلول متفاوت بود که محلول A را تری فلورو استیک اسید ۰/۰۵٪ در استونیتریل و محلول B را تری فلورو استیک اسید ۰/۰۵٪ در آب تشکیل داده بود. شست و شوی گرادپانت از ۵ تا ۶۰ دقیقه برنامه ریزی شد که در آن محلول‌ها از صفر تا ۹۵٪ استفاده شدند (گزنکو، ۲۰۱۳). همچنین در آزمایش مشابه، مورایس رزمارینیک اسید را از گیاه *Ocimum gratissimum* استخراج و در دستگاه کروماتوگرافی گازی با استفاده از استونیتریل (به عنوان محلول A) و ترکیب آب، استونیتریل و فرمیک اسید (به عنوان محلول B) با برنامه ایزوکراتیک ۳۰٪ (محلول A) به ۷۰٪ (محلول B) در طول موج ۳۲۹nm آنالیز کردند (مورایس، ۲۰۱۲).

در بررسی گیاه رزماری (*Rosmarinus officinalis*)، ترانکوز و همکارانش ۵۰ میلی گرم از پودر برگ‌های خشک شده را به مدت ۵ دقیقه در اتانول خرد و پس از سانتریفیوژ، عصاره آن را استخراج کردند. سپس عصاره به دست آمده را در دستگاه کروماتوگرافی با برنامه ایزوکراتیک و با استفاده از محلول‌های اسیدفسفریک و آب در طی مدت ۸ دقیقه آنالیز کردند. رزمارینیک اسید در دقیقه ۲/۷ در طول موج ۲۳۰nm توسط دستگاه HPLC آنالیز شد (ترانکوز، ۲۰۰۵). همچنین کوتو و همکارانش عصاره گیاه رزماری را در طول موج ۲۵۴nm در مدت زمان ۱۵ دقیقه بررسی کردند. آن‌ها ۴۰۰ میلی گرم از وزن خشک گیاه را در ۱۰ml متانول خرد کرده و به مدت ۳۰ دقیقه در دستگاه اولتراسونیک عصاره‌گیری کردند. برنامه در نظر گرفته شده برای دستگاه، به صورت ایزوکراتیک و حاوی محلول‌های استونیتریل و ترکیب استونیتریل و فرمیک اسید به عنوان محلول‌های A و B بود و رزمارینیک اسید در دقیقه دوم آنالیز، مشخص شد (کوتو، ۲۰۱۱). آنالیز رزمارینیک اسید، کارنوسول و کارنوسیک اسید در گیاهان *Salvia*

Salvia santolinifolia و *eremophila* توسط دکتر جاسبی و همکارانش در دانشکده داروسازی شیراز نیز انجام شد. آن‌ها ۵۰ میلی گرم از بخش‌های هوایی هر دو گیاه را خشک و به وسیله ۵ml از محلول آب و متانول یا اتانول در دستگاه اولتراسونیک عصاره‌گیری کردند. عصاره به دست آمده سانتریفیوژ و مایع رویی برای استفاده در آنالیز کروماتوگرافی گازی نگهداری شد. برای این آنالیزها، برنامه گرادیانت به مدت ۵۰ دقیقه، در طول موج‌های ۲۵۴، ۲۱۰ و ۲۲۰، با استفاده از محلول‌های A شامل اسید فسفریک و آب و محلول B شامل اسید فسفریک، آب و استونیتریل به کار گرفته شد (جاسبی، ۲۰۱۴).

در بررسی دیگر، در گیاهان *Mentha longifolia* و *Mentha Piperita* و *Osimum basilicum* جمع‌آوری شده از منطقه کردستان عراق، محققان ۳۰ میلی گرم از پودر خشک شده برگ‌های این گونه‌های گیاهی را با استفاده از دو ماده n-هگزان و اتانول ۸۰٪ به دو روش حمام اولتراسونیک و کوبیدن در محلول‌ها عصاره‌گیری کردند. کروماتوگرافی با محلول‌های متانول و استیک اسید با برنامه‌ی ایزوکراتیک در طول موج ۲۸۰nm انجام گرفت. آن‌ها استانداردهای رزمارینیک اسید را با حل کردن ۱ میلی گرم از استاندارد خریداری شده در ۵ میلی لیتر از حلال‌های اتانول و آب به نسبت برابر و در رقت‌های ۵، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ µg در ۵ ml حلال به دست آوردند (ادهم، ۲۰۱۵).

همانطور که گفته شد، ساختار MYB بزرگترین خانواده شناخته شده در گیاهان هستند، که در آن هر دو بخش R2 و R3 دارای توالی‌های منحصر به فردند و با وجود داشتن برخی تکرارهای آمینواسیدی متفاوت، در شناسایی پروتئینی مشابه عمل می‌کنند. عملکرد پروتئین‌های MYB در کنترل تولید متابولیت‌های ثانویه، تعیین مورفولوژی سلول، تاثیر در مسیرهای هدایت سیگنال که در پاسخ به تنظیم کننده‌های رشدی گیاه تولید می‌شود، بررسی شده است. از پروتئین‌های MYB شناخته شده در تنظیم متابولیت ثانویه فنیل پروپانویید، می‌توان به ژن *AmMYB305* در توتون و همچنین گیاه *Antirrhinum majus* اشاره کرد که ژن کد کننده اولین آنزیم درگیر در مسیر ساخت فنیل پروپانویید، فنیل آلانین آمونیا لیاژ (PAL) را کد می‌کند (اوراو، ۱۹۹۳). همچنین لین وانگ در سال ۲۰۱۰ ارتباط ژن‌های MYBA یا MYB1 و MYB10 را با تنظیم سنتز آنتوسیانین در *Rosaceae* بررسی کرد (لین وانگ، ۲۰۱۲). ذرت

حداقل ۸۲ ژن را بیان می‌کند که پروتئین‌های R2R3MYB را کد می‌کند. از این میان ۵ ژن کد کننده نواحی پروتئینی R2R3MYB است، با نام‌های ZmI, P1, C1, P و ZM 38 شناخته شده است. محصولات حاصل از این ژن‌ها به طور مستقیم یا غیرمستقیم، در کنترل سنتز فلاونوئیدها نقش دارند (پاز-آرس، ۱۹۸۷، کوون ۱۹۹۳). یانگ دو کلون cDNA (NtMyb AS1 و NtMyb AS2) را از توتون، جداسازی کرد که پروتئین‌های مرتبط با MYB را کد می‌کند و مشابه توالی ژن *PhMYB3* در گیاه گل اطلسی است. وی بیان کرد *NtMybAS1* یک فاکتور رونویسی مخصوص بساک است که به عنوان تنظیم کننده مثبت در بیان آنزیم PAL1 و سنتز فنیل پروپانویید در سلول‌های جنسی اسپور و نه تخمدان عمل می‌کند (یانگ، ۲۰۱۳). همچنین *GmMYB176* نیز در تولید فلاونوئید در سویا نقش کلیدی دارد (وی، ۲۰۱۰).

در بررسی‌های ژانگ و همکارانش در سال ۲۰۱۳ توالی ژن *SmMYB39* را با ۶۹۳ جفت باز از چارچوب خوانش به دست آوردند، که پروتئینی با اندازه ۲۵/۷ کیلودالتون را کد می‌کند. با توجه به درخت فیلوژنیک رسم شده، این ژن شباهت ۷۷ درصدی را در توالی‌های آمینواسیدی با ژن *SsMYB2* از گیاه *Solenostemon* نشان داد. آن‌ها همچنین با تهیه لاین‌های بیش بیان و خاموشی ژن مذکور نقش این ژن را در گیاه مریم گلی مشخص کردند. نتیجه این آزمایشات نشان داد، در لاین‌های با بیان بالای این ژن، مقدار ۴-کوماروئیک اسید، رزمارینیک اسید، سالویانولیک اسید A و B کاهش یافته است (ژانگ و همکاران، ۲۰۱۳). همچنین آمار ردی و همکارانش در سال ۲۰۱۷ در آزمایشات خود RNA توالی‌یابی شده از بافت‌های متفاوت گیاه نعنای زینتی را بررسی کردند. طول کامل چارچوب خوانش رونویسی (ORF) ژن *MsMYB* شامل ۸۱۳ جفت باز بود که پلی پپتیدی با ۲۷۱ آمینواسید را کد می‌کند. این ژن شامل توالی R2, R3 است و پنج تریپتوفان باقیمانده بین این دو تکرار، یک موتیف هلیکسی را در ناحیه N-ترمینال تشکیل می‌دهد. در آنالیزهای BLAST، توالی ژن *MsMYB* شباهت ۶۰ درصدی به توالی فاکتورهای رونویسی وابسته به MYB در *Salvia miltiorrhiza* نشان می‌دهد (آمار ردی و همکاران، ۲۰۱۷).

فصل سوم

مواد و روش ها

۳. مواد و روش ها

۳-۱. مواد مورد نیاز

۳-۱-۱. مواد شیمیایی

تمامی مواد شیمیایی از شرکت مرک آلمان، فرمنتاز و سیگما با درجه خلوص بالا، جهت انجام مطالعات بیولوژی مولکولی تهیه گردید. مواد شیمیایی استفاده شده در جدول ۳-۱ آمده است.

جدول ۳-۱. مواد مورد نیاز و شرکت‌های سازنده

شرکت سازنده	مواد مورد نیاز	مواد شیمیایی
GenetBio	مواد مورد نیاز در واکنش زنجیره ای پلیمرز شامل بافر، Mgcl ₂ و dNTP و	
Thermo Scientific	آنزیم Taq	
Thermo Scientific	آنزیم Dnase	
Invitrogen	آنزیم Rnase	
	حامل Ecoli (DH5α)	
roch,vivantis, Qiagen	استخراج RNA	کیت‌ها
Thermo Scientific	ساخت cDNA	
Bio Neer	خالص سازی از محصول PCR	
GenetBio	استخراج پلاسمید	
الحاوی	ریفامپیسین	آنتی بیوتیک‌ها
جابرین حیان	سفوتاکسیم	
جابرین حیان	آمپی سیلین	
Sigma-Aldrich	استاندارد رزمارینیک اسید	استاندارد مورد نیاز در HPLC

۳-۱-۲. توالی آغازگرهای استفاده شده

جهت انجام واکنش‌های PCR از آغازگرهای مربوط به ژن خانه دار اکتین وتوالی های کلی اختصاصی ژن *smMYB39* استفاده شد که توالی آن‌ها در جدول ۳-۲ آمده است.

جدول ۳-۲. توالی آغازگرهای استفاده شده

Gene	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')	دمای اتصال (°C)	اندازه قطعه (bp)
<i>Actin</i>	GGATATCCAGCCCCTT GTCTG	GCGGTGGTGGTGAATG AGTAG	۶۰	۶۰۰
<i>smMYB39</i> (در گیاه <i>S. miltiorrhiza</i>)	GCCCTCCCTATCAACA AGAAC	ATCCCAGAAAATCGAA TCCAG	۵۹	۸۰۰
<i>smMYB39</i> (در گیاه <i>M. aquatica</i>)	CCTCCGCTGGATCAAC TACC	CGGCTCACCAGTTTTCT CCT	۵۹	۱۹۵
<i>rolB</i>	GCTCTTGCAGTGCTAG ATTT	GAAGGTGCAAGCTACC TCTC	۵۸	۴۲۳

۳-۱-۳. نمونه گیاهی

گونه‌های نعنای آبی (*Mentha aquatica*) از همدان گرد آوری شد و پس از تایید، در شرایط گلخانه به روش قلمه زدن تکثیر و رشد داده شد (شکل ۳-۱).



شکل ۳-۱. گیاه نعنای آبی (*Mentha aquatica*)

۲-۳. ضد عفونی و آماده سازی ریزنمونه ها

پس از رشد گیاهان تا حد مطلوب، قطعاتی از ریزنمونه های برگ و ساقه، با اندازه دو سانتی متر تهیه شد. جهت ضد عفونی ریزنمونه ها، ابتدا ریزنمونه ها در آب حاوی مقدار کمی ماده شوینده، شستشو داده شدند، پس از آن به مدت ۲ دقیقه در الکل ۷۰ درصد ضد عفونی و سپس با آب مقطر سترون شستشو داده شدند. قطعات گیاهی به مدت ۳ دقیقه در هیپوکلریت سدیم یک درصد حاوی یک قطره توئین ۲۰ قرار گرفتند و پس از آن ۴ مرتبه با آب مقطر سترون شسته شدند (دولت آبادی، ۱۳۸۹). در نهایت، ریزنمونه ها بر روی کاغذ صافی استریل قرار گرفته و خشک شدند.

۱-۲-۳. تلقیح ریزنمونه ها

تلقیح ریزنمونه های برگ با غوطه وری آن ها در سوسپانسیون باکتری انجام شد. به این صورت که قطعات برش خورده برگ به مدت ۲ دقیقه در سوسپانسیون باکتری غوطه ور شده، سپس با سرنگ آغشته به باکتری، زخم های کوچکی بر روی ریزنمونه ها ایجاد شد و ریزنمونه ها پس از خشک شدن بر روی کاغذ صافی، به مدت ۴۸ ساعت در محیط MS بدون آنتی بیوتیک کشت داده شدند. ریزنمونه های ساقه نیز به صورت عمودی و در خلاف جهت ریشه در محیط MS کشت شدند و راس آن ها با سرنگ آغشته به باکتری تلقیح شد. پس از گذشت دو روز، ریزنمونه ها به محیط حاوی سفوتاکسیم 250 mg/ml و تیمار شده با فسفر، نیتروژن و $\text{pH} \sim 5.5$ منتقل و هر دو هفته یکبار واکست شدند تا ریشه های مویین ظاهر شدند.

۲-۲-۳. کشت ریزنمونه ها

ریزنمونه ها در قالب یک طرح کاملا تصادفی کشت شدند. به این صورت که برای هر سویه باکتری، ۶ پتری (برای ریزنمونه برگ) یا شیشه (برای ریزنمونه ساقه) در ۳ تکرار در نظر گرفته شد. در هر ظرف ۵ ریزنمونه از ساقه یا برگ تلقیح و در محیط MS (پیوست ۲) کشت داده شد.

۳-۲-۳. رشد ریشه ها در محیط های متفاوت

ریشه های رشد کرده به محیط های تحت تیمار با نیتروژن، فسفر و pH که حاوی سفوتاکسیم mg/ml ۲۵۰ بودند، منتقل شده و به مدت چهار هفته بر روی شیکر با دور ۱۱۰rpm قرار گرفتند. با رشد ریشه های موئین تا حد مطلوب، نمونه ها به صورت شبانه در آون ۴۰ درجه سانتیگراد خشک شده و در ۷۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند تا برای اندازه گیری میزان رزمارینیک اسید توسط HPLC و بررسی بیان نیمه کمی مورد استفاده قرار گیرند.

۳-۳. کشت باکتری

به منظور تهیه سوسپانسیون تلقیح، سویه های باکتری شامل ۹۵۳۴، ۴A، ۱۳A، ۱۵۸۳۴ATCC و ۳۱۸ در محیط کشت LB^۱ (پیوست ۳) مایع حاوی mg/ml ۵۰ آنتی بیوتیک ریفامپیسین در دمای ۲۸ درجه سانتیگراد به صورت شبانه رشد داده شدند. ژن مقاومت به ریفامپیسین در تمام سویه های اگروباکتریوم مورد استفاده، وجود دارد که به عنوان نشانگر انتخابی این باکتری ها عمل می کند. سپس سوسپانسیون باکتری را در دمای ۴ درجه در سرعت rpm ۴۵۰۰ رسوب داده و رسوب باکتری را در محیط ۱/۲MS حاوی ۱۰۰mM استوسرینگون به آرامی حل گردید. ریزنمونه های برگه در این سوسپانسیون غوطه ور و تلقیح شدند. همچنین مقداری از این سوسپانسیون بر روی پلیت حاوی محیط کشت LB جامد ریخته و به صورت شبانه، در دمای ۲۸ درجه سانتیگراد نگهداری شد. پس از رشد باکتری، از آن جهت تلقیح مستقیم ریزنمونه های ساقه استفاده شد.

۳-۴. بررسی اثر سویه باکتری بر میزان القا و رشد ریشه های موئین

دو هفته پس از ظهور اولین ریشه، از ریزنمونه های برگ و ساقه گیاه نعناع، درصد ریزنمونه هایی که موفق به تولید ریشه موئین شدند نسبت به کل ریزنمونه های مورد مطالعه، به طور جداگانه برای هر تیمار (محیط های حاوی نیتروژن، فسفر و pH اسیدی) و هریک از سویه های باکتری محاسبه گردید.

1. Luria Bertani

به منظور انتخاب تیمار و سویه باکتری بهینه از نظر میزان رشد ریشه های موین القا شده، ریشه های حاصل از هر سویه به صورت جداگانه در محیط MS حاوی ۲۵۰mg/ml سفوتاکسیم با تیمارهای فسفر، نیتروژن و ۵/۵~pH و در سه تکرار کشت و در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد، در شرایط تاریکی و بر روی شیکر چرخشی با سرعت ۱۱۰rpm نگهداری شدند. پس از گذشت شش هفته و رسیدن ریشه ها به وزن مناسب، از محیط مایع خارج و پس از خشک کردن در آون در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد به مدت یک روز، وزن خشک آن ها یادداشت شد.

۳-۵. آنالیز داده ها

نتایج به دست آمده با استفاده از نرم افزار SAS v9.1.3 با استفاده از آزمون توکی در سطح معنی داری ۰/۰۱ مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

۳-۶. تأیید مولکولی ماهیت تراریختی ریشه های موین

اگرچه مورفولوژی منشعب، رشد سریع و سطحی ریشه ها در محیط کشت فاقد هورمون، معرف ریشه های موین مورد مطالعه است، با این حال بررسی ماهیت تراریخته آن ها توسط واکنش زنجیره ای پلیمرز برای تکثیر قطعه ای از ژن *rolB* با آغازگر اختصاصی انجام شد.

۳-۶-۱. استخراج DNA ژنومی از ریشه های موین

جهت استخراج DNA از ریشه ها از روش CTAB استفاده شد. چراکه به دلیل وجود پلی فنول بالا در بافت ها، روش های دیگر مانند روش سریع (Edwards) کارایی مطلوبی در استخراج DNA نداشت.

روش کار:

۱. حدود ۵۰۰ میلی گرم از ریشه موین در ویال ۱/۵ میلی لیتری قرار گرفت و با سرسمپلر داخل ویال له شدند.

۲. ۵۰۰ میکرولیتر بافر استخراج (مشابه بافر استخراج RNA) به ویال اضافه و پس از ورتکس به مدت ۲۰ دقیقه در ۶۵ درجه سانتیگراد انکوبه شد.

۳. ۵۰۰ میکرولیتر کلروفورم-ایزوآمیل الکل (۲۴:۱) به آن اضافه شد و با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید.

۴. فاز رویی به ویال جدید منتقل و هم حجم آن ایزوپروپانول اضافه شد. ویال به مدت حداقل ۱ ساعت در ۲۰- درجه سانتیگراد قرار گرفت.

۵. پس از گذشت این مدت، ویال به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ انجام گرفت و مایع رویی به ویال جدید منتقل گردید.

۶. ۱ میلی لیتر اتانول ۷۰٪ به آن اضافه گردید و مجدداً سانتریفیوژ شد.

۷. رسوب باقی مانده در معرض هوا، خشک شد و در ۱۰۰ میلی لیتر آب DEPC حل شد.

۳-۶-۲. تایید تراریختی ریشه های موبین

جهت بررسی تراریختی ریشه های موبین و اثبات حضور ژن مورد نظر در DNA ژنومی استخراج شده، واکنش^۱ PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن *rolB* انجام شد (جدول ۳-۲). مواد موجود در واکنش زنجیره-ای پلیمرز مشابه سایر واکنشها است (جدول ۳-۳) و از DNA استخراج شده به عنوان نمونه در واکنش استفاده شد. برنامه واکنش در جدول ۳-۴ آمده است.

جدول ۳-۳. مواد و مقادیر مورد نیاز برای آزمون PCR

مواد و مقادیر موجود	مقادیر مورد نیاز	مقادیر برای هر ۲۰ میکرولیتر واکنش
Buffer (10x)	۱ X	۲
Mgcl ₂ (50 mM)	۱/۵ mM	۰/۶
dNTP (10 mM)	۰/۲ mM	۰/۴
Primer F (100 pm)	۱۰ Pm	۰/۴
Primer R(100 pm)	۱۰ Pm	۰/۴
Taq	۰/۵	۰/۵
Template	۱	۱
ddH ₂ O	تا حجم نهایی ۱M۲۰	۱۴/۷

جدول ۳-۴. برنامه واکنش PCR جهت تایید تراریختی ریشه های مویین

تعداد	زمان	دما (درجه سانتیگراد)	مراحل PCR
			چرخه
۱	۱۰ دقیقه	۹۴	واسرشت سازی اولیه
۳۵	۴۵ ثانیه	۹۴	واسرشت سازی هر چرخه
۳۵	۳۰ ثانیه	۵۸	اتصال آغازگرها
۳۵	۴۵ ثانیه	۷۲	طویل سازی
۱	۵ دقیقه	۷۲	طویل سازی نهایی

۳-۷. بررسی میزان متابولیت رزمارینیک اسید

۳-۷-۱. کشت ریشه ها در محیط های رشدی متفاوت

ریشه های مویین جوانه زده به مدت یک ماه در محیط های متفاوت حاوی نیتروژن، فسفر و ۵/۵~۵ pH رشد داده شدند تا جهت بررسی میزان متابولیت رزمارینیک اسید موجود در آنها به وزن مطلوب برسند.

۳-۷-۲. محاسبات مربوط به تهیه استوک نیتروژن و فسفر

جهت بررسی میزان بیان ژن مورد نظر در محیط های تیمار شده با نیتروژن و فسفر، استوک های NH_4NO_3 و KH_2PO_4 با محاسبه مقدار نیتروژن و فسفر موجود در محیط پایه و مقدار ماده لازم جهت آماده سازی استوک، تهیه شد.

۳-۷-۲-۱. نیتروژن

با توجه به اینکه در هر لیتر از محیط MS، نیتروژن در ترکیبات KNO_3 (با جرم مولکولی gr/mol) و NH_4NO_3 (با جرم مولکولی gr/mol) و میزان $1/9$ گرم در هر لیتر محیط) و $10/1105$ و $802/042$ میزان $1/6$ گرم در هر لیتر محیط) وجود دارد و مجموع جرم مولکولی NO_3^- در هر لیتر محیط gr/mol 124 در 181 از کل ترکیبات نیتروژن دار (پتاسیم نترات و آمونیوم نترات) و مجموع وزن ترکیبات نیتروژن دار $3/5$ گرم در هر لیتر است، بنابراین مقدار ترکیب در هر لیتر NO_3^- ، $2/39$ گرم و برابر 10 میلی مولار است. لذا در این آزمایش لازم بود که مقدار آن در محیط های تحت تیمار به 15 میلی مولار برسد. با اضافه کردن ترکیب شیمیایی KNO_3 ، میزان پتاسیم محیط و به تبع آن میزان ترکیبات کلی و اسیدیته محیط تغییر می کند. بنابراین جهت افزایش میزان نیتروژن، تنها از ترکیب NH_4NO_3 استفاده شد. جهت تهیه استوک 1 مولاری از NH_4NO_3 8 گرم از این ماده را در 100 میلی لیتر آب حل کرده و بسته به حجم محیط هایی که در هر کشت آماده شد، 5 میلی مولار از استوک را به محیط پایه اضافه گردید تا نهایتاً مقدار این ماده در محیط به 15 میلی مولار برسد.

۳-۷-۲-۲. فسفر

به دلیل اینکه عنصر فسفر در دمای بالای اتوکلاو خاصیت خود را تا حدودی از دست می دهد، بنابراین لازم است استوک آن را به صورت مجزا تهیه کرده و به محیط پایه بدون ترکیبات فسفر (KH_2PO_4) اضافه کرد. می دانیم که فسفر تنها در KH_2PO_4 (با جرم مولکولی gr/mol) 136 و به میزان $0/17$ گرم) در محیط MS وجود دارد. بنابراین میزان ترکیب PO_4^- در هر لیتر برابر $0/11$ گرم و 1 میلی مولار است. با حل کردن $13/6$ گرم از این ترکیب شیمیایی در 100 میلی لیتر آب، استوک 1 مولاری از آن

تهیه و با فیلتر استریل و در هر کشت، بسته به میزان محیط تهیه شده و ۲/۵ میلی مولار از آن به محیط بدون KH_2PO_4 اضافه گردید. جهت بررسی فسفر کمتر در محیط نیز مقدار فسفر محیط mM ۰/۶ در نظر گرفته شد.

۳-۸. کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

آزمون‌ها توسط دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)، مدل HKNAUER آلمان با ستون C_{18} (Eurosphere 5-100) (250×4/6mm; particle size 5µm) انجام شد. فاز متحرک شامل آب حاوی تری فلورو استیک اسید ۰/۱٪ (محلول A) و استونیتریل حاوی تری فلورو استیک اسید ۰/۱٪ (محلول B) با سرعت جریان ۱ میلی متر در دقیقه از ستون عبور داده و میزان جذب استانداردها و نمونه های تهیه شده در طول موج‌های ۲۱۰، ۲۵۴، ۲۸۰، ۳۳۰ و ۳۶۰ نانومتر اندازه گیری گردید. برنامه آنالیز دستگاه به صورت گرادینت در ۲۰ دقیقه تنظیم شد. به این صورت که در ۱۵ دقیقه اول ۹۰٪ از محلول A و ۱۰٪ از محلول B، تا دقیقه ۱۷ ۹۰٪ از محلول B و ۱۰٪ از محلول A و تا پایان زمان آنالیز مشابه دقایق اول از محلول‌ها استفاده شد.

۳-۸-۱. تهیه استانداردهای HPLC

محلول استاندارد مادر با غلظت ۱۰۰۰ ppm، از انحلال ۱ میلی گرم از پودر استاندارد رزمارینیک اسید خالص تهیه شده از شرکت Sigma-Aldrich (USA) در ۱ میلی لیتر آب دیونیزه آماده شد. همچنین محلول‌های استاندارد جهت به دست آوردن دامنه خطی منحنی استاندارد، با افزودن حجم‌های محاسبه شده از محلول استاندارد مادر در غلظت‌های مناسب تهیه شد.

۳-۸-۲. عصاره گیری

۵۰ میلی گرم از ریشه های مویین خشک شده در آون، در ۲ میلی لیتر اتانول ۷۰٪ کوبیده شد تا عصاره آن کاملاً خارج شود. سپس عصاره به دست آمده به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع رویی از فیلتر $\text{mM} ۴۵/۰$ عبور داده شد و به عنوان عصاره خالص جهت انجام آنالیزهای کروماتوگرافی در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد.

۳-۸-۳. بررسی آماری داده های کروماتوگرافی

کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا، در واقع مدت زمان لازم جهت آنالیز متابولیت رزمارینیک اسید طی عبور عصاره از ستون کروماتوگرافی و همچنین سطح زیر هر نمودار را نشان می دهد. این اعداد برای ریشه های موین رشد کرده در محیط های متفاوت (N^+ , P^+ , P^- , PH اسیدی و CO) و در دو تکرار به دست آمد. با استفاده از این داده ها، میزان رزمارینیک اسید موجود در هر نمونه و در هر محیط رشدی بررسی شد. همچنین با استفاده از نرم افزار Excel، منحنی خطی استانداردها رسم و با استفاده از نرم افزار SAS v9.1.3 منحنی کالیبراسیون و ضریب همبستگی محاسبه شد.

۳-۹. بخش مولکولی

جهت انجام بخش مولکولی، ابتدا لازم است از برگ گیاه نعنای آبی استخراج RNA صورت گیرد. استخراج RNA به روش های متفاوتی مانند استخراج دستی با استفاده از TriZol، روش RNA X-plas و همچنین با استفاده از کیت های Qiagen, Rosh و Vivantis آزمون شد اما وجود ترکیبات پلی فنولی بالا در این گیاهان، مانع از استخراج RNA با خلوص بالاشده و سنتز cDNA و نتایج واکنش های PCR را تحت تاثیر قرار می دهد. نهایتاً استخراج RNA به روش CTAB آزمون و به عنوان بهترین روش تایید گردید.

۳-۹-۱. استخراج RNA به روش CTAB

۱. جهت استخراج RNA در این روش، یک میلی لیتر از بافر استخراج (CTAB ۲٪، Tris HCL (pH:۸)، $M\ 1/4$ NaCl، $mM\ 20$ EDTA، β ۱۰٪ mercaptoethanol، ۲٪ PVP) درون میکروتیوب ۲ میلی لیتری ریخته و ۲۰ میکرولیتر بتا-مرکاپتواتانول به آن اضافه شد. وجود این ماده در بافر استخراج مانع اکسید شدن رشته های RNA می گردد. سپس میکروتیوب های حاوی بافر به مدت ۱۰ دقیقه در دستگاه Thermoblock با دمای ۶۵ درجه سانتیگراد قرار گرفتند.

۲. حدود ۲۰۰ میلی گرم بافت برگ منجمد شده به کمک ازت مایع را درون هاون چینی استریل ساییده تا به پودر نرم و یکنواختی تبدیل شود. پودر حاصل باید قبل از ذوب شدن، به بافر استخراج اضافه گردد.

۳. مجددا میکروتیوب‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد قرار گرفتند. در طی این مدت هر ۳ یا ۴ دقیقه میکروتیوب‌ها را از دستگاه خارج و به آرامی تکان دادیم تا مخلوط همگنی به دست آید.

۴. در مرحله بعد ۸۰۰ میکرولیتر کلروفرم به نمونه‌ها اضافه و به مدت ۳۰ ثانیه کاملاً مخلوط شد. سپس میکروتیوب‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد با سرعت ۱۰۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. در این مرحله سه لایه تشکیل می‌شود: لایه بالایی شامل بافر استخراج و RNA، لایه میانی شامل بافت برگی و لایه پایینی حاوی محلول کلروفرم.

*از این مرحله بعد کلیه مراحل باید بر روی یخ انجام گیرد.

۵. لایه بالایی به میکروتیوب جدید منتقل و هم‌حجم محلول، فنول کلروفرم (۱:۱) به آن اضافه شد. پس از مخلوط کردن محلول، به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد با سرعت ۱۰۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد.

۶. لایه فوقانی به میکروتیوب جدید منتقل شد و هم‌حجم آن کلروفرم و ایزوآمیل الکل (۱:۲۴) به آن اضافه گردید. سپس میکروتیوب به مدت ۱۰ دقیقه مشابه مرحله قبل سانتریفیوژ شدند.

۷. مجدداً لایه فوقانی به میکروتیوب جدید منتقل شد و یک سوم حجم آن لیتیم کلراید ۸ مولار به آن اضافه گردید. میکروتیوب، حداقل به مدت ۴ ساعت در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد. در این مرحله رشته‌های بسیار ظریف RNA برای مدت چند ثانیه مشاهده و سپس محو شدند.

۸. نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد با سرعت ۱۰۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند. پس از تخلیه لایه فوقانی، رسوب RNA با ۵۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰٪ شست و شو و سپس به مدت ۴ دقیقه در ۱۲۰۰۰ rpm سانتریفیوژ گردید.

۹. رسوب حاصل در معرض هوا خشک شده و در ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر تیمار شده با DEPC حل و در دمای ۸۰- درجه نگهداری شد (راجاگانی، ۲۰۱۳).

۳-۹-۲. حذف DNA از RNA استخراج شده

۱. مقدار ۱۰ میکرولیتر از بافر dnase و ۳ میکرولیتر از آنزیم dnase به ۱۰۰ میکرولیتر از رسوب حل شده در آب (در مرحله ۹ استخراج RNA) اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه انکوبه شد.
۲. ۱۰ میکرولیتر بافر EDTA, ۵۰ mM به محلول قبلی اضافه و ۱۰ دقیقه در ۶۵ درجه انکوبه شد.
۳. هم حجم محلول نهایی قبل، فنل-کلروفرم (۱:۱) به آن اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در ۴ درجه و با سرعت ۱۰۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد.
۴. لایه بالایی به ویال جدید منتقل شد و هم حجم محلول به آن کلروفرم: ایزوامیل الکل (۲۴:۱) اضافه و با شرایط بالا مجدداً سانتریفیوژ گردید.
۵. لایه فوقانی به ویال جدید منتقل شد و ۱/۱۰ حجم آن استات سدیم (۵,۲ M^۳: pH) و دو برابر حجم آن اتانول ۱۰۰٪ اضافه و صورت شبانه در ۲۰- درجه سانتیگراد انکوبه شد.
۶. پس از گذشت این زمان، به مدت ۱۵ دقیقه در ۴ درجه سانتیگراد و با سرعت ۱۳۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد.
۷. رسوب به وجود آمده با حدود ۵۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰٪ (آماده شده با آب DEPC) شسته و ۵ دقیقه در ۷۵۰۰ rpm سانتریفیوژ شد.
۸. مایع رانشین تخلیه و رسوب در معرض هوا خشک و در ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر تیمار شده با DEPC حل شد (ژاکوبس، ۲۰۱۳).

۳-۹-۳. ساخت cDNA

مقدار مطلوب RNA برای سنتز cDNA بین ۰/۱ تا ۵ میکروگرم است این مقدار RNA با ۱ میکرولیتر Oligodt و ۳ میکرولیتر آب DEPC مخلوط و به مدت ۵ دقیقه در دستگاه Thermoblock با دمای ۶۵ درجه سانتیگراد قرار داده شد. پس از گذشت این مدت، ۲ میکرولیتر dNTP، ۱ میکرولیتر آنزیم MMULV (۲۰^u/μl)، ۲ میکرولیتر بافر MMULV و ۰/۵ میکرولیتر Ribolock به آن اضافه کرده و با

آب DEPC به حجم ۲۰ میکرولیتر رسانده شد. سپس ویال حاوی این مخلوط ابتدا به مدت ۹۰ دقیقه در ۴۲ درجه سانتیگراد و به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۰ درجه سانتیگراد انکوبه شد (ژیلینسکین، ۲۰۱۳).

۳-۹-۴. واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) با آغازگرهای ژن خانه دار و ژن مورد مطالعه

واکنش زنجیره ای پلیمرز با آغازگرهای ژن های خانه دار اکتین، جهت آزمون cDNA های سنتز شده و ژن مورد مطالعه که براساس توالی ژن *smMYB39* در گیاه *Salvia miltiorrhiza* (پیوست ۵) طراحی گردید، انجام شد. توالی آغازگرها در جدول ۳-۲ و مواد و مقادیر مورد نیاز در واکنش در جدول ۳-۳ ارائه شده است. برنامه PCR مطابق جدول ۳-۵ است.

جدول ۳-۵. برنامه واکنش PCR

تعداد چرخه	زمان	دما (درجه سانتیگراد)	مراحل PCR
۱	۵ دقیقه	۹۴	واسرشت سازی اولیه
۳۵	۱ دقیقه	۹۴	واسرشت سازی هر چرخه
۳۵	۱ دقیقه	۶۰	اتصال آغازگرها
۳۵	۱ دقیقه	۷۲	طویل سازی
۱	۱۰ دقیقه	۷۲	طویل سازی نهایی

۳-۹-۵. الکتروفورز با استفاده از ژل آگارز

ژل آگارز جهت شناسایی و جداسازی نوکلئیک اسیدها منجمله محصولات PCR به کار برده می شود. در این روش قطعات DNA که دارای بار منفی هستند، تحت میدان الکتریکی ایجاد شده توسط دستگاه، به سمت قطب مثبت حرکت می کنند و براساس اندازه از هم تفکیک می شوند. پس از گذشت مدت زمان مناسب از تفکیک قطعات، رنگ آمیزی ژل با اتیدیوم بروماید انجام می گیرد که در زیر لامپ فرابنفش (UV) قابل مشاهده است (پیوست ۴).

۳-۹-۶. خالص سازی محصول از مواد واکنش

جهت دستیابی به توالی ژن مورد مطالعه، ابتدا لازم است نوکلئوتیدها را از محصول تکثیر شده، استخراج نماییم تا با قرار دادن در وکتور مناسب و انتقال به باکتری، امکان کشت آن فراهم شود. سپس پلاسمیدهای تکثیر شده حاوی ژن هدف، استخراج شده و برای توالی‌یابی به شرکت مربوطه ارسال گردد.

جهت خالص سازی نوکلئوتیدهای تکثیر شده از مواد واکنش به صورت زیر عمل شد:

۱. همه محصولات PCRها را به یک ویال منتقل کرده و ۱/۵ برابر حجم آن، سدیم استات M۳ اضافه شد.

۲. هم حجم نمونه کل، ایزوپروپانول اضافه کرده. سپس ویال‌ها حداقل به مدت ۳۰ دقیقه در ۷۰- درجه سانتیگراد انکوبه و به مدت ۳۰ دقیقه در ۴ درجه سانتیگراد و ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد.

۳. مایع رویی را با دقت خارج کرده و رسوب با اتانول ۷۰٪ شست و شو داده شد.

۴. مجدداً سانتریفیوژ با همان شرایط تکرار شد.

۵. رسوب DNA در معرض هوا خشک و در آب دیونیزه یا اتانول حل گردید.

۳-۹-۷. ligation

این مرحله مقدمه ای برای مرحله بعد یعنی ترانسفرماسیون می‌باشد. جهت تکثیر قطعه هدف به مقدار زیاد، این قطعه باید در وکتور (پیوست ۱) مناسب وارد شده و سپس همراه با وکتور به یک سلول میزبان منتقل گردد. روش کار براساس دستوالعمل شرکت Bioneer (AccuPower Ligation PreMix) انجام شد. مواد و مقادیر مورد نیاز در جدول ۳-۶ ارائه شده است.

جدول ۳-۶. مواد و مقادیر مورد نیاز برای Ligation

مواد مورد نیاز	مقادیر مورد نیاز	مقادیر مورد نیاز برای ۲۰ میکرولیتر واکنش
PTZ vector	۳ml	۳
Buffer ligation(5x)	۶ ml	۶
PCR product	variable	۱۵,۵
T4 DNA ligaze	۱ml	۱
Water	تا حجم نهایی ۳۰ ml	۴,۵

مواد مورد نیاز با مقادیر ذکر شده با هم مخلوط. و به مدت یک ساعت در ۲۲ درجه سانتیگراد انکوبه شد.

*محصول PCR حاوی توالی غنی از A در دو انتها جهت وارد شدن به وکتور می‌باشد که با افزایش دمای مرحله طولیل سازی به ۲۰ دقیقه در برنامه PCR ایجاد می‌شود.

۳-۹-۸. Transformation

جهت انجام ترانسفر ماسیون سلول‌های مستعدی مورد نیاز است که پلاسمید نوترکیب به درون آن انتقال یابد. برای ترانسفر ماسیون اولیه پلاسمید نوترکیب، از اشیرشیا کلائی سویه DH5 α به صورت زیر استفاده شد:

۱. در این مرحله Competent cellها (در واقع سلول‌های باکتری E.coli یا EcoR₁ هستند که قطعه ژن مورد نظر را داخل وکتور خود جای می‌دهد) از دمای ۷۰- درجه سانتی گراد خارج و کنار شعله روی یخ نگه داشته شد.

۲. ۱۰ میکرولیتر از نمونه ligate شده به صورت دورانی و خیلی آرام به Competent cellها اضافه شد و ویال‌ها به مدت ۲۰ دقیقه روی یخ انکوبه شدند.

۳. سپس هر ویال مدت ۹۰ ثانیه در دمای ۴۲ درجه انکوبه شدند.

۴. ویال‌ها مجدداً ۲ دقیقه روی یخ قرار داده شدند.

۵. ۹۰۰ میکرولیتر از محیط LB مایع فاقد امپی سیلین به هر نمونه اضافه شد.

۶. ویال‌ها به مدت ۱ ساعت روی شیکر ۳۷ درجه سانتی‌گراد با دور rpm ۱۸۰ قرار گرفتند.

۷. ۱۰۰ میکرولیتر از هر نمونه روی محیط LB جامد حاوی امپی سیلین کشت چهار نقطه‌ای داده شد و به صورت شبانه در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند تا کلنی‌های باکتری رشد کنند. *مرحله آخر برای غربالگری کلنی‌های ترانسفرم شده از ترانسفرم نشده از آنتی بیوتیکی که ژن مقاومت به آن توسط وکتور نو ترکیب حمل می‌گردد، در مقادیر مناسب استفاده شد. در این طرح، از آنتی بیوتیک امپی سیلین که بازدارنده رشد باکتری می‌باشد استفاده شد. سلول‌های ترانسفرم نشده در حضور امپی سیلین رشد نمی‌کنند.

۳-۹-۹. Clony PCR

جهت بررسی باکتری‌های ترانسفرم شده که پلاسمید حاوی قطعه مورد نظر را دریافت کرده‌اند، از داخل پلیت باکتری، کلنی‌هایی که به صورت مجزا رشد کرده‌اند، به صورت تصادفی انتخاب و شماره گذاری شدند. سپس با یک سوزن آن را برداشته و ابتدا در پلیت LB جامد، کشت خطی کوتاهی داده شد و بعد داخل ویال حاوی آب مقطر (در هر ویال ۴/۵ میکرولیتر) زده شد. این کار برای چند کلنی تکرار و سایر مواد واکنش PCR به آن‌ها اضافه شد. برنامه واکنش Clony PCR با شرایطی مشابه واکنش‌های قبل (جدول ۳-۵) و با دمای اتصال ۵۹ درجه سانتی‌گراد انجام شد تا کلنی‌هایی که دارای باند ژن مورد مطالعه است، شناسایی شوند. مواد مورد نیاز برای Clony PCR در جدول ۳-۷ ارائه شده است.

جدول ۳-۷. مواد و مقادیر مورد نیاز برای Clony PCR

مواد و مقادیر موجود	مقادیر مورد نیاز
Master Mix (dNTP, Mgcl ₂ , buffer)	۵ μl
Primer F (100 pm)	۰/۲ Pm
Primer R(100 pm)	۰/۲ Pm
Taq	۰/۱
Template	.
ddH ₂ O	تا حجم نهایی ۱۰ μl

۳-۹-۱۰. استخراج پلاسمید

برای استخراج پلاسمید از باکتری‌های ترانسفرم شده، مراحل زیر انجام شد:

۱. به میزان ۵ میلی لیتر از کشت شبانه باکتری در ویال ۲ میلی لیتری با سرعت ۱۲۰۰۰rpm به مدت ۲ دقیقه سانتریفیوژ شد.
 ۲. پس از سانتریفیوژ، محلول رویی خارج و ۱۰۰ میکرولیتر از محلول Solution I به رسوب اضافه شد. سپس به مدت ۱ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد.
 ۳. میزان ۱ میکرولیتر از محلول Visualyse به مواد بالا اضافه شد. این ماده لیز کردن باکتری را تسریع می‌کند.
 ۴. ۲۰۰ میکرولیتر از محلول Solution II را به ویال اضافه کرده، چندبار خوب تکان داده شد و مجدداً به مدت ۱ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد.
- * اگر Visualyse اضافه شود، محلول آبی رنگ می‌شود. میکس کردن مواد را آنقدر ادامه دادیم تا رنگ آبی آن یکنواخت شود.

۵. سپس ۳۰ میکرولیتر از محلول Solution III را اضافه کرده و مشابه مرحله قبل عمل نمودیم. در طی این مدت، ماده پفکی و سفید رنگی ایجاد می‌شود که همان سلول‌های تجزیه شده است.
۶. مواد در سانتریفیوژ با دور ۱۲۰۰۰rpm رسوب داده شد. در واقع مواد لیز شده سلولی شامل دیواره و سایر مواد باکتریایی رسوب می‌کند و DNA ژنومی در رانشین باقی می‌ماند.
۷. محلول رویی را به ستون EZ-۱۰ منتقل و به مدت ۳ دقیقه در ۱۰۰۰۰ rpm سانتریفیوژ گردید.
۸. فیلتر را خارج کرده و مواد داخل تیوب را دور ریخته و دوباره ستون داخل آن قرار داده شد. سپس ۷۵۰ میکرولیتر از محلول شست و شو (Wash Solution) را به ستون اضافه و مشابه مرحله قبل سانتریفیوژ شد.
۹. مرحله قبل مجدداً تکرار شد.
۱۰. محلول رویی (مایع داخل تیوب) را خارج کرده و مجدداً سانتریفیوژ تکرار شد تا تمام محلول شست و شو خارج شود.
۱۱. ستون را به تیوب جدید منتقل و ۵۰ میکرولیتر از Elution Buffer طی دو مرحله ۲۵ میکرولیتر به ستون اضافه شد. هر بار ستون ابتدا ۲ دقیقه در دمای اتاق انکوبه و سپس ۲ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور سانتریفیوژ گردید.
۱۲. ستون را دور انداخته و مایع داخل تیوب را که حاوی پلاسمید باکتری است، در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد ذخیره شدند (GenetBio Kit, 2014).
- نهایتاً ۲۰ میکرولیتر از پلاسمید استخراج شده را به ویال جدید منتقل کرده و برای توالی‌یابی به شرکت مربوطه فرستادیم.

۳-۹-۱۱. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با آغازگرهای اختصاصی ژن *smMYB39*

بر اساس توالی به دست آمده از گیاه *Mentha aquatica*، آغازگر اختصاصی توالی مورد مطالعه طراحی و با واکنش PCR آزمون شد. دمای اتصال در این واکنش ۵۹ درجه سانتیگراد در نظر گرفته شد. توالی آغازگر اختصاصی ژن *smMYB39* در جدول ۳-۲ ارائه شده است.

۳-۹-۱۲. RT-PCR نیمه کمی جهت تکثیر ژن مورد نظر در ریشه های موپین

در RT-PCR نیمه کمی برای آنکه بتوان شدت باند تکثیر شده در هر واکنش را مقایسه کرد، باید مقدار cDNA به کار رفته در همه واکنش ها یکسان باشد. بدین منظور در ساخت cDNA مقدار ۱mg برای تمامی نمونه ها در نظر گرفته شد. از ژن های خانه دار اکتین نیز جهت نرمال سازی سطوح بین نمونه های مختلف استفاده شد.

واکنش های PCR برای هر دو ژن اکتین و ژن *SmMYB39* مشابه واکنش های قبل انجام شد. با این تفاوت که جهت اندازه گیری دقیق بیان ژن به روش RT-PCR، باید در تعداد چرخه مناسب و در فاز صعودی انجام شود. بدین منظور، واکنش PCR با تعداد ۲۵ چرخه انجام شد. محصولات واکنش بر روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز و شدت باندها برای داده های مربوط به بیان ژن با استفاده از نرم افزار TotalLab کمی شدند.

۳-۹-۱۳. بررسی آماری داده ها

باندهای به دست آمده از واکنش های PCR، توسط نرم افزار TotalLab کمی شدند، سپس نرمال سازی و تجزیه واریانس و مقایسه میانگین داده ها با استفاده از نرم افزار IBM SPSS Statistics 23 انجام گرفت. تحلیل داده ها در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام گرفت و جهت بررسی اختلاف میانگین داده ها برای هر دو ژن و در دو تکرار، از آزمون دانکن و در سطح ۰/۰۱٪ استفاده شد.

فصل چہارم

نتایج و بحث

۴. نتایج و بحث

الف: بخش کشت بافت

۴-۱. انتخاب ریزنمونه مناسب

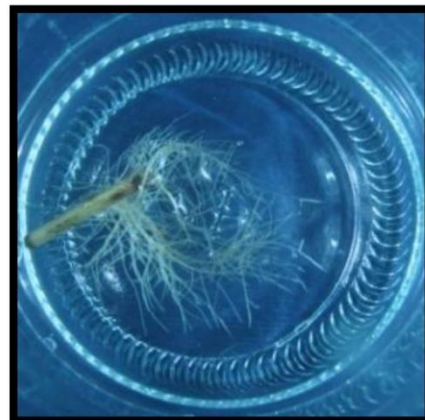
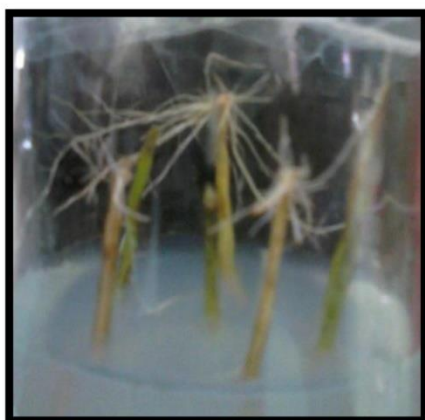
در این مطالعه قدرت بیماری زایی سویه‌های مختلف اگروباکتریوم (۱۵۸۳۴، ۴A، ۱۳A، ATCC، ۹۵۳۴ و ۳۱۸) در ریزنمونه‌های برگ و ساقه تعیین گردید. در مقیاس کلی نیز میزان جوانه زنی برای ریزنمونه‌های برگ ۴۲/۶٪ و برای ریزنمونه‌های ساقه ۵۰٪ محاسبه گردید. نتایج نشان داد، در ریزنمونه ساقه تلقیح شده با اگروباکتریوم سویه ۴A بیشترین میزان ریشه زایی را دارند. همچنین ریشه‌های ظاهر شده در برگ‌ها به مراتب از نظر کمیت و کیفیت ضعیف‌تر بودند. این ریشه‌ها پس از مدتی نکروز شده و خشک شدند اما ریشه‌های حاصل از ریزنمونه ساقه ضخیم‌تر بوده و رشد بیشتری در محیط MS داشتند (شکل ۴-۱).



الف



ب



شکل ۴-۱ ریز نمونه های برگ و ساقه تلقیح شده توسط سویه های آگروباکتریوم رایزوزنز و ریشه های ایجاد شده حاصل از آن. الف. ریز نمونه برگ تلقیح شده. ب. ریشه های حاصل از ریزنمونه برگ ج. ریز نمونه ساقه تلقیح شده. د. ریشه های حاصل از ریزنمونه ساقه

۴-۲. بررسی اثر سویه باکتری بر میزان القا و رشد ریشه های مویین

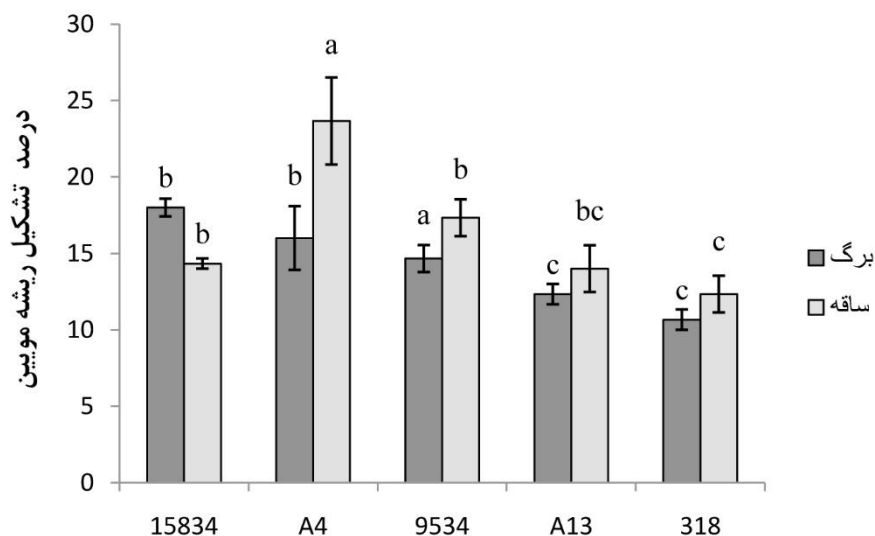
نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده ها نشان داد که برهمکنش بین سویه های مختلف باکتری و انواع ریزنمونه بر درصد تشکیل ریشه مویین در سطح ۰/۰۱ معنی دار بود (جدول ۴-۱). مقایسه میانگین داده ها با استفاده از روش توکی نشان داد که سویه ۴A در ریزنمونه ساقه بالاترین درصد تشکیل ریشه مویین (۲۳٪/۶۶) را دارد و دارای اختلاف معنی داری با سایر سویه ها می باشد (شکل ۴-۲).

جدول ۴-۱. میانگین مربعات درصد القای ریشه موپین تحت تاثیر سویه‌های مختلف آگروباکتریوم رایزوزنز بر ریز نمونه

برگ و ساقه

میانگین مربعات	df	منابع تغییر
درصد جوانه زنی		
۶۱/۱۶**	۴	سویه باکتری
۳۰/۰۰**	۱	بافت
۲۴/۳۳**	۴	سویه باکتری × بافت
۵/۹۳	۲۰	خطا
۱۵/۸۸	-	cv

** : معنی داری در سطح ۰/۰۱ را نشان می دهد.



سویه‌های آگروباکتریوم

شکل ۴-۲. مقایسه میانگین سویه‌های باکتری و نوع ریزنمونه بر تشکیل ریشه موپین

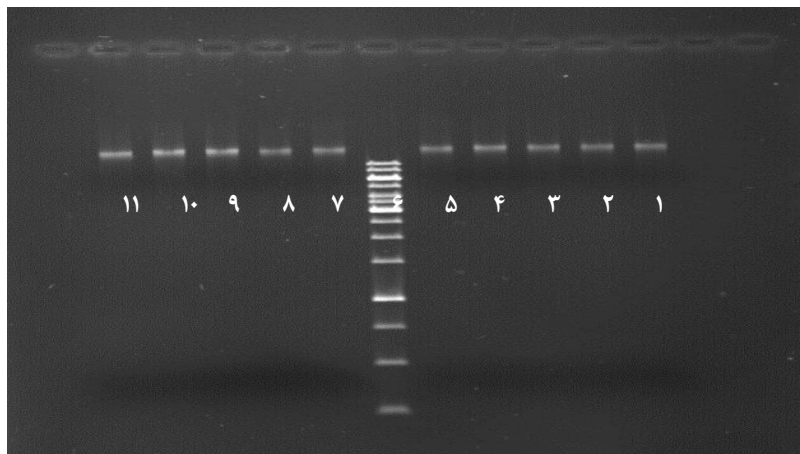
در بررسی‌های انجام شده توسط تی پارک و همکاران، نتایج حاصل از تلقیح ریزنمونه های برگ گیاه *Agastache rugosa* توسط سویه‌های متفاوت آگروباکتریوم (۱۳۳۳۳، ۱۵۸۳۴، ۹۴۰۲، ۱۰۰۰R، ۱۶۰۱R، ۱۲۰۰R و ۴A) نشان داد، سویه A4 با درصد ریشه دهی ۴۹/۱٪ بهترین کارایی را در تشکیل ریشه های موپین دارد (تی پارک، ۲۰۱۷). همچنین نوروزی در سال ۲۰۱۴ با تلقیح ریزنمونه های گیاه *Agastache foeniculum* توسط سویه‌های آگروباکتریوم ۷A، ۴A و ۹۵۳۴ به این نتیجه رسیدند که سویه A4 بیشترین میزان ریشه دهی (۵۱٪/۱) را نسبت به سایر سویه‌ها دارد (نوروزی، ۲۰۱۴). پارسا و

همکاران نیز در بررسی آلکالوئیدهای موجود در ریشه های مویین گیاه *Hyoscyamus niger* ریزنمونه های برگ این گیاه را با سویه های 4A و 9402 تلقیح کردند که بیشترین میزان ریشه دهی را از سویه 4A به دست آوردند (پارسا، 1390). در پژوهش حاضر، القاء ریشه مویین در گیاه نعنای آبی، تحت تاثیر سویه های اگروباکتریوم رایزوزنز و نوع ریزنمونه قرار گرفت. نتایج نشان داد، ریزنمونه ساقه با میزان ریشه دهی 50 درصد، نسبت به ریزنمونه برگ، عملکرد بهتری داشته است. همچنین سویه 4A با ریشه دهی 23/66 درصد، بیشترین میزان ریشه دهی را دارا بوده و به عنوان بهترین سویه انتخاب شد. ادامه مراحل انجام پروژه شامل بررسی میزان متابولیت رزمارینیک اسید، در ریشه های مویین حاصل از تلقیح سویه 4A بر روی ریزنمونه ساقه انجام گرفت.

۳-۴. اثبات مولکولی ماهیت تراریختی ریشه های مویین

۱-۳-۴. استخراج DNA

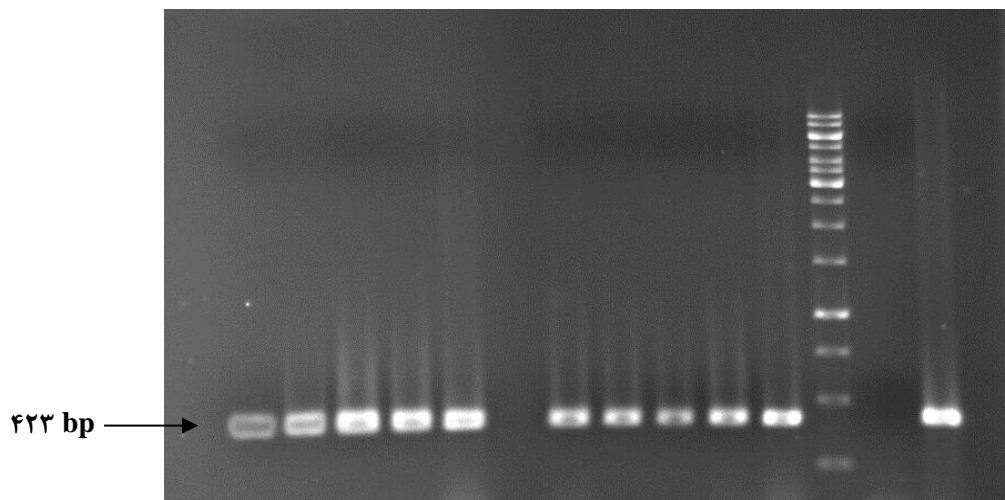
به منظور اثبات مولکولی ماهیت تراریختی ریشه های مویین، DNA ریشه ها با روش CTAB استخراج و بر روی ژل آگارز مشاهده شد (شکل ۳-۴).



شکل ۳-۴. نتایج حاصل استخراج DNA از ریشه های مویین تلقیح شده گیاه نعنای آبی. چاهک ۱ تا ۵، مربوط به محیط های حاوی نیتروژن، فسفر، pH اسیدی، فسفر حداقل و محیط کنترل در تکرار اول، چاهک ۶. مارکر با سایز 50 bp، چاهک ۷ تا ۱۱. مربوط به محیط های ذکر شده در تکرار دوم.

۲-۳-۴. واکنش PCR با آغازگرهای *rol B*

DNA استخراج شده، با یک جفت آغازگر اختصاصی برای تکثیر قطعه ای از ژن *rol B* با طول حدود ۴۲۳bp وارد واکنش PCR گردید. توالی آغازگر ژن *rol B* در جدول ۲-۳ و نتایج حاصل از واکنش در شکل ۴-۴ آمده است. وجود باند ۴۲۳ جفت باز، نشان دهنده تراریخت بودن ریشه های مویین است.



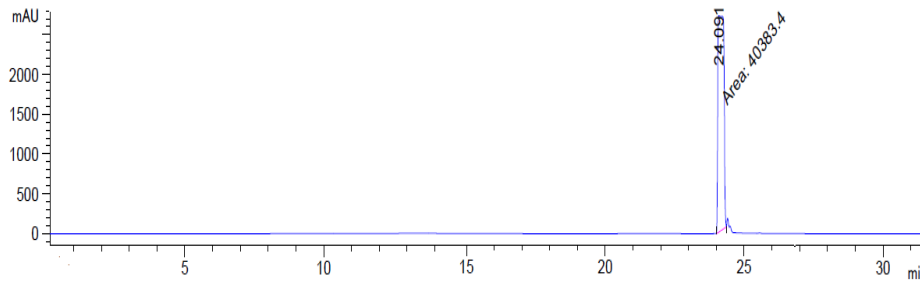
شکل ۴-۴. نتایج حاصل از واکنش PCR در اثبات تراریختی ریشه های مویین. ۱. کنترل مثبت واکنش که با باکتری کشت داده شده در پلیت جامد گذاشته شد، چاهک ۲. کنترل منفی که با ریشه های معمولی گیاه گذاشته شد، چاهک ۳. مارکر سایز ۱ Kb، چاهک های ۸-۴، محصول حاصل از واکنش PCR نمونه های ریشه مویین کشت داده شده در شرایط محیطی متفاوت در تکرار اول. چاهک های ۱۳-۹، محصول حاصل از واکنش PCR نمونه های ریشه مویین کشت داده شده در شرایط محیطی متفاوت در تکرار دوم.

۴-۴. کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

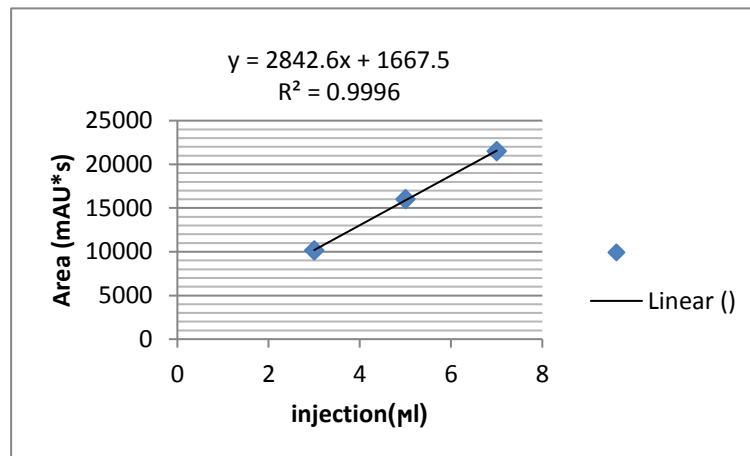
۱-۴-۴. خطی بودن روش آزمون

ابتدا ۵۰ میکرولیتر از استاندارد تهیه شده از عصاره خالص رزمارینیک اسید در طول موج های متفاوت ۲۱۰، ۲۵۴، ۲۸۰، ۳۳۰ و ۳۶۰ نانومتر به دستگاه تزریق شد تا میزان خلوص و زمان خروج ترکیب رزمارینیک اسید از ستون بررسی شود. در این پژوهش، رزمارینیک اسید در طول موج ۳۳۰ نانومتر و زمان بازداری ۲۴ دقیقه، بهترین نمودار را نشان داد (شکل ۴-۵). همچنین از نمونه استاندارد، غلظت های

مختلف در ۳ سطح (۵، ۳، ۱ μM و ۷ از استاندارد مادر) تهیه و به دستگاه تزریق شد. خطی بودن منحنی، با استفاده از محلول‌های استاندارد، توسط آنالیز رگرسیون خطی در نرم افزار Excel ارزیابی شد و منحنی کالیبراسیون با معادله خط $y = 2842.x + 1667$ و ضریب همبستگی $R^2 = 0.999$ به دست آمد (شکل ۴-۶).



شکل ۴-۵. کروماتوگرام حاصل از تزریق ۵۰ میکرولیتر از استاندارد به دستگاه در طول موج ۳۳۰ نانومتر



شکل ۴-۶. منحنی کالیبراسیون رزمارینیک اسید در ۳ غلظت ۵، ۳، ۱ μM و ۷ از استاندارد

۴-۴-۲. محاسبه میزان رزمارینیک اسید

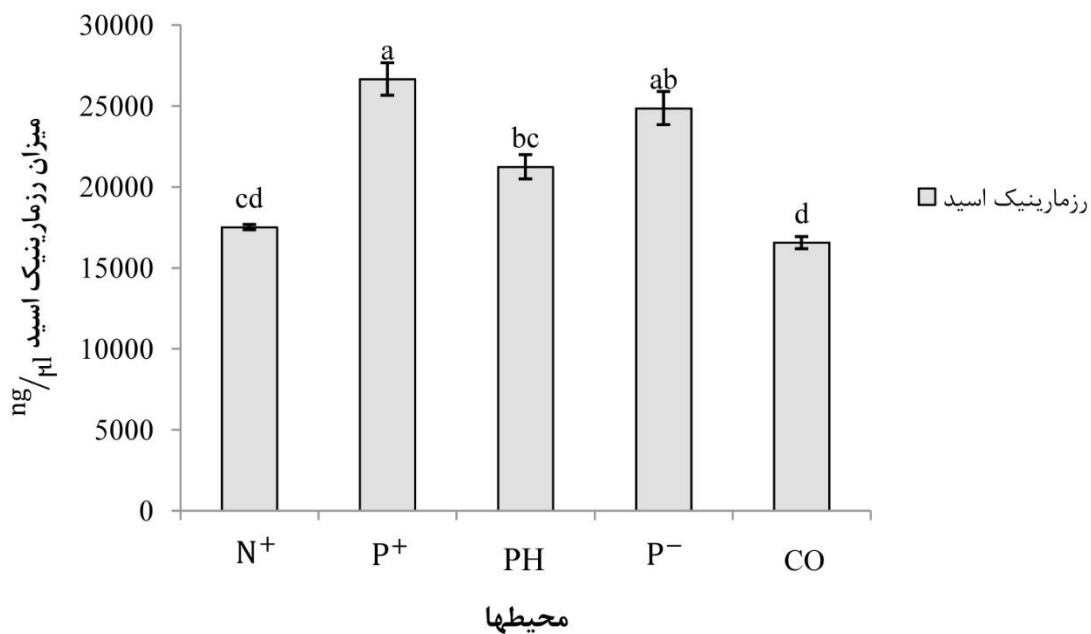
عصاره‌های حاصل از نمونه های ریشه مویین که در شرایط مختلف تغذیه‌ای و محیطی رشد کردند، در دو تکرار به دستگاه کروماتوگرافی تزریق و رزمارینیک اسید موجود در آن‌ها بعد از ۲۴ دقیقه شناسایی و مقدار آن اندازه‌گیری شد. سطح زیر نمودار، بیانگر میزان رزمارینیک اسید موجود در هر نمونه است. مقایسه میانگین داده‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی و با استفاده از روش توکی مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۴-۲).

جدول ۴-۲. میانگین مربعات حاصل از میزان رزمارینیک اسید موجود در نمونه‌های رشد کرده در

محیط‌های مختلف رشدی

میانگین مربعات	df	منابع تغییر
رزمارینیک اسید	۴	تیمار
۳۹۱۳۵۰۳۵/۲**	۵	خطا
۰/۱۱۰۸۱۲۹	-	cv
۴/۹۲		

** : معنی داری در سطح ۰/۰۱ را نشان میدهد.



شکل ۴-۷. مقایسه داده‌های حاصل از میزان رزمارینیک اسید در ریشه‌های مویین کشت داده شده در محیط‌های رشدی متفاوت با استفاده از آزمون توکی.

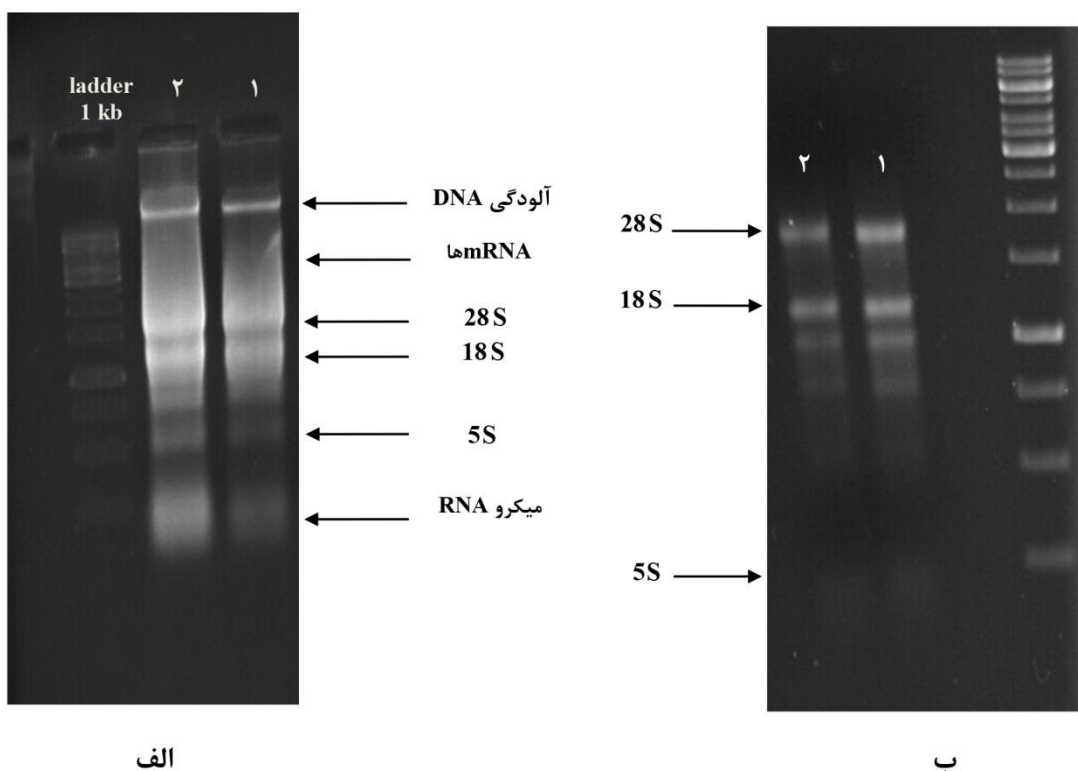
در پژوهش حاضر، ریشه‌های مویین القا شده توسط سویه‌های مختلف آگروباکتریوم، در محیط‌های متفاوت رشدی شامل محیط کشت MS مایع، حاوی ۱۵mM نیتروژن، فسفر ۲/۵mM و ۰/۶، محیط با ۵/۵pH و همچنین محیط MS پایه به عنوان شاهد رشد داده شدند و میزان رزمارینیک اسید موجود در عصاره آن‌ها به وسیله دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا مورد بررسی قرار گرفت. داده‌های به دست آمده نشان می‌دهد، میزان رزمارینیک اسید موجود در ریشه‌های مویین رشد یافته در محیط

حاوی فسفر حداقل، $24851/21 \text{ ng}/\mu\text{l}$ بوده است که در مقایسه با محیط کشت کنترل با میزان رزمارینیک اسید $16543/69 \text{ ng}/\mu\text{l}$ افزایش تولید متابولیت ثانویه را نشان می‌دهد. مطالعات انجام گرفته نیز این مطلب را تایید می‌کند. راوو و راویشانکار در سال ۲۰۰۲ و بین و همکارانش در سال ۲۰۱۴ با بررسی تولید پلی ساکارید در ریشه های نابجای حاصل از برخی گیاهان بیان کردند، سطوح پایین‌تر فسفات جهت تولید برخی آلكالوئیدها، فلاونوئیدها و گلیسریدها مناسب‌تر است. هرچند پژوهش‌ها نشان می‌دهد، کاهش میزان نیتروژن کل و یا حذف کامل نیترات از کشت سلولی ریشه های نابجا در گیاهان *Glycyrrhiza uralensis*، *Panax ginseng* و *Eleutherococcus koreanum* تولید متابولیت‌های ثانویه را بهبود می‌بخشد (لی و پیک، ۲۰۱۲؛ کیم، ۲۰۰۵)، اما بررسی‌های انجام گرفته، محیط حاوی نیتروژن نیز افزایش جزئی در میزان متابولیت با مقدار $17498/16 \text{ ng}/\mu\text{l}$ را نشان داد. نتایج به دست آمده از میزان رزمارینیک اسید تولید شده در محیط های حاوی فسفر بیشتر و pH اسیدی، نیز افزایش سطح بیان متابولیت ثانویه را به ترتیب تا سطح $26647/0.2 \text{ ng}/\mu\text{l}$ و $\text{ng}/\mu\text{l}$ ۲۱۲۲۴/۱۳ مشاهده کردیم.

ب: بخش مولکولی

۴-۵. استخراج RNA

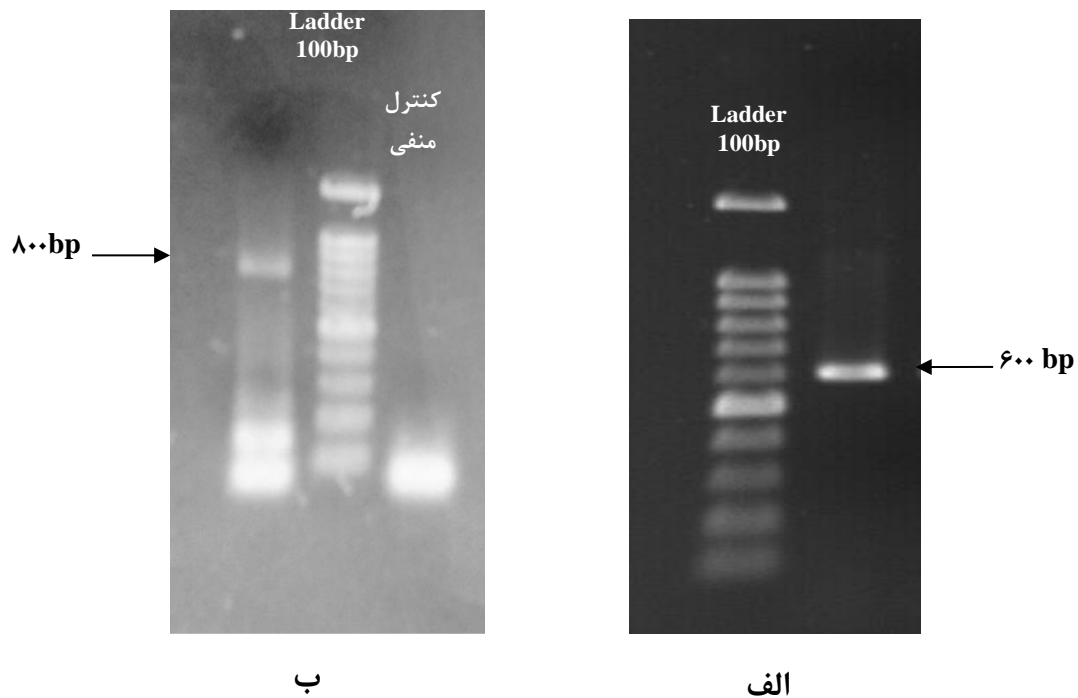
RNA نمونه های برگ گیاه نعنای آبی با روش CTAB استخراج شد. مقدار نانوگرم RNA خالص شده، حدود ۱۰۰۰ نانوگرم بود که به دلیل وجود آلودگی DNA در آن، با dnase تیمار شد و میزان RNA آن به ۱۰۳ نانوگرم کاهش یافت (شکل ۴-۸). آلودگی DNA به صورت یک باند مجزا در ابتدای ژل نمایان می‌شود که پس از تیمار نمونه با Dnase از بین می‌رود.



شکل ۴-۸. الف. RNA استخراج شده از گیاه *Mentha aquatica* به روش CTAB. چاهک‌های ۱ و ۲ مربوط به نمونه‌های با شرایط مشابه از گیاه *M. aquatica* است. ب. نمونه‌های RNA تیمار شده از گیاه *M. aquatica* با Dnase. چاهک ۱، مربوط به نمونه ۱ از RNA استخراج شده و چاهک ۲، مربوط به نمونه ۲ از RNA استخراج شده است.

۴-۶. واکنش‌های PCR انجام شده

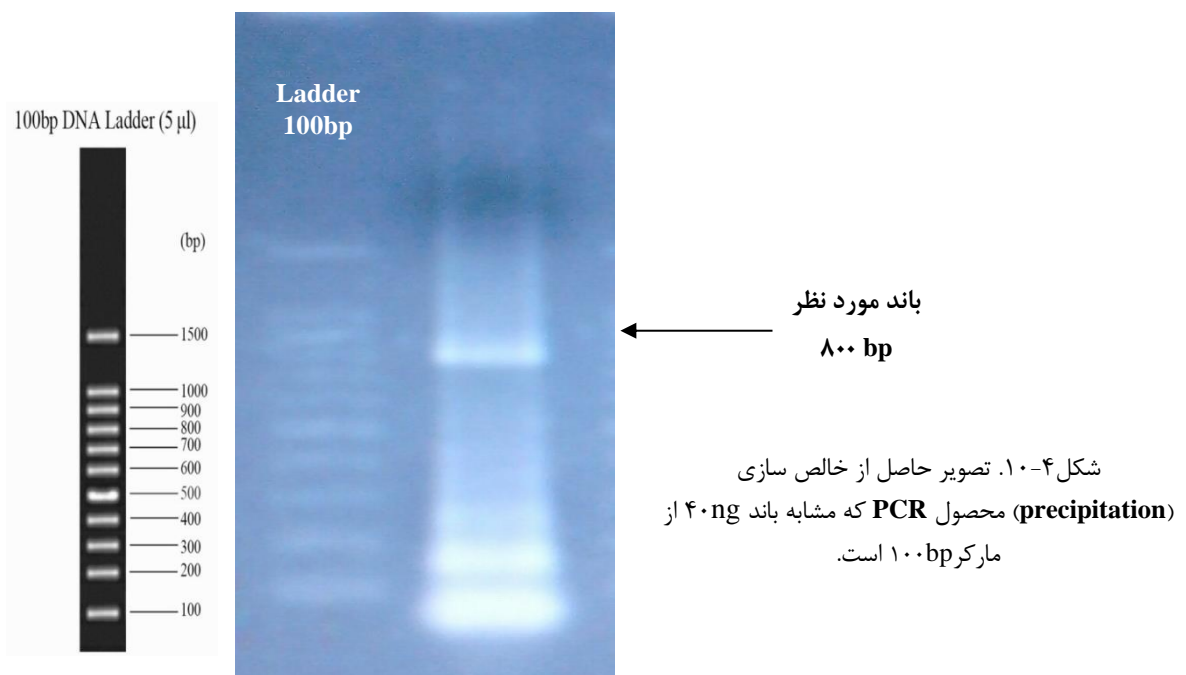
پس از استخراج RNA و حذف آلودگی‌های موجود در آن، واکنش‌های PCR با آغازگرهای اکتین و آغازگر کلی ژن *SmMYB39* که براساس توالی این ژن در گیاه *Salvia miltiorrhiza* طراحی شده بود، انجام گرفت (شکل ۴-۹). توالی آغازگرها در جدول ۳-۲ نمایش داده شده است.



شکل ۴-۹. تصویر حاصل از واکنش های PCR انجام گرفته برای ژن اکتین و *SmMYB39*.
 الف. باند حاصل از PCR با آغازگر خانه دار اکتین از نمونه cDNA ویال شماره ۲.
 ب. باند حاصل از PCR با آغازگر کلی ژن *SmMYB39* طراحی شده براساس توالی ژن در گیاه *Salvia miltiorrhiza* از نمونه cDNA شماره ۲.

۴-۷. خالص سازی DNA

پس از انجام واکنش PCR با آغازگر ژن *SmMYB39*، نوکلئوتیدهای تکثیر شده از مواد واکنش PCR خالص سازی شد. سپس مقداری از DNA خالص شده را بارگذاری کرده و نانوگرم آن تخمین زده شد (شکل ۴-۱۰).

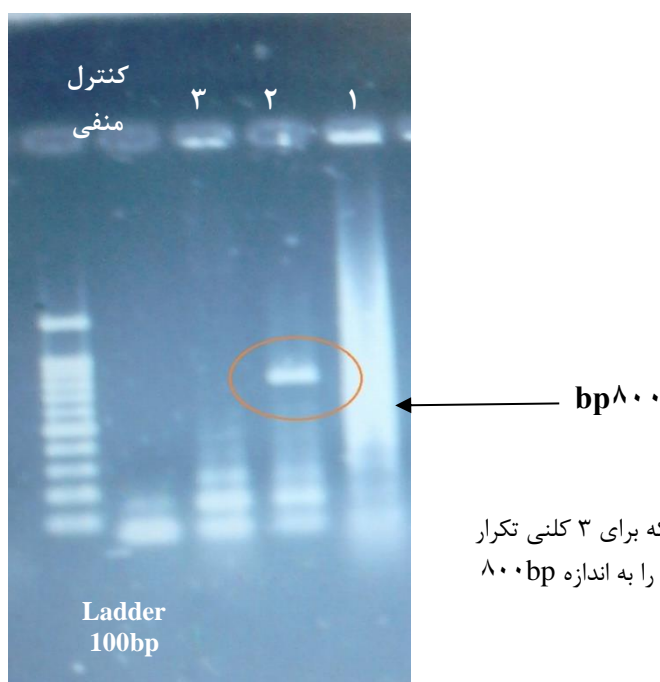


۴-۸. Ligation

*غلظت نمونه DNA هدف در این واکنش بسیار مهم است که با بارگذاری محصول PCRهای خالص شده در مرحله قبل و تخمین مقدار نانوگرم آن از مارکر ۱۰۰bp تهیه شده از شرکت سیناکلون تعیین شد. ۴ میکرولیتر از محصول PCRها بارگذاری شد که مشابه باند سوم مارکر با اندازه ۸۰۰bp و مقدار ۴۰ نانوگرم بود. از طرفی، در Catalog number وکتور اشاره شده است، به ازای هر ۱۰۰۰bp از ژن، ۱۷۲ نانوگرم از نمونه باید استفاده شود. ژن مورد مطالعه حدود ۸۰۰bp طول داشت. بنابراین لازم است، ۱۵۴/۸ نانوگرم از وکتور استفاده شود. از آنجایی که هر میکرولیتر از نمونه، ۱۰ نانوگرم است، بنابراین حدود ۱۵/۵ میکرولیتر از نمونه مورد نظر را به کیت ligation اضافه شد.

۴-۹. Clony PCR

پس از ترانسفر ماسیون و کشت باکتری‌ها در محیط LB جامد حاوی امپی سیلین، از تک کلون‌های رشد کرده به عنوان نمونه جهت انجام واکنش PCR استفاده شد. از میان Clony PCRهای انجام شده، یک کلونی مثبت بود و بر روی ژل آگارز، باند تکثیر شده‌ی ۸۰۰bp را نشان داد که از پلیت حاوی کشت آن کلنی، برای استخراج پلاسمید استفاده گردید (شکل ۴-۱۱).



شکل ۴-۱۱. تصویر حاصل از Clony PCR که برای ۳ کلنی تکرار شد. تنها نمونه کلنی شماره ۲، باند مورد نظر را به اندازه ۸۰۰bp را دارا بود.

۴-۱۰. استخراج پلاسمید

پس از تایید وجود ژن مورد نظر در باکتری‌های ترانسفرم شده، پلاسمید آن‌ها به وسیله کیت شرکت GenetBio استخراج شد و سپس بارگذاری شد. باند موجود در ژل مربوط به پلاسمیدهای استخراج شده در شکل ۴-۱۲ نمایش داده شده است.



شکل ۴-۱۲. تصویر حاصل از پلاسمید استخراج شده.

شکل ۴-۱۲ تصویر حاصل از پلاسمید استخراج شده

۴-۱۱. نتایج حاصل از تعیین توالی ژن *SmMYB39*

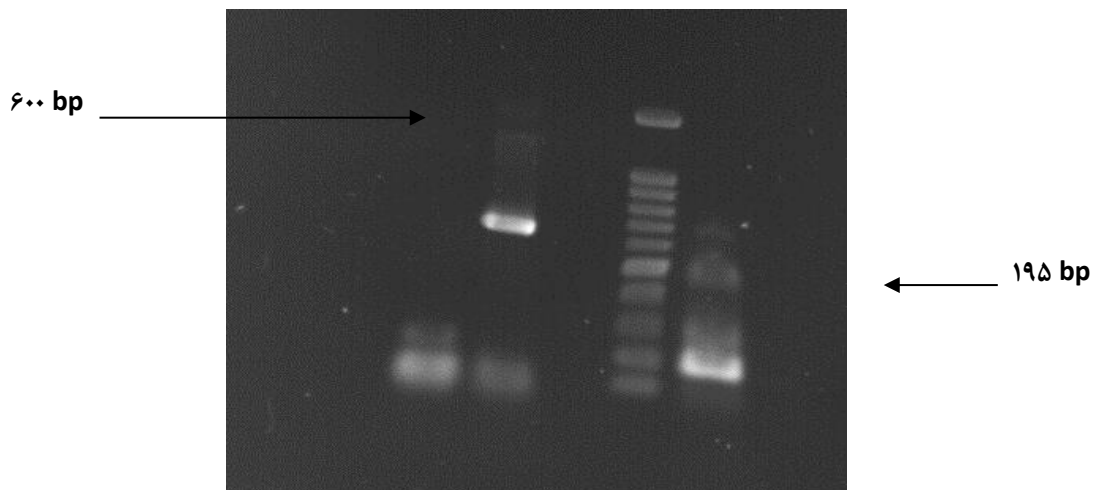
توالی به دست آمده از ژن *SmMYB39*، در گیاه *M.aquatica* براساس نتایج حاصل از توالی یابی به صورت زیر بود (شکل ۴-۱۳).

```
ATGGGAAGGTCTCCTTGCTGTGAGAAAGCACACACAAACAAAGGGGCATGGACTAAGGA
AGAAGACGACCGCCTCACCGCCTACATCCGGGCCACGCGAGGGCTGCTGGCGGAGCC
TCCCAAGGCCGCGGCCTCCTCCGCTGCGGCAAGAGCTGCCGCCTCCGCTGGATCAACT
ACCTCCGCCCCGATCTCAAGCGCGGCAACTTCTCCGACGAAGAAGACGAGCTCATCATC
AACTCCACAGCCTCCTCGGCAACAAATGGTCTCTGATAGCAGGAAGATTACCGGGAAG
GACTGATAATGAAATAAAGAATACTGGAACACACACATAAGGAGAAAACCTGGTGAGC
CGAGGAATCGACCCACCACCCACCGCGCCATGACCATGACCATGACCATGAATGAAGA
AGCTTCAGCATCACAGAATTAGCAGCTGCAAAAACCATTTCTTTTGCAGCTGCCAATAA
TATTAATAATATTCCTATGAAAGAAGAGAGCAGTAGTAGCCCTGTAAGAGAAGAAAAGT
GCCAGATTTGAATCTTGATCTCAGAATCAGCCCTCCCTATCATGATCATGATCAGCAGC
AGCAGAATGAGGAAGCAGCCTTCAAAACAGGTACGACTACGACTCCTACCTTGTGCTTC
GCTTGTGGTCTAGGCATCCAAAACAGCAAAGAATGCAGCTGCACAAATGAGACCACCGC
CAATTCTGCCTATGATTTTCTGGGCTTGA AAAACTGGAGTTGTTTTGGATTACAGAAGATT
GGAGATGAAATGA
```

شکل ۴-۱۳ توالی به دست آمده از ژن *SmMYB39*

۴-۱۲. واکنش PCR با آغازگرهای اختصاصی بر اساس ژن توالی یابی شده

پس از به دست آمدن توالی ژن مورد نظر در گیاه نعنای آبی، پرایمر اختصاصی این ژن طراحی و واکنش PCR با پرایمر طراحی شده و مشابه با شرایط واکنش‌های قبل انجام شد (شکل ۴-۱۴). همانطور که در تصویر مشاهده می‌شود، علاوه بر باند اصلی، تعدادی باند غیر اختصاصی نیز تکثیر شده است که امکان بررسی بیان ژن با استفاده از واکنش‌های Real time PCR را غیر ممکن می‌سازد.

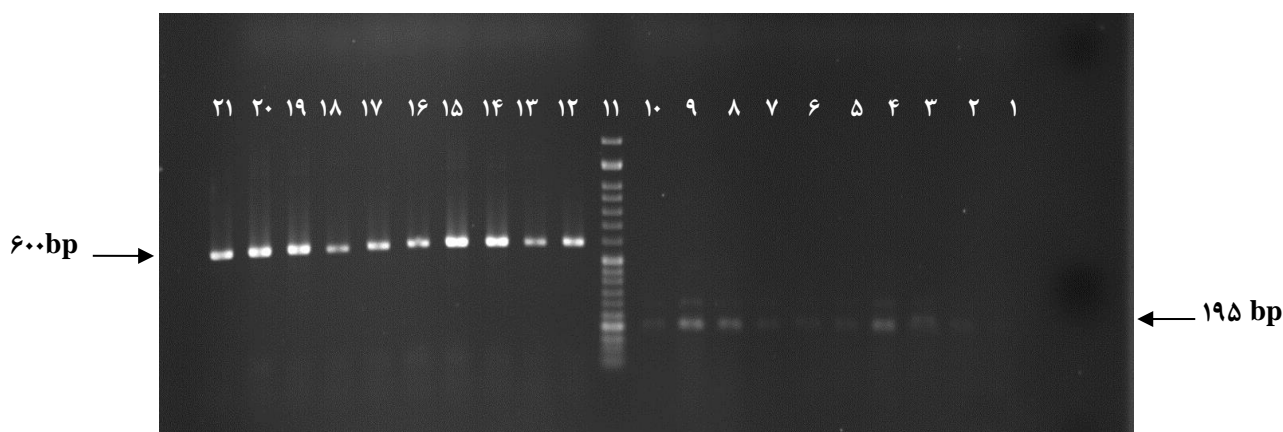


شکل ۴-۱۴. آزمون آغازگر اختصاصی طراحی شده بر اساس توالی ژن *smMYB39* در گیاه *M.aquatica*.
*باند مورد نظر با اندازه ۱۹۵ bp مشاهده شد.
* باند ۶۰۰bp متعلق به پرایمر اکتین است که به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد.

۱۳-۴. بررسی بیان نیمه کمی ژن ها

۱-۱۳-۴. واکنش PCR با آغازگرهای ژن اکتین و ژن *SmMYB39*

واکنش PCR برای هر دو ژن خانه دار اکتین و ژن مورد مطالعه از گیاه *M.aquatica* با آغازگرهای مربوط که در جدول ۲-۳ آمده است، انجام شد (شکل ۴-۱۵). توالی ژن اکتین با اندازه ۶۰۰ جفت باز و ژن *SmMYB39* با اندازه ۱۹۵ جفت باز بر روی ژل آگارز ۱٪ مشاهده شد.



شکل ۴-۱۵. تصویر حاصل از باندهای مربوط به واکنش PCR اکتین و ژن *SmMYB39*.

چاهک ۱ تا ۵. باند مربوط به ژن *SmMYB39* برای محیط‌های رشدی مختلف در تکرار اول، چاهک ۶ تا ۱۰. باند مربوط به ژن *SmMYB39* در تکرار دوم، چاهک ۱۱. مارکر با اندازه ۱۰۰bp، چاهک ۱۲ تا ۱۶. باند ژن‌های اکتین در محیط‌های رشدی مختلف در تکرار اول، چاهک ۱۳ تا ۲۱. باند ژن‌های اکتین در تکرار دوم.

۲-۱۳-۴. اندازه گیری بیان ژن ها

پس از انجام واکنش‌های PCR و به دست آمدن عکس‌های مربوط به باندها، بیان نیمه کمی ژن‌های اکتین و ژن *SmMYB39* در نرم افزار TotalLab، اندازه گیری شد. این نرم افزار با توجه به شدت باندهای موجود در عکس ژل، اعدادی را به عنوان میزان بیان ژن‌ها، به صورت نیمه کمی در اختیار ما قرار داد.

۳-۱۳-۴. تحلیل آماری داده ها

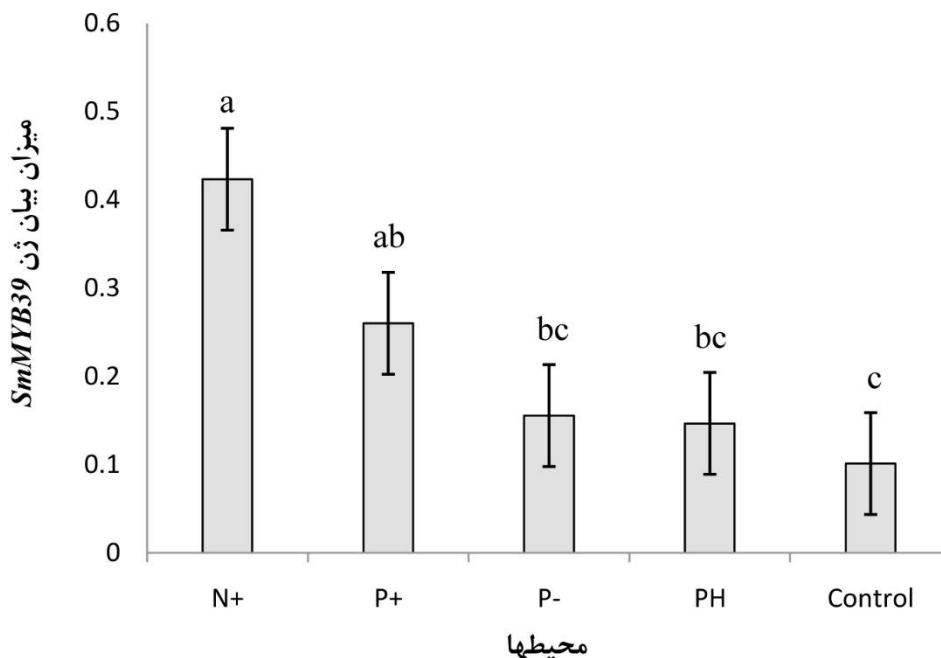
تحلیل آماری داده‌ها، شامل نرمال سازی اعداد، تجزیه واریانس و مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از نرم افزار IBM SPSS Statistics 23 انجام شد. پس از نرمال سازی اعداد، تجزیه واریانس داده‌ها انجام

شد. نتایج حاصل نشان داد که بین گروه‌ها تفاوت معنی داری وجود دارد (Block 0/85>0/05). بنابراین مقایسه میانگین داده‌ها با آزمون دانکن در سطح ۰.۱٪ انجام شد (جدول ۳-۴). همچنین نمودار مقایسه میانگین داده‌ها نیز رسم گردید (شکل ۴-۱۶). نتایج نشان داد بیان ژن *SmMYB39* موجود در ریشه‌های مویین رشد کرده در تمامی محیط‌ها (محیط‌های حاوی N^+ ، P^+ ، P^- و pH اسیدی) نسبت به محیط MS که به عنوان شاهد در نظر گرفته شد، بیشتر بود. همچنین ریشه‌های موجود در محیط حاوی نیتروژن بیشترین میزان بیان (۰/۴۲۳۳) و ریشه‌های موجود در محیط با pH اسیدی کمترین میزان بیان ژن (۰/۱۴۶۶) را نشان دادند.

جدول ۳-۴. میانگین مربعات بیان ژن *SmMYB39* در محیط‌های مختلف رشدی

منابع تغییر	مجموع مربعات	df	میانگین مربعات	f
بین تیمارها	۱۵/۷۹۴	۴	۳/۹۴۹	۶/۴۴۶**

** معنی داری در سطح ۰/۰۱ را نشان می‌دهد.



شکل ۴-۱۶. مقایسه میانگین داده‌های حاصل از بیان نیمه کمی ژن در محیط‌های مختلف رشدی

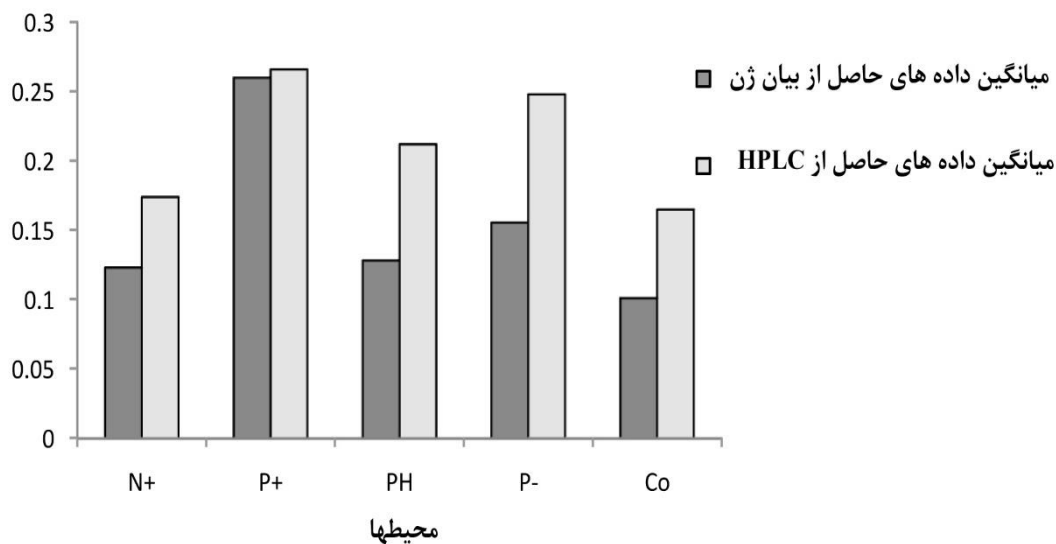
۱۴-۴. بررسی همبستگی میان بیان ژن *SmMYB39* و رزمارینیک اسید

برای این منظور، همبستگی با استفاده از روش پیرسون انجام شد. نتایج نشان داد، همبستگی مثبت، معنی دار و بالایی ($0/697^*$) بین میزان رزمارینیک اسید و بیان ژن *SmMYB39* مشاهده می شود (جدول ۴-۴). همچنین نمودار مقایسه داده ها رسم شد که نشان دهنده رابطه کنترلی مثبت بین بیان ژن و تولید متابولیت رزمارینیک اسید است (شکل ۴-۱۷).

جدول ۴-۴. بررسی همبستگی میان بیان ژن *SmMYB39* و رزمارینیک اسید

بیان ژن MYB		متغیرها
p	r	
۰/۲۵	۰/۶۹۷*	میزان رزمارینیک اسید

*: معنی داری در سطح ۰/۰۵ را نشان می دهد



شکل ۴-۱۷. مقایسه داده های حاصل از میزان رزمارینیک اسید و بیان ژن *SmMYB39* که نشان دهنده رابطه کنترلی مثبت بین بیان ژن و تولید متابولیت ثانویه است.

در بررسی‌های مولکولی، پس از استخراج RNA از نمونه‌های مورد مطالعه و انجام واکنش‌های PCR، بیان نیمه کمی ژن‌های اکتین و ژن *SmMYB39* در برنامه TotalLab، اندازه‌گیری شد. این برنامه به صورت نیمه کمی و با استفاده از شدت باندهای موجود در عکس ژل، میزان بیان ژن‌ها را در اختیار ما قرار داد. مقایسه میانگین داده‌ها با آزمون دانکن در سطح ۰/۰۱ از طرح کاملاً تصادفی انجام گرفت و مشخص شد هر یک از نمونه‌ها افزایش بیان ژن را نشان می‌دهد که بیشترین میزان بیان مربوط به محیط حاوی نیتروژن و کمترین بیان در محیط با pH اسیدی بوده است. در پژوهش حاضر ژن *MYB39* در گیاه نعنای آبی توالی یابی و به عنوان تنظیم‌کننده تولید رزمارینیک اسید معرفی شد. همانگونه که قبلاً ذکر شد، بررسی منابع نشان می‌دهد اغلب ژن‌های MYB، تنظیم‌کننده‌های مثبت در رونویسی محسوب می‌شوند. برای مثال ژن *ZmC1* بیوسنتز فلاونوئیدها را به وسیله تغییر بیان کالکون سنتاز (CHS) به طور مثبت، تحت کنترل دارد (پاز-آرس، ۱۹۸۷). اما مطالعات نشان می‌دهد که ژن *R2R3 Myb* اغلب به عنوان یک کنترل‌کننده منفی عمل می‌کند و بیان بالای آن، آنزیم‌های درگیر در سنتز رزمارینیک اسید (*4CL1*، *4CL2* و *TAT*) را کم می‌کند. برای مثال *AmMyb305* و اورتولوگ آن در آرابیدوپسیس با نام *AtMyb4*، تجمع ترکیبات حفاظتی در برابر اشعه UV را به وسیله سرکوب کردن بیان ژن سینامات هیدروکسیلاز (*C4H*) کنترل می‌کند (جین، ۲۰۰۰). از طرفی اسکوویل و همکارانش (۲۰۱۱) ژن *MYB MIXTA* در گیاه *Mimulus guttatus* را به عنوان کنترل‌کننده منفی در تولید کرک‌های گیاهی شناسایی کردند و اذعان داشتند، ایجاد زخم در بخش‌های هوایی و برگ‌های گیاه منجر به القای این تنظیم‌کننده منفی می‌شود. همچنین ژانگ و همکارانش به این نتیجه رسیدند که همولوژی ساختاری بین پروتئین‌های MYB و *myb39* نشان می‌دهد که عملکرد ژن *myb39* به عنوان عامل مانع شونده‌ای در تولید رزمارینیک اسید در گیاه محسوب می‌شود (ژانگ، ۲۰۱۳). با انجام آزمایشات ذکر شده، همانطور که نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان می‌دهد تغییر در محیط رشدی ریشه‌های مویین سبب افزایش بیان نیمه کمی ژن *myb39* شده است. از طرفی میزان تولید رزمارینیک اسید در این محیط‌ها افزایش داشته است. با توجه به مقالات مطالعه شده انتظار می‌رفت با افزایش میزان متابولیت رزمارینیک

اسید تولیدی، بیان ژن هدف کمتر شود اما نتایج به دست آمده نشان دهنده نقش این ژن به عنوان کنترل کننده مثبت تولید رزمارینیک اسید می باشد.

۴-۱۵. آنالیزهای بیوانفورماتیک

جهت آنالیز توالی به دست آمده از گیاه نعناع آبی، ابتدا این توالی با سایر توالی های موجود در بانک اطلاعاتی ژن (WWW.ncbi.nlm.nih.gov) مقایسه شد. انجام بلاست نوکلئوتید با شماره دسترسی MH245208.1، شباهت ۱۰۰ درصدی را نشان داد. همچنین با انجام بلاست پروتئین توالی جداسازی شده با توالی مربوط به گیاه ذکر شده، ۹۸ درصد تشابه از لحاظ آمینواسیدی به دست آمد.

۴-۱۵-۱. انتخاب توالی های رمز کننده MYB39 برای آنالیزهای بیوانفورماتیکی

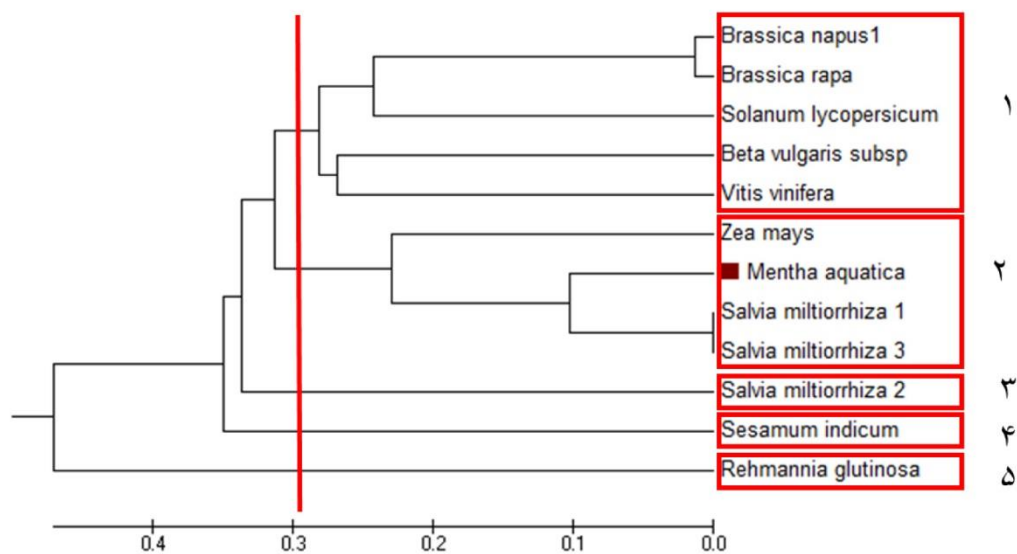
پس از مطالعه توالی های موجود در بانک داده های NCBI، از بین توالی های مشابه ۱۱ توالی براساس شاخص های کامل بودن توالی رمز کننده و اطمینان از صحت توالی ژن، انتخاب شدند که شامل گیاهان زراعی، باغی و... می باشند. اسامی و شماره دسترسی آن ها در پایگاه NCBI در جدول ۴-۵ ارائه شده است.

۴-۱۵-۲. مقایسه توالی های ژن MYB39 در گیاهان مختلف با ژن کلون شده

جدول ۴-۵. اسامی گیاه و شماره دسترسی توالی ژن MYB39 در پایگاه NCBI

Num	Plant	Gene bank	Pro ID
1	<i>Mentha aquatica</i>	MH245208.1	AXL96842.1
2	<i>Beta vulgaris subsp</i>	XM_019248429.1	XP_019103974.1
3	<i>Salvia miltiorrhiza 1</i>	KC213793.1	AGS55356.1
4	<i>Salvia miltiorrhiza 2</i>	KF059503.1	AGN52173.1
5	<i>Salvia miltiorrhiza 3</i>	KC771280.1	AGS48990.1
6	<i>Brassica rapa</i>	XM_009152363.2	XP_009150611.1
7	<i>Brassica napus1</i>	XM_013790309	XP_013645763.1
8	<i>Rehmannia glutinosa</i>	KR780115.1	AKV71978.1
9	<i>Sesamum indicum</i>	XM_011074233.2	XP_011072535.1
10	<i>Solanum lycopersicum</i>	XM_004248417.4	XP_004248465.1
11	<i>Vitisvinifera</i>	XM_002277535.3	XP_002277571.3
12	<i>Zea mays</i>	NM_001112479.2	NP_001105949.2

پس از مطالعه توالی های گزارش شده برای ژن *MYB39* در NCBI، تمامی توالی های دارای CDS کامل ذخیره شدند (توالی های ذکر شده در جدول ۴-۵). توالی ها با برنامه MEGA7 و براساس روش UPGMA با توالی ژن کلون شده از گیاه نعناع آبی هم ردیف شده و نمودار دندروگرام مربوط به آن رسم شد (شکل ۴-۱۸). براساس این نمودار، نمونه های مورد مطالعه براساس شباهت در ترتیب اسیدهای نوکلئیک به ۵ گروه مجزا تقسیم شدند که در شکل با شماره های ۱ تا ۵ شماره گذاری شدند. همچنین ژن جداسازی شده به همراه گیاهان *Zea mays*، *Salvia miltiorrhiza 1* و *Salvia miltiorrhiza 3* در گروه یک قرار گرفتند. کمترین فاصله مربوط به نمونه های *Salvia miltiorrhiza 1* و *Salvia miltiorrhiza 3* با *Mentha aquatic* بوده است و بیشترین فاصله نیز مربوط به نمونه ذکر شده با گیاه *Rehmannia glutinosa* بوده است.

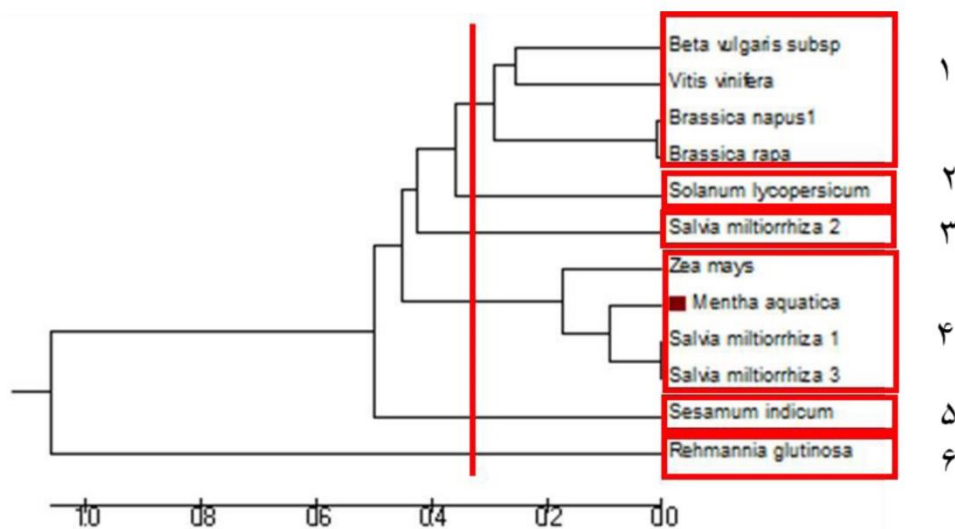


شکل ۴-۱۸. نمودار درختی حاصل از مقایسه توالی های ژن *MYB39* در گیاهان مختلف با ژن کلون شده از گیاه نعناع آبی

۳-۱۵-۴. مقایسه توالی های پروتئین گزارش شده از ژن *MYB39* با توالی پروتئین ژن

کلون شده

توالی پروتئینی ۱۱ نمونه از گیاهان دارای ژن *MYB39* با CDS کامل که در جدول ۴-۵ ذکر شد، از پایگاه داده ای NCBI جمع آوری شد. همچنین توالی پروتئینی حاصل از ترجمه ژن جداسازی شده به وسیله نرم افزار تحت شبکه سایت EXPASY بدست آمد. تمامی توالی ها، با نرم افزار MEGA7 به روش UPGMA هم ردیف و درخت فیلوژنی آن رسم شد (شکل ۴-۱۹). توالی پروتئین نمونه های مورد مطالعه به ۶ گروه مجزا تقسیم شدند که توالی پروتئینی ژن جدا شده به همراه *Zea mays* *Salvia miltiorrhiza* 1 و *Salvia miltiorrhiza* 3 در گروه ۴ قرار گرفتند. همچنین کمترین فاصله بین *Salvia miltiorrhiza* 1 و *Salvia miltiorrhiza* 3 با *Mentha aquatic* مشاهده شد. بیشترین فاصله نیز مربوط به نمونه کلون شده با *Rehmannia glutinosa* بوده است.



شکل ۴-۱۹. نمودار درختی حاصل از مقایسه توالی های پروتئین گزارش شده از ژن *MYB39* در گیاهان مختلف با ژن کلون شده از گیاه نعناع آبی

۴-۱۵-۴. مقایسه دندروگرام DNA با دندروگرام پروتئین

بررسی‌ها نشان داد که دندروگرام پروتئین به ۶ گروه و دندروگرام DNA به ۵ گروه مجزا تقسیم شدند همچنین ژن کلون شده به همراه نمونه‌های *Zea mays*، *Salvia miltiorrhiza 1* و *Salvia miltiorrhiza3* در هر دندروگرام به تنهایی یک گروه را تشکیل دادند. همچنین *Salvia miltiorrhiza 2* در دندروگرام DNA با فاصله بیشتری نسبت به گروه ۱ قرار گرفت. در صورتی که در دندروگرام پروتئین، فاصله کمتری با این گروه دارد. بنابراین با وجود تفاوت زیاد در توالی DNA، از نظر توالی پروتئین دارای شباهت بیشتری است. در دندروگرام DNA، *Solanum lycopersicum* در گروه یک به همراه چهار گیاهان مورد مطالعه در یک گروه قرار گرفت اما در دندروگرام پروتئین از این گروه مجزا شده است.

پیشنهادات

۱. بررسی بیان ژن مورد مطالعه در سایر گونه‌های نعناع مانند *Mentha* و *Mentha spicata*

langifolia جهت اطمینان از صحت نتایج به دست آمده در جهت کنترل بیان ژن

۲. کشت ریشه‌های مویین در محیط‌هایی با مقادیر متفاوت نیتروژن و فسفر جهت بررسی میزان

رزمارینیک اسید

۳. استفاده از Real time PCR جهت بررسی دقیق‌تر بیان ژن

منابع

۱. اسد آبادی. ب، (۱۳۸۹)، "پتانسیل اقتصادی تولید و فرآوری گیاهان دارویی در ایران و جهان"
۲. امجدیان. ا و کاشی. ع، (۱۳۹۲)، "گیاهان دارویی و بهره برداری بی رویه از منابع طبیعی"
۳. امیدی. م و سید طباطبایی. ب، (۱۳۹۴)، "کشت بافت و سلول های گیاهی"، چاپ چهارم، انتشارات دانشگاه تهران
۴. اورمزدی. پ و چلبیان. ف، (۱۳۸۵) "مطالعه کشت بافت و اندام زایی در گیاه دارویی *Salvia nemorosa*"
۵. بنیادیان. م و مشتاقی. ح، (۱۳۸۷) "اثرات ضد لیستریایی عصاره روغنی (*Mentha spicata*) در یک مدل غذایی"
۶. جمشیدی. و احمدی آشتیانی. ح، (۱۳۸۹) "بررسی و مقایسه ترکیبات فنلی و فعالیت آنتی اکسیدانی چند گونه گیاهی بومی مازندران"
۷. حبیبی خانیانی. ب و معینی. ا، (۱۳۸۴) "تولید متابولیت های ثانویه و مواد دارویی از طریق کشت بافت و سلول های گیاهی"
۸. دولت آبادی. ح، (۱۳۸۹) "ارزیابی تأثیر غلظت های مختلف اکسین و قارچ های *Sebacina vermifera* و *Piriformospora indica* روی نعنای فلفلی (*Mentha piperita*) و آویشن (*Thymus vulgaris*) در شرایط درون شیشه ای"
۹. زرگری. ع، (۱۳۷۱)، "گیاهان دارویی"، جلد اول، چاپ هفتم، انتشارات دانشگاه تهران،
۱۰. شکری. ا، (۱۳۹۱) "بهینه سازی شرایط القا و تثبیت کشت ریشه های موپین گیاه کاسنی (*Cichorium intybus*) حاصل از تلقیح آگروباکتریوم رایزوزنز"
۱۱. فدائی. س و آبرومندآذر. پ، (۱۳۸۸) "بررسی اثر ضد میکروبی اسانس نعنای فلفلی و مقایسه آن با بنزوات سدیم"
۱۲. فرشادی. م و بخشی خانیکی. غ، (۱۳۹۰)، "مبانی بیوتکنولوژی و کشت بافت گیاهی"
۱۳. مجاوریان. م، احمدی کلیجی و امین روان. م، (۱۳۹۳)، "تعیین بازارهای هدف صادراتی دارویی ایران"
۱۴. محمودی سروسناتی. م و اکبر زاده. م، (۱۳۹۲) "تغییرات فصلی میزان، عملکرد و اجزای اسانس نعنای دشتی کشت شده در منطقه شوشتر"
۱۵. نبرد ا، (۱۳۹۱) "بررسی ترکیب های فرآر سه گیاه دارویی خودرو تیره نعنایان در شهرستان کاشمر"

۱۶. نوری قنبلانی. ق، (۱۳۷۱)، "تجربیهاتی در زمینه کشت بافت های گیاهی"، چاپ اول، انتشارات دانشگاه

تبریز

۱۷. نوری. م و اسدی. پ، (۱۳۹۲)، "بررسی جایگاه ایران در تجارت جهانی گیاهان دارویی"

۱۸. یزدانی. د، جمشیدی. ا و مجاب. ف، (۱۳۸۱) "مقایسه میزان اسانس و منتول موجود در نعنای فلفلی کاشته

شده در مناطق مختلف کشور"

19. **Abdelkarim, A. (2016).** "DSC Data and Solubility of Rosmarinic Acid in Different Pure Solvents and in Binary Mixtures(methyl acetate + water)"
20. **Ahmadian Chashmi, N. (2010).** "Differential Production of Tropane Alkaloids in Hairy Roots and in vitro Cultured Two Accessions of *Atropa belladonna* L. under Nitrate Treatments"
21. **Amarr Reddy, V. (2017).** "Spearmint R2R3-MYB transcription factor *MsMYB* negatively regulates monoterpene production and suppresses the expression of geranyl diphosphate synthase large subunit"
22. **Ambawat, S., P. Sharma and N. R. Yadav, (2013).** "MYB transcription factor genes as regulators for plant responses"
23. **Bauer, N. (2004).** "Rosmarinic Acid Synthesis in Transformed Callus Culture of *Coleus blumei*"
24. **Benabdallah, A. and C. Rahmoune (2016)** "Total phenolic content and antioxidant activity of six wild *Mentha* species(Lamiaceae) from northeast of Algeria"
25. **Bensaddek , L. (2010).** "The effect of nitrate and ammonium concentrations on growth and alkaloid accumulation of *Atropa belladonna* hairy roots"
26. **Bezenjani, N. (2014).** "Rosmarinic Acid Production and Expression of Tyrosine Aminotransferase Gene in *Melissa officinalis* Seedlings in Response to Yeast Extract"
27. **Bhat, S. (2002).** "Mentha species: In vitro Regeneration and Genetic Transformation"
28. **Bok Kim, Y. (2013).** "Metabolomics Analysis and Biosynthesis of Rosmarinic Acid in *Agastache rugosa* Kuntze Treated with Methyl Jasmonate"

29. **Canelas, V. (2007).** “Quantitative HPLC Analysis of Rosmarinic Acid in Extracts of *Melissa officinalis* and Spectrophotometric Measurement of Their Antioxidant Activities”
30. **Chandra, S., h. Iata (2013)** “Biotechnology for medicinal plants”
31. **Chu, S. (2017).** “An R2R3-type MYB transcription factor, GmMYB29, regulates isoflavone biosynthesis in soybean”
32. **Couto, R. (2014).** “Validated HPLC-PDA Method For Rosmarinic Acid Quantification in Rosemary”
33. **Dewick, M. (1987).** “The Biosynthesis of Shikimate Metabolites”
34. **Ding K. (2017).** “*SmMYB36*, a Novel R2R3-MYB Transcription Factor, Enhances Tanshinone Accumulation and Decreases Phenolic Acid Content in *Salvia miltiorrhiza* Hairy Roots”
35. **Ellis, E. and N. Towers (1970).** ”Biogenesis of Rosmarinic Acid in *Mentha*”
36. **Fedal, D. (2010).** “Study of phenolic compounds production in spearmint clones regenerated in vitro”
37. **Fialova, S. and D, Tekelova (2012).** “The content of phenolic compounds in underground and aerial parts of different *menthe spicata*”
38. **Gambino, G. (2008).** “A rapid and effective method for RNA extraction from different tissues of grapevine and other woody plants”
39. **Gholipour, M. (2013).** “Validation Method and Determination of Potassium Sorbat in Dough with HPLC”
40. **Grzegorzczka, I. and A. Kro´licka (2006).** “Establishment of *Salvia officinalis* L. Hairy Root Cultures for the Production of Rosmarinic Acid”
41. **Gudzenko, A. (2005).** “Development and validation of a method for the determination of rosmarinic acid in *Mentha piperita* L. using solid-phase extraction and RP-HPLC with photodiode array detection”
42. **Huang, L. (2005).** “Total synthesis and biological evaluation of (-)- and (+)-Butyl ester of rosmarinic acid”
43. **ickavar, B., A. Alinaghi and M. Kamalinejad (2008)** ”Evaluation of the Antioxidant Properties of Five *Mentha* Species”
44. **Ilker Ozyigit, I. (2014).** “*Agrobacterium rhizogenes*-Mediated Transformation and Its Biotechnological Applications in Crops”
45. **Jacobs, D. (2013).** FGRS: protocol; DNase Treatment of RNA

46. **Jager, A. and J. Almqvist (2007).** “Compounds from *Mentha aquatica* with affinity to the GABA benzodiazepine receptor”
47. **Jassbi, R. (2014).** “Quantification of Phenolic Diterpenoids and Rosmarinic Acid in *Salvia eremophila* and *Salvia santolinifolia* by LC-DAD-MS”
48. **Kabinataj, S. (2013).** “The Effect of Different Strains of *Agrobacterium rhizogenes* on Production of Chlorogenic Acid and Phenolic Compounds in Hairy Root Cultures of *Cichorium intybus*”
49. **Kashfi, A. (2010)** “Economic comparative advantage of medical plants trade in iran and this value in world market
50. **Knaggs, R. (1999).** “The biosynthesis of shikimate metabolites”
51. **Kochan, E. (2016).** “Nitrogen and phosphorus as the factors affecting ginsenoside production in hairy root cultures of *Panax quinquefolium* cultivated in shake flasks and nutrient sprinkle bioreactor
52. **Liu, L. (2007).** “Phosphate starvation promoted the accumulation of phenolic acids by inducing the key enzyme genes in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots”
53. **Lu, Y. and L. Yeap Foo (1998).** “Rosmarinic acid derivatives from *Salvia officinalis*
54. **Moraes, S. (2012).** “Detection methods for rosmarinic acid in *Ocimum gratissimum* L. extracts”
55. **Ngoc Dai, D. (2015).** “Study on essential oil of *Mentha aquatica* L. from Vietnam”
56. **Nourozi, E. and B. Hosseini (2014).** “A reliable and efficient protocol for induction of hairy roots in *Agastache foeniculum*”
57. **Nozad Adham, A. (2015).** “Comparative extraction methods, phytochemical constituents, fluorescence analysis and HPLC validation of rosmarinic acid content in *Mentha piperita*, *Mentha longifolia* and *Ocimum basilicum*”
58. **Parizi, A. (2014).** “Impact of different culture media on hairy roots growth of *Valeriana officinalis*”
59. **Park, S. and M. Uddin (2008).** “Biotechnological applications for rosmarinic acid production in plant”
60. **Petersen, M. and A. Alfermann (1988).** “Two New Enzymes of Rosmarinic Acid Biosynthesis from Cell Cultures of *Coleus blumei*”
61. **Phatak, S. (2002).** “Rosmarinic acid synthetase in shoot culture of *Mentha arvensis*”

62. **Pistelli, L. (2010).** “Hairy Root Cultures for Secondary Metabolites Production”
63. Polyphenols, Flavonoids – Stilbenoids – Phenolic Acids, alexis-biochemicals
64. **Rajakani, R. and L. Narnoliya, (2013).** “Activated charcoal-mediated RNA extraction method for *Azadirachta indica* and plants highly rich in polyphenolics, polysaccharides and other complex secondary compounds”
65. **Ramanauskienė, K. (2016).** “Rosmarinic Acid and *Melissa officinalis* Extracts Differently Affect Glioblastoma Cells”
66. **Russell, J. and R. Schweizer, M. Douglas (2013).** MYB Family Transcription Factors
67. **Shekarchi, M (2002).** “Comparative study of rosmarinic acid content in some plants of Labiatae family
68. **Srivastava, S. and K. Srivastava (2007).** “Hairy Root Culture for Mass-Production of High-Value Secondary Metabolites”
69. **Tahira, R. (2011).** “Major phenolic acids of local and exotic mint germplasm growing in Islamabad”
70. **Toth, J. (2003).** “Rosmarinic acid; an important phenolic active compound of Lemon balm (*Melissia officinalis*)”
71. **Troncoso, N. (2005).** “Fast high performance liquid chromatography and ultraviolet–visible quantification of principal phenolic antioxidants in fresh rosemary”
72. **Tsao, R. (2010).** “Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols”
73. **Valimehr, S. (2014).** “A reliable and efficient protocol for inducing genetically transformed roots in medicinal plant *Nepeta pogonosperma*”
74. **Zhang, S., P. Ma, and D. Yang (2013).** “Cloning and Characterization of a Putative R2R3 MYB Transcriptional Repressor of the Rosmarinic Acid Biosynthetic Pathway from *Salvia miltiorrhiza*”
75. **Zilinskiene, J. (2013).** ”Thermo Scientific; RevertAid First CDNA Syenthesi”

۲-۱. محلول مادری ۱۰x عناصر پرمصرف محیط کشت MS

این مواد به مقداری بیش از ۰/۵ میلی مول بر لیتر، مورد نیاز گیاه هستند. این عناصر شامل: Ca, Mg, K, P, N می باشند. محلول عناصر معدنی پرمصرف به حجم یک لیتر تهیه و در یخچال نگهداری شد.

جدول ۱. مواد و مقادیر مورد نیاز جهت تهیه ۱۰۰۰ml محلول مادری ۱۰x عناصر پرمصرف

مقدار (g/l)	نوع ماده
۱۹	KNO ₃
۱۶/۵	NH ₄ NO ₃
۳/۷	MgSO ₄ -7H ₂ O
۴/۴	CaCl ₂ -2H ₂ O
۱/۷	KH ₂ PO ₄

۲-۲. محلول مادری ۱۰۰x عناصر کم مصرف محیط کشت MS

این مواد به مقداری کمتر از ۰/۵ میلی مول بر لیتر مورد نیاز گیاه می باشند. این عناصر شامل Mn, Fe, Cu, B, Zn, Co, I, Mo می باشند. در میان این عناصر فقط آهن به صورت محلول جداگانه و بقیه عناصر به صورت یک محلول واحد ساخته شد. همچنین محلول آهن درون فویل قرار گرفت تا از تجزیه به وسیله نور حفظ گردد.

جدول ۲. مواد و مقادیر مورد نیاز جهت تهیه ۱۰۰۰ ml محلول مادری ۱۰۰x عناصر کم مصرف

مقدار	نوع ماده
g۲/۳۲	MnSO ₄ -4H ₂ O
۰/۶۲g	H ₃ BO ₃
۰/۸۶ g	ZnSO ₄ - 7H ₂ O
۰/۰۸۳ g	KI
۲۵mg	Na ₂ MoO ₄ - 2H ₂ O
۲/۵mg	CuSO ₄ -5H ₂ O
۲/۵mg	CoCl ₂ -6H ₂ O

جدول ۳. مواد و مقادیر مورد نیاز جهت تهیه ۱۰۰ ml محلول مادری ۱۰ x آهن

مقدار (mg)	نوع ماده
۲۷۸	FeSO ₄ -7H ₂ O
۳۷۳	Na ₂ EDTA- 2H ₂ O

۳-۲. محلول مادری ۱۰۰x ویتامین محیط کشت MS

اکثر ویتامین‌ها توسط گیاه ساخته می‌شود؛ لیکن اضافه نمودن برخی از ویتامین‌ها نظیر اسید نیکوتینیک (۳B)، تیامین (۱B)، پیرویدوکسین (B۲) و... به محیط کشت ضروری است. همچنین از ویتامین C به عنوان آنتی اکسیدان نیز استفاده می‌شود. محلول ویتامین، پس از تهیه توسط صافی استریل گردید و از اتوکلاو (به دلیل حساسیت ویتامین‌ها به گرما) استفاده نشد.

جدول ۴. مواد و مقادیر مورد نیاز جهت تهیه ۵۰۰ ml محلول مادری ۱۰۰x ویتامین

مقدار (mg)	نوع ماده
۲۰۰	Glycine
۵۰	Nicotinic Acid
۵۰	Pyridoxine HCl
۵۰	Thiamine HCl

۴-۲. قندها یا هیدرات‌های کربن

به دلیل نور کم در محیط درون شیشه‌ای، فتوسنتز چندانی در گیاه صورت نمی‌گیرد، لذا افزودن قند در محیط کشت کاملاً ضروری است. معمولاً از قند ساکاروز، فروکتوز و گلوکز استفاده می‌شود. میزان غلظت قند افزوده شده به محیط، بستگی به نوع ریز نمونه و سن آن دارد. مثلاً جنین‌های جوان به درصد بالاتری قند نیاز دارند. نکته مهمی که باید توجه کرد این است که قندها در اثر اتوکلاو نمودن، دچار تغییر می‌شوند.

۳. محیط کشت LB

جهت کشت باکتری به محیط نیاز است که از ترکیبات پایه تریپتون (۱٪)، نمک (۱٪) و عصاره مخمر (۰/۵٪) به دست می آید. مقادیر ذکر شده از مواد با هم مخلوط و در $\text{pH} \sim 7$ تنظیم گردید. جهت تهیه محیط جامد نیز آگار ۱/۵٪ به مواد اضافه و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد و فشار ۱۵ پاسکال اتوکلاو شد.

۴. بافرهای الکتروفورز ژل آگارز

۴-۱. تهیه بافر نمونه گذاری (X10)

۲۵۰ میلی گرم برموفنول بلو و ۲۵۰ میلی گرم زین سیانول در ۳۳ میلی لیتر بافر ۱۵۰ میلی مولار تریس حل شد. سپس ۶۰ میلی لیتر گلیسرول و ۷ میلی لیتر آب مقطر به آن اضافه گردید. محلول به دست آمده در دمای اتاق نگهداری شد.

۴-۲. تهیه بافر TBE (X5/0)

۵۴ گرم تریس بازی و ۲۷/۵ گرم بوریک اسید در ۹۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل گردید. ۲۰ میلی لیتر محلول و ۰/۵ مولار EDTA با آن اضافه شد. سپس با آب مقطر به حجم ۱۰۰۰ میلی لیتر رسانده شد. بافر به دست آمده در دمای اتاق نگهداری شد. جهت تهیه بافر X5/0 لازم است بافر محلول ۱۰ برابر رقیق شود.

۴-۳. تهیه ژل آگارز ۱٪

۱ گرم از پودر آگارز در یک ارلن ریخته و با اضافه کردن بافر TBE (X5/0)، به حجم ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شد. سپس به آن حرارت داده تا پودر آگارز کاملاً در بافر ذوب شود و هیچ کریستالی دیده نشود.

۵. توالی ژن *SmMYB39* از گیاه *Salvia miltiorrhiza*

ATGGGAAGGTCTCCTTGCTGTGAGAAAGCTCACACAAACAAAGGGGCGT
GGACTAAGGAAGAAGACGATCGGCTGGTGGCCTACATCCGCGCCACGG
CGAGGGATGCTGGCGCTCGCTCCCTAAGGCCGCCGGGCTCCTCCGCTGCG
GCAAGAGCTGCCGCCTCCGCTGGATCAACTACCTCCGCCCCGATCTCAAG
AGAGGCAACTTCACCGAAGAAGAAGACGAATCATCATCAAATCCATA
GCCTTCTCGGCAACAAATGGTCTCTTATTGCTGGGAGATTGCCGGGGCGG
ACGGACAACGAGATCAAGAATACTGGAACACGCACATCAGAAGAAAGC
TGGTGAGCCGAGGCATTGATCCCCTACGCATCGCCCCATCAATGAGGCT
GAGGCTCAGCCTGCCACAATACTTTCTTTAATTCATCAAACAAATTA
GGGAAGGAAGAGAGGGCGCAGCCCTAAGTGCCCCGATTTGAATCTTGACCT
CAGAATCAGCCCTCCCTATCAACAAGAACCCTTCAAACAGGTACCGCCA
GTAGTAGCAGTACCTTGTGCTTCGCTTGTAGTCTCGGCATCCAAAACAGC
AAAGATTGCAGCTGTACAAATACCACTAATTCTGGATTGATTTTCTGGG
ATTGAAATCTGGCGTTTTGGATTACAGAAGATTGGAGATGAAATGA

شکل ۲. توالی فاکتور رونویسی MYB (MYB39)R2R3 از گیاه *Salvia miltiorrhiza*

*GenBank: KC213793.1

Abstract

Analysis of Rosmarinic acid production in *Mentha aquatica* hairy roots and expression pattern of *smMYB39* regulatory gene

Mentha aquatica of the Lamiaceae family is one of the most important species of aromatic plants known for its medicinal properties. The therapeutic effects of this plant are for essential oils and poly phenols. The main phenolic compounds in tannins are phenolic acids, especially Rosmarinic Acid and produces as a secondary metabolite in these plants. To achieve secondary metabolites at high levels, the hairy roots induced by exogenous bacteria are considered as an appropriate option. In this experiment, five different strains of *Agrobacterium rhizogenes* (CCTA15834, A13, A4, 9534, 318) used for induction of leaf and stock of water mint and studied the rooting and root growth in leaf samples (42/6%) and stock (50%). Among strains of bacteria, 15834 bacteria had the highest percentage of rooting and among the finest specimens, the stock was chosen as the best option for inducing hairy roots. The emerged roots has grown in different environments (N⁺, P⁺, PH⁺, P⁻ and CO⁺) and calculated secondary metabolite of rosmarinic acid in these by high performance liquid chromatography (HPLC). The production of rosmarinic acid has increased in all environments as compared to the control environment. Among these, the environment containing phosphorus had the highest amount of rosmarinic acid (26647.027 ng/ml)

Rosmarinic acid production increased in all environments than control environment. Meanwhile, the environment containing phosphorus had the highest amount of rosmarinic acid. In molecular studies section, DNA extracted from the hairy roots to confirm the validity of the measures and performed PCR reaction by the nuclear genome and proved successful integration of T-DNA in the genome of the hairy roots after electrophoresis of PCR products. Also, to investigate the control role of this gene in water mint and also the manipulation of the rosmarinic acid biosynthesis pathway, the *smMyB39* gene was isolated, matched and sequenced from the water mint. Finally, by verifying *smMYB39* inhibitor homolog genes has proven the expression of Rosmarinic Acid by semi-quantized PCR and the effect of the elicitors on the regulating genes of this metabolite in vitro. The results of the mean comparison of the data indicates changes in

the growth medium of the hairy roots caused to increase in the expression of the semi-quantitative expression of the *smMYB39* gene. On the other hand, the amount of rosmarinic acid production has increased in these environments. According to the studied papers, it was expected that as the amount of metamorphic rosemary production increased, the target gene expression would be lower, but the results suggest contrary to this.

Keywords: water mint, hairy roots, *agrobacterium rhizogenes*, inhibitor gene *smMYB39*



دانشگاه صنعتی شاهرود

Shahrood University of Technology

Faculty of Agriculture

M.Sc. Thesis in Agricultural Biotechnology

**Analysis of Romarinic acid production in *Mentha aquatica* hairy roots
and expression pattern of *smMYB39* regulatory gene**

By: Fatemeh ahmadi nik

Supervisors

Dr. Shahrokh Gharanjik

Dr. Tahmineh Lohrasebi

September 2018