

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشکده کشاورزی

پایان نامه کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی

بررسی میزان تولید شیکوریک اسید و بیان ژن PAL در ریشه‌های مؤین القا شده گیاه

سرخارگل (*Echinacea purpurea* L.)

نگارنده: الهام کرابی

اساتید راهنما

دکتر شاهرخ قرنجیک

دکتر محمدرضا واعظی کاخکی

شهریور ۱۳۹۷



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

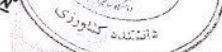
با نام و یاد خداوند متعال، ارزیابی جلسه دفاع از پایان نامه کارشناسی ارشد خانم / آقای الهام کرابی با شماره دانشجویی ۹۳۱۳۹۹۴ رشته مهندسی کشاورزی. گرایش بیوتکنولوژی کشاورزی. تحت عنوان ..بررسی میزان تولید شیکوریک اسید و بیان ژن PAL در ریشه های موثین القا شده گیاه سرخارگل (Echinacea purpurea L.) که در تاریخ ۹۷/۶/۲۱ با حضور هیأت محترم داوران در دانشگاه صنعتی شاهرود برگزار گردید به شرح ذیل اعلام می گردد:

قبول (با امتیاز ۱۹.۳۳ درجه) مردود
نوع تحقیق: نظری عملی

عضو هیأت داوران	نام و نام خانوادگی	مرتبۀ علمی	امضاء
۱- استاد راهنمای اول	آقای دکتر شاهرخ فرنجیک	استادیار	
۲- استاد راهنمای دوم	آقای دکتر محمد رضا واعظی کاخکی	استادیار	
۳- استاد مشاور			
۴- نماینده تحصیلات تکمیلی	خانم دکتر مریم عجم حسینی	استادیار	
۵- استاد ممتحن اول	خانم دکتر مهدیه بارسائیان	استادیار	
۶- استاد ممتحن دوم	خانم دکتر زیبا قسیمی حق	استادیار	

نام و نام خانوادگی رئیس دانشکده: آقای دکتر محمد رضا 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

گل واژه ظهور، مهدی موعود (عج)

گرانیهاترین گنجینه‌های زندگی‌م پدر و مادر عزیزم

و

اسوه صبر و محبت، همسر عزیز و مهربانم

و همه کسانی که دوستشان دارم و هرگز آفتاب مهرشان در خاطر من غروب

نخواهد کرد.

تشکر و قدردانی

سپاس بیکران خدای جهانیان را که به بشر قدرت آموختن عطا فرمود و او را به نعمت عقل و اندیشه آراست. اکنون که به فضل خداوند متعال مراحل انجام، تحقیق و نگارش این پایان نامه به اتمام رسیده است بر خود لازم می‌دانم از تمام کسانی که در به دست آمدن این اثر بی هیچ منتهی بنده را یاری نموده‌اند سپاسگزاری نمایم. لازم می‌دانم که از بذل محبت بی شائبه جناب آقای دکتر شاهرخ قرنجیک و جناب آقای دکتر محمدرضا واعظی کاخکی که در تمامی مراحل انجام این پایان نامه راهنمایی اینجانب را بر عهده گرفتند و در سایه حمایت‌ها و راهنمایی‌شان تلاش‌هایمان به بار نشست، کمال تشکر و قدردانی را داشته باشم و برای این دو استاد گرامی و خانواده محترمشان توفیق روز افزون و سلامت از خداوند منان خواستارم. از کمک‌های خالصانه و زحمات بی شائبه دکتر ناصر فرخی، دکتر عیسی کهن‌باغ‌خیراتی، دکتر جعفر وطن‌دوست، دکتر مجید مومنی‌مقدم و دکتر علیرضا کیخسروی، دکتر اسکندر رستگارپویانی نهایت تشکر را دارم. تشکر ویژه از همسر عزیزم و خانواده محترمشان که در تمام مراحل پشتیبانم بودند را دارم. در پایان از زحمات و تلاش‌های دوستان عزیزم آقای فرید سلیمانی و خانم‌ها آزاده محسنی تکلو، زهرا فتحی، مریم کیهانفر، الهه فیض‌آبادی، فرحناز شیبیک، زهرا بیات، مریم حمیدیان، فاطمه پاکدامن، سمیرا خلیل‌زاده، زینب صانعی و مریم نوری که در تمام مراحل کار مددکارم بوده‌اند کمال تشکر را دارم و از پروردگار متعال برایشان آرزوی سعادت دارم. از پدر و مادر مهربان و فداکارم که در طول سال‌های زندگی‌ام یاری‌گر و پشتیبان همیشگی‌ام بودند آرزوی سلامتی و کمال تشکر و سپاسگزاری را دارم. امیدوارم آنچه در قالب پایان نامه ارائه شده در راه گسترش علم مؤثر باشد و برای رفع مشکلات موجود در کشاورزی راهگشا باشد.

الهام کرابی

شهریور ۹۷

تعهد نامه

اینجانب **الهام کرابی** دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی گیاهی دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود نویسنده پایان نامه بررسی میزان تولید شیکوریک اسید و بیان ژن PAL در ریشه‌های مؤین القا شده گیاه سرخارگل (*Echinacea purpurea L.*) تحت راهنمایی دکتر شاهرخ قرنجیک و دکتر محمدرضا واعظی کاخکی متعهد می‌شوم.

تحقیقات این پایان نامه توسط اینجانب انجام شده است و از صحت و اصالت برخوردار است.

در استفاده از نتایج 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 می‌باشد 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 تاثیرگذار بوده‌اند در مقالات مستخرج از پایان نامه رعایت می‌گردد.

در کلیه مراحل انجام این پایان نامه، در مواردی که از موجود زنده (یا بافت‌های آن‌ها) استفاده شده است ضوابط و اصول اخلاقی رعایت شده است.

در کلیه مراحل انجام این پایان نامه در مواردی که به حوزه اطلاعات شخصی افراد دسترسی یافته یا استفاده شده است اصل رازداری، ضوابط و اصول اخلاقی انسانی رعایت شده است.

تاریخ امضای دانشجو

کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج، کتاب، برنامه‌های رایانه‌ای، نرم افزارها و تجهیزات ساخته شده است) متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می‌باشد. این مطلب باید به نحو مقتضی در تولیدات علمی مربوطه ذکر شود.

استفاده از اطلاعات و نتایج موجود در پایان‌نامه بدون ذکر مرجع مجاز نمی‌باشد.

چکیده:

سرخارگل (*Echinacea purpurea* L.) گیاهی دارویی و چند ساله متعلق به تیره گل‌ستاره‌ای‌ها^۱ می‌باشد. ریشه این گیاه حاوی ترکیباتی هم‌چون آلکالوئیدها، کلروژنیک‌اسید و شیکوریک‌اسید می‌باشد. کشت ریشه موئین^۲ توسط آگروباکتریوم رایزوزنژ روشی مؤثر برای تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان است. در این پژوهش قطعات جداگشت برگ و هیپوکوتیل حاصل از گیاهچه‌های ۳۰-۲۰ روزه بدست آمده از کشت بذر سرخارگل در شرایط درون شیشه‌ای با آگروباکتریوم رایزوزنژ سویه‌های ATCC15834 و A13، A4، LAB 9402 تلقیح شدند. ریشه‌های موئین ۲ تا ۳ هفته بعد از آلودگی ظاهر شدند. ریزنمونه‌ها به محیط MS نیم غلظت دارای آنتی بیوتیک سفوتاکسیم انتقال یافت. به منظور بررسی بیان ژن‌های PAL، 4CL و C4H و اندازه‌گیری مقدار شیکوریک‌اسید در گیاه سرخارگل ریشه‌های موئین تحت تیمار متیل جاسمونات و اسیدسالسیلیک قرار گرفتند و نمونه برداری ۷۲ ساعت بعد از اعمال تیمار صورت گرفت. نتایج تجزیه واریانس داده‌های حاصل از اعمال تیمار متیل جاسمونات نشان داد هر سه ژن PAL، 4CL و C4H در اثر اعمال متیل جاسمونات القا می‌شوند. به طوری که اعمال متیل جاسمونات با غلظت ۲۰۰ میکرومولار نسبت به غلظت‌های ۱۰۰، ۵۰ و نمونه شاهد افزایش بیان هر سه ژن را به همراه داشت. اما محرک اسید سالسیلیک در غلظت ۱۲۵ میکرومولار باعث افزایش بیان ژن PAL و 4CL شد و غلظت ۲۵۰ اسید سالسیلیک باعث بالاترین بیان در ژن C4H شد. مقدار شیکوریک‌اسید در غلظت ۲۵۰ میکرومولار اسیدسالسیلیک و غلظت ۲۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات به صورت جداگانه مورد سنجش قرار گرفت.

کلید واژه: سرخارگل، ریشه موئین، آگروباکتریوم رایزوزنژ، بیان ژن و PAL، 4CL و C4H،

اسیدسالسیلیک، متیل جاسمونات

¹ Asteraceae

² Hairy root cultur

لیست مقالات مستخرج از پایان نامه

بررسی تأثیر ریزنمونه و سویه بر القای ریشه‌های موئین توسط آگروباکتریوم رایزوزنز در گیاه سرخارگل، دومین همایش بین‌المللی و دهمین همایش ملی بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران. الهام کرابی، شاهرخ قرنجیک، محمدرضا واعظی‌کاخکی. ۷ تا ۹ شهریور ۱۳۹۶. کرج، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری.

فهرست مطالب

فصل اول	۱
۱-۱ مقدمه	۲
۲-۱ گیاه‌شناسی سرخارگل	۳
۱-۲-۱ اهمیت دارویی سرخارگل	۵
۲-۲-۱ اهمیت اقتصادی سرخارگل	۵
۳-۲-۱ سطح زیر کشت گیاهان دارویی و معطر در ایران	۵
۴-۲-۱ ساختار شیمیایی ترکیبات موجود در عصاره سرخارگل	۶
۳-۱ متابولیت‌های ثانویه	۷
۱-۳-۱ طبقه‌بندی متابولیت‌های ثانویه	۷
۴-۱ کاربرد بیوتکنولوژی در گیاهان دارویی	۸
۱-۴-۱ سیستم کشت ریشه‌های موئین	۹
۱-۵-۱ ویژگی‌های ریشه‌های موئین	۱۰
۶-۱ معرفی آگروباکتریوم رایزوزنز	۱۰
۱-۶-۱ ساختار پلاسمید Ri در باکتری آگروباکتریوم رایزوزنز	۱۱
۲-۶-۱ مکانیسم انتقال T-DNA به سلول گیاهی	۱۲
۷-۱ عوامل مؤثر در ایجاد ریشه موئین	۱۳
۸-۱ تأیید تراریختی در ریشه‌های موئین	۱۴
۹-۱ استفاده از محرک‌ها برای افزایش تولید متابولیت ثانویه	۱۵
۱-۹-۱ متیل جاسمونات و اسیدسالسیلیک و تأثیر آن‌ها بر متابولیت‌های ثانویه	۱۵
۱۰-۱ آنزیم PAL	۱۷
۱۱-۱ آنزیم C4H	۱۸
۱۲-۱ آنزیم 4CL	۱۸
۱۳-۱ ساختار شیمیایی شیکوریک اسید	۱۹
۱۴-۱ بررسی بیان ژن	۲۰
Real-Time RT-PCR ۱-۱۴-۱	۲۰
۱-۱۴-۲ روش‌های انجام Real Time PCR	۲۰

۱۵-۱	اهداف اصلی این تحقیق	۲۱
۲۳	فصل دوم پیشینه تحقیق	۲۳
۲-۱	القای ریشه موئین و بررسی بیان ژن PAL در سرخارگل	۲۴
۲-۲	بررسی القای ریشه موئین و بیان ژن‌های PAL، 4CL و C4H در گیاهان دیگر	۲۶
۳۱	فصل سوم مواد و روش‌ها	۳۱
۱-۳	محل و زمان اجرای پژوهش	۳۲
۲-۳	مواد و وسایل مورد استفاده	۳۲
۱-۲-۳	میکروارگانیزم‌ها	۳۳
۲-۲-۳	محیط کشت MS	۳۳
۳-۳	کشت بذر و تهیه ریز نمونه	۳۳
۴-۳	تهیه محیط کشت باکتری	۳۵
۳-۴-۳	تهیه سوسپانسیون باکتری آگروباکتریوم رایزوزنز	۳۶
۵-۳	تلقیح ریزنمونه‌های سرخارگل با باکتری	۳۷
۱-۵-۳	انتقال ریزنمونه‌های سرخارگل به محیط کشت دارای آنتی‌بیوتیک	۳۷
۲-۵-۳	ظهور ریشه‌های موئین	۳۸
۳-۵-۳	بررسی فراوانی تولید ریشه‌های موئین	۳۸
۶-۳	تأیید تراخی ریشه‌های موئین سرخارگل از طریق PCR	۳۸
۱-۷-۳	تعیین غلظت DNA ژنومی ریشه‌ها با نانودراپ	۴۰
۱-۸-۳	تهیه بافر TAE(1X)	۴۰
۲-۸-۳	تهیه ژل آگارز و الکتروفورز محصولات PCR	۴۰
۳-۸-۳	الکتروفورز DNA ژنومی استخراج شده از ریشه‌ها	۴۱
۹-۳	استخراج پلاسمید از باکتری آگروباکتریوم رایزوزنز	۴۱
۱۰-۳	آزمون PCR برای تأیید تراخی ریشه‌های موئین سرخارگل	۴۳
۱۰-۳	استفاده از محرک‌ها برای بررسی تغییر میزان ماده مؤثر شیکوریک‌اسید در گیاه سرخارگل	۴۴
۱-۱۰-۳	افزودن محرک‌ها به محیط کشت ریشه‌های موئین	۴۴
۱-۱۰-۳	استوک اسیدسالسیلیک	۴۵
۲-۱۰-۳	استوک متیل جاسمونات	۴۵
۴۵	بخش دوم: آنالیز بیان ژن	۴۵

۴۵ RNA استخراج ۱۱-۳
۴۷ تعیین کمیت و کیفیت RNA استخراج شده با دستگاه نانودراپ ۱-۱۱-۳
۴۷ واکنش ساخت cDNA ۱۲-۳
۴۸ طراحی آغازگرها برای واکنش Real Time PCR ۱۳-۳
۴۹ الکتروفورز ۱-۱۴-۳
۵۰ Real Time PCR ۱۵-۳
۵۰ رسم نمودار کارایی پرایمرها ۱-۱۵-۳
۵۱ نمودار اصلی ۲-۱۵-۳
۵۱ محاسبه داده‌های Real Time PCR ۳-۱۵-۳
۵۲ عصاره‌گیری از ریشه‌ها ۱۶-۳
۵۲ تزریق نمونه‌های مربوط به شیکوریک‌اسید در دستگاه HPLC ۱-۱۶-۳
۵۳ فصل چهارم بحث و نتایج
۵۴ بررسی جوانه‌زنی بذر گیاه سرخارگل ۱-۴
۵۴ القای ریشه‌های موئین تراریخت در سرخارگل ۲-۴
۵۵ فراوانی تولید ریشه‌های موئین ۱-۲-۴
۵۸ بررسی حذف باکتری آگروباکتریوم رایزوزنز از ریشه‌های موئین گیاه سرخارگل ۲-۲-۴
۵۹ کیفیت DNA استخراج شده از ریشه‌های موئین و ریشه‌های طبیعی سرخارگل ۱-۴-۴
 بررسی وجود ژن roIB توسط واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز برای DNA ژنومی استخراج شده ۲-۴-۴
۶۰ سرخارگل
۶۱ مطالعات مولکولی ۵-۴
۶۱ بررسی کیفیت و کمیت RNA ۱-۵-۴
۶۲ واکنش‌های PCR و q RT-PCR ۶-۴
۶۳ بررسی بیان ژنها ۷-۴
۶۳ بررسی منحنی ذوب محصولات PCR ۱-۷-۴
۶۳ بهره‌وری پرایمرها ۲-۷-۴
۶۴ بررسی داده‌های حاصل از RealTime PCR ۸-۴
۶۴ الگوی تظاهر ژن PAL ۱-۸-۴
۶۶ الگوی بیان ژن 4CL ۹-۴

٦٨	١٠-٤	الگوی بیان ژن C4H
٧٣	١١-٤	نتایج HPLC
٧٤		نتیجه گیری کلی
٧٧		فصل پنجم منابع

فهرست اشکال

- شکل ۱- ۱: تصویر گیاه دارویی سرخارگل (جانس و همکاران، ۲۰۰۷) ۴
- شکل ۱- ۲: ترکیبات شیمیایی موجود در عصاره سرخارگل (بینس و همکاران، ۲۰۰۲) ۶
- شکل ۱- ۳: ساختار پلاسمید آگروباکتریوم رایزوزنز (ونا و همکاران، ۲۰۰۷) ۱۱
- شکل ۱- ۴: مکانیسم انتقال T-DNA به ژنوم گیاهی (سایتواسکی و همکاران، ۲۰۰۷) ۱۳
- شکل ۱- ۵: مسیر متابولیسمی تولید شیکوریک اسید (لیگاند و همکاران، ۲۰۱۶) ۱۹
- شکل ۴- ۱: مراحل مختلف رشد گیاهچه برای تهیه ریزنمونه الف: مراحل جوانه زنی بذر. ب: گیاهچه های ۲۰ روزه ۵۴
- شکل ۴- ۲: ریشه های موئین القا شده در ریزنمونه های برگ و هیپوکوتیل گیاه سرخارگل توسط سویه های الف: ATCC15834. ب: A4. پ: LBA9402 ت: A13 ث: نمونه شاهد ۵۵
- شکل ۴- ۵: کشت نوک ریشه های موئین در محیط LB. سمت راست نمونه آلوده و سمت چپ نمونه بدون آلودگی ۵۹
- شکل ۴- ۶: الکتروفورز ژل یک درصد آگارز DNA ژنومی استخراج شده از ریشه های موئین سرخارگل. چاهک ۱ نشانگر یک کیلو باز. چاهک ۲ تا ۵ به ترتیب کلون سویه های A13. A4. 9402. LBA ATCC15834 و چاهک ۶ ریشه طبیعی ۶۰
- شکل ۴- ۷: الگو الکتروفورز محصولات PCR (قطعه 430bp) از ژن *rolB* آگروباکتریوم رایزوزنز بر روی ژل یک درصد آگارز. سایز نشانگر ۱ کیلوبازی. کلونهای ریشه موئین به ترتیب از چاهکهای ۲ تا ۵ حاصل از ATCC15834، LBA9402، A4 و A13 و چاهک ۶ کنترل مثبت. ۷ چاهک کنترل منفی (ریشه طبیعی گیاه) ۶۱
- شکل ۴- ۸: الگوی الکتروفورز تعدادی از نمونه های RNA بر روی ژل آگارز ۲ درصد. ب: تعیین کیفیت و کمیت RNA استخراجی توسط دستگاه نانودراپ ۶۲
- شکل ۴- ۹: الگوی الکتروفورز محصول واکنش PCR با پرایمرهای اختصاصی از چاهک ۲ تا ۵ به ترتیب ژنهای *GAPDH*، *4CL*، *PAL*، *C4H*، نشانگر ۱۰۰bp ۶۲
- شکل ۴- ۱۰: نمودار منحنی ذوب ژن الف: *GAPDH*. ب: *PAL*. ج: *C4H*. د: *4CL*. (محور افقی دما °C، محور عمودی df/dt) ۶۳
- شکل ۴- ۱۱: نمودار بهره وری ژنها به ترتیب الف: *GAPDH*. ب: *PAL*. ج: *4CL*. د: *C4H* ۶۴

- شکل ۴-۱۲: تغییرات بیان ژن PAL در حضور محرک اسید سالیسیلیک در غلظت‌های ۱۲۵، ۲۵۰ و ۵۰۰ میکرومولار. علائم **، * و ns به ترتیب معنی داری در سطح احتمال ۱ درصد، ۵ درصد و عدم معنی داری را نشان می‌دهد. ۶۵.....
- شکل ۴-۱۳: تغییرات بیان ژن PAL در حضور محرک متیل جاسمونات در غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار. علائم **، * و ns به ترتیب معنی داری در سطح احتمال ۱ درصد، ۵ درصد و عدم معنی داری را نشان می‌دهد. ۶۶.....
- شکل ۴-۱۴: تغییرات بیان ژن 4CL در حضور محرک اسید سالیسیلیک در غلظت‌های ۱۲۵، ۲۵۰ و ۵۰۰ میکرومولار. علائم **، * و ns به ترتیب معنی داری در سطح احتمال ۱ درصد، ۵ درصد و عدم معنی داری را نشان می‌دهد. ۶۷.....
- شکل ۴-۱۵: تغییرات بیان ژن 4CL در حضور محرک متیل جاسمونات در غلظت‌های ۱۲۵، ۲۵۰ و ۵۰۰ میکرومولار. علائم **، * و ns به ترتیب معنی داری در سطح احتمال ۱ درصد، ۵ درصد و عدم معنی داری را نشان می‌دهد. ۶۸.....
- شکل ۴-۱۶: تغییرات بیان ژن C4H در حضور محرک متیل جاسمونات در غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار. علائم **، * و ns به ترتیب معنی داری در سطح احتمال ۱ درصد، ۵ درصد و عدم معنی داری را نشان می‌دهد. ۶۹.....
- شکل ۴-۱۷: تغییرات بیان ژن C4H در حضور محرک متیل جاسمونات در غلظت‌های ۱۲۵، ۲۵۰ و ۵۰۰ میکرومولار. علائم **، * و ns به ترتیب معنی داری در سطح احتمال ۱ درصد، ۵ درصد و عدم معنی داری را نشان می‌دهد. ۷۰.....
- شکل ۴-۱۸: نمایه HPLC مربوط به نمونه استاندارد شیکوریک اسید با غلظت یک میلی‌گرم در میلی‌لیتر (الف)، ریشه طبیعی گیاه (ب)، ریشه موئین گیاه (پ)، ریشه موئین تیمار شده با غلظت ۲۵۰ میکرومولار اسید سالیسیلیک (ت)، ریشه موئین تیمار شده با غلظت ۲۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات (ث). ۷۴.....

فهرست جداول

- جدول ۳-۱: تهیه محلول‌های پایه موراشیک و اسکوگ (MS) ۳۴
- جدول ۳-۲: توالی آغازگرهای اختصاصی ژن rolB ۴۴
- جدول ۳-۳: مشخصات اسیدسالسیلیک و متیل جاسمونات ۴۵
- جدول ۳-۴: پرایمرهای استفاده شده برای ژن PAL، C4H، 4CL و GAPDH ۴۹
- جدول ۴-۱: نتایج تجزیه واریانس و میانگین مربعات سویه های آگروباکتریوم و ریزنمونه هیپوکوتیل ۵۶

علائم اختصاری

pH	potential of hydrogen
°C	Degree of centigrade
RNA	Ribonucleic acid
cDNA	Complementary DNA
Bp	Base pair
RT-PCR	Reverse transcriptase polymerase chain reaction
LB	Luria bertani
Ct	Threshold cycle
PAL	Phenylalanine ammonia lyase
4CL	4-Coumarate:Coenzyme A Ligase
C4H	Cinnamate 4-hydroxylase
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

فصل اول

مقدمه

گیاهان دارویی دارای اهمیت جهانی بوده و در شمار میراث‌های بومی کشورها محسوب می‌شوند. این داروها در طول تاریخ جزء منابع اصلی پزشکی و داروسازی در اکثر نقاط جهان مانند ایران، چین، یونان باستان، هندوستان و مصر می‌باشند (قاسمی، ۱۳۸۸). امروزه استفاده از داروهایی با منشأ طبیعی در درمان و حفظ سلامتی مورد توجه قرار گرفته است (دیانتی و همکاران، ۲۰۰۱). طبق آمار سازمان بهداشت جهانی^۱ (WHO) در حال حاضر حدود ۸۰ درصد از مردم جهان از داروهای گیاهی برای درمان بیماری‌ها استفاده می‌کنند. فراورده‌های طبیعی حاصل از گیاهان دارویی منبع وسیعی برای تهیه‌ی داروها و پایه‌ی اصلی توسعه ترکیبات دارویی جدید است (آزادبخت، ۲۰۰۸). داروهای شیمیایی با وجود تأثیر سریعی که در بدن دارند ولی دارای عوارض جانبی زیادی هستند، در حالی که داروهای طبیعی با منشأ گیاهی به دلیل وجود تعادل بیولوژیکی در ترکیبات آن‌ها تأثیر تدریجی در بدن گذاشته و به سلامت جسمانی انسان کمک زیادی می‌کنند (ولاگ، ۱۹۹۷). سازمان بهداشت جهانی تخمین زده که ۷۰-۸۰ درصد از جمعیت آفریقا، هند و سایر کشورهای در حال توسعه به درمان سنتی برای بیماری‌های اولیه وابسته هستند (راجسوارا و همکاران، ۲۰۱۲). با توجه به گزارش‌های ارائه شده، ارزش اقتصادی گیاهان دارویی، فقط در آمریکا تا سال ۲۰۱۱ میلادی در حدود ۲ میلیارد و ۲۰۰ میلیون دلار پیش‌بینی شده است، در حالی که طی گزارشی مقدار ارزش فروش گیاهان دارویی در ایران در سال ۲۰۰۰ میلادی تنها در حدود ۳۷ میلیارد ریال برآورد شده است. با توجه به اینکه ایران جزء هشت کشور اول دارای فلور متنوع گیاهان دارویی در دنیا است، متأسفانه در عرصه فروش ۶۰ میلیارد دلاری داروهای گیاهی از جایگاه اقتصادی چندان مناسبی برخوردار نیست (قاسمی، ۲۰۰۹).

¹ World Health Organization

تهیه‌ی برخی از مواد مؤثره فعال که در صنایع دارویی اهمیت دارند به طوری مصنوعی امکان پذیر نیست، بلکه تنها به صورت طبیعی از گیاهان دارویی قابل استخراج می‌باشند. این دسته مواد ساختمان شیمیایی ناشناخته‌ای دارند و تهیه آن‌ها به صورت مصنوعی مشکل و هزینه‌بر است. مواد دارویی مصنوعی هر چند به طور سریع اثر می‌گذارند اما ممکن است فقط مسکن باشند ولی اکثر آن‌ها عوارض جانبی نامطلوبی در بدن به جا می‌گذارند. در حالی که مواد دارویی حاصل از گیاهان با آن‌که به تدریج اثر می‌کنند، ولی فواید زیادی از نظر دوام و سلامت بدن دارند. مواد مؤثره گیاهان به-خصوص عطرها و اسانس‌ها، در صنایع دارویی، لوازم آرایشی و خوشبو کننده‌ها کاربرد دارند (امیدبیگی، ۱۳۷۶).

سرخارگل یکی از گیاهان دارویی پر مصرف بومی آمریکای شمالی است که دارای نه گونه می‌باشد. این گیاه برای درمان سرماخوردگی، سرفه، برونشیت، عفونت دستگاه تنفسی فوقانی و بعضی التهابات به کار می‌رود (تقی زاده و همکاران، ۱۳۸۱).

۱-۲ گیاه‌شناسی سرخارگل

گل و میوه: این گیاه دارای کلاپرک‌های بزرگ و منفرد، گل‌ها زبانه‌ای کشیده بوده و در انتهای دم‌گل قرار دارند. گریبان یک ردیف و متشکل از براکت‌های گریبانی سخت، علفی با نوکی خار مانند است که از طول گل‌های لوله‌ای بلندتر می‌باشند. گل‌ها به رنگ قرمز فام و گاه سفید هستند. گل‌های زبانه‌ای به طول ۳ سانتی‌متر و معمولاً سترون می‌باشند. جقه‌ی فندق‌ها کوتاه بوده یا وجود ندارد (امامی و همکاران، ۲۰۱۴).

برگ‌ها، ساقه و ریشه: گیاه علفی، چند ساله به ارتفاع تا ۴۵ سانتی‌متر، دارای برگ‌های تنک، بزرگ، منفرد، متقابل یا متناوب سرنیزه‌ای تا خطی می‌باشند. برگ‌ها به طول ۷/۵ تا ۲۰ سانتی‌متر، واجد سطح زیر، حاشیه کامل و دم‌برگ باریک است. ریزوم‌های خشک شده‌ی قهوه‌ای مایل به خاکستری، اغلب پیچیده و دارای شیارهای طولی هستند. قطر ریزوم حدود یک سانتی‌متر بوده و در مقطع عرضی

آن پوست نازک و چوب زرد فام و منفذدار با لکه‌های سیاه رنگ دیده می‌شود (امامی و همکاران، ۲۰۱۴).

ویژگی‌ها: مزه کمی شیرین و سپس تلخ بوده، نوعی احساس سوزش را روی زبان باقی می‌گذارد. گیاه اندکی معطر است (امامی و همکاران، ۲۰۱۴).

رویشگاه: *Echinacea pallida* و *Echinacea purpurea* در مرکز و شرق ایالت متحده‌ی آمریکا رویش داشته و در اروپا کاشته می‌شود. در ایران در برخی از نقاط کشور برخی از گونه‌ها کاشته می‌شود (امامی و همکاران، ۲۰۱۴).

بخش‌های دارویی: بر حسب گونه از ریشه، برگ و گیاه کامل در مراحل مختلف رشد استفاده می‌شود.

نام‌های عمومی سرخارگل در زبان انگلیسی شامل: Sampson Root, Rudbeckia, Red Sunflower, Purple Coneflower, Hedgehog, Black Sampson می‌باشد (امامی و همکاران، ۲۰۱۴).



شکل ۱- ۱: تصویر گیاه دارویی سرخارگل (جانس و همکاران، ۲۰۰۷)

۱-۲-۱ اهمیت دارویی سرخارگل

به تازگی سازمان بهداشت جهانی مصرف موضعی سرخارگل را در درمان التهابات پوستی تأیید کرده و به عنوان کاندیدایی برای درمان بیماری ایدز مطرح کرده است (ایزدی و همکاران، ۲۰۱۴). بر طبق گزارش‌های کمیسیون اروپا فرمولاسیون‌های حاصله از *E.purpurea* که به صورت خوراکی یا تزریقی تجویز شده‌اند محرک سیستم ایمنی بوده، باعث افزایش تعداد گلبول‌های سفید خون و سلول‌های طحال شده و توانایی فاگوسیتوز توسط گرانولوسیت‌ها را زیاد می‌کند (حاجی مهدی پور و همکاران، ۲۰۰۹). اثر سرخارگل در تقویت ایمنی سلولی غیراختصاصی است. دارای اثرات ضدباکتری، ضدالتهاب متابولیک، محرک ایمنی، التیام‌دهنده‌ی زخم، ضدباروری، ضدنئوپلاسم و ضدعفونی کننده می‌باشد (امامی و همکاران، ۲۰۱۴).

۱-۲-۲ اهمیت اقتصادی سرخارگل

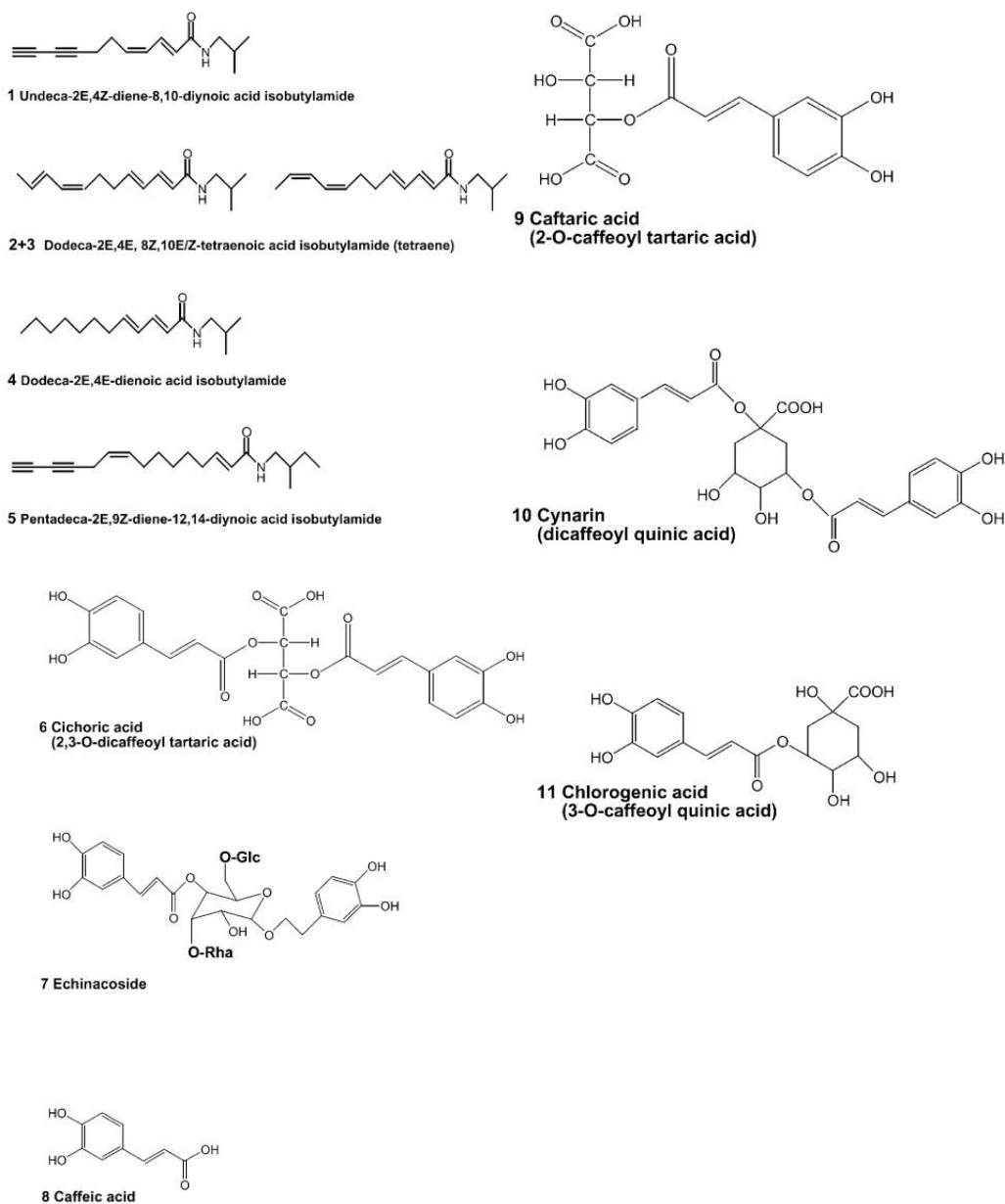
در شمال آمریکا سرخارگل جزء ۱۱ عصاره‌ی گیاهی پر فروش یاد می‌شود. خرده‌فروشی از محصولات سرخارگل بیش از ۱۵۸ میلیون دلار در سال در ایالت متحده‌ی آمریکا و در سراسر جهان ۱۳۰۰ میلیون دلار برآورد شده است (عباسی و همکاران، ۲۰۰۷).

۱-۲-۳ سطح زیر کشت گیاهان دارویی و معطر در ایران

تعداد گونه‌های دارویی و معطری که در ایران کشت می‌شود حدود ۵۶ گونه و درصد نسبت سطح زیر کشت گیاهان دارویی و معطر به سطح زیر کشت در ایران، حدود ۰٫۸۷ درصد می‌باشد که از این مقدار حدود ۴۴٫۶ درصد سطح زیر کشت مربوط به گونه زعفران و زیره سبز می‌باشد و بخش عمده‌ی دیگر نیز به کشت گونه‌های دارویی چندمنظوره اختصاص یافته است. در بین کل استان‌های کشور نیز بیشترین سطح زیر کشت و تنوع گیاهان دارویی مربوط به استان خراسان می‌باشد (کوچکی، ۲۰۰۴).

۴-۲-۱ ساختار شیمیایی ترکیبات موجود در عصاره سرخارگل

تمام پیکر این گیاه اعم از ریشه و پیکر رویشی حاوی موثره ارزشمندی از قبیل ترکیبات آلکیل آمیدی، ۲- متیل بوتیل آمید، شیکوریک اسید، ترکیبات پلی ساکاریدی مانند اکیناسئین، اکیناکوزید و اکینولون و نیز حاوی اسانس است. مهم‌ترین ترکیبات تشکیل دهنده اسانس را هومولن، کاریوفیلن و اکسید کاریوفیلن تشکیل می‌دهد (امیدبیگی، ۲۰۰۲).



شکل ۱- ۲: ترکیبات شیمیایی موجود در عصاره سرخارگل (بینس و همکاران، ۲۰۰۲).

۱-۳ متابولیت‌های ثانویه

در گیاهان آوندی ترکیباتی که از متابولیت‌های اولیه ایجاد می‌شوند و به عنوان ترکیبات فرعی و انتهایی در نظر گرفته می‌شوند متابولیت‌های ثانویه نامیده می‌شوند. این ترکیبات در فرایندهای متابولیسمی وارد نمی‌شوند و می‌توانند به عنوان الگویی برای طبقه‌بندی گیاهان به کار روند (بینت و همکاران، ۱۹۹۴). کلمه ثانویه که در سال ۱۸۹۱ توسط Kossel معرفی شد دلالت بر این دارد که متابولیت‌های اولیه در هر سلول زنده که توانایی تقسیم را دارد وجود دارند اما جزء ضروری زندگی گیاهان نیستند (ادروارو همکاران، ۲۰۰۸).

۱-۳-۱ طبقه‌بندی متابولیت‌های ثانویه

بر اساس ویژگی‌های بیوسنتزی، محصولات ثانویه به سه گروه ترپن‌ها، ترکیبات ازت‌دار و ترکیبات فنولی تقسیم می‌شوند.

الف- ترپن‌ها

بزرگ‌ترین گروه محصولات ثانویه شامل ترپن‌ها یا ترپنوئیدها می‌باشند. این مواد معمولاً در آب نامحلول هستند و از پیوستن واحدهای پنج کربنی که از طریق مسیر موالونیک‌اسید تشکیل می‌شوند. این مواد سمی و به عنوان ترکیبات دفاعی ضد گیاه‌خواری نقش دارند (تایز و همکاران ۱۳۹۲).

ب- ترکیبات ازت‌دار

ازت در ساختمان بسیاری از محصولات ثانویه وجود دارد. این ترکیبات شامل آلکالوئیدها و گلیکوزیدهای سیانوژنیک می‌باشند. آلکالوئیدها محصولات طبیعی و دارای نیتروژن در ساختمان خود هستند این ساختارها معمولاً حلقوی هستند (تایز و همکاران، ۱۳۹۲). بسیاری از داروهای رایج بر پایه‌ی ترکیبات آلکالوئیدی شکل گرفته‌اند که از جمله آن‌ها مسکالین، نیکوتین، کوکائین و مورفین می‌باشند (دی جیسیوس و همکاران، ۲۰۰۳). گلیکوزیدهای سیانوژنیک و گلیکوزینولیت‌ها گروه دیگر

از ترکیبات ازت دار هستند که مهم ترین آن ها آمیگدالین و پروناسین ها هستند که در خانواده گندمیان و گل سرخ یافت می شود (قاسمی، ۲۰۰۹).

ج- ترکیبات فنولی

ترکیبات فنولی در گیاهان شامل فنول های ساده، لیگنین ها، فلاونوئیدها و تانن های فشرده می باشند، که با توجه به تنوع شیمیایی نقش های متفاوتی دارند. اکثر ترکیبات فنولی از فنیل آلانین و تیروزین مشتق شده است. از مشتقات فنیل پروپان های ساده (اسیدفرولیک^۱ و اسیدکافئیک^۲)، کومارین ها (آمبلیفرون^۳ و سورالن^۴) و مشتقات اسیدبنزوئیک (اسیدسالسیلیک^۵ و وانیلن) می توان اشاره نمود (تایزو همکاران، ۱۳۹۲).

۱-۴ کاربرد بیوتکنولوژی در گیاهان دارویی

با توجه به این که در طبیعت سرعت تولید متابولیت های ثانویه کند بوده و مدت زمان زیادی برای تولید لازم است، استفاده از روش های بیوتکنولوژی برای تولید سریع و انبوه متابولیت های ثانویه و مواد دارویی ضروری به نظر می رسد (غلامرضا، ۲۰۰۸). برخی از متابولیت ها فقط در مرحله ی کشت ریشه تولید می شوند. کشت ریشه را می توان به صورت ریشه ی نابجا و ریشه ی تراریخته ایجاد نمود. سیستم کشت ریشه در گیاهان عالی معمولاً سرعت رشد کمتری را نشان داده و نیاز به منبع فیتوهورمونی خارجی دارد که این امر منجر به سنتز بسیار کم متابولیت های ثانویه می شوند (سلیمانی و همکاران، ۲۰۱۲). بیوتکنولوژی روش های جایگزینی برای تولید مواد دارویی با منشاء ریشه معرفی

¹ Ferulic acid

² Caffeic acid

³ Umbelliferon

⁴ Psorlen

⁵ Salicylic acid

می‌کند. یکی از این راهکارها استفاده از یک ناقل طبیعی به نام آگروباکتریوم رایزوژنز^۱ و طراحی سیستم کشت ریشه‌ی موئین^۲ برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه می‌باشد (سلیمانی و همکاران، ۲۰۱۲). سیستم کشت ریشه‌ی موئین با داشتن ویژگی‌هایی چون زمان کوتاه دو برابر شدن، رشد سریع، پایداری ژنتیکی، نگهداری آسان در محیط فاقد هورمون و توان تولید متابولیت‌های ثانویه کاربرد فراوانی دارد. با این وجود، گاهی کارایی ریشه‌ها در تولید متابولیت‌های ثانویه پایین است و برای افزایش تولید متابولیت‌ها از روش‌های مختلفی مانند انتخاب دودمان^۳ برتر تولیدکننده‌ی متابولیت و تیمار ریشه‌ها با محرک استفاده شود (سلیمانی و همکاران، ۲۰۱۲).

۱-۴-۱ سیستم کشت ریشه‌های موئین

سیستم کشت ریشه‌ی موئین در مطالعات بیوسنتزی متابولیت‌های ثانویه، باززایی و تولید گیاهان تراریخت، مهندسی ژنتیک و تولید پروتئین‌های نو ترکیب، مدل‌سازی برای مطالعه‌ی ریزوسفر، مطالعه‌ی روابط هورمونی و آنزیمی در فرایندهای بیولوژی سلولی مورد استفاده قرار می‌گیرد. آگروباکتریوم رایزوژنز در گیاهان باعث بروز غیرعادی ریشه‌های موئین می‌شوند. این باکتری خاکزی و گرم منفی از محل زخم وارد گیاه شده و با انتقال قطعه^۴ T-DNA پلاسمید Ri به درون ژنوم سلول گیاهی، ریشه‌های نئوپلاستیک را در گیاه به وجود می‌آورد (گیری و همکاران، ۲۰۰۰). تا قبل از سال ۱۹۸۰ تنها در گیاهان دولپه‌ای تلقیح با آگروباکتریوم صورت می‌گرفت ولی امروزه تحت شرایط آزمایشگاهی آگروباکتریوم قادر است به‌جز گیاهان، دامنه گسترده‌ای از گونه‌های یوکاریوت از قارچ‌ها تا موجودات دریایی را تراریخته کند (تزفیرا و همکاران، ۲۰۰۶).

¹ Agrobacterium rhizogenes

² Hairy roots culture

³ line

⁴ Transformable DNA

۱-۵-۱ ویژگی‌های ریشه‌های موئین

ریشه‌های موئین که توسط آگروباکتریوم رایزوزنژ تولید می‌شوند ویژگی‌هایی چون رشد ریشه‌های موئین در جهات مختلف (پلاژیوتروپیک^۱) به دلیل کاهش حساسیت نوک ریشه‌ها به زمین‌گرایی و در نتیجه کاهش مقدار آمیلوپلاست‌ها در نوک ریشه دارد (کیوزوکینا و همکاران، ۲۰۰۶). این ریشه‌ها دارای ویژگی‌های سرعت رشد بالا، انشعابات فراوان و نگهداری آسان می‌باشند. به علاوه از نظر ژنتیکی و بیوسنتزی پایدار بوده و زمان دو برابر شدن آن‌ها کوتاه است و می‌توانند در زمان کمتری متابولیت ثانویه بیشتری تولید کنند (گیری و همکاران، ۲۰۰۰، هیو و همکاران، ۲۰۰۶).

۱-۶ معرفی آگروباکتریوم رایزوزنژ

آگروباکتریوم نوعی باکتری گرم منفی، میله‌ای و متعلق به خانواده ریزوبیاسه^۲ می‌باشد که به‌عنوان یکی از ناقلین ژن برای سلول‌های گیاهی مورد استفاده قرار می‌گیرد. این باکتری اغلب در سطح خاک و نواحی طوقه‌ی گیاه یافت می‌شود. نام‌گذاری آگروباکتریوم بر اساس خصوصیت بیماری‌زایی آن‌ها صورت می‌گیرد که شامل:

A. tumefaciens: عامل بیماری گال طوقه

A. rhizogenes: عامل بیماری ریشه‌ی موئین

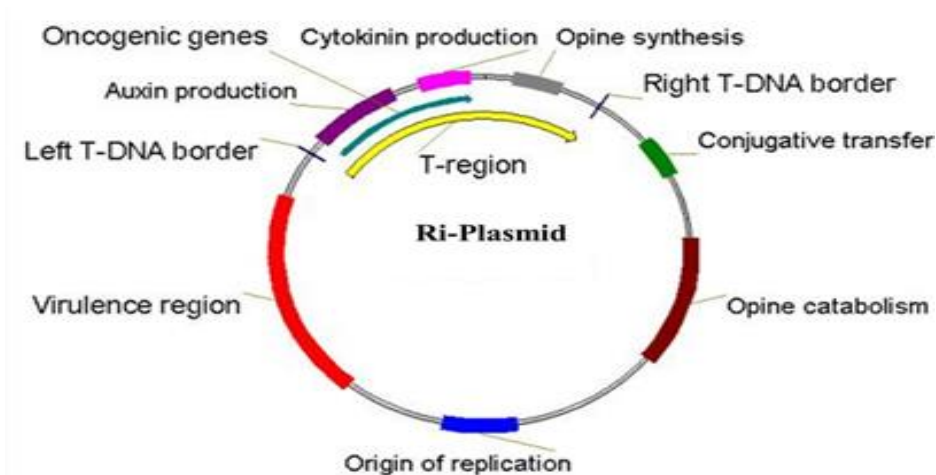
A. radiobacter: نژاد غیر بیماری‌زا (زایمینیوز و همکاران، ۲۰۰۸).

^۱ plagiotropic

^۲ Rhizobiaceae

۱-۶-۱ ساختار پلاسمید Ri در باکتری آگروباکتریوم رایزوژنز

این سویه‌ی باکتری حاوی یک پلاسمید بزرگ با بیش از ۲۰۰kb^۱ به نام Ri (حاوی ژن‌های سنتز کننده اکسین، سیتوکنین و تولیدکننده‌ی ریشه) است که موجب تولید بیماری و ایجاد ریشه‌ی موئین می‌شود. دو دسته از ژن‌ها در این پلاسمید حائز اهمیت می‌باشند.



شکل ۱-۳: ساختار پلاسمید آگروباکتریوم رایزوژنز (ونا و همکاران، ۲۰۰۷).

ژن‌هایی که بر روی T-DNA قرار گرفته‌اند شامل:

ژن‌های مولد ریشه‌های موئین (آنزیم‌های سنتز کننده اکسین و سیتوکنین)

ژن‌های کدکننده‌ی سنتز اوپین‌ها^۲

ژن‌هایی که در خارج از T-DNA قرار دارند که شامل:

- ژن‌هایی که در فرایند انتقال T-DNA به سلول گیاهی نقش دارند (ناحیه^۳ vir^۳ شامل virB, virE, virD, virC).

^۱ Kilo base

^۲ Opins

^۳ Virulence Region

- ژن‌های مسئول کاتابولیسم اوپین‌ها

- ژن‌های شرکت‌کننده در هم‌یوگی بین دو باکتری (انتقال پلاسمید)

- نواحی که ثبات پلاسمید را حفظ می‌کنند (فارسی، ۲۰۰۰).

بخش کوچکی (۱۳ تا ۱۷ درصد) از این پلاسمید باکتریایی تحت عنوان T-DNA به ژنوم هسته‌ای گیاه میزبان منتقل می‌شود (گیولون و همکاران، ۲۰۰۶). برخی از ژن‌های موجود در T-DNA در سنتز پروتئین‌های غیرعادی به نام اوپین‌ها نقش دارند. اوپین‌ها به وسیله‌ی ریشه‌ها سنتز شده و به عنوان منابع کربن و نیتروژن مورد استفاده‌ی باکتری قرار می‌گیرند. شناسایی این ترکیبات یک شاخص در تأیید ورود T-DNA پلاسمید Ri آگروباکتریوم به درون گیاه و ایجاد ریشه‌ی موئین به حساب می‌آید.

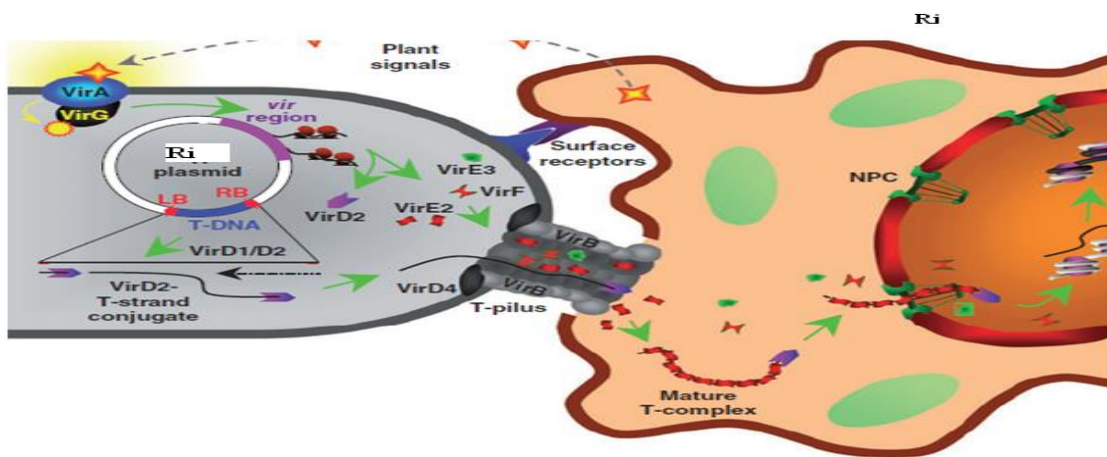
۱-۶-۲ مکانیسم انتقال T-DNA به سلول گیاهی

دو توالی DNA تکراری به شدت محافظت‌شده و به طول ۲۵bp در پلاسمید Ri وجود دارد که در طرفین T-DNA قرار گرفته و حدود آن را مشخص می‌کند. این توالی مانند مرزهای T-DNA عمل می‌کند که به آن‌ها مرزهای چپ^۱ و راست^۲ گفته می‌شود. و در انتقال نقش دارند (فارسی و همکاران، ۲۰۰۰). مطالعات ژنتیکی نشان داده که ناحیه مرزی راست برای بیماری‌زایی ضروری ولی ناحیه مرزی سمت چپ ضروری نیست (وانگ و همکاران، ۱۹۸۴). در حضور پروتئین vir D1 و vir D2 توالی مرزی ۲۵bp در یک جایگاه شکسته می‌شود. برش در توالی سمت راست سبب ایجاد یک انتهای آغازگر می‌گردد و سنتز رشته جدید DNA از محل این بریدگی در جهت ۵' به ۳' آغاز شده و رشته‌ی جدید جایگزین تک رشته قبلی می‌شود. یافته‌های جدید نشان می‌دهد که پروتئین vir D2،

¹ Left border

² Right border

رشته‌ی T-strand را با ایجاد پیوند کووالانسی در انتهای ۵' خود نگه می‌دارد که باعث جلوگیری از آسیب‌پذیری انتهای ۵' در برابر حمله آنزیم‌های اگزونوکلاز می‌گردد. به‌علاوه این پروتئین دارای یک توالی هدفیاب هسته‌ای است و در هدایت T-DNA به سوی هسته‌ی سلول گیاهی عمل می‌کند. T-DNA برای انتقال به بافت زخمی، در درون باکتری مراحل را طی کرده و سپس به سلول گیاهی ارسال شده و در آنجا به ژنوم گیاهی اضافه می‌گردد. پروتئین‌های کد شده به‌وسیله‌ی ناحیه بیماری‌زا (vir) در پلاسمید مراحل انتقال T-DNA را تنظیم می‌کنند. ترکیبات فنولی مشتق از دیواره‌ی سلولی زخمی شده (از جمله استوسرینگون^۱ و بتا استوسرینگون^۲) نیز بیان ژن‌های ناحیه vir را القا می‌کنند (فارسی و همکاران، ۲۰۰۰).



شکل ۱-۴: مکانیسم انتقال T-DNA به ژنوم گیاهی (سایتواسکی و همکاران، ۲۰۰۷).

۷-۱ عوامل مؤثر در ایجاد ریشه موئین

الف- بیماری‌زایی آگروباکتریوم رایزوژنز

نژادهای آگروباکتریوم بر اساس نوع اوپین تولیدی، به تیپ‌های مختلف نظیر کوکوموپین، آگروپین و مانوپین طبقه‌بندی می‌شوند. در نژادهای تیپ آگروپین ناحیه T-DNA شامل دو قسمت چپ و راست

^۱ Acetosyringone

^۲ Beta Acetosyringone

بوده، از قدرت بیماری‌زایی بیشتری برخوردار می‌باشند. درحالی‌که در نژادهای کوکوموپین و مانوپین T-DNA تنها یک‌قسمتی است و قدرت بیماری‌زایی کمتری دارند. بنابراین برای ایجاد سیستم ریشه‌ی موئین بیشتر از تیپ آگروپین استفاده می‌شود (وانا و همکاران، ۲۰۰۷).

ب- سن و نوع ریز نمونه

در بیشتر موارد نمونه‌هایی با سن پایین فراوانی تراریختی بیشتری را ایجاد می‌کنند (جیولانگ و همکاران، ۲۰۰۲).

ج- نوع محیط کشت

محیط رشد تأثیر زیادی در ایجاد ریشه موئین دارد. محیط‌هایی با مقادیر بالای نمک‌های معدنی از قبیل MS یا LS تشکیل ریشه‌های موئین را در برخی از گیاهان تشدید می‌کنند. درحالی‌که محیط‌هایی با مقادیر پایین نمک مانند B5 تکثیر بیش‌ازحد باکتری را در محیط فراهم می‌کنند و در نتیجه محیط مناسبی برای ایجاد ریشه‌های موئین در برخی از گونه‌های گیاهی نمی‌باشند (میوکندان و همکاران، ۱۹۹۸).

۱-۸ تأیید تراریختی در ریشه‌های موئین

الف- استفاده از ویژگی‌های مورفولوژیکی

سرعت رشد زیاد، ریشه‌های منشعب و عدم زمین‌گرایی از ویژگی‌های مورفولوژیکی ریشه‌های موئین می‌باشد (تپفر، ۱۹۸۴).

ب- استفاده از نشانگرهای بیوشیمیایی

اوپین‌ها نشانگرهای بیوشیمیایی مؤثر برای تأیید بافت ریشه موئین می‌باشند و تعیین اوپین‌ها به عنوان یک نشان محکم برای تأیید ریشه‌های تراریخته می‌باشند (تپفر، ۱۹۸۴).

ج- استفاده از نشانگرهای ژنتیکی

روش‌های مختلفی برای تأیید اتصال T-DNA بر روی DNA گیاه میزبان بکار می‌روند. این روش‌ها شامل ساترن هیبریداسیون^۱، DNA بلات داتینگ^۲ (داپر، ۱۹۸۸) و استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز یا PCR می‌باشد.

۱-۹ استفاده از محرک‌ها برای افزایش تولید متابولیت ثانویه

محرک می‌تواند با توجه به نوع گیاه و نوع متابولیت مورد نظر عصاره استخراج‌شده از ارگانسیم، برخی مواد شیمیایی، اشعه UV، نور و فلزات سنگین را شامل شود (اسماعیل زاده و همکاران، ۲۰۱۳).

امروزه به منظور بهبود تولید شیکوریک‌اسید، استفاده از محرک‌ها در کشت ریشه‌های موئین سرخارگل مورد توجه قرار گرفته است. استفاده از محرک‌ها (زیستی^۳ و غیر زیستی^۴) یکی از راهکارهای زیست‌فناوری برای بهبود تولید متابولیت‌های ثانویه است. با توجه به این که تولید برخی از متابولیت‌های ثانویه گیاهی در پاسخ به استرس‌های محیطی و حمله پاتوژن‌ها افزایش می‌یابد، استفاده از محرک‌های میکروبی از جمله باکتری‌ها می‌تواند راهکاری مناسب برای افزایش تولید این گروه از متابولیت‌ها باشد.

۱-۹-۱ متیل جاسمونات و اسیدسالیسیک و تأثیر آن‌ها بر متابولیت‌های ثانویه

تحقیقات نشان می‌دهد که اسیدسالیسیک^۵ و متیل جاسمونات به عنوان مولکول‌های پیام‌رسان هم‌چون سایر محرک‌ها باعث بیان ژن‌های مرتبط با تولید متابولیت ثانویه در گیاه را القا می‌کنند.

^۱ Southern hybridization

^۲ DNA blot dotting

^۳ Biotic

^۴ Abiotic

^۵ Salicylic acid

درواقع اسیدسالیسیلیک و متیل جاسمونات دو تنظیم‌کننده رشد گیاهی‌اند که ترکیبات پیام‌رسان کلیدی در فعال‌سازی پاسخ‌های اختصاصی دفاعی گیاهان محسوب می‌شوند. پاسخ‌های دفاعی گیاه نیز به کاهش تولید مواد اولیه و بیوسنتز انواع ترکیبات ثانویه گیاه می‌انجامد (ایودورس و همکاران، ۲۰۱۵).

الف) متیل جاسمونات: اسید جاسمونات و مشتقات آن یعنی متیل جاسمونات تنظیم‌کننده‌ای رشد درونی یا بازدارنده رشد گیاه هستند که نقش کلیدی در رشد، نمو و پاسخ به تنش‌های محیطی ایفا می‌کنند. این مولکول‌ها منجر به القای فعالیت آنزیم‌های ویژه‌ای می‌شوند که واکنش‌های بیوسنتزی مربوط به تولید ترکیبات دفاعی مانند پلی‌فنل‌ها، آلکالوئیدها و پروتئین‌های مربوط به میکروب‌های بیماری‌زا را کاتالیز می‌کنند. جاسمونات‌ها گروهی از ترکیبات ویژه حلقوی سیکلوپنتان می‌باشند که در دهه ۱۹۶۰ به عنوان متابولیت‌های ثانویه در اسانس گیاه گل یاس یافت شد. اثرات فیزیولوژیکی جاسمونات‌ها در گیاهان بسته به گونه گیاهی، مرحله نمو، نوع جاسمونات و غلظت به کار رفته متفاوت است (رجبی، ۲۰۱۶). جاسمونیک‌اسید و متیل استر آن (متیل جاسمونات)، ترکیب‌هایی سیکلوپنتانونی از مشتقات اسیدلینولنیک می‌باشند که از مسیر اکتا دکانوئید^۱ ساخته می‌شوند (بیوندی و همکاران، ۲۰۰۱، کیان و همکاران، ۲۰۰۴). که فرایندهای فیزیولوژیکی متعددی نظیر رشد ریشه، پیری، رسیدن میوه، واکنش‌های دفاعی گیاه در برابر پاتوژن‌ها و حشرات و تنش‌های غیر زیستی را تحت تأثیر قرار می‌دهند (کیان و همکاران، ۲۰۰۴). تولید متابولیت‌های ثانویه تحت تأثیر ژنتیک گیاه و شرایط محیطی و مولکول‌های پیام‌رسان می‌تواند تغییر کند. وقتی گیاه در برابر تنش‌های زنده و غیر زنده قرار می‌گیرد به این تنش‌ها پاسخ می‌دهد (کیم و همکاران، ۲۰۱۳)

ب) اسید سالیسیلیک: از جمله ترکیبات فنولیکی است که نقش تنظیم‌کنندگی در فرایندهای زیستی و بیوشیمیایی گیاهان دارد، که از جمله می‌توان به تنظیم تعرق، بسته شدن روزنه‌ها تراوایی غشاء،

¹ Octadecanoid

رشد و فتوسنتز اشاره کرد. نتایج پژوهش‌ها نشان می‌دهد که این ترکیب از جوانه‌زنی تا پیری گیاه، می‌تواند تأثیرگذار باشد و منجر به افزایش کارایی فتوسنتز و محصول نهایی می‌گردد (کشاورز و همکاران، ۲۰۱۵).

متیل جاسمونات و اسیدسالیسیلیک به عنوان مولکول‌های پیام‌رسان برخی از مسیرهای انتقال پیام که القاکننده آنزیم‌های خاص کاتالیزکننده واکنش‌های بیوسنتزی برای تشکیل ترکیب‌های دفاعی مثل پلی‌فنول‌ها، آلکالوئیدها یا پروتئین‌های مربوط به پاتوژن هستند دخالت می‌کنند و منجر به القای واکنش‌های دفاعی می‌شوند. زمانی که این مولکول‌ها از خارج وارد گیاه می‌شوند در گیاه حرکت کرده و منجر به بیان یک سری از ژن‌های دفاعی می‌گردند (یوو و همکاران، ۲۰۰۵).

۱-۱۰ آنزیم PAL

این آنزیم اولین بار توسط Koukol and Conn در سال ۱۹۶۱ شرح داده شد و به طور گسترده‌ای در گیاهان مورد مطالعه قرار رفت (نادری و همکاران، ۲۰۱۴). فنیل‌آلانین‌آمونیا لایز (PAL) آنزیم اصلی واسط در مسیر سنتزی اسیدهای آمینه آرماتیک و متابولیت‌های ثانویه که شامل گروه وسیعی از ترکیبات فنولی است و نقش کلیدی در تنظیم محصولات حاصل از مسیر فنیل پروپانوئیدی ایفا می‌کند. فعالیت آنزیم PAL تحت تأثیر مرحله رشد، تمایزیابی سلول و هم‌چنین استرس‌های زنده و غیر زنده تغییر می‌کند، به طوری که بیان شده است آلودگی به بیمارگر، زخم‌های مکانیکی، تابش اشعه ماورای بنفش، خشکی، اسیدسالیسیلیک و متیل جاسمونات سبب افزایش فعالیت PAL می‌شوند. مسیر فنیل پروپانوئیدی، مسیر اولیه تولید بسیاری از ترکیبات طبیعی مانند هیدروکسی سینامیک‌اسیدها و سپس فلاونوئیدها، ایزوفلانوئیدها، لیگنین، کومارین، استیلین و طیف وسیعی از سایر مواد فنولی است، که نقش‌های مهمی چون حفاظت در برابر استرس‌های زنده و غیر زنده، سیگنال‌های بین سلولی، محافظت در برابر نور و به ویژه ماورای بنفش و هم‌چنین حفاظت‌های مکانیکی را بر عهده دارند. در واقع PAL امکان تبدیل فنیل‌آلانین به ترانس-اسیدسینامیک را فراهم

ساخته و سبب ادامه چرخه و تولید مواد فنولی می‌شود. ترانس- اسیدسینامیک پیش ماده اصلی تولید فلاونوئیدها و لیگنین‌ها می‌باشد و بنابراین افزایش فعالیت PAL سبب افزایش سطح تولید مواد فنیل پروپانویدی می‌گردد (صمدی و همکاران، ۲۰۱۵). آنزیم‌های مهم مسیر تولید فلاونوئیدها، آنزیم‌های فنیل‌آلانین‌آمونیاک (PAL)، سینامیک‌اسید ۴-هیدروکسیلاز (C4H) و ۴-کومارات کوآنزیم‌آ لیگاز (4CL) می‌باشند (شکل ۱-۵). PAL تولید ترانس سینامیک‌اسید را از طریق حذف غیر اکسیداتیوی آمونیاک از L- فنیل‌آلانین کاتالیز می‌کند، که در مسیر متابولسیم فنیل‌آلانین پیش ساخت‌های متابولیت‌هایی چون فلاونوئیدها را فراهم می‌کند.

۱-۱ آنزیم C4H

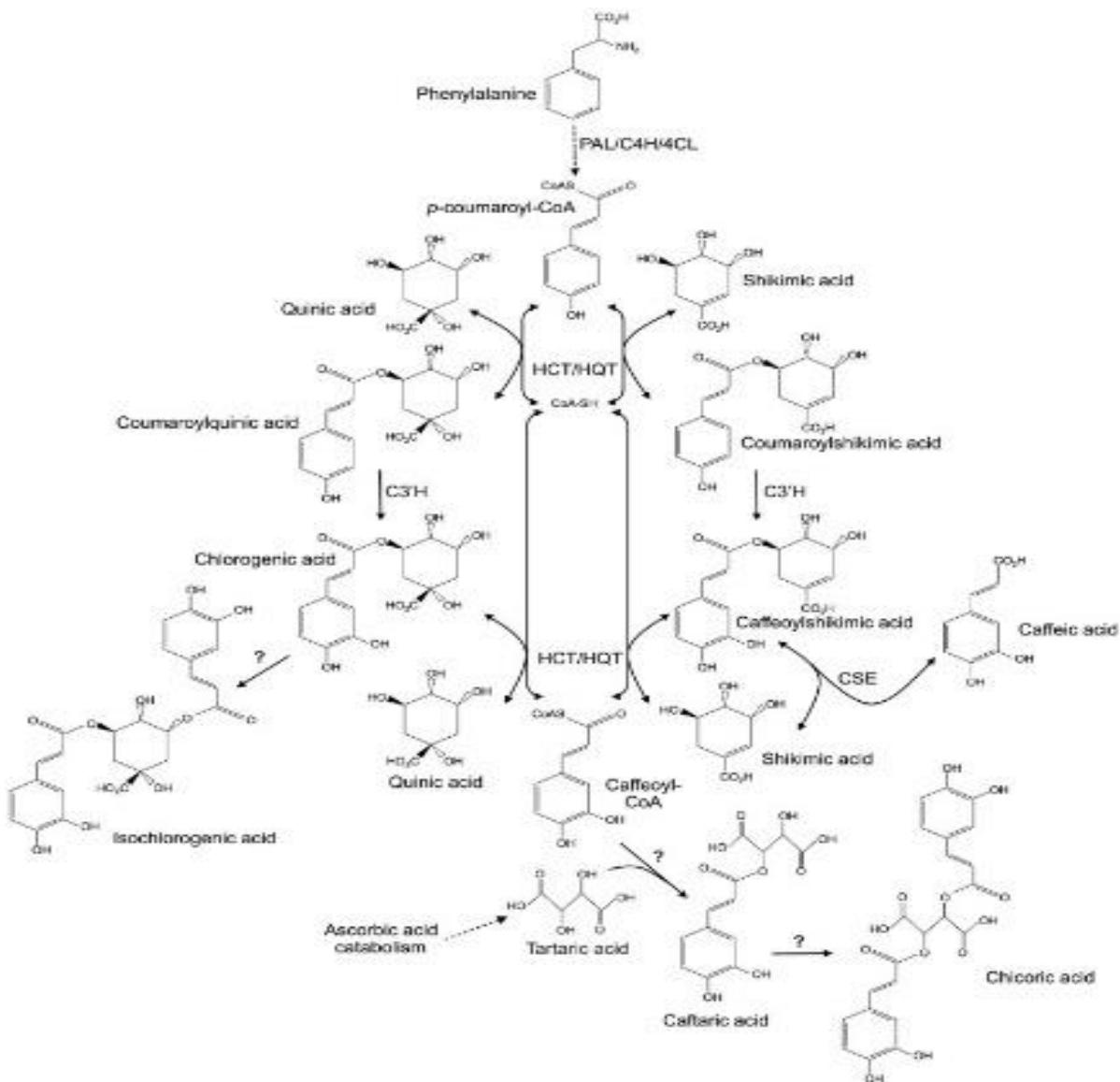
یک مونواکسیژناز وابسته به سیتوکروم P450 است و تقریباً در همه گیاهان عالی وجود دارد. این آنزیم با هیدروکسیلاسیون ترانس سینامیک اسید ۴ کومارات را تولید می‌کند. ۴ کومارات با فعالیت 4CL بصورت تیواستر کوآنزیم آ درآمده و ۴ کومارویل کوآنزیم‌آ ایجاد می‌شود که این ترکیب به سمت مسیرهای جدید تولید ترکیبات فنولی می‌رود (ژانگ و همکاران، ۲۰۰۹). توالی این آنزیم به‌طور قابل ملاحظه‌ای در گیاهان محافظت شده است. این آنزیم از چند آنزیم چرخه تولید متابولیت‌های ثانویه که در مقاومت به بیماری‌ها نقش دارند می‌باشد. این آنزیم کنترل کربن، حفاظت در برابر اشعه UV.B، رنگیزه‌های تاثیرگذار بر گرده افشانی نقش دارند (دهقان و همکاران، ۲۰۱۳).

۱-۱ آنزیم 4CL

آنزیم ۴-کومارات کوآنزیم A لیگاز (EC 6.2.1.12) یک آنزیم کلیدی در مسیرهای متابولیکی فنیل پروپانوید بیوسنتز برای لیگنین و فلاونوئیدها می‌باشد. این آنزیم سینامیک اسید و مشتقات هیدروکسیله‌ی آن نظیر کافئات، فرولات، کومارات و سیناپات را به تیواسترهای فعال با کوآنزیم آ تبدیل می‌کند. در ادامه این ترکیبات وارد مسیر بیوسنتز کومارین‌ها، استیلین‌ها، فلاونوئیدها و سایر متابولیت‌های ثانویه می‌شوند (لیگاند و همکاران، ۲۰۱۶).

۱۳-۱ ساختار شیمیایی شیکوریک اسید

اسید شیکوریک یکی از مهم‌ترین مواد موثر در گیاه سرخارگل می‌باشد که دارای خواص دارویی متعددی مانند خاصیت ضدسرطانی، ضدچاقی، ضد ویروسی، ضد دیابت و آنتی‌اکسیدانی برای انسان می‌باشد. با توجه به نقش آن در مهار آنزیم HIV integrase، فعالیت ضدویروس ایدز (HIV) گزارش شده است (فتح‌الله و همکاران، ۲۰۱۶).



شکل ۱-۵: مسیر متابولیسمی تولید شیکوریک اسید (لیگاند و همکاران، ۲۰۱۶).

۱-۱۴ بررسی بیان ژن

۱-۱۴-۱ Real-Time RT-PCR

پاسخ بسیاری از سلول‌ها به تغییرات محیط، رشد و تمایز با تغییر در الگوی بیان ژن‌ها همراه می‌شود. توانایی کمی سنجی سطوح رونویسی یک ژن خاص همیشه محور بسیاری از تحقیقات در رابطه با عمل ژن بوده است (بوستین، ۲۰۰۰). یکی از روش‌هایی که برای کمیت سنجی رونوشت ژنی مورد استفاده قرار می‌گیرد Real Time PCR است. ایده اولیه این روش توسط Higuchi و همکارانش در سال ۱۹۹۲ به مفهوم مشاهده لحظه به لحظه واکنش PCR بر اساس میزان فلورسانت گزارشگری مثل سایبرگرین ساطع شده از واکنش و مشاهده و ثبت آن در یک Detector ارائه شد. در طول فاز خطی لگاریتمی تکثیر، فلورسنس تا نقطه‌ای افزایش می‌یابد که قابل سنجش می‌شود و به عنوان آستانه چرخه (CT)^۱ یا نقطه تقاطع نامیده می‌شود بنابراین با استفاده از رقت‌های متوالی DNA استاندارد با مقدار مشخص می‌توان مقدار DNA یا cDNA نمونه ناشناخته را به عنوان ارزش CT با استفاده از ترسیم منحنی استاندارد لگاریتم غلظت در مقابل CT محاسبه کرد. (بهلولی و همکاران، ۲۰۱۶). از ویژگی‌های Real Time PCR می‌توان به سرعت بالای انجام کار، حذف مرحله ردیابی محصول پس از PCR، مشاهده لحظه به لحظه واکنش و قطع آن در هر زمان، حساسیت و اختصاصیت بالا اشاره کرد.

۱-۱۴-۲ روش‌های انجام Real Time PCR

در ارزیابی بیان ژن ۲ روش وجود دارد.

۱- **کمیت سنجی مطلق (Absolute Quantification):** که در این روش محاسبات تعداد کپی ژن معمولاً با استفاده از سیگنال Real Time PCR نسبت به یک منحنی استاندارد به دست می‌آید. برای به دست آوردن مقدار کپی از الگوی اولیه و یا شرایط کاری واکنش Real Time PCR با استفاده از

¹ Cycle threshold

رقت سازی DNA الگو و یا استانداردهایی که مقدار آن‌ها مشخص است، می‌توان منحنی استاندارد را بر این اساس ترسیم کرد. شیب خط منحنی و ضریب رگرسیون باید به ترتیب تقریباً $M=33 < 0.9$ ، $R^2 < 1$ باشد تا Efficiency ۱۰۰ درصد حاصل شود. یعنی در هر واکنش مقدار ژنوم دو برابر شود.

۲- کمیت سنجی نسبی (Relative Quantification): اطلاعات ژن مورد نظر نسبت به کالیبراتور با یک کنترل ژن داخلی نشان داده می‌شود.

از روش‌های استفاده شده در این رابطه می‌توان به روش Pfaffl و $\Delta\Delta CT$ اشاره کرد.

HPLC

کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا تکنیکی جهت آنالیز شیمیایی برای جداسازی، تشخیص و تعیین مقدار اجزای یک مخلوط می‌باشد. در این تکنیک، پمپ‌هایی قرار دارد که با ایجاد فشار قوی، حلال مایع را از مخلوط نمونه از طریق ستون بسیار ریزحاوی مواد جاذب جامد عبور می‌دهد. هر جزء نمونه با تفاوت جزئی از بقیه، با ماده جاذب واکنش می‌دهد که باعث اختلاف سرعت‌های جریان برای اجزای متفاوت شده و باعث جدا کردن اجزا در ستون می‌شود. کروماتوگرافی کاربردی وسیع در پژوهش‌های مختلف علوم پایه دارد و گوناگونی و تکامل شگرفی در غلبه تحقیقات یافته است. در روش‌های مختلف کروماتوگرافی یک فاز متحرک (phase Mobile) و یک فاز ثابت (phase Statonary) وجود دارد. فاز ثابت می‌تواند جامد یا مایع و فاز متحرک مایع یا گاز باشد (صباغ زاده، ۲۰۱۷).

۱-۱۵ اهداف اصلی این تحقیق

تحقیق حاضر با هدف بررسی تغییرات بیان ژن‌های موثر در بیوسنتز شیکوریک اسید از جمله فنیل آلانین آمونیا لیاز (PAL)، سینامیک اسید ۴- هیدروکسیلاز (C4H) و ۴- کومارات کوآنزیم آ لیگاز (4CL) در گیاه سرخارگل در پاسخ به غلظت‌های متفاوتی از متیل جاسمونات و اسیدسالیسیک انجام شد. هم‌چنین میزان تولید ماده موثره شیکوریک اسید با روش HPLC در ریشه‌های موئین تیمار شده با متیل جاسمونات و اسید سالیسیک اندازه گیری شد.

فصل دوم

پیشینه تحقیق

۲-۱ القای ریشه موئین و بررسی بیان ژن PAL در سرخارگل

بذر گیاه *Echinacea purpurea* اولین بار در سال ۱۳۷۲ از مجارستان به ایران آورده و نام سرخارگل بر آن نهاده شد (قاسمی، ۲۰۰۷). با توجه به اهمیت القای ریشه‌های موئین و تولید متابولیت ثانویه شیکوریک‌اسید در سرخارگل تحقیقات زیادی در کشت درون شیشه‌ای گیاه سرخارگل صورت گرفته است. اولین ترانسفورماسیون^۱ ریشه‌های موئین گیاه سرخارگل به وسیله آگروباکتریوم رایزونژ توسط تریپسین و همکاران ۱۹۹۱ گزارش شد (تریپستین و همکاران، ۱۹۹۱). چین و همکاران در سال ۲۰۰۶ با کمک سه سویه آگروباکتریوم رایزونژ در ریزنمونه‌های دمبرگ و برگ قابلیت انتقال ژن و تولید ریشه‌ی موئین را در گیاه سرخارگل مورد بررسی قرار دادند. درصد تراریختگی^۲ در ریزنمونه‌های برگی با سویه‌های R1000، A4 و R1601 به ترتیب ۴۰، ۶۰ و ۸۰ درصد و در ریزنمونه دمبرگ به ترتیب ۱۰، ۳۰ و ۴۵ درصد بود. بنابراین به این نتیجه رسیدند نوع سویه آگروباکتریوم رایزونژ و ریزنمونه‌های مختلف تأثیر بسزایی در تولید ریشه‌های موئین در گیاه سرخارگل دارد. در همین پژوهش مقدار ترکیبات فنولی و پلی‌ساکاریدی ریشه‌های موئین نسبت به شاهد به ترتیب ۱۶۳ درصد و ۳۳ درصد افزایش نشان داد (وانگ و همکاران، ۲۰۰۶). پژوهشی برای تعیین بهترین روش استخراج ترکیبات فنلی موجود در گیاه سرخارگل انجام شد که نتایج نشان داد که بهترین روش استفاده از حلال متانول: آب (۸۰:۲۰)، روش استخراج گرم (۲ ساعت در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد)، اندازه ذره‌ای ۳۰۰ میکرومتر و نسبت گیاه به حلال ۱:۲۰۰ می‌باشد (حاجی مهدی پور و همکاران، ۲۰۰۹). نوری و همکاران در سال ۱۳۹۳ تأثیر ۳ سویه 15834، A13 و A4 را بر القای ریشه موئین در ریزنمونه‌های برگ و هیپوکوتیل گیاه سرخارگل مورد بررسی قرار دادند که نتایج نشان داد سویه A4 سریع‌تر از بقیه قادر به القای ریشه موئین می‌باشد ولی از لحاظ فراوانی ترانسفورماسیون سویه A13 با ۸۰ درصد تراریختی بالاترین درصد را به خود اختصاص داد (نوری و همکاران، ۲۰۱۷).

¹ Transformation

² Transgenic

تیمار سلول‌های گیاهی با ایستور^۱های زیستی (پلیمرهای گلیکان، گلیکو پروتئین‌ها، اسیدهای ارگانیک کوچک و ترکیبات استخراج شده از سلول‌های قارچی) و غیرزیستی (امواج UV، US، نمک‌ها، فلزات سنگین و موادی هم‌چون اسیدسالیسیک، متیل‌جاسمونات، ایستورهای قارچی، نیترات‌نقره و انادیل سولفات) همواره یکی از موثرترین راهکارهایی است که سنتز متابولیت‌های ثانویه را افزایش می‌دهد (آتراشی و همکاران، ۲۰۱۱). در پژوهشی ترکیبات فنلی موجود در ریشه سرخارگل به وسیله تیمار با متیل‌جاسمونات افزایش یافت. ریشه‌ها با سه غلظت ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرومولار متیل‌جاسمونات تیمار شد و پس از ۱۰ روز مقدار فنل کل مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که بالاترین مقدار فنل در غلظت ۱۰۰ میکرومولار متیل‌جاسمونات به دست آمد. در این پژوهش محتوای شیکوریک‌اسید ریشه سرخارگل تحت تأثیر غلظت‌های مختلف متیل‌جاسمونات مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این مطالعه نشان داد که متیل‌جاسمونات می‌تواند شیکوریک‌اسید موجود در کشت‌های ریشه سرخارگل را بهبود دهد و بالاترین مقدار شیکوریک‌اسید در تیمار ۱۰۰ میکرومولار متیل‌جاسمونات به دست آمد (آقایی، ۲۰۱۲).

در پژوهشی دیگر اثر متیل‌جاسمونات و سالیسیلیک‌اسید بر الگوی بیان ژن و فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیا‌لیاز^۲ (PAL) در گیاه سرخارگل مورد بررسی قرار گرفت. در این تحقیق تغییرات بیان ژن و فعالیت آنزیم (PAL) در بافت ریشه و برگ ۱۲۰ روزه گیاه سرخارگل تحت ۳ تیمار (سالیسیلیک‌اسید ۲ میلی‌مولار، متیل‌جاسمونات ۲۰۰ میکرومولار و غلظت صفر) و ۴ زمان (صفر، ۲۴، ۴۸، ۱۲۰ ساعت) انجام شد. نتایج نشان داد که اثر متقابل دو فاکتور زمان و غلظت محرک برای بیان ژن و فعالیت آنزیم PAL در ریشه و فعالیت آنزیم PAL در برگ در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار است. تیمار توأم متیل‌جاسمونات ۲۰۰ میکرومولار و اسیدسالیسیلیک ۲ میلی‌مولار باعث افزایش معنی‌دار بیان ژن و فعالیت آنزیم PAL با گذشت ۱۲ ساعت بعد از تیماردهی در ریشه و هم‌چنین افزایش

^۱elicitor

^۲ Phenylalanine ammonia lyase (PAL)

فعالیت آنزیم PAL در برگ می‌گردد. این افزایش بیان و فعالیت آنزیم PAL در زمان ۴۸ ساعت و با تیمار سالسیلیک‌اسید ۲ میلی‌مولار بیشترین مقدار را نشان داد (ملاپور و همکاران، ۲۰۱۵).

در پژوهشی دیگر عباسی و همکاران (۲۰۰۷) تأثیر نور بر فعالیت آنزیم PAL و مقدار تجمع مشتقات کافئیک‌اسید را در سرخارگل مورد بررسی قرار دادند بررسی آن‌ها نشان داد مقدار فعالیت ژن مذکور با مقدار تجمع شیکوریک اسید همبستگی نزدیکی دارد. نور بر مورفولوژی ریشه‌های موئین تأثیر گذاشت و پس از گذشت ۳۵ روز که ریشه در معرض نور قرار گرفته لایه بیرونی آن به رنگ بنفش درآمد، همچنین ریشه‌هایی که در معرض نور بودند قطر بیشتری نسبت به ریشه‌های بخش تاریکی داشتند. نور نه تنها بر مورفولوژی بلکه بر سنتز متابولیت‌های ثانویه تأثیر گذاشته و به خوبی مشخص شد که افزایش فعالیت PAL باعث افزایش شیکوریک اسید، کافتاریک‌اسید، کلروژنیک‌اسید نسبت به زمانی که ریشه‌ها در تاریکی بودند شده است. فردی^۱ و همکاران در سال ۲۰۰۹ پژوهشی انجام دادند که نتایج آن نشان داد نوع محیط کشت باعث افزایش هم‌زمان رشد ریشه‌های موئین و سنتز آلکامیدها در ریشه‌های موئین می‌شود. همچنین تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشدی بر رشد ریشه‌های موئین سرخارگل بررسی شد که بیشترین مقدار رشد ریشه‌های موئین و سنتز آلکامیدها با حضور ۴۰ میکرومولار جاسمونیک اسید به دست آمد (فردی و همکاران، ۲۰۰۹).

۲-۲ بررسی القای ریشه موئین و بیان ژن‌های PAL، 4CL و C4H در گیاهان دیگر

شجاعی و همکاران (۲۰۱۴) در مطالعه‌ای تأثیر ژن‌های rol به خصوص ژن rolB در ریشه‌زایی سه گیاه سرخارگل، سنبل الطیب و رازیانه مورد مطالعه قرار دادند. نتایج بدست آمده نشان داد که بهترین ریشه‌زایی در گیاه سنبل الطیب و در شرایط کشت ریزنمونه‌ها برگی در محیط کشت جامد MS صورت می‌گیرد و تلقیح باکتری بر روی گیاهچه‌های کامل تأثیری در القای ریشه‌زایی ندارد. در این تحقیق از سویه LBA4404 حامل هر سه ژن rolA، rolB و rolC و سویه A985 به عنوان شاهد

¹ Romero Ferdi

مثبت، اگروباکتریوم حامل ژن roIB (A847) و اگروباکتریوم حامل وکتور خالی (A826) به عنوان شاهد منفی استفاده شد. نتایج نشان داد در گیاه رازیانه ریزنمونه‌های برگ‌ی آغشته به باکتری‌های A985 و A847 بعد از گذشت ۵-۷ روز زرد و از بین رفتند. در ریزنمونه‌های سرخارگل تنها سویه A985 قادر به ریشه‌زایی بود. و در گیاهان سنبل الطیب بهترین نتیجه القای ریشه‌زایی مشاهده شد و دو هفته پس از آلودگی با سویه A985 ریشه‌های موئین مشاهده شد. در پژوهشی کبیر نتاج و همکارانش در سال ۱۳۹۱ از سویه‌های 11325، A4، A13 و 15834 برای القای ریشه موئین در گیاه کاسنی (*Cichorium intybus L.*) در سه محیط MS، LS و B5 استفاده شد نتایج نشان داد درحالی که هر سه سویه موفق به القای ریشه موئین شدند ولی سویه A13 و محیط MS بالاترین درصد تراریختی (۶۳.۱۵ درصد) را نشان دادند. سویه 11325 تنها موفق به ایجاد کالوس در محل زخم شد و درصد ریشه‌زایی در آن صفر در نظر گرفته شد و سویه‌های 15834 و A4 به ترتیب ۱۸.۲ و ۳۶.۴۷ درصد موفق به ریشه‌زایی در نمونه‌ها شدند. محیط کشت MS با ۴۵.۳۴ درصد بهترین ترکیب برای ریشه‌زایی در کاسنی را کسب کرد. در حالی که محیط LS ۳۵.۹۴ و محیط B5 ۲۲.۲۲ درصد کمترین میزان ریشه زایی را داشتند (کبیرنتاج و همکاران، ۲۰۱۳). در آزمایشی دیگر توسط شیرازی و همکاران در سال ۱۳۹۱ انجام شد از سویه AR15834 برای القای ریشه موئین در شیرین بیان (*Glycyrrhiza glabr L.*) استفاده شد و این سویه باعث القای ریشه موئین در این گیاه شد (شیرازی و همکاران، ۲۰۱۲). در گیاه برازمبل (*Karel Perovskia abrotanoides*) برای اولین بار تولید ریشه موئین و تاثیر استوسرینگون مورد مطالعه قرار گرفت. در این پژوهش از سه سویه R1000، TR105 و ATCC15834 در دو حالت استفاده یا عدم استفاده از ماده استوسرینگون استفاده شد. نتایج نشان داد بیشترین میزان تولید ریشه‌ی موئین پس از آلودگی با سویه ATCC15834 به دست آمد (۴۷.۳۳ درصد). سویه‌های R1000 و TR105 به ترتیب با ۳۸.۱۶ و ۲۸.۹۹ درصد موجب القای ریشه‌ی موئین گردیدند. استفاده از استوسرینگون در سویه‌ی ATCC15834 تولید ریشه‌ی موئین را به طرز معنی داری افزایش داد (۶۰.۹۹ درصد). در سویه‌های R1000 و TR105 نیز استفاده از استوسرینگون

موجب تقویت تولید ریشه‌ی موئین گردید (به ترتیب ۴۹.۴۹ و ۳۶.۳۳ درصد) (ابراهیمی و همکاران، ۲۰۱۵). در مطالعه‌ی افزایش بیان ژن آنزیم فنیل‌آلانیل‌آمونیا‌لیاز (PAL) در گیاه ریحان تحت تأثیر کیتوزان بررسی شد که نتایج حاصل از پژوهش نشان داد که بیان ژن PAL در مراحل مختلف برداشت روند کاهشی دارد به طوری که بیشترین مقدار بیان ژن PAL در یک روز پس از اعمال کیتوزان بوده و در روز پنجم پس از اعمال کیتوزان میزان بیان این ژن کاهش می‌یابد و کیتوزان نسبت به شاهد باعث افزایش معنی دار بیان ژن PAL گردیده است (نادری و همکاران، ۲۰۱۴). در پژوهشی که توسط دهقان و همکاران در سال ۲۰۱۴ انجام گرفت، گیاه گلرنگ به عنوان گیاهی دولپه از خانواده آستراسه با توجه به متابولیت‌های ثانویه با ارزش و مقاوم در برابر تنش‌های محیطی بیان دو ژن PAL و CHS (سنتاز کالکون)^۱ در تیمار با اسیدسالسیلیک مورد بررسی قرار گرفت. در این آزمایش از غلظت‌های ۰/۱ و ۱ میلی‌مولار اسیدسالسیلیک استفاده شد. نتایج نشان داد که هر دو ژن پاسخ متفاوتی به غلظت بالای اسیدسالسیلیک نشان می‌دهند. این دو ژن در مسیر تولید فنیل پروپانویید و فلاونوئید قرار دارند و این مسیر در مقاومت گیاه در شرایط بحرانی نقش دارند (دهقان و همکاران، ۲۰۱۴). در تحقیقی دیگر بیان ژن‌های ^۲C4H، PAL، ^۳4CL و ^۴TAT و تجمع رزمارینیک‌اسید و بتالیدوسپریمیک‌اسید^۵ در گیاه مریم گلی تحت تیمار متیل جاسمونات در غلظت ۰/۱ میلی‌مولار مورد بررسی قرار گرفت که نتایج نشان داد متیل جاسمونات باعث افزایش متابولیت رزمارینیک‌اسید از ۳/۲۵ به ۶/۰۲ درصد وزن خشک و افزایش از ۲/۹۴ درصد به ۱۹/۳ درصد بتالیدوسپریمیک‌اسید شد (ایکسیا و همکاران، ۲۰۰۹). در پژوهشی که توسط عبدخانی و همکاران در

^۱ Chalcone synthase

^۲ cinammate-4-hydroxylase enzyme (C4H)

^۳ 4-Coumarate-CoA ligase

^۴ Tyrosine aminotransferase

^۵ B Lithospermic acid

سال ۱۳۹۳ بر روی گیاه ریحان^۱ صورت گرفت، بیان ژن PAL و فعالیت آنزیم PAL در گیاه ریحان تحت تیمار هورمون‌های اسیدسالسیلیک، اسیدجیبرلیک و اسیدجاسمونیک با غلظت ۰/۱ میلی‌مولار در لیتر در مراحل رشدی گیاهچه‌ای، پیش گلدهی و گلدهی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان دهنده‌ی افزایش در مقدار بیان ژن و فعالیت آنزیم PAL در تیمار هورمون اسیدجاسمونیک در مرحله گلدهی بود. بیش‌ترین میزان بیان این ژن برای هورمون جاسمونیک اسید در مرحله گلدهی به دست آمد که نسبت به شاهد مربوطه ۱.۵۱ برابر افزایش نشان داد و این افزایش در سطح ۵ درصد معنی دار بود. هم‌چنین اسید جیبرلیک ۱.۴۷ و اسید سالسیک ۱.۴۱ واحد نسبت به شاهد افزایش یافت و در سطح ۵ درصد معنی دار بود (عبدخانی و همکاران، ۲۰۱۵). در مطالعه‌ای که توسط فخاری و شریفی ۱۳۹۲ انجام گرفت، تأثیر متیل جاسمونات بر مقدار تولید پودوفیلوتوکسین در دوره زمانی ۱، ۶، ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در کشت سلولی در کتان سفید^۲ بررسی شد. با توجه به نتایج، تفاوت معنی داری بین رشد سلول‌های تیمار شده نسبت به شاهد، در زمان‌های مختلف مشاهده نشد اما تولید پودوفیلوتوکسین تحت تأثیر متیل جاسمونات با گذشت زمان روند افزایشی داشت و پس از ۴۸ ساعت به ۰/۳۲ میلی‌گرم در وزن خشک رسید. برای درک عملکرد متیل جاسمونات بر مسیر بیوسنتز پودوفیلوتوکسین فعالیت آنزیم PAL بررسی شد. با افزودن متیل جاسمونات در روز ششم از دوره رشد، فعالیت آنزیم PAL، ۶ ساعت پس از تیمار به طور معنی داری نسبت به شاهد افزایش یافت که این افزایش مقدار ۲۴ و ۷۲ ساعت پس از تیمار نیز مشاهده شد. در صورتی که در ساعت‌های ۱۲، ۱ و ۴۸ ساعت پس از تیمار تفاوت معنی داری بین نمونه‌های تیمار و شاهد مشاهده نشد (شریفی و همکاران، ۲۰۱۴). در پژوهشی دیگر که توسط صمدی و همکاران ۱۳۹۳ انجام شد، اثر محرک‌های متیل جاسمونات و اسیدسالسیلیک بر فعالیت آنزیم PAL، محتوای فنولی و فلاونوئیدی کالوس در

^۱ *Ocimum basilicum* L

^۲ *Linum album*

کنگفرنگی^۱ مورد بررسی قرار گرفت. طبق نتایج حاصله تغییرات فعالیت آنزیم PAL، محتوای فنولی و فلاونوئیدی تحت تأثیر نسبت‌های مختلف محرک قرار گرفته و نسبت به هم همبستگی مثبت نشان دادند. حداکثر مقدار فنول کل و فلاونوئید در نمونه‌های تیمار شده با ۱۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات مشاهده شد و نسبت به شاهد افزایش سه برابری داشت. ولی با افزایش غلظت اسیدسالسیلیک از ۱۰۰ به ۲۵۰ میکرومولار اختلاف معنی داری مشاهده نشد. اثر متقابل اسیدسالسیلیک و متیل جاسمونات نیز کاملاً معنی‌دار بود به طوری که در غلظت‌های ۵۰ میکرومولار متیل جاسمونات همراه با ۱۰۰ میکرومولار اسیدسالسیلیک هم چنین ۵۰ میکرومولار اسیدسالسیلیک همراه با ۵۰ میکرومولار اسیدسالسیلیک حداکثر مقدار ترکیبات فنولی بدست آمد (صمدی و همکاران، ۲۰۱۵). در پژوهش دیگری که توسط مهرجردی و همکارانش بر روی گیاه درمنه صورت گرفت استفاده از متیل جاسمونات در یک دوره ۱ هفته‌ای بیان ژن PAL که در مسیر بیوسنتز آرتمیزینین درگیر می‌باشد افزایش داد (مهرجردی و همکاران، ۲۰۱۳).

¹ *Cynara scolymus* L.

فصل سوم

مواد و روش‌ها

۳-۱ محل و زمان اجرای پژوهش

این پژوهش در آزمایشگاه تحقیقاتی گیاهان دارویی دانشکده علوم پایه دانشگاه حکیم سبزواری در سال ۱۳۹۶-۱۳۹۵ انجام شد.

۳-۲ مواد و وسایل مورد استفاده

نیترات آمونیوم، پتاسیم نیترات، منیزیم سولفات ۷ آب، کلسیم کلرید ۲ آب، پتاسیم دی هیدروژن فسفات، منگنز سولفات روی ۷ آب، پتاسیم یدید، سدیم مولیبدات ۲ آب، سولفات مس ۵ آب، کلرید کبالت ۶ آب، آهن، نیکوتنیک اسید، تیامین هیدروکلرید، پیرو دکسین هیدروکلرید، میو اینوزیتول، ساکارز، آگار، عصاره مخمر، پپتون، سدیم کلراید، سدیم هیدروکسید، هیدروکلرید، اسید فسفوریک، ماده تحریک کننده استوسرینگون، آنتی بیوتیک سفوتاکسیم، آنتی بیوتیک ریفاپیپسین، اتانول، متانول، گلیسرول، تریس هیدروکلرید، سدیم دو دوسیل سولفات (SDS)، اتیلن دی آمین تتراستیک اسید (EDTA)، استات پتاسیم، مسترمیکس PCR خریداری از شرکت تکاپوزیست، آگارز، ladder 1 kb و ladder 100 pb سیناکلون، بافر رنگی، اتیدیوم بروماید، بی کربنات سدیم، متیل جاسمونات خریداری شده از شرکت سیگما (هند)، اسید سالیسیلیک، سدیم سیترات، سیتریک اسید، Dnase 1 buffer، Dnase ایزوپروپانول، آب DEPC، سدیم استات، اتانول خالص، ماده استاندارد شیکوریک اسید، کیت سنتز cDNA و سایبرگرین خریداری از شرکت یکتا تجهیز آزما، آغازگرهای مورد استفاده توسط شرکت دنازیست و شرکت ماکروژن کره سنتز شد. فالكون ۱۵ و ۵۰ میلی لیتری، فیلترسرنگی ۰٫۲۲ میکرون، نوک سمپلیر آبی، زرد و سفید کریستالی، ویال ۲، ۱٫۵ و ۰٫۲ میلی لیتر، پتری دیش یکبار مصرف و شیشه‌ای، شیشه کشت بذر

۳-۲-۱ میکروارگانیزم‌ها

سویه‌های باکتری آگروباکتریوم رایزوزنز شامل ATCC 15834، LBA 9402، A13 و A4 از پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان و پژوهشگاه ملی ژنتیک کرج تهیه شدند.

۳-۲-۲ محیط کشت MS

محیط کشت MS (موراشیک و اسکوگ، ۱۹۶۲)^۱ از متداول‌ترین محیط‌های مورد استفاده در کشت بافت گیاهی است. به منظور تهیه راحت و کوتاه مدت محیط کشت MS، ابتدا محلول‌های ذخیره (استوک) مربوط به عناصر ماکرو، میکرو، ویتامین‌ها و آهن با غلظت‌های ۱۰ برابر و ۱۰۰ برابر مطابق (جدول ۳-۱) تهیه شدند.

۳-۳ کشت بذر و تهیه ریز نمونه

بذرهای گیاه سرخارگل (*Echinacea purpurea*) از شرکت پاکان بذر^۲ اصفهان تهیه شد. برای شکستن خواب بذر به مدت ۴ روز در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. بذرهای سرخارگل در الکل اتیلیک ۷۰ درصد به مدت ۲ دقیقه و در محلول وایتکس تجاری ۲۰ درصد (هیپوکلریت سدیم ۱ درصد) به مدت ۱۰ دقیقه و سپس ۵ بار با آب مقطر استریل و هر بار به مدت ۴ دقیقه شستشو داده شدند. پس از ضدعفونی، بذور در محیط کشت جامد MS فاقد هورمون کشت شدند. کشت‌ها در اتاقک رشد با شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. جوانه‌زنی بعد از یک هفته شروع شد. پس از رشد گیاهچه، از برگ و هیپوکوتیل از گیاهان ۲۰-۳۰ روزه به عنوان ریزنمونه استفاده شدند، بدین منظور ابتدا قیچی، اسکالپل، پنس و پلیت‌های شیشه‌ای به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد با فشار بالای بخار آب اتوکلاو (ساخت شرکت ریحان طب، ایران) شدند.

¹ Murashige and SKoog (1962)

² www.pakanbazzr.com

سپس هود لامینار (ساخت شرکت جلاتجهیز ایران) توسط الکل اتیلیک ۷۰ درصد ضد عفونی و لامپ UV به مدت ۲۰ دقیقه روشن شد. بعد از ضد عفونی هود انتقال ریزنمونه‌ها به پلیت صورت گرفت.

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

Constituent	Concentration in MS medium (mg/l)	Concentration in the stock solution (mg/l)	Volume to be taken/Liter of medium (ml)
Macronutrient (10x)			۱۰۰
NH ₄ NO ₃	۱۶۵۰	۱۶۵۰۰	
KNO ₃	۱۹۰۰	۱۹۰۰۰	
MgSO ₄ .7H ₂ O	۳۷۰	۳۷۰۰	
CaCl ₂ .2H ₂ O	۴۴۰	۴۴۰۰	
KH ₂ PO ₄	۱۷۰	۱۷۰۰	
Micronutrient (100x)			
H ₃ BO ₃	۶.۲	۶۲۰	۱۰
MnSO ₄ .4H ₂ O	۲۲.۳	۲۲۳۰	
ZnSO ₄ .7H ₂ O	۸.۶	۸۶۰	
KI	۰.۸۳	۸۳	
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	۰.۲۵	۲۵	
CuSO ₄ .5H ₂ O	۰.۰۲۵	۲.۵	
CoCL ₂ .6H ₂ O	۰.۰۲۵	۲.۵	
Fe.EDTA-Na salt	۴۰	Add fresh	
Vitamins			
Nicotinic acid	۰.۵	۵۰ mg/ ۱۰۰ ml	۱
Thiamine HCL	۰.۱	۵۰ mg/ ۱۰۰ ml	۰.۲
Pyridoxine HCL	۰.۵	۵۰ mg/ ۱۰۰ ml	۱
Myo-inositol	۱۰۰	Add fresh	
Sucrose	۳۰۰۰۰	Add fresh	
Agar	۸۰۰۰	Add fresh	
pH	۵.۸		

۳-۴ تهیه محیط کشت باکتری

از محیط کشت مایع و جامد LB برای کشت باکتری استفاده شد. برای نگهداری کوتاه مدت و واکشت باکتری‌ها از محیط کشت LB جامد استفاده شد. برای کشت سوسپانسیون باکتری، از کشت‌های جامد تک‌کلونی گرفته شد و در محیط کشت LB مایع حاوی آنتی بیوتیک ریفامپسین کشت گردید.

برای تهیه یک لیتر محیط LB، عصاره مخمر ۵ گرم، سدیم کلراید ۱۰ گرم و پپتون ۱۰ گرم اضافه شد و pH محیط با سود یک نرمال و اسیدکلریک یک نرمال روی عدد ۷ تنظیم شد و در صورت نیاز به محیط کشت LB جامد، ۱۰ گرم در لیتر آگار بعد از تنظیم pH اضافه شد. محیط تهیه شده به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد اتوکلاو گردید.

۳-۴-۱ تهیه ذخیره^۱ باکتری

هریک از ۴ سویه باکتریایی در محیط کشت LB جامد به مدت ۲۴ ساعت کشت شد. به وسیله آنس استریل از هر یک از سویه‌ها برداشته و در ۱۵ میلی‌لیتر محیط LB مایع حاوی آنتی بیوتیک ریفامپسین (به جز سویه A13) کشت شد. سپس به مدت ۲۴ ساعت در دستگاه انکوباتور (ساخت شرکت Scientific، کشور استرالیا) با دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و سرعت ۱۸۰ دور در دقیقه هوادهی شد. برای تهیه ذخیره باکتری محلول گلیسرول دوبار اتوکلاو شد. پس از آن محیط حاوی باکتری به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۵۰۰۰ rpm سانتریفیوژ انجام شد سپس محلول رویی از هر سویه برداشته و به رسوب گلیسرول افزوده شد. به وسیله محلول رویی که در واقع محیط کشت باکتری بوده، حجم نهایی استوک به ۱ میلی‌لیتر رسانده شد و در فریزر (ساخت شرکت امرسان، ایران) ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

¹ stock

۳-۴-۲ تهیه محلول ذخیره آنتی بیوتیک و دیگر ترکیبات مورد نیاز جهت تراریختی

به منظور تهیه ذخیره آنتی بیوتیک ریفامپسین^۱، ۵۰ میلی گرم از پودر آنتی بیوتیک در یک میلی لیتر آب مقطر حل و توسط فیلتر استریل شد و استوک تهیه شده در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری گردید. آنتی بیوتیک مورد نظر در حالی که دمای محیط کشت LB اتوکلاو شده تا حدود ۶۰ درجه سانتی گراد سرد شده بود به آن افزوده شد. غلظت آنتی بیوتیک در محیط کشت باید ۵۰ میلی گرم بر لیتر باشد. برای کسب این غلظت، به ازای هر میلی لیتر محیط کشت، یک میکرو لیتر از استوک آنتی بیوتیک با آن مخلوط شد.

محلول استوک آنتی بیوتیک سفوتاکسیم^۲: این آنتی بیوتیک از داروخانه تهیه شد. مقدار ۵۰۰ میلی گرم از این ماده در ۵ میلی لیتر آب دیونیزه حل و سپس از فیلتر استریل عبور داده شد.

محلول استوک استوسرینگون^۳: برای تهیه این محلول ۵۰ میلی گرم از این ترکیب در یک میلی لیتر آب مقطر استریل حل شد. سپس این محلول توسط فیلتر ۰/۲۲ میکرون فیلتر شده و در فریزر ۲۰- درجه حداکثر تا یک ماه نگهداری شد.

۳-۴-۳ تهیه سوسپانسیون باکتری آگروباکتریوم رایزوژنز

برای تهیه کشت سوسپانسیونی، یک کلونی از باکتری آگروباکتریوم رایزوژنز، سویه های ATCC LBA9402، 15834، A13 و A4 کشت شده در محیط کشت جامد LB در شرایط استریل برداشته شد و در ۱۰ میلی لیتر محیط کشت مایع LB دارای ۵۰ میلی گرم در لیتر آنتی بیوتیک ریفامپسین (بجز سویه A13 به دلیل حساسیت به این آنتی بیوتیک) کشت داده شد. در مرحله بعد LB مایع

¹Rifampicini

²Cefotaxime

³Acetosyringone

آغشته به باکتری به انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد منتقل شد و در دستگاه شیکر با سرعت ۱۸۰ دور در دقیقه به مدت ۲۴ ساعت در شرایط تاریکی قرار گرفت، تا باکتری رشد کرده و فعال شود. بعد از سپری شدن این مدت، غلظت سوسپانسیون باکتری با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری در طول موج ۶۰۰ نانومتر تعیین شد. برای تراریختی جذب نوری محیط در طول موج ۶۰۰ نانومتر بین ۰/۵-۰/۴ تنظیم گردید به این منظور با ۳۸۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. سپس رسوب باکتری همراه با ۱۰ میلی‌لیتر محیط MS نیم غلظت مایع و ۱۰۰ میکرومولار استوسرینگون برای تلقیح ریزنمونه‌های گیاهان مورد استفاده قرار گرفت.

۳-۵-۵ تلقیح ریزنمونه‌های سرخارگل با باکتری

ریزنمونه‌های برگ و هیپوکوتیل به مدت ۵ دقیقه در سوسپانسیون باکتری قرار گرفتند. بعد از حذف سوسپانسیون اضافی باکتریایی اطراف ریزنمونه‌ها با استفاده از کاغذ صافی، ریزنمونه‌ها به محیط کشت MS ۱/۲ جامد منتقل شدند و به مدت ۴۸ ساعت در اتاقک رشد، در دمای 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. تعدادی ریز نمونه نیز به عنوان شاهد به همین روش آماده شدند با این تفاوت که به جای سوسپانسیون باکتری به مدت ۵ دقیقه در آب مقطر استریل قرار گرفتند و سپس در شرایط یکسان با نمونه‌های تلقیحی کشت و نگهداری شدند. این آزمایش برای هر سویه باکتری در سه تکرار در ریزنمونه برگ و سه تکرار در ریزنمونه هیپوکوتیل در قالب آزمایش فاکتوریل بر پایه کاملاً تصادفی انجام و داده‌ها با نرم افزار spss آنالیز شد.

۳-۵-۱-۵ انتقال ریزنمونه‌های سرخارگل به محیط کشت دارای آنتی‌بیوتیک

۴۸ ساعت بعد از هم‌کشتی، برای حذف باکتری، ریزنمونه‌ها ۲-۳ مرتبه با آب مقطر استریل شستشو شدند و بر روی کاغذ صافی استریل قرار گرفتند. بعد از حذف آب اضافی، ریزنمونه‌ها به محیط MS نیم غلظت دارای ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم منتقل شدند. برای حذف کامل باکتری در

واکشت‌های بعدی از غلظت‌های پایین تر (۴۰۰-۳۰۰-۲۰۰-۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) سفوتاکسیم استفاده گردید. واکشت ریزنمونه‌ها هر ۱۰ روز انجام شد. تولید ریشه‌های موئین در این مرحله مشاهده گردید.

۳-۵-۲ ظهور ریشه‌های موئین

پس از انتقال ریز نمونه‌ها به محیط دارای سفوتاکسیم، مشاهدات روزانه برای بررسی ظهور ریشه‌های موئین، در ریز نمونه‌های تلقیح شده با باکتری انجام شد. بعد از رشد کافی و مطلوب ریشه‌ها، برای آزمایشات گوناگون از جمله: تأیید تراریختی ریشه‌های ایجاد شده، مقدار تولید متابولیت‌های ثانویه در ریشه‌های موئین و تأثیر تیمار با محرک‌ها در میزان شیکوریک اسید و بیان ژن‌های PAL، C4H و 4CL مورد استفاده قرار گرفتند.

۳-۵-۳ بررسی فراوانی تولید ریشه‌های موئین

برای بدست آوردن فراوانی تولید ریشه‌های موئین در ریزنمونه‌های متفاوت و همچنین مقایسه آن با نمونه شاهد از فرمول زیر استفاده گردید.

$$\text{فرمول ۳-۱:} \quad \text{فراوانی تراریختی} = \frac{\text{تعداد نمونه‌های مولد ریشه}}{\text{تعداد کل ریزنمونه‌های تلقیح شده}} * 100$$

۳-۶ تأیید تراریختی ریشه‌های موئین سرخارگل از طریق PCR

برای تأیید تراریختی ریشه‌های موئین ابتدا استخراج DNA به شرح زیر صورت گرفت. پیش از استخراج DNA همه وسایل از جمله ویال، سر سمپلر اتوکلاو گردید. هنگام استخراج از دستکش استفاده شد و مکان استخراج با الکل ۷۰ درصد استریل گردید.

استخراج DNA از ریشه‌های موئین و طبیعی گیاه بر پایه روش ادوارد^۱ و همکاران (۱۹۹۱) به صورت زیر انجام گرفت (ادوارد و همکاران، ۱۹۹۱).

الف- محلول‌های مورد نیاز

بافر استخراج شامل (تریس ۲۰۰ میلی‌مولار با pH=۷.۵، کلرید سدیم ۲۵۰ میلی‌مولار، اتیلن دی‌آمین تترا استیک اسید (EDTA) ۲۵ میلی‌مولار، سدیم دودسیل سولفات (SDS) ۰/۵ درصد، ایزوپروپانول. بافر TE شامل: (تریس ۱۰ میلی‌مولار با pH=۸، اتیلن دی‌آمین تترا استیک اسید (EDTA) ۱ میلی‌مولار با pH=۸).

ب- روش کار:

ابتدا به مقدار ۱۰۰ میلی‌گرم نمونه گیاهی از محیط کشت جدا شد و بعد از شستشو با آب مقطر استریل بر روی دستمال کاغذی استریل خشک گردید. و درون یک ویال ۱/۵ میلی‌لیتری قرار داده شد. از ریزه‌آون (میکروپیستیل) برای کوبیدن نمونه استفاده شد. سپس ۴۰۰ میکرولیتر بافر استخراج به نمونه‌ها اضافه شد و به مدت ۱ دقیقه هم‌زده شد تا یک محلول هموزن بدست بیاید. در مرحله بعد ۱۵۰ میکرولیتر استات پتاسیم ۳ مولار اضافه شد و به آرامی تکان داده شد. سپس به مدت ۲ دقیقه در دمای اتاق با سرعت ۱۳۰۰۰rpm سانتریفیوژ شد و محلول رویی به ویال جدید انتقال پیدا کرد. سپس به مقدار ۵۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول سرد افزوده و مخلوط کردن انجام شد و ۱۰-۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه و سانتریفیوژ با سرعت ۱۳۰۰۰rpm به مدت ۲ دقیقه در دمای اتاق تکرار شد. در مرحله شستشو به مقدار ۳۰۰ میکرولیتر اتانول ۸۰ درصد اضافه و مجدداً سانتریفیوژ به مدت ۲ دقیقه در دمای ۱۳۰۰۰ rpm در دمای اتاق صورت گرفت. روشناور حذف شده و تیوپ به صورت وارونه برای مدت کوتاهی بر روی دستمال کاغذی قرار گرفت. سپس رسوب به طور کامل در ۲۰ میکرولیتر بافر TE حل شد.

¹ Edwards

۳-۷-۱ تعیین غلظت DNA ژنومی ریشه‌ها با نانودراپ

برای بررسی کمیت DNA جذب نوری نمونه‌ها در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر با استفاده از دستگاه نانودراپ (ساخت شرکت Thermo Scientific، کشور آمریکا) انجام شد. در این روش در صورتی نسبت جذب نوری DNA ژنومی ریشه‌های مورد نظر بین ۲-۱/۸ باشد، نشان‌دهنده کیفیت مطلوب DNA استخراج شده است. در صورتی که نسبت جذب کمتر از ۱/۸ باشد، بیانگر وجود بیش از حد پروتئین و سایر ناخالصی‌های جاذب اشعه‌های ماورای بنفش می‌باشد.

۳-۸-۱ تهیه بافر TAE(1X)

۲۴۲ گرم تریس در ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد. ۱۰۰ میلی‌لیتر Na-EDTA نیم مولار که pH=۸ دارد به آن اضافه شد سپس ۵۷/۱ میلی‌لیتر استیک اسید اضافه و به کمک آب مقطر حجم نهایی محلول به یک لیتر رسانده شد. این محلول بافر TAE (50x) است. با افزودن ۹۸۰ میلی‌لیتر آب مقطر به هر ۲۰ میلی‌لیتر این محلول، بافر TAE (1x) به دست می‌آید که برای انجام الکتروفورز (ساخت شرکت پایاپژوهش، ایران) قابل استفاده است.

۳-۸-۲ تهیه ژل آگارز و الکتروفورز محصولات PCR

برای تهیه ژل ۱ درصد، ۰/۳ گرم آگارز وزن شد و در ۳۰ میلی‌لیتر بافر TAE (1X) حل شد. آگارز به وسیله حرارت شعله در بافر حل شد. سپس محلول تا دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد سرد شد. ۱۰ میکرولیتر محلول اتیدیوم بروماید^۱ (10 mg/ml) به آن افزوده و مخلوط شد. سپس در قالب ژل الکتروفورز ریخته شد. پس از قرار دادن شانه چاهک و سرد شدن و بستن ژل، ژل درون تانک حاوی بافر قرار داده شد. در اولین چاهک ۳ میکرولیتر از DNA ladder 1kb ریخته شد. از هر یک از محصولات PCR، ۱۰ میکرولیتر به همراه ۰/۵ میکرولیتر بافر رنگی برداشته و در چاهک‌های ژل

¹ Ethidium bromide

بارگذاری شد. نمونه‌ها به مدت ۶۰ دقیقه با ولتاژ ۴۵ ولت، الکتروفورز شد. سپس ژل در دستگاه ژل داک^۱ قرار داده شد. تصویر آن مشاهده و ذخیره شد.

۳-۸-۳ الکتروفورز DNA ژنومی استخراج شده از ریشه‌ها

برای بررسی کیفیت DNA از نظر شکستگی رشته DNA یا وجود آلودگی RNA از الکتروفورز ژل افقی استفاده شد به این منظور ابتدا ژل آگارز ۱ درصد تهیه گردید و در سینی مخصوص الکتروفورز^۲ ریخته شد. پس از خنک شدن ژل و ایجاد چاهک‌های مورد نظر، سینی حاوی ژل در تانک الکتروفورز قرار گرفت. ژل تا حدود ۰/۵ سانتی‌متر بالای آن، در بافر TAE (1X) غوطه ور شد. ۳ میکرولیتر از مارکر DNA در چاهک اول ریخته شد. سپس بارگذاری محصولات DNA در چاهک‌های بعدی انجام گرفت. برای هر نمونه ۵ میکرولیتر از محصول استخراج DNA همراه با ۲ میکرولیتر بافر بارگذاری در چاهک‌ها جداگانه تزریق شد. تانک به دستگاه تأمین‌کننده جریان الکتریکی با ولتاژ ۷۰ ولت متصل گردید. پس از یک ساعت، ژل در دستگاه عکسبرداری از ژل^۳ قرار داده شد و به وسیله اشعه ماورای بنفش مشاهده گردید.

۳-۹ استخراج پلاسمید از باکتری آگروباکتریوم رایزوزنز

به منظور استفاده از DNA پلاسمید به عنوان شاهد مثبت در PCR عمل استخراج پلاسمید از باکتری به روش تغییر یافته سامبروک^۴ و همکاران، (۲۰۰۱) به ترتیب زیر انجام شد (سامبروک و همکاران، ۱۹۸۹).

¹ Gel Documentation System

² Electrophoresis

³ Gel doc

⁴ Sambrook

- محلول I (GTE buffer): شامل گلوکز ۵۰ میلی‌مولار، تریس ۲۵ میلی‌مولار با $\text{pH} = 8$ ، اتیلن دی‌آمین تترااستیک اسید (EDTA) ۱۰ میلی‌مولار با $\text{pH} = 8$
- محلول II (Alkaline buffer): ۶۰ میلی‌لیتر استات پتاسیم ۵ مولار، ۱۱/۵ میلی‌لیتر اسیداستیک خالص، ۲۸/۵ میلی‌لیتر آب مقطر
- محلول III: استات سدیم ۳ مولار
- ایزوپروپانول
- اتانول ۹۶ درصد
- بافر TE شامل: تریس ۱۰ میلی‌مولار با $\text{pH} = 8$ ، اتیلن دی‌آمین تترااستیک اسید (EDTA) ۱ میلی‌مولار با $\text{pH} = 8$

روش کار:

کشت آگروباکتریوم رایزوزنز در محیط LB مایع حاوی آنتی بیوتیک ریفامپسین به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور شیکردار با سرعت ۱۸۰ rpm صورت گرفت سپس ویال‌های ۱/۵ میلی‌لیتری از محیط کشت حاوی باکتری پر شده و ۱۰ دقیقه با دور ۳۰۰۰ rpm در ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. محلول روشن‌تر حذف و ویال‌ها به صورت وارونه بر روی دستمال کاغذی قرار گرفت تا در حد امکان خشک شود. در مرحله بعد ۲۰۰ میکرولیتر از محلول شماره ۱ سرد شده به رسوب اضافه گردیده و پس از ورتکس کردن، ۵ دقیقه در حد امکان خشک شود. سپس ۴۰۰ میکرولیتر از محلول شماره ۲ تازه تهیه شده به تیوپ اضافه شد و به آرامی مخلوط و به مدت ۵ دقیقه بر روی یخ قرار گرفت. ۳۰۰ میکرولیتر از محلول شماره ۳ سرد شده به ویال‌ها اضافه شد. در این مرحله توده ابرمانندی در داخل ویال تشکیل گردید که تا حد امکان از ویال خارج شد. در ادامه ویال برای ۲۰ دقیقه روی یخ قرار گرفت و به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۳۰۰۰ rpm در ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. سپس ۶۰۰ میکرولیتر از محلول بالایی به تیوپ جدید منتقل گردید. به تیوپ ۶۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول اضافه

شد از آنجایی که ایزوپروپانول یک رسوب دهنده قوی است بهتر است دمای آن پایین نباشد تا از رسوب بیش از حد پروتئین‌ها جلوگیری شود. پس از ورتکس کردن، تیوپ به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت. ویال‌ها به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۳۰۰۰ rpm در ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. روشناور حذف شده و رسوب در ۲۰۰ میکرولیتر آب دیونیزه حل شد. ۵۰۰ میکرولیتر اتانول خالص و ۲۰ میکرولیتر استات سدیم ۳ مولار اضافه شد و پس از ورتکس کردن، به مدت ۱ ساعت در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. ویال‌ها به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۳۰۰۰ rpm در ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شده و رسوب حاصله در ۵۰ میکرولیتر بافر TE حل گردید و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

۳-۱۰ آزمون PCR برای تأیید تراریختی ریشه‌های موئین سرخارگل

ریشه‌های موئین حاصل از انتقال T-DNA پلاسمید Ri اگروباکتریوم رایزوژنز به سلول‌های گیاهی می‌باشد. تایید تراریختی ریشه‌های موئین می‌توان با ردیابی ژن‌های موجود بر T-DNA این باکتری که مهم‌ترین آن‌ها ژن‌های roIA، roIB و roIC می‌باشند، انجام داد. برای این منظور از روش‌های مختلفی استفاده می‌شود، که مهم‌ترین آن‌ها استفاده از تکنیک PCR است. در این تحقیق برای تایید مولکولی ریشه‌های موئین تراریخت از تکنیک PCR بر روی ریشه‌های موئین با آغازگرهای اختصاصی تکثیر ژن roIB استفاده شد. DNA های استخراج شده با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن roIB (طراحی شده توسط کبیرنتاج و همکاران، ۲۰۱۳) با توالی‌های (جدول ۳-۲) تکثیر شد (کبیرنتاج و همکاران، ۲۰۱۳).

مواد مورد نیاز جهت انجام واکنش PCR یک میکرولیتر از هر آغازگر، ۱۲.۵ میکرولیتر Master mix PCR و یک میکرولیتر DNA بود که با آب مقطر استریل به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. به تیوپ کنترل منفی از نمونه DNA استخراج شده از نمونه شاهد اضافه شد و کنترل مثبت هم DNA پلاسمید باکتری بود. شرایط دمایی PCR شامل واسرشته سازی اولیه DNA به مدت ۵ دقیقه

در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، واسرشته سازی DNA الگو به مدت ۳۰ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، اتصال آغازگر به DNA تک رشته‌ای به مدت ۴۵ ثانیه در ۵۵ درجه سانتی‌گراد و بسط آغازگر ۴۵ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و بسط نهایی ۷ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و با استفاده از دستگاه ترموسایکلر شرکت Corbet ساخت کشور هلند انجام شد. محصولات PCR را می‌توان در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری نمود.

جدول ۳-۲: توالی آغازگرهای اختصاصی ژن rolB

آغازگر	توالی پرایمر	دمای اتصال	طول قطعه تکثیری
	5'.....3'		
آغازگر پیشرو	GCTCTTGCAGTGCTAGATTT	۵۵	۴۳۰ bp
آغازگر برگشتی	GAAGGTGCAAGCTACCTCTC		

۳-۱۰ استفاده از محرک‌ها برای بررسی تغییر میزان ماده مؤثر شیکوریک‌اسید در گیاه سرخارگل

۳-۱۰-۱ افزودن محرک‌ها به محیط کشت ریشه‌های موئین

به منظور بررسی تأثیر محرک‌ها در میزان بیان ژن و تولید ماده مؤثره شیکوریک‌اسید از محرک‌های متیل‌جاسمونات و اسیدسالسیلیک استفاده شد. از متیل‌جاسمونات در ۴ غلظت مختلف (۱۰۰-۲۰۰-۵۰-۰ میکرومولار) و از اسیدسالسیلیک هم در ۴ غلظت متفاوت (۵۰-۱۲۵-۲۵۰-۵۰۰ میکرومولار) استفاده شد. نمونه‌گیری ۷۲ ساعت بعد از اعمال تیمار انجام شد. هر غلظت به عنوان یک تیمار محسوب شد. به منظور افزودن هر یک از محرک‌ها به محیط‌های کشت مورد نظر، ابتدا از هر یک از محرک‌ها استوک تهیه شد و غلظت مورد نظر از استوک برداشته شد و به محیط کشت اضافه گردید.

۳-۱۰-۱ استوک اسیدسالیسیک

جهت تهیه استوک اسیدسالیسیک، ابتدا ۶۹٫۰۶ میلی گرم از اسیدسالیسیک در NaOH یک نرمال حل شد و سپس با آب مقطر به حجم ۱۰ میلی لیتر رسانده و pH آن روی ۵٫۸ تنظیم گردید. برای استریل کردن محلول ساخته شده از فیلتر ۰٫۲ میکرون استفاده شد و غلظت‌های مورد نظر از استوک برداشته و به محیط‌ها افزوده شدند.

۳-۱۰-۲ استوک متیل جاسمونات

۰٫۰۲۲۹ میلی لیتر متیل جاسمونات در اتانول ۱۰۰ درصد حل شده و با آب مقطر به حجم ۱۰ میلی لیتر رسانده شد و پس از عبور از فیلتر، غلظت‌های مورد نظر از استوک برداشته شده و به هر یک از محیط‌های کشت اضافه گردیدند.

برای اعمال تیمار ریشه‌ها به محیط ۱٫۲MS مایع انتقال داده شد و ریشه‌ها به مدت ۷۲ ساعت در محیط حاوی محرک‌ها قرار گرفتند.

جدول ۳-۳: مشخصات اسیدسالیسیک و متیل جاسمونات

نام حلال	وزن مولکولی	فرمول شیمیایی	محرک
اتانول	۲۲۴/۳g/mol	C ₁₃ H ₂₀ O ₃	متیل جاسمونات
سود	۱۳۸/۱۲g/mol	C ₇ H ₆ O ₃	اسیدسالیسیک

بخش دوم: آنالیز بیان ژن

۳-۱۱ استخراج RNA

ابتدا تمام وسایل مورد نیاز از جمله نوک سمپلیرها و ویال دو مرتبه اتوکلاو شد. میزکار با الکل ۷۰ درصد و H₂O₂ ضدعفونی گردید. در هنگام استخراج از دستکش لاتکس و ماسک استفاده شد.

استخراج RNA با استفاده از پرتکل زیر انجام شد (انتاسانچز و همکاران، ۲۰۰۸).

الف- محلول‌ها و مورد استفاده:

محلول شماره I شامل: سدیم‌دودسیل‌سولفات (SDS) ۲ درصد، ۶۸ میلی‌مولار سدیم‌سیترات، ۱۳۲ میلی‌مولار سیتریک‌اسید و ۱ میلی‌مولار اتیلن‌دی‌آمین‌تترااستیک‌اسید (EDTA).

محلول شماره II شامل: NaCl ۴ مولار، ۱۶ میلی‌مولار سدیم‌سیترات، و ۳۲ میلی‌مولار سیتریک‌اسید. ایزوپروپانول، اتانول ۱۰۰ درصد، اتانول ۷۰ درصد، DEPC، بافر Dnase1 و Dnase10x، آمونیوم‌استات.

ب- روش کار

ابتدا ۳۰ میلی‌گرم از نمونه گیاهی در ویال ۱٫۵ میلی‌لیتری قرار داده شد و ۳۰۰ میکرولیتر از محلول شماره I اضافه و با کمک میکروپیستیل کوبیده شد. به مدت کوتاهی ورتکس شد تا همگن شود و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد، سپس از محلول شماره II به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر اضافه و به آرامی به مدت چند ثانیه تکان داده شد. به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس محلول حاصل به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰rpm دور در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید. محلول رویی به ویال جدید انتقال یافت و ۳۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول سرد به آن اضافه گردید و به مدت ۵ دقیقه بر روی یخ نگهداری شد. به مدت ۴ دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰rpm در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ انجام شد و محلول رویی حذف گردید و با اتانول ۷۰ درصد شستشو انجام شد و رسوب در ۲۵ میکرولیتر آب دیپس حل گردید برای حذف DNA به مقدار ۳ میکرولیتر بافر Dnase(10x) و ۲ میکرولیتر Dnase اضافه گردید، و در دمای ۳۷ درجه به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شد، به مقدار ۷۰ میکرولیتر DEPC به ۳۰ میکرولیتر RNA اضافه گردید. سپس ۵۰ میکرولیتر محلول آمونیوم‌استات و ۴۰۰ میکرولیتر اتانول ۱۰۰ درصد اضافه گردید. به مدت ۲۰

دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰rpm در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید. با ۱ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد شستشو صورت گرفت و بر روی دستمال کاغذی استریل خشک شد و در ۲۰ میکرولیتر آب دیپس^۱ حل گردید.

۳-۱۱-۱ تعیین کمیت و کیفیت RNA استخراج شده با دستگاه نانودراپ

برای بررسی کمیت و خلوص RNA استخراج شده از دستگاه نانودراپ شرکت Thermo scientific استفاده شد (نسبت ۲۶۰ به ۲۸۰ نشان دهنده آلودگی‌های پروتئینی و نسبت ۲۶۰ به ۲۳۰ جهت بررسی مقدار آلودگی‌های مواد معلق و قندهای محلول RNA استخراج شده توسط دستگاه محاسبه گردید). از آب DEPC برای صفر کردن دستگاه استفاده شد و دو میکرولیتر از نمونه‌های RNA استخراج شده برای اندازه‌گیری روی حسگر دستگاه قرار داده شد. همچنین برای تعیین کیفیت و یکپارچگی RNA استخراج شده از ژل آگارز ۲ درصد استفاده شد.

۳-۱۲ واکنش ساخت cDNA

cDNA با استفاده از کیت سنتز cDNA (شرکت یکتا تجهیز آزما) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده ساخته شد. ابتدا ۱ میکروگرم RNA به داخل هر ویال ریخته شد. به هر تیوپ یک میکرولیتر آغازگر oligodt (۵۰ میکرومولار) و با DEPC به حجم ۱۳/۴ میکرولیتر رسانده شد. به آرامی مخلوط کرده و اسپین شد. سپس در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انکوبه شد. در مرحله بعدی ۴ میکرولیتر از 5x first-strand buffer و یک میکرولیتر d NTPs(10 mμ) و نیم میکرولیتر RNasin (400 U/μL) و یک میکرولیتر M-MLV اضافه و به آرامی مخلوط و اسپین صورت گرفت. سپس ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. و در مرحله آخر در دمای ۷۰ درجه به مدت ۵ دقیقه انکوبه شد.

¹ Water DEPC (Diethyl pyrocarbonate)

۳-۱۳ طراحی آغازگرها برای واکنش Real Time PCR

به منظور بررسی تغییر در مقدار رونوشت ژن‌های PAL، 4CL و C4H در زمان واقعی (qRT-PCR)، آغازگرها برای ژن‌های مورد نظر با استفاده از برنامه Gene runner طراحی و جهت سنتز به شرکت ماکروژن ارسال گردید. سعی شد در طراحی آغازگرها طول آغازگر، درصد GC (۴۰ تا ۶۰ درصد)، مکمل بودن آغازگرها باهم، اختصاصی بودن و احتمال تشکیل حلقه مورد توجه قرار گیرد. غلظت پایه آغازگرها پس از سنتز، ۱۰۰ پیکومول بر میکرولیتر بود که توسط آب استریل به غلظت ۱۰ پیکومول بر میکرولیتر رسید. از ژن GAPDH گیاه سرخارگل نیز به عنوان ژن مرجع استفاده شد (جدول ۳-۴).

۳-۱۴: تأیید پرایمرهای طراحی شده با کمک آزمون PCR

با هدف تأیید عملکرد صحیح و تعیین محدوده دمای بهینه فعالیت پرایمرها و تأیید ساخت cDNA مخلوط واکنش PCR در میکروویال‌های ۰٫۲ میلی‌لیتری انجام شد. مواد مورد نیاز جهت انجام واکنش PCR یک میکرولیتر از هر آغازگر، ۱۲٫۵ میکرولیتر Master mix PCR و دو میکرولیتر cDNA بود که با آب مقطر استریل به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. شرایط دمایی PCR شامل واسرشته سازی اولیه DNA به مدت ۱ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد، واسرشته سازی DNA الگو به مدت ۳۰ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، اتصال آغازگر به DNA تک رشته‌ای به مدت ۴۵ ثانیه در دمای اتصال هر پرایمر و بسط آغازگر ۴۵ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و بسط نهایی ۷ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. محصولات PCR را می‌توان در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری نمود.

جدول ۳-۴: پرایمرهای استفاده شده برای ژن PAL، C4H، 4CL و GAPDH

آغازگر	توالی پرایمر 3'.....5'	طول پرایمر	دمای اتصال	طول قطعه تکثیر
آغازگر پیشرو PAL	TCCCCAACAGGATCAAGG	۱۸	۵۵	۱۶۹
آغازگر برگشتی PAL	ACACTCCAACAACGGATC	۱۸		
آغازگر پیشرو C4H	AACTATGGCGATTCATCCC	۲۰	۵۸	۲۲۳
آغازگر برگشتی C4H	AGAACATTGTCTTCGTTGATCTC	۲۳		
آغازگر پیشرو 4CL	CGAAGGAGCCATTTGACATC	۲۰	۵۷/۵	۱۱۷
آغازگر برگشتی 4CL	ATCTCGCCACGTTTGTTC	۱۹		
آغازگر پیشرو GAPDH	ACCACTAACTGCCTTGCTC	۱۹	۵۷/۵	۱۱۴
آغازگر برگشتی GAPDH	GCCCATCAACAGTCTTCTG	۱۹		

۴-۱۴ الکتروفورز

به منظور بررسی و آنالیز کمی و کیفی محصولات PCR، بر روی ژل ۲ درصد آگارز الکتروفورز شد.

۳-۱۵ Real Time PCR

برای سنجش مقدار بیان ژن‌ها از روش Real Time PCR استفاده شد.

۳-۱۵-۱ رسم نمودار کارایی پرایمرها

برای اطمینان از عملکرد پرایمرها در واکنش Real Time PCR نیاز است بهره^۱ هر جفت پرایمر به صورت جداگانه محاسبه شود و نمودار استاندارد عملکرد هر جفت پرایمر رسم شود. و پس از اطمینان از عملکرد صحیح پرایمرها واکنش اصلی انجام گیرد. برای رسم نمودار استاندارد پرایمرهای هر ژن، ۶ میکرولیتر از cDNA یک تیمار برداشته و با افزودن ۲۴ میکرولیتر آب دوبار تقطیر، نمونه ۵ برابر رقیق شد. سپس از این نمونه ۴ رقت (۱، ۱/۱۰، ۱/۱۰۰، ۱/۱۰۰۰) تهیه شد. برای رقت‌های هر جفت پرایمر دو تکرار تهیه شد. سپس میکروتیوب‌ها در دستگاه Real Time PCR rotor gene 6000 ساخت شرکت Corbet کشور آلمان قرار گرفت. مواد مورد نیاز جهت انجام واکنش PCR به منظور تعیین بهره وری پرایمرها یک میکرولیتر از هر آغازگر، پنج میکرولیتر سایبرگرین و دو میکرولیتر cDNA بود که با آب مقطر استریل به حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر رسانده شد. شرایط دمایی PCR شامل واسرشته سازی اولیه DNA به مدت ۳ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد، واسرشته سازی DNA الگو به مدت ۲۰ ثانیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد، اتصال آغازگر به DNA تک رشته‌ای به مدت ۲۰ ثانیه در ۶۰ درجه سانتی‌گراد و بسط آغازگر ۲۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد با ۴۰ تکرار و بسط نهایی ۲ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. منحنی استاندارد بر حسب لگاریتم غلظت cDNA (محور افقی) و سیکل آستانه (Ct) (محور عمودی) برای هر پرایمر ترسیم گردید.

¹ Efficiency primer

۳-۱۵-۲ نمودار اصلی

به منظور بررسی کمی بیان ژن‌های مورد نظر از روش Real Time PCR استفاده شد. نمونه‌های cDNA هر تیمار به مقدار ۵ برابر رقیق شد. نمونه‌های هر تیمار از نظر بیان ژن مرجع (GAPDH) و ژن‌های PAL، 4CL و C4H مورد بررسی قرار گرفت. برای انجام Real Time PCR در میکروویال‌های جداگانه تهیه شد. هر تیمار در ۳ تکرار بیولوژیک و ۲ تکرار تکنیکی انجام شد.

۳-۱۵-۳ محاسبه داده‌های Real Time PCR

بیان ژن با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak and Schmittgen 2001) بررسی شد. در این روش برای پیدا کردن مقدار رونوشت ژن مورد نظر، از نسبت میزان رونویسی RNA هدف به میزان رونویسی RNA یک ژن مرجع داخلی استفاده می‌شود که توسط روش $\Delta\Delta CT$ محاسبه می‌گردد.

Ct ژن GAPDH در همان نمونه - Ct ژن هدف = ΔCt نمونه هدف

Ct ژن GAPDH در همان نمونه - Ct ژن هدف = ΔCt نمونه کالیبرکننده

$\Delta\Delta Ct$ = ΔCt نمونه کالیبرکننده - ΔCt نمونه هدف

که در این روابط Ct چرخه ای از PCR را نشان می‌دهد که در آن، میزان فلورسنت منتشر شده از محصولات واکنش، افزایش قابل توجه یافته است به طوری که منحنی محصول PCR در آن چرخه توسط نرم افزار تجزیه کننده قابل مشاهده می‌گردد. این چرخه به عنوان ابزاری برای محاسبه مقدار توالی هدف شروع کننده در هر نمونه به کار می‌رود. سپس مقدار نسبی به دست آمده از رابطه $\Delta\Delta CT$ توسط رابطه $2^{-\Delta\Delta CT}$ به صورت مقادیر مطلق تبدیل می‌شود. آنالیز داده های حاصل با نرم افزار REST انجام شد.

۳-۱۶ عصاره‌گیری از ریشه‌ها

برای تهیه عصاره از ریشه‌های موئین تیمار شده و شاهد گیاه سرخارگل، مقدار ۱ میلی‌لیتر از محلول متانول و اسید فسفریک ۰/۱ درصد (۷۰:۳۰ v/v) بر روی ۱۰۰ میلی گرم پودر ریشه‌های موئین در ویال ۲ میلی‌لیتر ریخته شد، سپس محلول حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در دستگاه حمام اولتراسونیک^۱ قرار گرفت. در مرحله بعد، به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شده و محلول روشن‌آور برای سنجش مقدار شیکوریک‌اسید برداشته شد.

۳-۱۶-۱ تزریق نمونه‌های مربوط به شیکوریک‌اسید در دستگاه HPLC

برای اندازه‌گیری مقدار شیکوریک‌اسید در ریشه‌های موئین، مقدار ۵۰ میکرولیتر از عصاره استخراج شده، به صورت دستی به دستگاه HPLC (مدل Knauer ساخت کشور آمریکا) با ستون C18 (4.6 × 250 mm) تزریق شد. فاز متحرک برای دستگاه به صورت ایزوکراتیک (Isocratic) (ثابت بودن نسبت حلال‌ها در طول زمان) شامل ۳۰ درصد (v/v) استونیتریل و ۷۰ درصد (v/v) آب حاوی اسید فسفریک ۰/۱ درصد با سرعت جریان (Flow Rate) ۱/۷۵ میلی‌لیتر در دقیقه تنظیم شد و از آشکارساز U.V.(Detector) با طول موج ۳۳۰ نانومتر استفاده شد (احمدی و همکاران، ۲۰۱۶).

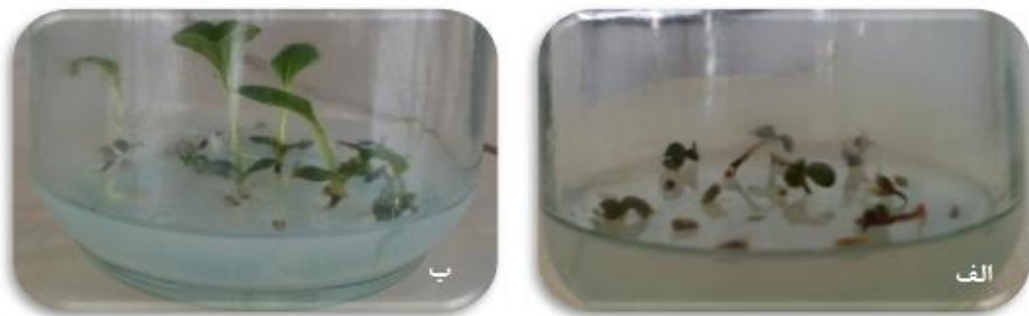
¹ Bath Ultrasonic

فصل چہارم

بحث و نتایج

۱-۴ بررسی جوانه‌زنی بذر گیاه سرخارگل

. جوانه‌زنی بذرهای کشت شده در محیط MS فاقد هورمون بعد از گذشت ۷-۱۰ روز از زمان کشت شروع شد و ریزنمونه از گیاهچه‌های ۲۰-۳۰ روزه تهیه گردید (شکل ۴-۱).



شکل ۴-۱: مراحل مختلف رشد گیاهچه برای تهیه ریزنمونه الف: مراحل جوانه‌زنی بذر. ب: گیاهچه‌های ۲۰ روزه

۲-۴ القای ریشه‌های موئین تراریخت در سرخارگل

در این مطالعه قدرت بیماری‌زایی سویه‌های مختلف آگروباکتریوم رایزوزنز در ایجاد ریشه موئین در ریزنمونه‌های محور زیر لپه (هیپوکوتیل) و برگ تعیین گردید. نتایج نشان داد هر ۴ سویه آگروباکتریوم ATCC15834، A4، A13 و LBA9402 در ریزنمونه‌های برگ و هیپوکوتیل موفق به القاء ریشه‌ی موئین شدند و در ریزنمونه‌های هیپوکوتیل بعد از ۸-۱۲ روز و در ریزنمونه‌های برگ بعد از ۱۲-۱۵ روز هم‌کشتی و انتقال به محیط حاوی آنتی بیوتیک سفوتاکسیم ریشه موئین ظاهر شد. درصد تشکیل ریشه‌ی موئین در سویه‌های مختلف آگروباکتریوم رایزوزنز در ریزنمونه‌های برگ و هیپوکوتیل متفاوت بود. در اکثر ریزنمونه‌ها، ریشه‌ها بدون ایجاد کالوس و مستقیماً از بافت ایجاد شدند و بعد از گذشت مدتی تمام سطح پتری به وسیله انشعابات فراوان ریشه‌ها احاطه شد. قابل ذکر است که از ریزنمونه‌ی برگ نمونه‌های شاهد حتی با گذشت ۲-۳ ماه هیچ ریشه‌ای ایجاد نشد (Error! Reference source not found.). ریشه‌های موئین تولید شده از نظر مورفولوژی

خصوصیاتی از قبیل رشد سریع، انشعابات فرعی زیاد و رشد در محیط فاقد هورمون را از خود بروز دادند و به راحتی از ریشه‌های معمولی بدون انشعاب و کند رشد قابل تشخیص بودند.

۴-۲-۱ فراوانی تولید ریشه‌های موئین

در این آزمایش فراوانی تولید ریشه‌های موئین در ریزنمونه‌های هیپوکوتیل و برگ در هریک از ۴ سویه باکتری ATCC15834، A4، A13 و LBA9402 نسبت به نمونه شاهد با هم مقایسه شدند.



شکل ۴-۲: ریشه‌های موئین القا شده در ریزنمونه‌های برگ و هیپوکوتیل گیاه سرخارگل توسط سویه‌های الف: ATCC15834.

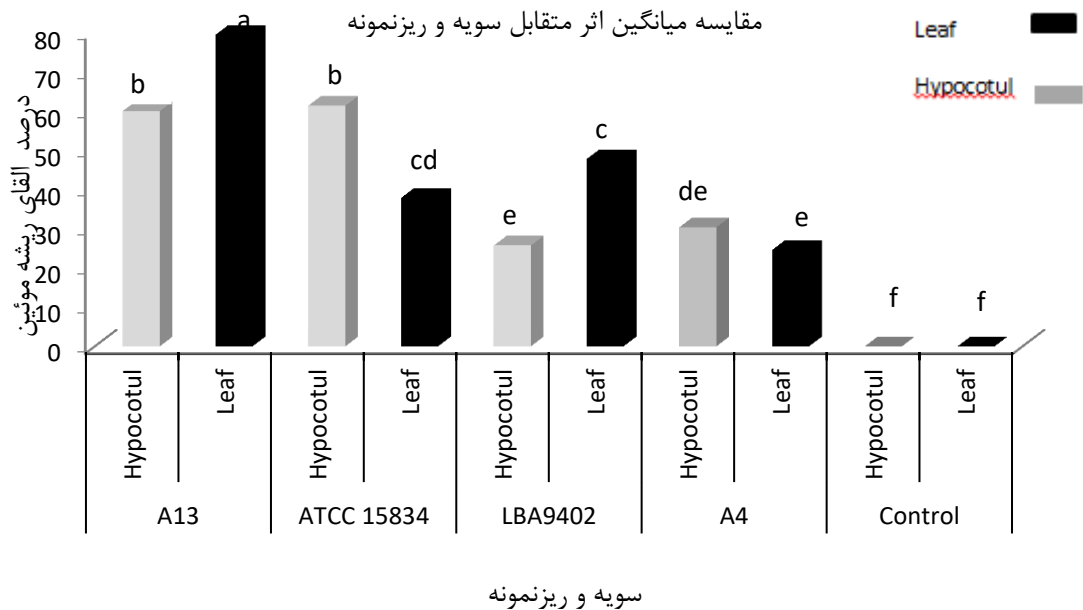
ب: A4. پ: LBA9402. ت: A13. ث: نمونه شاهد

جدول ۴-۱: نتایج تجزیه واریانس اثر ریزنمونه و سویه باکتری بر میزان تولید ریشه موئین

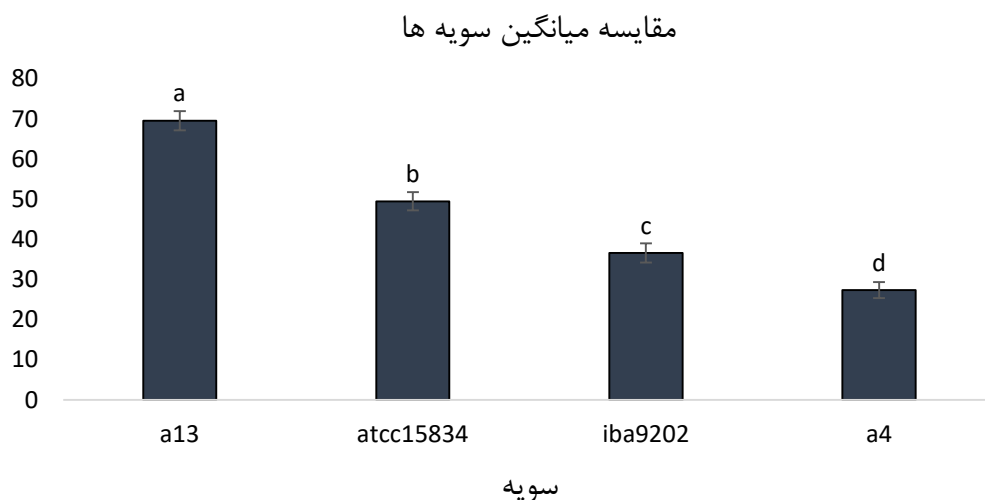
منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات
ریزنمونه	۱	۵۵/۴۱۹ ^{ns}
سویه باکتری	۳	۲۰۰۵/۰۴۵ ^{**}
ریزنمونه × سویه	۳	۷۰۴/۸۷۸ ^{**}
خطا	۱۶	۰/۰۸۵
کل	۲۳	

CV=۱۷.۷

* و ** به ترتیب معنی دار بودن در سطح ۵ و ۱ درصد را نشان می‌دهد و ns عدم معنی داری را نشان می‌دهد.



شکل ۴-۳: مقایسه میانگین سویه های باکتری A13، ATCC15834، LBA9402 و A4 در ریزنمونه های برگ و هیپوکوتیل در ایجاد القای ریشه موئین گیاه سرخارگل



شکل ۴-۴: نمودار مقایسه میانگین سویه های باکتری A13، ATCC15834، LBA9402 و A4 در ایجاد ریشه موئین در گیاه سرخارگل

نتایج تجزیه واریانس داده ها نشان داد که اثر سویه باکتری و نوع ریزنمونه در القای ریشه موئین در سطح احتمال ۱ درصد معنی دار بود (جدول ۴-۱). هم چنین سویه های A13، ATCC15834، LBA9402 و A4 به ترتیب با میانگین ۶۱/۶۹، ۴۹/۵۲، ۳۶/۶۶ و ۲۷/۴۱ درصد بالاترین درصد ریشه زایی را در گیاه سرخارگل داشتند. که این نتایج با گزارش های نوری و همکاران در گیاه سرخارگل و کبیرنتاج و همکاران در گیاه کاسنی هم خوانی دارد (نوری و همکاران، ۲۰۱۷، کبیرنتاج و همکاران، ۲۰۱۳). بر اساس مطالعه دوپر^۱ و همکارانش در سال ۲۰۰۰ با افزایش سن گیاه توان ریزنمونه ها به تلقیح توسط باکتری تغییر کرده و فراوانی تولید ریشه کاهش می یابد. هم چنین سن و نوع ریزنمونه مورد استفاده تأثیر عمده ای در القاء ریشه های موئین دارند و افزایش سن ریزنمونه به دلیل تغییر در ویژگی فیزیولوژیکی سلول از مهم ترین فاکتورهای مؤثر در تراریختی است (دوپر و همکاران، ۲۰۰۰). معمولاً بافت ها و بخش های جوان تر گیاه دارای توان تکثیری بالاتری می باشند و بنابراین برای رشد در شرایط این ویترو و تراریختی مطلوب تر هستند. با افزایش سن گیاه غالباً توان تکثیر آن نیز پایین

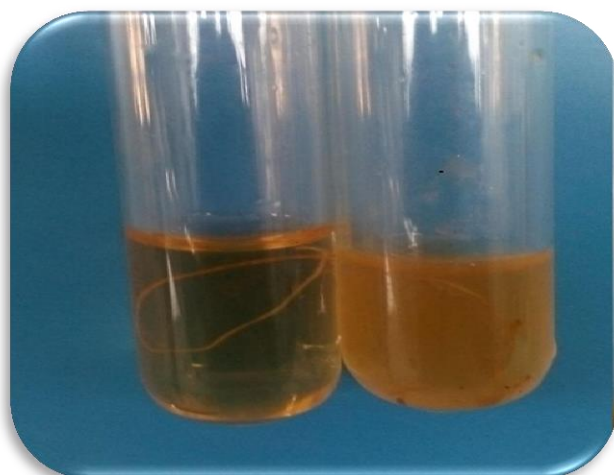
¹ Dupré

می‌آید. در این صورت تراریختی ممکن است اتفاق بیفتد اما سلول تراریخت توان تکثیر را نداشته باشد. افزایش سن گیاه و اندام‌های گیاهی باعث تمایز بیشتر بافت‌ها و سلول‌ها می‌شود و در نتیجه از این طریق بر قابلیت تکثیر و مقابله سلول با عوامل بیماری‌زا (از جمله آگروباکتریوم) تأثیر می‌گذارد (پیرک، ۲۰۱۲). بر طبق پژوهشی که توسط نوری و همکاران (۱۳۹۳) انجام گرفت ریزنمونه‌های با سن کمتر برای تولید ریشه موئین در گیاه سرخارگل مستعدتر می‌باشند. مستعد بودن ریزنمونه برگ در پاسخ به تلقیح و دریافت قطعه T-DNA باکتری آگروباکتریوم رایزوزنز بود و ریزنمونه‌های هیپوکوتیل و برگ توسط سویه‌های باکتری A13 و ATCC15834 و A4 قادر به القای ریشه موئین بودند، (نوری و همکاران، ۲۰۱۷). طبق گزارشات هو و دو^۱ (۲۰۰۶) موفقیت ایجاد سیستم کشت ریشه موئین علاوه بر نوع گونه گیاهی، سویه باکتری و ریزنمونه مناسب، به انتخاب آنتی بیوتیک مناسب برای حذف باکتری اضافی از سطح ریزنمونه‌ها و همچنین محیط کشت مناسب نگهداری ریشه‌ها نیز بستگی دارد (هیو و همکاران، ۲۰۰۶).

۴-۲-۲ بررسی حذف باکتری آگروباکتریوم رایزوزنز از ریشه‌های موئین گیاه سرخارگل

با انتقال مقدار کمی از ریشه‌های موئین موجود در محیط کشت MS نیم غلظت جامد به محیط LB مایع، در صورتی که هنوز ریشه‌ها به باکتری آلودگی داشته باشند محیط LB در اثر رشد باکتری کدر شده و مشخص می‌شود. اما در صورت عدم رشد باکتری دیگر نیازی به استفاده از آنتی بیوتیک سفوتاکسیم نمی‌باشد. در ریشه‌هایی که از گیاه سرخارگل در محیط LB مایع قرار گرفتند پس از ۷۲ ساعت، اثری از رشد باکتری مشاهده نشد و نیازی به استفاده سفوتاکسیم نبود (شکل ۴-۵).

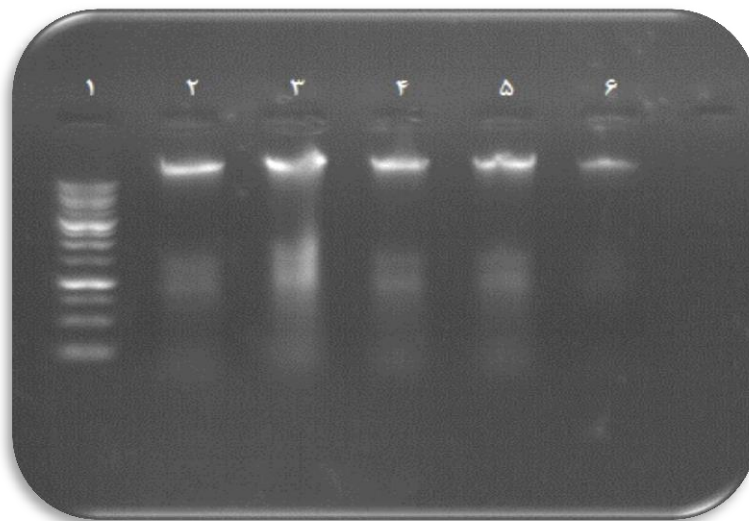
¹ Hu & Du



شکل ۴-۵: کشت نوک ریشه‌های موئین در محیط LB. سمت راست نمونه آلوده و سمت چپ نمونه بدون آلودگی

۴-۴-۱ کیفیت DNA استخراج شده از ریشه‌های موئین و ریشه‌های طبیعی سرخارگل

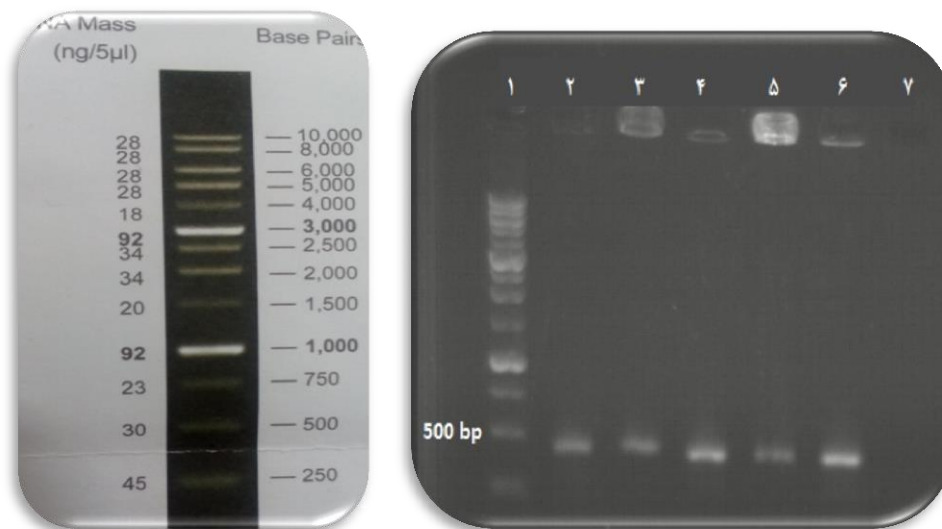
نتایج ژل آگارز DNA استخراج شده از ریشه‌های موئین و ریشه‌های طبیعی گیاه سرخارگل برای نمونه تزریق شده در هر چاهک، یک تک باند را نشان داد (شکل ۴-۶). تک باند مشاهده شده به دلیل سنگینی DNA ژنومی، حرکت زیادی روی ژل نداشته و به همین دلیل در قسمت بالای ژل الکتروفورز قرار گرفته است. همچنین اسمیری که نشان دهنده وجود RNA و DNA تخریب شده باشد نیز دیده نشد. وجود اسمیر بر وی ژل آگارز نشان دهنده کیفیت پایین DNA استخراج شده می‌باشد. بر اساس وجود تک باندهای واضح و نتایج حاصل از اسپکتروفتومتری DNA استخراج شده، کیفیت آن برای واکنش PCR مناسب بود. در روش غلظت سنجی با استفاده از دستگاه نانودراپ مقدار جذب نور در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر برای بررسی کیفیت DNA اندازه‌گیری شد. در کلیه نمونه‌های مورد مطالعه این نسبت بین ۱/۸ تا ۲ بدست آمد.



شکل ۴-۶: الکتروفورز ژل یک درصد آگارز DNA ژنومی استخراج شده از ریشه‌های موئین سرخارگل. چاهک ۱ نشانگر یک کیلو باز. چاهک ۲ تا ۵ به ترتیب کلون سویه‌های LBA A13. A4. 9402. ATCC15834 و چاهک ۶ ریشه طبیعی

۴-۴-۲ بررسی وجود ژن rolB توسط واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز برای DNA ژنومی استخراج شده سرخارگل

تأیید تراریختی ریشه‌های موئین گیاه سرخارگل با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن rolB و از تکنیک PCR صورت گرفت. برای هر یک از نمونه‌های ریشه موئین و پلاسمید باکتری (کنترل مثبت)، تک باند مشاهده گردید. نتایج حاصل از تفکیک محصولات واکنش PCR و آشکارسازی باندها حضور ژن rolB (تکثیر قطعه مورد انتظار ۴۳۰ bp) در ژنوم سلول‌های ریشه‌های موئین را تأیید نمود. (شکل ۴-۷).



شکل ۴-۷: الگو الکتروفورز محصولات PCR (قطعه 430bp) از ژن *rolB* آگروباکتریوم رایزوژنز بر روی ژل یک درصد آگارز. سایز نشانگر ۱ کیلوبازی. کلون‌های ریشه موئین به ترتیب از چاهک‌های ۲ تا ۵ حاصل از ATCC15834، LBA9402، A4 و A13 و چاهک ۶ کنترل مثبت. ۷ چاهک کنترل منفی (ریشه طبیعی گیاه).

۴-۵ مطالعات مولکولی

با توجه به اثرات محرکی برخی ایستورها در بیوسنتز آلکالوئیدها، نقش این مولکول‌های پیام رسان در افزایش القاء سطح رونوشت ژن‌های مسیر شیکوریک‌اسید مورد توجه قرار گرفته است. بر این اساس، ژن‌های PAL، 4CL و C4H جهت بررسی تغییرات بیان در گیاه سرخارگل تیمار شده با ایستورهای متیل جاسمونات و اسیدسالسیلیک در زمان ۷۲ ساعت بعد از اعمال تیمار در مقایسه با گیاه شاهد با استفاده از تکنیک qRT-PCR مورد ارزیابی قرار گرفتند.

۴-۵-۱ بررسی کیفیت و کمیت RNA

برای اطمینان از کیفیت خوب RNA استخراج شده از ژل الکتروفورز ۲ درصد استفاده شد. وضوح دو باند مربوط به ۱۸S rRNA و ۲۸S rRNA روی ژل ۲ درصد نشان دهنده کیفیت خوب RNA استخراج شده بود (شکل ۴-۸). هم‌چنین غلظت RNA استخراج شده با دستگاه نانودراپ در حدود ۱۰۰ الی ۳۰۰ نانوگرم در میکرولیتر به دست آمد. نسبت جذب نوری طول موج ۲۶۰ نانومتر به ۲۸۰

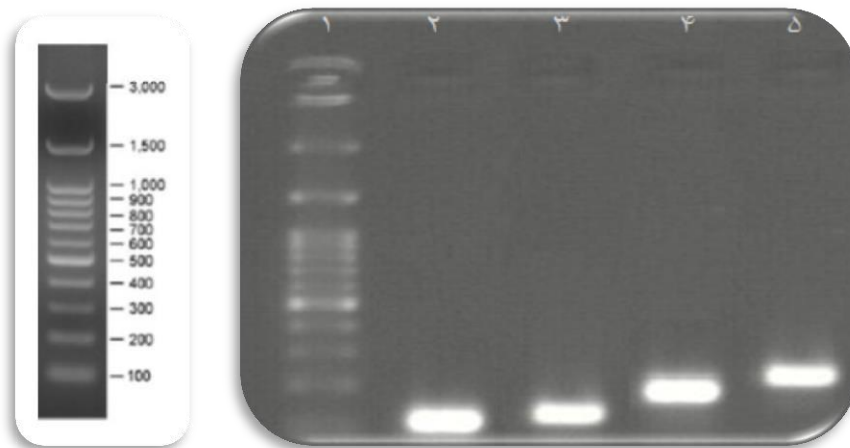
نانومتر و هم‌چنین ۲۶۰ به نانومتر به ۲۳۰ نانومتر نشان‌دهنده عدم آلودگی RNA استخراجی بود (شکل ۴-۸).



شکل ۴-۸: الگوی الکتروفورز تعدادی از نمونه‌های RNA بر روی ژل آگارز ۲ درصد. ب: تعیین کیفیت و کمیت RNA استخراجی توسط دستگاه نانودراپ

۴-۶ واکنش‌های PCR و RT-PCR

برای اطمینان از کارکرد اختصاصی آغازگرهای طراحی شده و تعیین بهترین دمای اتصال این آغازگرها به رشته الگو، واکنش PCR انجام شد (شکل ۴-۹).



شکل ۴-۹: الگوی الکتروفورز محصول واکنش PCR با پرایمرهای اختصاصی از چاهک ۲ تا ۵ به ترتیب

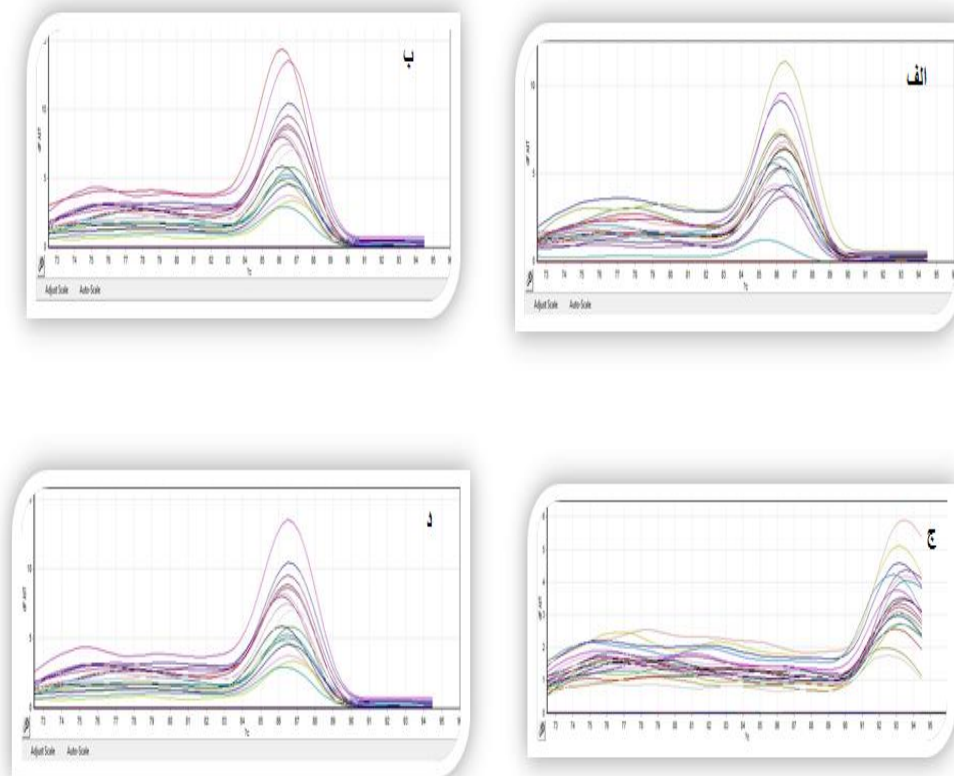
ژن‌های GAPDH، 4CL، PAL، C4H، نشانگر ۱۰۰bp

برای به دست آوردن بهره پرایمرها ۴ غلظت مختلف از نمونه‌ی cDNA تهیه و نمودار بهره پرایمرها رسم شد.

۷-۴ بررسی بیان ژن‌ها

۱-۷-۴ بررسی منحنی ذوب محصولات PCR

نمودار مربوط به منحنی ذوب ژن‌ها در واکنش qRT-PCR به دلیل اینکه فقط یک پیک نشان داد، نشان از عدم آلودگی (عملکرد اختصاصی پرایمرهای طراحی شده) در این واکنش بود. در این بررسی دمای ذوب آغازگرها در محدوده دمایی اتصال آغازگرها تا دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد مورد بررسی قرار گرفت که بررسی‌های نمودارهای ژن مرجع GAPDH و ژن‌های PAL و 4CL و C4H در فازهای مختلف نمودار دمای ذوب از کیفیت مناسبی برخوردار می‌باشد (Error! Reference source not found).

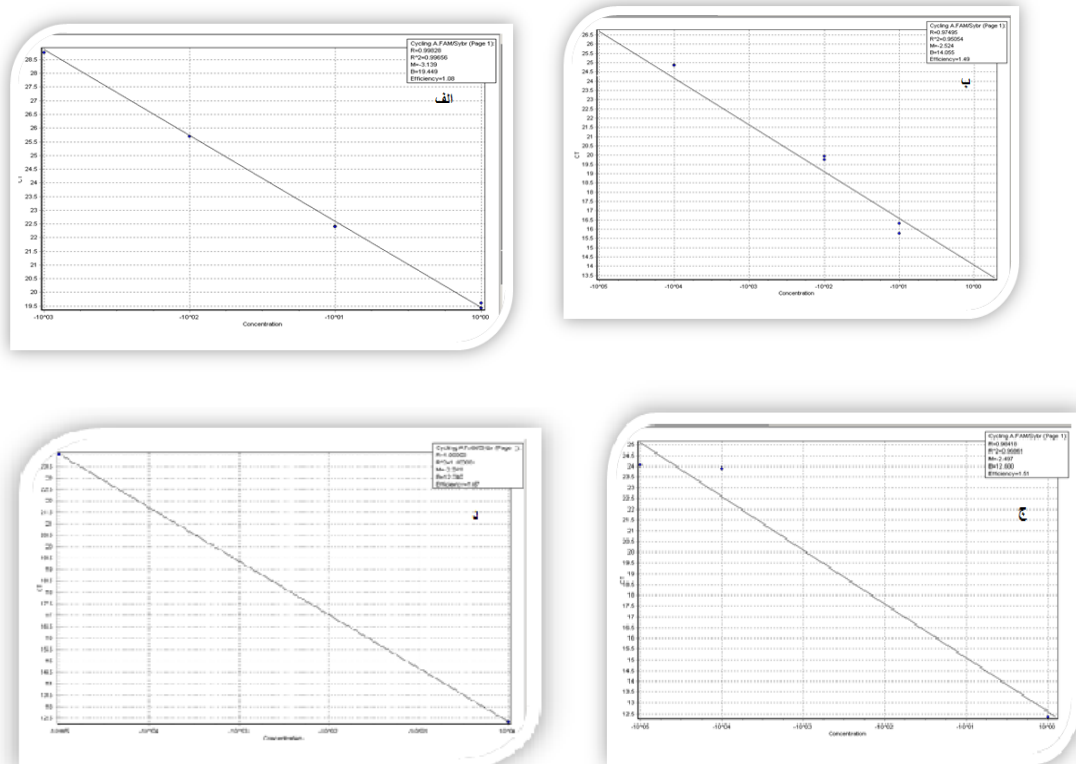


شکل ۴-۱۰: نمودار منحنی ذوب ژن الف: GAPDH. ب: PAL. ج: C4H. د: 4CL. (محور افقی

دما °C، محور عمودی df/dt)

۴-۷-۲ بهره وری پرایمرها

برای اطمینان از عملکرد پرایمرها در واکنش Real Time PCR بهره هر جفت پرایمر به صورت جداگانه محاسبه شد و نمودار استاندارد عملکرد هر جفت پرایمر رسم شد. تصاویر نتایج بهره وری ژن-های GAPDH و 4CL و C4H در زیر آماده است (شکل ۴-۱۱).



شکل ۴-۱۱ : نمودار بهره وری ژن‌ها به ترتیب الف: GAPDH، ب: PAL، ج: 4CL، د: C4H

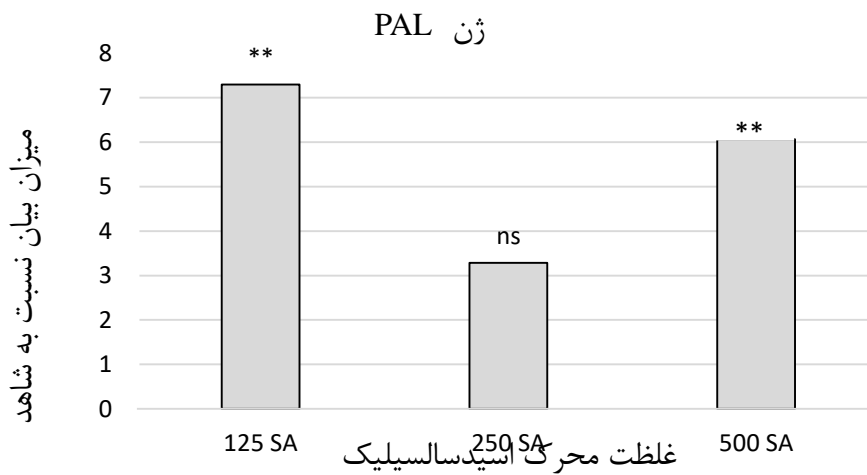
۴-۸ بررسی داده‌های حاصل از RealTime PCR

۴-۸-۱ الگوی تظاهر ژن PAL

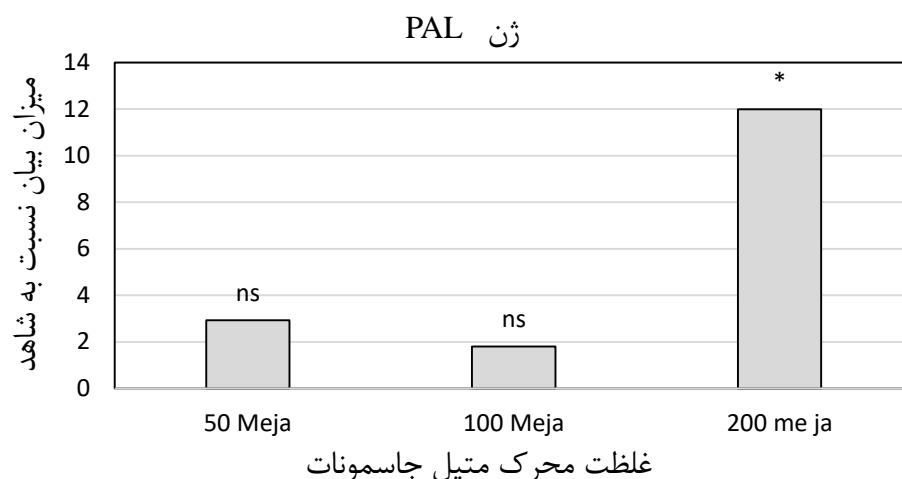
سطح رونوشت mRNA ژن PAL در ۷۲ ساعت بعد از اعمال تیمار اسید سالیسیک را نشان می‌دهد که بیان ژن در غلظت‌های ۱۲۵ و ۵۰۰ میکرومولار در سطح احتمال یک درصد معنی دار بوده و بیان

ژن در سطح احتمال ۱ درصد در غلظت ۲۵۰ میکرومولار معنی دار نشده است. میزان بیان در غلظت-های ۵۰۰، ۲۵۰، ۱۲۵ میکرومولار به ترتیب ۶/۰۶، ۳/۲۸ و ۷/۲۹ می باشد (شکل ۴-۱۲).

بررسی روند تغییرات بیان ژن با فرمول ($2^{\Delta\Delta ct}$) نشان داد غلظت ۲۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات بیشترین تاثیر را در افزایش بیان ژن PAL نسبت به نمونه های تیمار شده با ۱۰۰ و ۵۰ میکرومولار دارد. همانگونه که در شکل مشاهده می شود روند بیان این ژن در غلظت های مختلف متفاوت است. میزان بیان در غلظت های ۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰ به ترتیب ۱۱/۹۸، ۱/۸ و ۲/۹۲ می باشد (شکل ۴-۱۳).



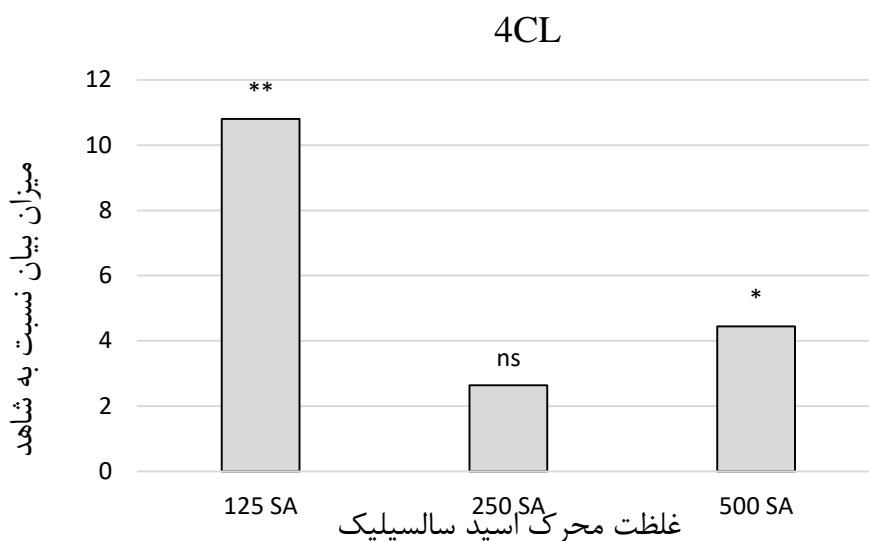
شکل ۴-۱۲: تغییرات بیان ژن PAL در حضور محرک اسید سالیسیک در غلظت های ۱۲۵، ۲۵۰ و ۵۰۰ میکرومولار علایم **، * و ns به ترتیب معنی داری در سطح احتمال ۱ درصد، ۵ درصد و عدم معنی داری را نشان می دهد.



شکل ۴-۱۳: تغییرات بیان ژن PAL در حضور محرک متیل جاسمونات در غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار. علائم **، * و ns به ترتیب معنی داری در سطح احتمال ۱ درصد، ۵ درصد و عدم معنی داری را نشان می‌دهد.

۴-۹ الگوی بیان ژن 4CL

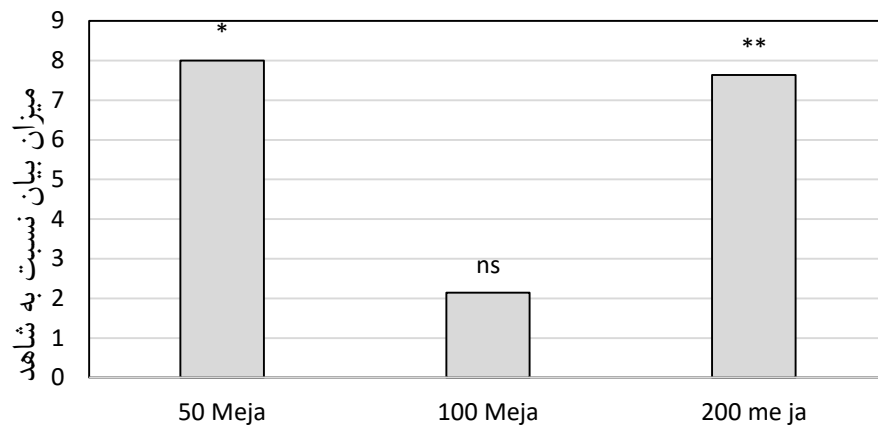
روند بیان این ژن در تیمار با اسید سالیسیلیک در غلظت ۱۲۵ میکرومولار بالاترین بیان ژن را نشان می‌دهد به صورتی که بیان ژن در غلظت ۱۲۵ میکرومولار در سطح احتمال ۱ درصد معنی دار شده است. در غلظت ۵۰۰ میکرومولار بیان ژن در سطح احتمال ۵ درصد معنی دار شد و در غلظت ۲۵۰ میکرومولار تفاوت معنی داری مشاهده نشد. بیان ژن این ژن در تیمار با اسید سالیسیلیک در غلظت-های ۵۰۰، ۲۵۰، ۱۲۵ به ترتیب ۴/۴۳، ۲/۶۳ و ۱۰/۸ می‌باشد (شکل ۴-۱۴).



شکل ۴-۱۴: تغییرات بیان ژن 4CL در حضور محرک اسید سالسیلیک در غلظت‌های ۱۲۵، ۲۵۰ و ۵۰۰ میکرومولار. علائم **، * و ns به ترتیب معنی داری در سطح احتمال ۱ درصد، ۵ درصد و عدم معنی داری را نشان می‌دهد.

روند تظاهر بیان ژن 4CL بعد از اعمال تیمار با متیل جاسمونات در غلظت‌های ۲۰۰ میکرومولار و ۵۰ میکرومولار با تیمار ۱۰۰ میکرومولار تفاوت معنی داری نشان می‌دهد. به طوری که در غلظت ۲۰۰ میکرومولار در سطح احتمال ۱ درصد و در غلظت ۵۰ میکرومولار در سطح معنی دار ۵ درصد معنی دار شد ولی در غلظت ۱۰۰ میکرومولار تفاوت معنی داری با نمونه شاهد مشاهده نشد. بررسی بیان ژن با فرمول ($2^{\Delta\Delta Ct}$) در محرک متیل جاسمونات میزان بیان ژن در غلظت‌های ۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰ به ترتیب ۷/۶۳، ۲/۱۴ و ۸ اختلاف معنی داری را در سطح ۵ درصد نشان داد (شکل ۴-۱۵).

4CL



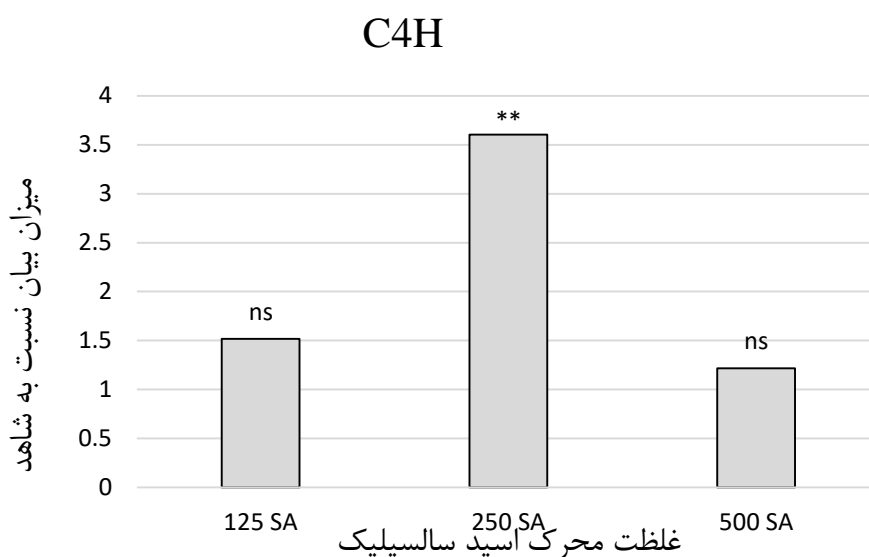
غلظت محرک متیل جاسمونات

شکل ۴-۱۵: تغییرات بیان ژن 4CL در حضور محرک متیل جاسمونات در غلظت‌های ۱۲۵، ۲۵۰ و ۵۰۰

میکرومولار. علائم **، * و ns به ترتیب معنی داری در سطح احتمال ۱ درصد، ۵ درصد و عدم معنی داری را نشان می‌دهد.

۴-۱۰ الگوی بیان ژن C4H

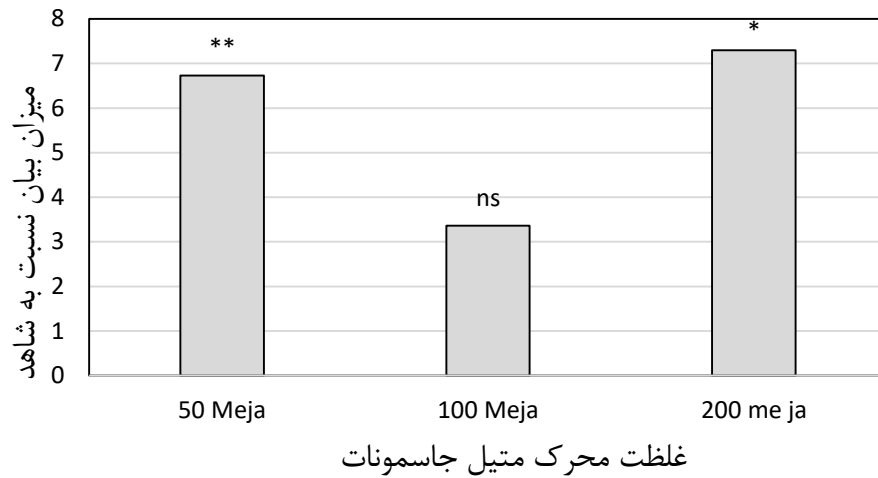
بررسی تغییرات بیان این ژن در حالی که با اسیدسالسیلیک تیمار شده نشان داد غلظت ۲۵۰ میکرومولار بالاترین بیان را موجب شده است. در این غلظت میزان بیان ژن C4H در سطح احتمال ۱ درصد معنی دار شده در حالی که در غلظت‌های ۱۲۵ و ۵۰۰ میکرومولار تفاوت معنی داری نسبت به نمونه شاهد مشاهده نشده است. میزان بیان این ژن در غلظت‌های ۵۰۰، ۲۵۰، ۱۲۵ به ترتیب ۱/۲۱، ۳/۶ و ۱/۵۱ می‌باشد (شکل ۴-۱۶).



شکل ۴-۱۶: تغییرات بیان ژن C4H در حضور محرک متیل جاسمونات در غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار. علائم **، * و ns به ترتیب معنی داری در سطح احتمال ۱ درصد، ۵ درصد و عدم معنی داری را نشان می‌دهد.

روند تظاهر بیان ژن C4H بعد از اعمال تیمار با متیل جاسمونات در غلظت‌های ۲۰۰ میکرومولار و ۵۰ میکرومولار با تیمار ۱۰۰ میکرومولار تفاوت معنی داری نشان می‌دهد. به طوری که در غلظت ۲۰۰ میکرومولار در سطح احتمال ۵ درصد و در غلظت ۵۰ میکرومولار در سطح معنی دار ۱ درصد معنی دار شد ولی در غلظت ۱۰۰ میکرومولار تفاوت معنی داری با نمونه شاهد مشاهده نشد. روند تظاهر ژن C4H در تیمار با متیل جاسمونات میزان بیان ژن در ۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰ و نمونه شاهد به ترتیب ۷/۲۹، ۳/۳۶ و ۶/۷۲ می‌باشد. بالاترین میزان بیان در غلظت ۲۰۰ میکرومولار دیده می‌شود (شکل ۴-۱۷).

C4H



شکل ۴-۱۷: تغییرات بیان ژن C4H در حضور محرک متیل جاسمونات در غلظت‌های ۱۲۵، ۲۵۰ و ۵۰۰ میکرومولار. علائم **، * و ns به ترتیب معنی داری در سطح احتمال ۱ درصد، ۵ درصد و عدم معنی داری را نشان می‌دهد.

محرک‌های برون‌زا می‌تواند باعث تغییر در ساختار سلولی و اختلال در عملکرد فیزیولوژیک گیاهان شود. این پژوهش به منظور مطالعه بیان ژن‌های PAL، 4CL و C4H تحت تیمار متیل جاسمونات و اسید سالسیلیک در ریشه‌های موئین گیاه دارویی سرخارگل انجام شد. با توجه به نتایج این آزمایش بیان دو ژن PAL و 4CL در تیمار با اسید سالسیلیک در غلظت ۱۲۵ میکرومولار بالاترین بیان ژن را نشان دادند در حالی که در ژن C4H غلظت ۲۵۰ میکرومولار اسید سالسیلیک بالاترین بیان ژن را نشان داد. در تیمار ریشه‌های موئین سرخارگل با هورمون متیل جاسمونات در غلظت ۲۰۰ میکرومولار بالاترین بیان ژن را در هر سه ژن موجب می‌شود.

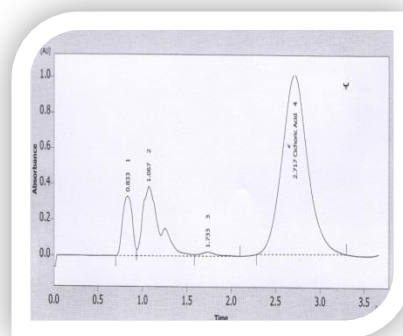
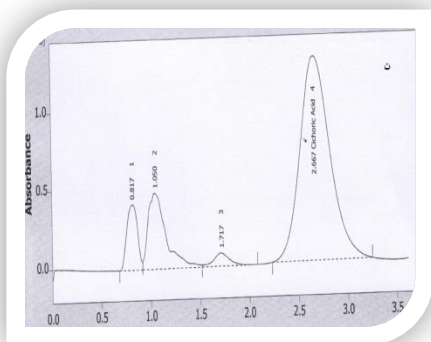
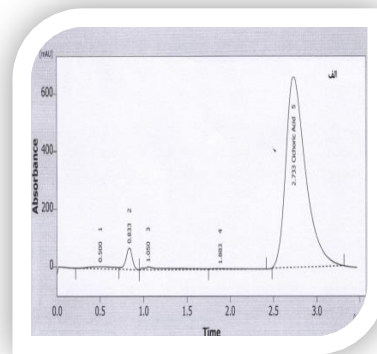
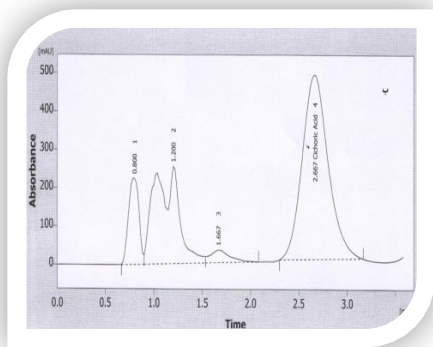
در گیاه دارویی ریحان (*Ocimum basilicum L.*) تاثیر غلظت ۰/۱ میلی مولار متیل جاسمونات بیشترین تاثیر را در افزایش میزان بیان ژن C4H داشت. بیان این ژن پس از تیمار ۰/۱ میلی مولار متیل جاسمونات افزایش یافته به طوری که در این غلظت نسبت به غلظت ۰/۵ میلی مولار و تیمار شاهد بیشترین افزایش بیان در ژن C4H را داشتند (حسینی و همکاران، ۲۰۱۶). میزان فعالیت ژن

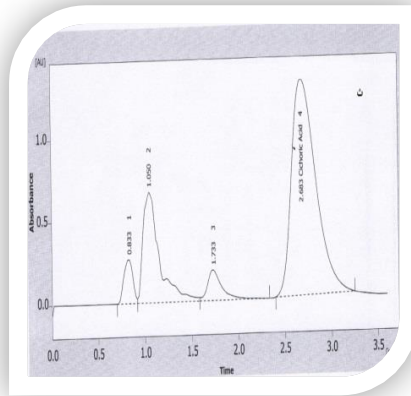
PAL و C4H در نمونه‌های برگ گیاه برنج که با متیل جاسمونات و متیل سالیسیلات تیمار شده بودند اندازه گیری شد. در این پژوهش فعالیت آنزیم PAL به میزان ۸۰/۱ درصد و فعالیت آنزیم C4H به میزان ۶۷ درصد در برگ‌های تیمار شده با متیل جاسمونات ۰/۰۵ میلی مولار نسبت به نمونه شاهد افزایش داشتند (بای و همکاران، ۲۰۰۷). تیمار یک میلی مولار متیل جاسمونات در گیاه آگاستاکه بعد از ۲۴ ساعت از شروع تیمار، افزایش معنی داری در فعالیت آنزیم PAL و 4CL و C4H نسبت به تیمار ۰/۱ میلی مولار متیل جاسمونات و تیمار شاهد در همین زمان گردید و به ترتیب باعث افزایش ۳۰ درصدی و ۱۶۵ درصدی فعالیت این دو آنزیم در مقایسه با تیمار شاهد در همین زمان شد. نتایج این پژوهش پیشنهاد می‌کند متیل جاسمونات با تاثیر بر بیان ژن‌های PAL، 4CL و C4H و افزایش فعالیت آنزیم‌های PAL و 4CL و مسیر بیوسنتز فنیل پروپانویید احتمالاً موجب افزایش متیل چاویکول در گیاهان آگاستاکه در سیستم کشت هیدروپونیک گردید (فرد و همکاران، ۲۰۱۴). متیل جاسمونات با غلظت ۰/۱ میلی مولار باعث افزایش متابولیت ثانویه رزمارینیک اسید و بتالیدوسپرمیک اسید و افزایش بیان ژن‌های PAL، C4H، 4CL و TAT در گیاه مریم گلی شد (ایکسیا و همکاران، ۲۰۰۹). محلول پاشی متیل جاسمونات با سه غلظت صفر، ۰/۱ و ۰/۵ میلی مولار در مرحله گلدهی بر روی برگ‌های ریحان و نمونه گیری بعد از ۰، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از محلول پاشی برداشت و میزان بیان ژن‌های CVOMT و C4H صورت گرفت. نتایج نشان داد بیشترین میزان بیان ژن CVOMT در غلظت ۰/۵ میلی مولار و زمان ۴۸ ساعت بعد از محلول پاشی حاصل شد و در مورد ژن C4H بیشترین بیان مربوط به غلظت ۰/۱ میلی مولار و زمان ۴۸ ساعت بعد از محلول پاشی می‌باشد (حسینی و همکاران، ۲۰۱۶). در گیاه جعفری و کشت تعلیقی سلول‌های جعفری ژن‌های 4CL توسط محرک متیل جاسمونات القا شده‌اند که نتایج آزمایشات ما هم این گزارش را تایید کرد (الارد- ایوی، ۱۹۹۶). نتایج تحقیق حاضر نشان داد که تیمار ۲۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات پس از سپری شدن ۷۲ ساعت از شروع تیمار، منجر به افزایش معنی دار فعالیت آنزیم‌های PAL، 4CL و C4H نسبت به تیمار ۱۰۰ و ۵۰ میکرومولار و تیمار شاهد همین زمان شد. گیاه *Ocimum basilicum L.* تحت تیمار

سه هورمون متیل جاسمونات، اسیدسالسیلیک و اسیدجاسمونیک با غلظت ۰/۱ میلی مولار قرار گرفت و بیان ژن PAL در سه مرحله رشدی گیاهچه‌ای، پیش گلدهی و گلدهی مورد سنجش قرار گرفت. نتایج نشان داد بیان این ژن بین تیمار هورمون‌های متیل جاسمونات، اسیدسالسیلیک و اسیدجاسمونیک و نمونه شاهد در سطح ۵ درصد معنی دار بود و این هورمون‌ها باعث افزایش بیان ژن PAL شده‌اند (عبدخانی و همکاران، ۲۰۱۵). در کشت سلولی گیاه کتان سفید استفاده از هورمون متیل جاسمونات باعث افزایش بیان ژن PAL بعد از گذشت ۶ ساعت از اعمال تیمار شد و میزان تولید پودوفیلوتوکسین افزایش یافت (شریفی و همکاران، ۲۰۱۴). متیل جاسمونات سبب افزایش فعالیت آنزیم‌های مسیر سنتز متابولیت‌های ثانویه از جمله PAL می‌گردد (آیالا-زاوالا و همکاران، ۲۰۰۵). در بررسی اثر تیمار متیل جاسمونات بر فعالیت آنزیم PAL در گیاه تربچه میزان فعالیت این آنزیم در ۴۸ ساعت بعد از تیماردهی با متیل جاسمونات ۱ میلی مولار به طور معنی داری افزایش یافت (کیم و همکاران، ۲۰۰۶). جلالپور و همکارانش در سال ۲۰۱۴ بعد از تیماردهی گیاه جو افزایش بیان در آنزیم PAL و پراکسیداز را گزارش کردند (جلالپور و همکاران، ۲۰۱۴). در پژوهشی دیگر تیمار گیاه آرابیدوپسیس با متیل جاسمونات نقش مهمی در القا بیان ژن‌های موثر در مسیر بیوسنتزی جاسمونات داشت (واستماک، ۲۰۰۷). به طوری که بعد از اعمال تیمار متیل جاسمونات، سطح mRNA فاکتورهای رونویسی موثر در تنظیم مسیر بیوسنتزی جاسمونات نیز افزایش یافته است (پایبولز و همکاران، ۲۰۰۸). در مجموع می‌توان اینگونه استنباط کرد سیستم بازخوری مثبتی که در ادامه تیمار با متیل جاسمونات به افزایش سطح بیان ژن‌های مسیر بیوسنتزی جاسمونات و در پی آن افزایش احتمالی میزان جاسمونات داخل سلولی منتهی می‌شود می‌تواند سهم مهمی در فعال‌سازی فاکتورهای رونویسی درگیر در مسیر بیوسنتزی متابولیت‌های ثانویه داشته باشد و به این ترتیب باعث افزایش همزمان سطح رونوشت ژن‌های مسیر بیوسنتزی و میزان این متابولیت‌ها شود.

۱۱-۴ نتایج HPLC

مقدار شیکوریک اسید ریشه‌های موئین سرخارگل تیمار شده با متیل جاسمونات با غلظت ۲۰۰ میکرومولار و ریشه‌های موئین که با اسید سالیسیک با غلظت ۲۵۰ میکرومولار تیمار شده اند در مقایسه با نمونه کنترل ریشه موئین و ریشه طبیعی گیاه سرخارگل با دستگاه HPLC مورد سنجش قرار گرفت. نتایج نشان داد با کاربرد ۲۵۰ میکرومولار اسید سالیسیک باعث کاهش تولید شیکوریک اسید گردید و استفاده از غلظت ۲۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات باعث افزایش میزان شیکوریک اسید نسبت به این میزان در ریشه موئین شاهد شد با این حال این افزایش معنی دار نبود.





شکل ۴-۱۸: نمایه HPLC مربوط به نمونه استاندارد شیکوریک اسید با غلظت یک میلی گرم در میلی لیتر (الف)، ریشه طبیعی گیاه (ب)، ریشه موئین گیاه (پ)، ریشه موئین تیمار شده با غلظت ۲۵۰ میکرومولار اسیدسالسیلیک (ت)، ریشه موئین تیمار شده با غلظت ۲۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات (ث).

نتیجه گیری کلی

هر ۴ سویه ATCC15834، A13، LBA9402 و A4 قادر به القای ریشه موئین در گیاه سرخارگل بودند.

✓ میزان تولید ریشه موئین در سویه A13 (۶۹ درصد) نسبت به سایر سویه‌ها بالاتر بود.

✓ افزایش بیان ژن‌های PAL و 4CL در غلظت‌های ۱۲۵ و ۵۰۰ میکرومولار اسید سالسیلیک نسبت به شاهد و افزایش میزان بیان ژن C4H در غلظت ۲۵۰ میکرومولار اسید سالسیلیک نسبت به شاهد

✓ افزایش بیان ژن‌های PAL و C4H در غلظت ۲۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات و افزایش میزان بیان ژن 4CL در غلظت‌های ۵۰ و ۲۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات نسبت به شاهد

- ✓ میزان تولید شیکوریک اسید در ریشه موئین نسبت به ریشه طبیعی افزایش نشان داد.
- ✓ غلظت ۲۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات باعث افزایش میزان شیکوریک اسید در ریشه‌های موئین شده است.
- ✓ غلظت ۲۵۰ میکرومولار اسید سالیسیلیک تاثیری بر میزان تولید شیکوریک اسید ریشه‌های موئین نداشته‌اند.

پیشنهادات:

- بررسی میزان رونوشت ژن‌های دیگر مسیر بیوسنتزی شیکوریک‌اسید در کاربرد برون‌زاد محرک‌های اسید سالیسیلیک و متیل جاسمونات
- بررسی میزان رونوشت ژن‌های PAL، C4H و 4CL در کاربرد بیرونی محرک‌های دیگر
- بررسی میزان رونوشت ژن‌های بررسی شده در زمان‌های متفاوت بعد از اعمال تیمار
- دیگر متابولیت‌های ثانویه موجود در ریشه‌های موئین گیاه سرخارگل اندازه‌گیری شود.

فصل پنجم

منابع

ابراهیمی، ثریا. ابریشمچی، پروانه. بهرامی، گنجعلی. سوداگران (۲۰۱۵). بررسی تاثیر استوسیرینگون در القای ریشه موئین در گیاه برازمل (*Perovskia abrotanoides* Karel). تقی زاده، م. جاروندی، ص. یاسان (۱۳۸۱). "مروری بر گیاه اکیناسه." دینی، ت. عباسپور، ج. صمدی، م (۲۰۱۴). "القا و بهینه سازی شرایط رشد ریشه های موئین گیاه سنبل الطیب (*Valeriana officinalis*) L. حاصل از تلقیح آگروباکتریوم رایزوزنز (*Agrobacterium rhizogenes*). "مجله سلول و بافت ۳۰-۳۳: ۵(۱): Cell & Tissue journal. امیدبگی، ر (۲۰۰۲). "بررسی کشت و سازگاری سرخارگل (*Echinaceae purpurea*) در شمال تهران." نشریه علوم آب و خاک-علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی - ۶(۲): ۲۳۱-۲۴۱ Isfahan University of Technology.

صباغ زاده، ر (۲۰۱۷). "اصول عمومی روش تجزیه ای کروماتوگرافی HPLC." فصلنامه رویکردهای نوین در آزمایشگاه های علمی ایران ۴۵-۵۰ (۲) ۱.

فتح الله، ا. رشیدی، س (۲۰۱۶). "بررسی اثرات مقدار اینوکولوم و سرعت هوادهی بر تولید بیوماس و اسید شیکوریک در کشت ریشه های موئین گیاه سرخارگل (*Echinacea purpurea* L.) در بیوراکتور ستون حباب دار." تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران ۳۲(۳).

قاسمی، ع (۱۳۸۸). "گیاهان دارویی و معطر بررسی و شناخت اثرات آن ها." انتشارات دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، سامان دانش، چاپ اول: صفحات ۱۸۷-۱۹۳.

کشاورز، ث. مدرس، س (۲۰۱۵). "اثر سالیسیلیک اسید بر کلروفیل، برخی خصوصیات رشدی و عملکرد دو رقم کلزا." مجله تولید گیاهان زراعی ۷(۴): ۱۶۱-۱۷۸.

Abbasi, B. H., P. K. Saxena, S. J. Murch, C.-Z. Liu and H. Wagner (2007).

"Echinacea biotechnology: challenges and opportunities." *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 43(6): 481-492.

Abbasi, B. H., C.-L. Tian, S. J. Murch, P. K. Saxena and C.-Z. Liu (2007). "Light-enhanced caffeic acid derivatives biosynthesis in hairy root cultures of *Echinacea purpurea*." *Plant cell reports* 26(8): 1367-1372.

Abdekhani, S., M. Solouki. and Y. Shiri. (winter 2015). "The Effect of Different Growth Hormones on Gene Expression of Phenylalanine Ammonia Lyase (PAL) in *Ocimum basilicum* L." *Journal of Biotechnology of Crops* 4(8): 21-30.

Aghaei.reza (2012). "Effect of Elirentorium Methyl Jasmonate on the Secondary Metabolites of the echinace Medicinal Plant".

Ahmadi ,F., A. Moieni and S. R. Monfared (2016). "Effects of inoculum density and aeration rate on biomass and cichoric acid production in *Echinacea purpurea* L. hairy roots in bubble column bioreactor." *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants* 32(3).

- Aliero, B. (2004).** "Effects of sulphuric acid, mechanical scarification and wet heat treatments on germination of seeds of African locust bean tree, *Parkia biglobosa*." *African journal of Biotechnology* **3**(3): 179-181.
- Koochaki ,a, Najafi,f (2004).** "The agrobiodiversity of medicinal and aromatic plants in Iran." *Journal of Crop Biotechnology*(2).
- Rajabi ,a, Sinaki , j (2016).** "Study the chemical stimuli effects of Methyl Jasmonate and Salicylic acid on stimulation of Hypericin production in *Hypericum* (*Hypericum perforatum* L.)." *new Cellular and Molcular Biotechnology Journal* **6**(22): 41-50.
- Atrashi, M., E. T. Dinanie, M. T. Darzi, J. Hashemi, S. Rozbeh and A. Masumi (2011).** "Effect of ultrasound on the production of Carvone as a secondary metabolite in callus derived from *Bunium persicum* Boiss." *Journal of Herbal Drugs* **2**(2): 129-135.
- Authors, A., G. Tanoori Azim and A. Mahdi (2015).** "Study the effect of methyl jasmonate and salicylic acid on morphological characters internal pigments of artichoke callus." *the University of Tehrans Scientific Journals Database* **16**(4): 857-869.
- Ayala-Zavala, J. F., S. Y. Wang, C. Y. Wang and G. A. González-Aguilar (2005).** "Methyl jasmonate in conjunction with ethanol treatment increases antioxidant capacity, volatile compounds and postharvest life of strawberry fruit." *European Food Research and Technology* **221**(6): 731.
- Bais, H. P., S. Govindaswamy and G. A. Ravishankar (2000).** "Enhancement of growth and coumarin production in hairy root cultures of witloof chicory (*Cichorium intybus* L. cv. Lucknow local) under the influence of fungal elicitors." *Journal of bioscience and bioengineering* **90**(6): 648-653.
- Bennett, R. N. and R. M. Wallsgrove (1994).** "Secondary metabolites in plant defence mechanisms." *New phytologist* **127**(4): 617-633.
- Bi., H. H., R. S. Zeng., L. M. Su., M. An. and S. M. Luo. (2007).** "Rice Allelopathy Induced by Methyl Jasmonate and Methyl Salicylate." *Journal of Chemical Ecology* **33**(5): 1089-1103.
- Binns, S. E., J. T. Arnason and B. R. Baum (2002).** "Phytochemical variation within populations of *Echinacea angustifolia* (Asteraceae)." *Biochemical systematics and ecology* **30**(9): 837-854.
- Biondi, S., S. Scaramagli, F. Capitani, M. Maddalena Altamura and P. Torrigiani (2001).** "Methyl jasmonate upregulates biosynthetic gene expression, oxidation and conjugation of polyamines, and inhibits shoot formation in tobacco thin layers." *Journal of Experimental Botany* **52**(355): 231-242.
- Bohlooli Khiavi R, A. K. T., Rakhshidan Z, Nasiri A, Modarres Sadrani S N, Faraji Mazraeh Khalafi F (2016).** "A critical review on PCR, its types and applications." *Journal laboratory & Diagnosis* **3**(31): 57-68.
- Cardina, J. and D. H. Sparrow (1997).** "Temporal changes in velvetleaf (*Abutilon theophrasti*) seed dormancy." *Weed Science*: 61-66.
- Citovsky, V., S. V. Kozlovsky, B. Lacroix, A. Zaltsman, M. Dafny-Yelin, S. Vyas, A. Tovkach and T. Tzfira (2007).** "Biological systems of the host cell involved in *Agrobacterium* infection." *Cellular microbiology* **9**(1): 9-20.

- De Jesus-Gonzalez, L. and P. Weathers (2003).** "Tetraploid *Artemisia annua* hairy roots produce more artemisinin than diploids." *Plant cell reports* **21**(8): 809-813.
- Dehghan, S., M. Sadeghi, A. Pöppel, R. Fischer, R. Lakes-Harlan, H. R. Kavousi, A. **Vilcinskas and M. Rahnamaeian (2014)**" .Differential inductions of phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase during wounding, salicylic acid treatment, and salinity stress in safflower, *Carthamus tinctorius*." *Bioscience reports* **34**(3).
- Dinati, B. and T. Momeni (2001).** *Herbaceous plants ,Toxicology, Medicinal plants ,Complications and consequences*, SHahr AB.Tehran: 304.
- Draper, J. (1988).** *Plant genetic transformation and gene expression*, Blackwell Scientific Publications.
- Dupré, P., J. Lacoux, G. Neutelings, D. Mattar-Laurain, M .A. Fliniaux, A. David and **A. Jacquin-Dubreuil (2000).** "Genetic transformation of *Ginkgo biloba* by *Agrobacterium tumefaciens*." *Physiologia Plantarum* **108**(4): 413-419.
- Edreva, A., V. Velikova, T. Tsonev, S. Dagnon, A. Gürel, L. Aktaş and E. Gesheva (2008)**" .Stress-protective role of secondary metabolites: diversity of functions and mechanisms." *Gen Appl Plant Physiol* **34**(1-2): 67-78.
- Edwards, k., C. Johnstone and C. Thompson (1991).** "A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis." *Nucleic acids research* **19**(6): 1349.
- ش, m. and C. J. Douglas (1996).** "Role of jasmonates in the elicitor-and wound-inducible expression of defense genes in parsley and transgenic tobacco." *Plant Physiology* **112**(1): 183-192
- Emami.ahmad .f. shirin and m. iraj (2014).** *Reference book of herbs (volumes 1 and 2)*, Institute for the Study of Medical History, Islamic Medicine and Supplement.
- Esmailzadeh behbahani, S. and M. SHarifi (Autumn 2013). "Increasing the Production of Plant Secondary Metabolites Using Biotic Elicitors." *cell and Tissue Journal* **4**(2): 119-128.
- Fard., R., Omidibaigi and R. Sharifi. (2014).** "Effect of methy jasmonate on metabolic enzymes and phenolics in agastache foeniculum (pursh) kuntze." *iranian journal of medicinal and Aromatic Plants* **3**(361-369.)
- Farsi, M. and J. Zolala (2000).** *Principles of plant biotechnology*, Ferdowsi University of Mashhad.
- Ghaemi, A., H. Soleimanjahi, M. Farshbaf Moghaddam and N. Yazdani (2007).** "Evaluation of antiviral activity of aerial part of *Echinacea purpurea* extract against herpes simplex virus type 1." *Hakim Research Journal* **9**(4): 59-64.
- Ghasemi, A. (2009).** *Medicinal and aromatic herbs, recognizing and examining their effects*, Islamic Azad University SHahrekor Branch.
- Gholamrezai, a. (2008).** "Biotechnology of medicinal plants and production of herbal medicines." *University Jihad (Isfahan University)* 1000: 2.۸۷

- Giri, A. and M. L. Narasu (2000).** "Transgenic hairy roots: recent trends and applications." *Biotechnology Advances* **18**(1): 1-22.
- Guillon, S., J. Tremouillaux-Guiller, P. K. Pati, M. Rideau and P. Gantet (2006).** "Harnessing the potential of hairy roots :dawn of a new era." *Trends in Biotechnology* **24**(9): 403-409.
- Hassani, L. (Autumn 2016).** "Increasing the Expression of Genes Chavicol O-Methyl Teransferase and Cinnamate 4-Hydroxilase under Methyl Jasmonate Treatment in Medicinal Plant Basil (*Ocimum basilicum* L.)." *Journal of Plant Productions (Agronomy, Breeding and Horticulture)* **39**(3) 101-112
- Hassani, L., B. Abdollahi Mandoulakani, R. Darvishzadeh and A. Hassani (2016).** "Increasing the Expression of Genes Chavicol O-Methyl Teransferase and Cinnamate 4-Hydroxilase under Methyl Jasmonate Treatment in Medicinal Plant Basil (*Ocimum basilicum* L.)." *Journal of Plant Productions (Agronomy, Breeding and Horticulture)* **39**(3): 101-112.
- Hajimehdipoor, H.Khanavi, M.Shekarchi, M.Abedi, Z.Pirali Hamedani, M. (2009) .** "Investigation of the Best Method for Extraction of Phenolic Compounds from *Echinacea purpurea* L. (Moench)." **4**(32): 145-152.
- Hu, Z. B. and M. Du (2006).** "Hairy root and its application in plant genetic engineering." *Journal of integrative plant biology* **48**(2): 121-127.
- Izadi, Z., Ali Sorooshzadeh , Saied .Ali Mohamad . Modarres Sanavi, Mohmod. Esna-Ashari, Majid . AghaAlikhani and P. a. Davoodi (2014).** "Effect of Extraction Method on Antimicrobial Properties of Shoot Extract of Purple Coneflower (*Echinacea Purpurea* l.) Against Some Pathogenic Bacteria." *Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences* **13**(3): 267-280.
- Jalalpour, Z., L. Shabani, L. Afghani, M. Sharifi-Tehrani and S. A. Amini (2014).** "Stimulatory effect of methyl jasmonate and squalestatin on phenolic metabolism through induction of LOX activity in cell suspension culture of yew." *Turkish Journal of Biology* **38**(1): 76-82.
- Jones, M. P., Z. Yi, S. J. Murch and P. K. Saxena (2007).** "Thidiazuron-induced regeneration of *Echinacea purpurea* L.: micropropagation in solid and liquid culture systems." *Plant cell reports* **26**(1): 13-19.
- Jualang Azlan, G., M. Marziah, M. Radzali and R. Johari (2002).** "Establishment of *Physalis minima* hairy roots culture for the production of physalins." *Plant cell, tissue and organ culture* **69**(3): 271-278.
- Kabirnataj,s., E. G. Ravandi. and B. S. Kaleybar. (Summer 2013).** "The Effect of Different Strains of *Agrobacterium rhizogenes* on Production of Chlorogenic Acid and Phenolic Compounds in Hairy Root Cultures of *Cichorium intybus* L." *Journal of Biotechnology of Crops* **3**(4): 69-76.
- Kim, H.-J., F. Chen, X. Wang and J.-H. Choi (2006).** "Effect of methyl jasmonate on phenolics, isothiocyanate, and metabolic enzymes in radish sprout (*Raphanus sativus* L.)." *Journal of agricultural and food chemistry* **54**(19): 7263-7269.

- Kim, Y. B., J. K. Kim, M. R. Uddin, H. Xu, W. T. Park, P. A. Tuan, X. Li, E. Chung, J.-H. Lee and S. U. Park (2013).** "Metabolomics analysis and biosynthesis of rosmarinic acid in *Agastache rugosa* Kuntze treated with methyl jasmonate." *Plos one* **8**(5): 199.
- Kuzovkina, I. N. and B. Schneider (2006).** Genetically transformed root cultures—generation, properties and application in plant sciences. *Progress in Botany*, Springer: 275-314.
- Legrand, G., M. Delporte, C. Khelifi, A. Harant, C. Vuylsteker, M. Mörchen, P. Hance, J.-L. Hilbert and D. Gagneul (2016).** "Identification and characterization of five BAHD acyltransferases involved in hydroxycinnamoyl ester metabolism in chicory." *Frontiers in plant science* **7**.
- M Azadbakht, M. A. (2008).** "Five prevalent antiprotozoal herbal drugs." *Mazandaran Univ Med Sci* **18**(67): 118-132.
- Mehrjerdi, M. Z., M. R. Bihamta, M. Omidi, M. R. Naghavi, H. Soltanloo and M. Ranjbar (2013).** "Effects of exogenous methyl jasmonate and 2-isopentenyladenine on artemisinin production and gene expression in *Artemisia annua*." *Turkish Journal of Botany* **37**(3): 499-505.
- Mollapour, M., D. Bakhshi and M. M. Sohani (2015).** "The Effect of Different Salicylic acid and Methyl jasmonate on Gene Expression of Phenylalanine Ammonia Lyase (PAL) in *Echinacea purpurea* L." 1st National Conference on Herbs and Medicine.
- Mukundan, U., A. Rai, H. Dawda, S. Ratnaparkhi and V. Bhide (1998).** "Secondary metabolites in *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformed root cultures." *Plant Tissue Culture and Molecular Biology Applications and Prospects*. New Delhi: Narosa Publishing House: 302-331.
- Naderi, S., B. Fakheri, S. Esmailzadeh Bahabadi and H. Kamaledini (2014).** "Increasing of phenyl alanine ammonia lyase (PAL) gene expression and phenylpropanoid compounds of basil (*Ocimum basilicum*) by chitosan." *Genetic novin* **9**: 259-266.
- Noori, M., S. GHaranjik, A. Safipour Afshar and S. Nematpur (2017).** "The influence of different strains of *Agrobacterium* on hairy root induction and the content of total phenolics and polysaccharides in medicinal plant *Echinacea purpurea* (L.) moench." **33**(1): 90-102.
- Omidbigi, R. (1376).** Approaches to production and processing of medicinal plants., Tarahan nashr.
- Oñate-Sánchez, L. and J. Vicente-Carbajosa (2008).** "DNA-free RNA isolation protocols for *Arabidopsis thaliana*, including seeds and siliques." *BMC research notes* **1**(1): 93.
- Pauwels, L., K. Morreel, E. De Witte, F. Lammertyn, M. Van Montagu, W. Boerjan, D. Inzé and A. Goossens (2008).** "Mapping methyl jasmonate-mediated transcriptional reprogramming of metabolism and cell cycle progression in cultured

Arabidopsis cells." Proceedings of the National Academy of Sciences **105**(4): 1380-1385.

Perek (2012). Principles of plant tissue culture ,Ferdowsi University Mashhad.

Qian, Z. G., Z. J. Zhao, Y. Xu, X. Qian and J. J. Zhong (2004). "Novel chemically synthesized hydroxyl-containing jasmonates as powerful inducing signals for plant secondary metabolism." Biotechnology and Bioengineering **86**(7):809-816.

Rahnama, H., T. Hasanloo, M. R. Shams and R. Sepehrifar (2008). "Silymarin production by hairy root culture of Silybum marianum (L.) Gaertn." Iranian Journal of Biotechnology **6**(2): 113-118.

Rajeswara, R., K. Syamasundar, D. Rajput, G. Nagaraju and G. Adinarayana (2012). "Biodiversity, conservation and cultivation of medicinal plants." World **422000**(77000): 18.12.

Romero, F. R., K. Delate, G. A. Kraus, A. K. Solco, P. A. Murphy and D. J. Hannapel (2009). "Alkamide production from hairy root cultures of Echinacea." In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant **45**(5): 599.

Sadeghi, M., S. Dehghan, R. Fischer, U. Wenzel, A. Vilcinskas, H. R. Kavousi and M. Rahnamaeian (2013). "Isolation and characterization of isochorismate synthase and cinnamate 4-hydroxylase during salinity stress, wounding, and salicylic acid treatment in *Carthamus tinctorius*." Plant signaling & behavior **8**(11): e27335.

Samadi, S., A. Ghasemnejhad and M. Alizadeh (2015). "Investigation on phenylalanine ammonia-lyase activity of artichoke (*Cynara scolymus* L.) affected by methyl jasmonate and salicylic acid in in-vitro conditions." journal of Plant Production (Journal Of Agricul Tural Sciences And Natural Resources.

Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis (1989). Molecular cloning: a laboratory manual, Cold spring harbor laboratory press.

Sharifi, M. and S. fakhari (Winter 2014). "Increased podophyllotoxin production and phenylalanine ammonia lyase activity in cell culture of *Linum album* by methyl jasmonate." Journal of plant production Research (JOPPR) **20**(4): 163-176.

Shirazi, Z., K. Piri, A. M. Asl and T. Hasanloo (2012). "Glycyrrhizin and isoliquiritigenin production by hairy root culture of *Glycyrrhiza glabra*." Journal of Medicinal Plants Research **6**(31): 4640-4646.

Soleimani ,T., M. Keyhanfar, K. H. Piri and T. Hasanloo (2012). "Hairy Root Induction in Burdock (*Arctium lappa* L.)." Journal of Medicinal Plants **4**(44): 176-184.

Taiz , E. and T. Lincoln (1392). Plant Physiology. Ferdowsi University Mashhad, Academic Center for Education, Culture and Research (ACECR).

Tepfer, D. (1984). "Transformation of several species of higher plants by *Agrobacterium rhizogenes*: sexual transmission of the transformed genotype and phenotype." Cell **37**(3): 959-967.

Trypsteen, M., M. Van Lijsebettens, R. Van Severen and M. Van Montagu (1991). "*Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of *Echinacea purpurea*." Plant cell reports **10**(2): 85-89.

- Tzfira, T. and V. Citovsky (2006).** "Agrobacterium-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology." *Current opinion in biotechnology* **17**(2): 147-154.
- Veena, V. and C. G. Taylor (2007).** "Agrobacterium rhizogenes: recent developments and promising applications." *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* **43**(5): 383-403.
- Vlag, Z.(1977).** Medicinal Plants, GHoghnos.
- Wang, B., G. Zhang, L. Zhu, L. Chen and Y. Zhang (2006).** "Genetic transformation of *Echinacea purpurea* with *Agrobacterium rhizogenes* and bioactive ingredient analysis in transformed cultures." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **53**(1): 101-104.
- Wang, K., L. Herrera-Estrella, M. Van Montagu and P. Zambryski (1984).** "Right 25 by terminus sequence of the nopaline T-DNA is essential for and determines direction of DNA transfer from *Agrobacterium* to the plant genome." *Cell* **455-462**:(2)**38**.
- Wasternack, C. (2007).** "Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development." *Annals of botany* **100**(4): 681-697.
- Xiao, Y., S. Gao, P. Di, J. Chen, W. Chen and L. Zhang (2009)"** .(Methyl jasmonate dramatically enhances the accumulation of phenolic acids in *Salvia miltiorrhiza* hairy root cultures." *Physiologia plantarum* **137**(1): 1-9.
- Yao, H. and S. Tian (2005).** "Effects of pre-and post-harvest application of salicylic acid or methyl jasmonate on inducing disease resistance of sweet cherry fruit in storage." *Postharvest Biology and Technology* **35**(3): 253-262.
- Zhang, H.-C., J.-M. Liu, H.-Y. Lu and S.-L. Gao (2009).** "Enhanced flavonoid production in hairy root cultures of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch by combining the over-expression of chalcone isomerase gene with the elicitation treatment." *Plant cell reports* **28**(8): 1205-1213.
- Ziemienowicz, A., T. Tzfira and B. Hohn (2008).** Mechanisms of T-DNA integration. *Agrobacterium: From Biology to Biotechnology*, Springer: 395-440.

Abstract

Echinacea purpurea L. is a herbaceous and perennial herb belongs to the Asteraceae family. The roots contain important drug compounds such as alkaloids, chlorogenic acid and chicory acid. In many plants, *in vitro* hairy roots culture is an effective way to produce secondary metabolites. The hairy roots formation in plants is the result of a plant disease that is caused by *Agrobacterium rhizogenesis*. When the bacterium infects the plant, the T-DNA, which is located between the TR and TL portions of the bacterium in the plasmid Ri, is transferred to the plant and placed in the nuclear genome of the host plant. In this study, leaves of leaf and hypocotyl extract from inoculum seedlings from 20 to 30 days of seedling *Echinacea purpurea* were inoculated with *Agrobacterium rhizogenesis* in vitro conditions of LAB 9402, A4, A13 and ATCC15834 strains. Hairy roots appeared 2 to 3 weeks after infection. The bacteria were removed by transferring the explants into the MS medium of 2.1 with antibiotic cefotaxime. In order to evaluate the expression of PAL, 4CL and C4H genes and measuring the amount of chicory acid in fennel plants, the SA and methyl jasmonate concentrations and the samples were taken 72 hours after treatment. results showed increase in gene expression of PAL, C4H and 4CL was higher for treated samples compared to control. The highest amount of chicory acid was obtained when the concentration of 250 μ M of acetic acid and 200 μ M of methyl jasmonate was used separately. So that the application of methyl jsmonate at a concentration of 200 μ m in comparison with the concentrations of 100, 50 and the control sample increased the expression of all three genes . But the salicylic acid stimulant up to 250 μ m resulted in increased expression of the three genes and the application of higher concentrations (500 μ M) reduced the expression of genes The amount of Cichoric acid in a concentration of 250 μ M of SA and 200 μ M of methyl jasmonate was measured .

Key words: Hairy root, *Agrobacterium rhizogenesis*, expression of gene PAL, 4CL, C4H, salicylic acid, methyl jasmonate, *Echinacea purpurea* L.



Shahrood University Of Technology
Faculty of Agriculture
M.Sc. Thesis in Agricultural Biotechnology

Analysis of Cichoric acid production and expression patterns of PAL gene
in induced *Echinacea purpurea* hairy roots

By: Elham Karabi

Supervisor:

Dr.Sh.Gharanjik

Dr.M.R.Vaezi.Kakhki

September 2017