



بررسی ساختار ریشه‌های موئین تراریخت و غیر تراریخت گیاه *Luffa cylindrica*

لیلا قاضی زاده^۱، پرستو احسانی^{۲*}، علیرضا ایرانبخش^۳

^۱ بانک سلولی انستیتو پاستور، تهران، ایران

^۲ بخش بیولوژی مولکولی انستیتو پاستور، تهران، ایران

^۳ گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات، تهران، ایران

* Email: p_ehsani@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۴/۱۰

تاریخ دریافت: ۹۶/۱۲/۰۸

چکیده

در این پژوهش ریشه‌های موئین تراریخت از گیاه دارویی *Luffa cylindrica* باروش مجاورت گیاه با سه سویه مختلف آگروباکتریوم رایزو ژنز به اسامی ۱۵۸۳ و ۹۵۳۴ و A4 به دست آمد. نتایج حاکی از افزایش میزان زیست توده در نمونه‌های القا شده با سویه ۱۵۸۳ و ۹۵۳۴ بود. پس از تهیه برش عرضی از ریشه‌های تراریخت و غیر تراریخت اندازه سطح لایه‌های مختلف اپیدرم، کورتکس و بافت آوندی و همچنین اندازه سلول‌های پارانشیم با استفاده از نرم‌افزار ImageJ مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که در نمونه‌های تراریخت ساختار آوندی نسبت به نمونه کنترل فشرده‌تر شده است. بطوریکه اندازه سطح گزیم در ریشه‌های تراریخت مجاور شده با آگروباکتریومها نسبت به نمونه کنترل بیشتر شده و به شرح زیر می‌باشد: $15834 (393/5 \mu m) < A4 (324/6 \mu m) < 9534 (238/8 \mu m) < \text{کنترل} (175 \mu m)$. علاوه بر آن، مقادیر سطح ناحیه فلوئم در کنترل ۲/۶ برابر نمونه ۱۵۸۳۴ می‌باشد که بین تراریخت‌ها بیشترین سطح ناحیه فلوئم را نشان داده است. سطح لایه کورتکس و ضخامت لایه اپیدرم و سایز سلول‌های پارانشیمی نیز در ریشه موئین ناشی از ۱۵۸۳۴ نسبت به نمونه کنترل بیشتر بوده است و بترتیب ۱/۶۷ و ۴/۱۵ و ۱/۸ برابر کنترل گردیده است ... نتایج این تحقیق تایید کننده‌ی اثر سویه‌های *Agrobacterium rhizogenes* در افزایش میزان زیست توده بود و نشان داد که با انتخاب سویه‌ی مناسب می‌توان بخش‌های ذخیره‌ای را افزایش داد و در نتیجه میزان متابولیت‌ها را در کشت ریشه‌های موئین گیاه *Luffa cylindrica* بهینه نمود.

کلیدواژه‌ها: آگروباکتریوم رایزوژنز، لوفین، RIP.

Luffa cylindrica می‌باشد که گیاهی است یکساله و

مقدمه

بالارونده است [۸].

گیاه لیف از خانواده Cucurbitaceae با نام علمی

بر افزایش متابولیت‌های گیاهی اثر می‌گذارد [۱۰]. این حقیقت که تولید متابولیت‌های ثانویه معمولا در بافت‌های تمایز یافته زیاده‌تر بوده و از لحاظ ژنتیکی نیز از ثبات بیشتری برخوردار می‌باشد ریشه‌های موپین را به تکنیکی جایگزین برای استفاده در جهت تولید متابولیت‌های ثانویه تبدیل کرده است [۱]. همچنین گیاه لوفای سیلیندریکا گیاهی مناسب برای بیان ژن‌های مختلف در مطالعات بیوتکنولوژی با استفاده از تکنیک آگروباکتريوم رایزوزنز می‌باشد که در مطالعات مختلف مورد توجه قرار گرفته است [۱۱].

محققین مختلف با مجاورت سویه‌های مختلف آگروباکتريوم رایزوزنز با استفاده از تکنیک‌های بیوتکنولوژی موفق به افزایش متابولیت‌های گیاهان شدند [۱].

در تحقیقی تولید پروتئین نوترکیب EPO با مجاورت گیاه تنباکو با آگروباکتريوم رایزوزنز انجام شده است [۱۳]. بررسی تغییرات آناتومیکی گیاه نیز دارای اهمیت فراوان می‌باشد علاوه بر استفاده در سیستماتیک، در بیان تغییرات ژنتیکی و اثرات عوامل مختلف بر ژنتیک گیاه استفاده می‌شود [۱۹]. از آنجا که ریشه محل اصلی تولید و ذخیره بسیاری از متابولیت‌های گیاهی است و سلول‌های پارانشیم در ریشه محل ذخیره متابولیت‌هاست تغییرات این سلول‌ها و سایر اجزا ریشه می‌تواند بر میزان ذخیره‌سازی متابولیت‌ها، و حتی تولید متابولیت‌ها اثر بگذارد [۱۷]. بر همین اساس بررسی تغییرات، تعداد و سایر ویژگی‌های بافت ریشه‌های تراریخت و مقایسه آن با نمونه غیرتراریخت حایز اهمیت است که بررسی اثرات آنها بر ویژگی‌های مورفولوژیکی و تشریحی گیاه لوفای برای اولین بار در ایران و جهان انجام می‌شود. در بررسی‌های انجام شده تاکنون مقاله‌ای در این زمینه

هابو و آلویر در سال ۲۰۰۹ ماده موثره این گیاه را که عمدتا پروتئینی به نام Luffin است و دو ایزوفرم a, b را در آن شناسایی کردند. این پروتئین خاصیت مهارکنندگی ریبوزوم را دارد [۱۸].

Luffin عضوی از خانواده (Rip Ribosome inactive protein) هاست که خواص ضدتوموری، ضدایدزی، القای سقط جنین و فعالیت‌های ضدقارچی دارد [۲۲،۷]. فیبرگیاه لیف دارای ظرفیت جذب بالای آب است که آن را به عنوان یک جاذب مناسب، به عنوان مثال در تصفیه فاضلاب آبی مورد استفاده قرار می‌دهند [۷]. گیاه لوفای تقریبا در تمام نقاط جهان بخصوص در کشورهای جنوب شرقی آسیا قابل کشت می‌باشد [۱۶].

بدلیل خواص دارویی و آنتی توموری لوفین تکنیک‌های مختلفی برای افزایش تولید آن در گیاه لوفای انجام شده است [۱۵]. از جمله این تکنیک‌ها استفاده از کشت بافت و همچنین آگروباکتريوم رایزوزنز جهت ایجاد ریشه‌های موپین روش مناسبی برای افزایش متابولیت‌های ثانویه بخصوص ترکیبات دارویی در گونه‌های مختلف گیاهی می‌باشد چراکه ریشه‌های موپین بدلیل رشد سریع و داشتن انشعابات فراوان و افزایش میزان زیست توده دارای ظرفیت بیوسنتزی بیشتر از ریشه‌های طبیعی است [۳،۲۳].

آگروباکتريوم یک نوع باکتری گرم منفی خاکزی است آگروباکتريوم می‌تواند DNA را به تعداد قابل ملاحظه‌ای از دولپه‌ای‌ها و تک‌لپه‌ای‌ها در گونه‌های نهان‌دانه و بازدانگان منتقل نماید پلاسمید در اثر عفونت با باکتری آگروباکتريوم رایزوزنز وارد گیاه می‌شود.

امروزه آگروباکتريوم رایزوزنز با انتقال Ri پلاسمید خود به سلول گیاه باعث افزایش هورمون اکسین و ایجاد ریشه‌های موپین در گیاه می‌شود و به این ترتیب

باکتری بود که نمونه‌های کنترل در آنها قرار داده شدند [۱۷].

در مرحله بعد ۳ بار با آب مقطر استریل شستشو داده شدند در سه مرحله و بین هر مرحله با دستمال کاغذی اتوکلاو شده خشک شدند و مجدداً شستشو انجام شد. در نهایت برش‌های گیاه در پتری دیش‌های حاوی محیط MS بدون آنتی‌بیوتیک حاوی آگار که قبلاً تهیه شده بود کشت داده شدند. پتری‌دیش‌ها داخل فویل پیچیده شدند تا شرایط تاریکی فراهم شود و در انکوباتور ۲۸ درجه قرار گرفتند. ریزنمونه‌ها بعد از ۲۴ ساعت از شرایط تاریکی خارج شدند و به محیط MS آگار حاوی آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم و شرایط روشنایی به مدت یکماه منتقل شدند. میزان سفوتاکسیم ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر می‌باشد. بعد از یکماه آنتی‌بیوتیک از محیط حذف شد [۱۷].

روش‌های بافت شناختی و بررسی ساختار ریشه گیاه

پس از مجاورت گیاه با باکتری و انجام مراحل تراریخت کردن و رشد گیاه بعد از گذشت ۳۰ روز از زمان مجاورت باکتری و گیاه از ریشه گیاه غیر تراریخت و نمونه‌های تراریخت نمونه‌گیری انجام شد بطوری که قطعاتی به طول ۱/۵ تا ۲ سانتی‌متر از ناحیه نزدیک به انتهای ریشه پایین‌تر از ناحیه مرستمی برش زده شد و هر نمونه جداگانه جهت انجام برش‌گیری در فیکساتور قرار داده شد و سپس آب‌گیری، شفاف‌سازی، نفوذ پارافین، قالب‌گیری، برش‌گیری، رنگ‌آمیزی بافت‌ها به روش هماتوکسیلین-اِئوزین انجام شد [۶]. برای حفظ نمونه‌ها و جلوگیری از خشک شدن و تغییر شکل آنها و نیز برای مشاهدات لازم با میکروسکوپ نوری برش‌ها بر روی لام سوار شدند. پس از مطالعه لام‌ها از نمونه‌های مناسب با

یافت نشد. بعلاوه اثر سویه‌های مختلف آگروباکتریوم بر گونه‌های مختلف گیاهی کاملاً متفاوت است [۱]. لذا یافتن سویه مناسب بسیار حایز اهمیت می‌باشد به همین دلیل از سویه‌های مختلف در این پژوهش استفاده گردید.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

گیاه مورد استفاده در این پژوهش لوفاسیلیندریکا (*Luffacylindrica*) بود که از خانواده کدویان می‌باشد. بذرگونه گیاهی مورد نظر از دانشگاه صنعت آب و برق تهیه شد و پس از استریل شدن بذرها گیاهی روی محیط Murashigskoog (MS) کشت داده شدند [۲۰].

باکتری‌های مورد استفاده در این پژوهش، سویه‌های ۱۵۸۳۴ و ۹۵۳۴ و A4 از گونه آگروباکتریوم رایزوزنز بودند که توسط سرکار خانم دکتر افقی از مرکز پژوهش‌های علمی و صنعتی هدیه شد. کشت یک تک کلون باکتری در ۱۰ میلی‌لیتر محیط TSB حاوی ۵۰ ماکروگرم در میلی‌لیتر ریغامپسین در شرایط تاریکی و دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد انجام شد.

بعد از ۴۸ ساعت سوسپانسیون باکتری‌ها با ۰/۴- OD: ۰/۶ با دور 2300G به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند سپس محیط رویی خارج شد و میزان ۱۰ سی سی از محیط MS مایع که قبلاً تهیه شده بود به پلیت باکتری اضافه شد. سوسپانسیون باکتری و محیط کشت در چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه ای بصورت یک در میان ریخته شد. گیاه از ناحیه ساقه بیشتر نواحی انتهایی و نواحی کمی پایین‌تر برش زده شد و با در نظر گرفتن قطبیت گیاه داخل سوسپانسیون باکتری قرار داده شدند. یکسری از چاهک هم محیط کشت بدون

بزرگ‌نمایی مختلف عکس‌برداری شد و بوسیله

نرم‌افزار Image J 1.50e عکس‌ها بررسی و مقایسه شد.

نتایج

میزان رشد در نمونه‌های مختلف متفاوت بود و تفاوت بین نمونه‌های تراریخت و غیر تراریخت به لحاظ زیست توده در طی یکماه بطور کامل نمایان شد.

در نمونه ۱۵۸۳۴ بیشترین میزان ریشه نسبت به نمونه کنترل و حتی سایر نمونه‌های تراریخت مشاهده شد. که با اندازه‌گیری وزن خشک ریشه‌ها بعد از ۳۰ روز این اختلاف مشخص‌تر شد. به این ترتیب که وزن خشک نمونه تراریخت شده با سویه ۱۵۸۳۴ به میزان ۳/۲ میلی‌گرم، در نمونه ۹۵۳۴ وزن خشک ریشه ۲/۶ میلی‌گرم، نمونه A4 وزن خشک ریشه ۱/۳ میلی‌گرم و در نمونه کنترل ۱.۶ میلی‌گرم بود. همانطور که مشاهده می‌شود بیشترین میزان زیست توده ریشه در نمونه ۱۵۸۳۴ بود.

در برش عرضی از ریشه، بافت اپیدرم یک لایه بوده و در زیر آن بافت پارانشیم و کورتکس که چند لایه قرار دارد و سپس دسته‌های آوندی که بصورت مجموعه‌ای از آوندهای چوب و آبکش می‌باشد بصورت یک در میان قرار گرفته‌اند. در قسمت مرکز سلول‌های پارانشیم وجود دارد. همانطور که در اشکال (۱) و (۲) مشاهده می‌شود. سلول‌های لایه پارانشیم نسبت به نمونه کنترل بزرگتر بنظر می‌آید و از فشردگی کمتری برخوردار است و در عوض سیستم آوندی فشرده تر شده است. در این مرحله با استفاده از نرم‌افزار ImageJ به مقایسه اندازه سطح لایه‌های مختلف اپیدرم، کورتکس و بافت آوندی پرداخته شد

[۲].

در تصویر شکل (۱) برش‌های عرضی با بزرگ‌نمایی ابژکتیو 10X را دیده می‌شود که در این بزرگ‌نمایی سطح ریشه در لایه‌های مختلف اندازه‌گیری شده است. نتایج اندازه‌گیری به شرح زیر بود. ضخامت لایه اپیدرم در نمونه کنترل ۶۴/۱ میکرومتر بود در نمونه ۱۵۸۳۴ این ضخامت ۲۶۶/۱ میکرومتر، نمونه ۹۵۳۴ برابر با ۴۷/۱ میکرومتر و در نمونه A4 میزان ۷۹/۱ میکرومتر بود. همانطور که در نتایج مشاهده می‌شود قطر لایه اپیدرم در نمونه‌های تراریخت شده سویه‌های ۱۵۸۳۴ و A4 نسبت به نمونه کنترل افزایش یافته و در نمونه تراریخت شده با سویه ۹۵۳۴ ضخامت این لایه نسبت به نمونه کنترل کاهش یافته است. اندازه سطح ناحیه کورتکس (پارانشیم پوست) نیز به شرح زیر بود. در نمونه کنترل سطح کورتکس ۷۹۴ میکرومتر اندازه‌گیری شد. نمونه ۱۵۸۳۴ این اندازه برابر با ۱۳۲۸ میکرومتر بود. در نمونه ۹۵۳۴ اندازه این لایه ۹۲۲/۷ میکرومتر بود و در نمونه A4 این لایه ۶۸۴/۳ میکرومتر اندازه‌گیری شد. همانطور که در نتایج ذکر شد ضخامت لایه کورتکس در نمونه تراریخت شده با سویه ۱۵۸۳۴ از همه بیشتر و سپس نمونه ۹۵۳۴ بیشترین ضخامت را دارد. در نمونه تراریخت شده با سویه A4 سطح این لایه نسبت به نمونه کنترل کاهش یافته است. ناحیه گزیم نیز اندازه‌گیری شد که نتایج آن بصورت زیر بود. سطح گزیم در نمونه کنترل ۱۰۷۵ میکرومتر گزارش شد که این سطح در نمونه تراریخت شده با سویه ۱۵۸۳۴ به میزان ۳۹۳/۵ میکرومتر و در نمونه ۹۵۳۴ به میزان ۲۳۸/۸ میکرومتر و در نمونه A4 به میزان ۳۲۴/۶ میکرومتر اندازه‌گیری شد. ناحیه فلوئم نیز اندازه‌گیری شد که به شرح زیر بود. در نمونه کنترل سطح لایه

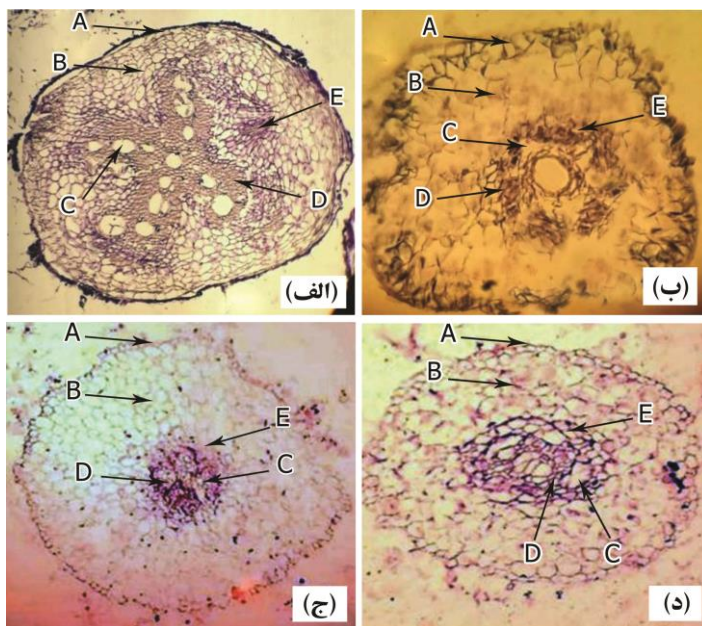
اندازه سلول‌های پارانشیمی در نمونه A۴ از همه کوچک‌تر بود و سپس در نمونه کنترل از دو نمونه دیگر کوچک‌تر بود و بعد از آن در نمونه ۹۵۳۴. اندازه سلول‌های پارانشیمی در نمونه ۱۵۸۳۴ از همه بزرگ‌تر بود.

بررسی اثر سوبه‌های ۱۵۸۳۴، ۹۵۳۴ و A4 آگروباکتریوم رایزوژن‌زبروری گیاه لوفاز طریق کشت بافت برای اولین بار در این طرح در ایران و جهان انجام گرفت.

در بررسی مورفولوژیک و تشریحی گیاه لوفاز همانطور که در قسمت نتایج گفته شد تغییرات قابل ملاحظه در نمونه‌های مختلف دیده شد. در نمونه غیر تراریخت دستجات آوندی چوب و آبکش مشابه دیگر جنس‌های خانواده کدویان مجتمع و کنار هم هستند. دستجات آوندی بصورت روی هم (Bi-Collateral) قرار گرفته است [۵].

فلوئم ۷۴۰ میکرومتر بود این ناحیه در نمونه تراریخت شده با سوبه ۱۵۸۳۴ به اندازه ۲۸۲/۲ میکرومتر در نمونه ۹۵۳۴ برابر با ۲۰۸/۹ میکرومتر و در نمونه تراریخت شده با ۲۱۲/۵A4 میکرومتر اندازه‌گیری شد اندازه‌گیری ناحیه آوندی چوب و آبکش نشان داد که این ناحیه در همه نمونه‌های تراریخت کاهش قابل ملاحظه‌ای نسبت به نمونه کنترل داشته‌اند (جدول ۱). شکل (۲) برش‌های عرضی ریشه را با بزرگنمایی ۴۰X ابژکتیو نشان می‌دهد که در این بزرگنمایی اندازه سلول‌های پارانشیمی در نمونه‌های مختلف بررسی شد.

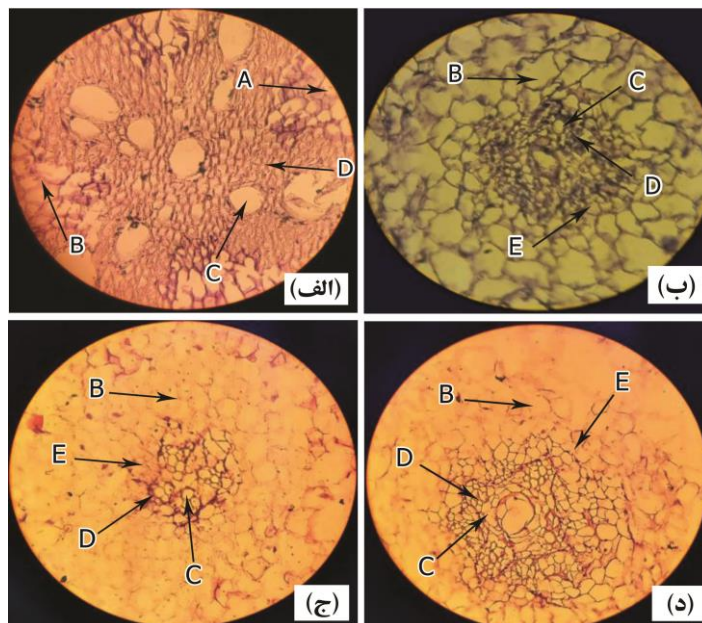
به این ترتیب که سایز سلول‌های پارانشیمی در نمونه کنترل بطور میانگین ۱۷۵.۸ میکرومتر بود. در نمونه ۱۵۸۳۴ سایز سلول‌های پارانشیمی بطور میانگین ۳۲۸ میکرومتر بود. در نمونه ۹۵۳۴ این اندازه بطور میانگین برابر با ۱۸۴/۴ میکرومتر و در نمونه A۴ برابر با ۱۶۴/۹ میکرومتر بود.



شکل (۱) برش عرضی ریشه گیاه بزرگنمایی ۱۰x ابژکتیو

الف) گیاه کنترل غیر تراریخت، ب) گیاه تراریخت با سوبه ۱۵۸۳۴، ج) گیاه تراریخت با سوبه ۹۵۳۴،

د) گیاه تراریخت با سوبه A4، ایپدرم، B) کورتکس (ایپدرم)، C) گزیم، D) فلوئم، E) اندودرم



شکل (۲) برش عرضی ریشه گیاه بزرگنمایی ۴۰X ایزکتیو

الف) گیاه کنترل غیر تراریخت، ب) گیاه تراریخت با سویه ۱۵۸۳۴، ج) گیاه تراریخت با سویه ۹۵۳۴،

د) گیاه تراریخت با سویه A4

(A) اندودرم، (B) کورتکس (اپیدرم)، (C) گزیم، (D) فلوئم

پارانشیم و ناحیه آوندی و همچنین اندازه سلولهای پارانشیمی در نمونههای مختلف متفاوت است. همانطور که در نتایج می بینیم سطح لایه کورتکس در نمونه ۱۵۸۳۴ نسبت به سایر نمونههای تراریخت و نمونه کنترل بیشتر شده است و در عوض سطح ناحیه آوندی نسبت به نمونه کنترل کاهش داشته است ولی در بین نمونههای تراریخت این ناحیه در نمونه ۱۵۸۳۴ نسبت به سایر نمونههای تراریخت از یقیه بزرگتر است.

جدول ۱: مقایسه اندازه نواحی مختلف ریشه در نمونههای تراریخت و غیر تراریخت

| Sample | Epiderm (µm) | Cotex (µm) | Xylem (µm) | Phloem (µm) |
|--------|--------------|------------|------------|-------------|
| Ctrl | 64 | 794 | 1075 | 740 |
| 15834 | 266 | 1328 | 393 | 283 |
| 9534 | 47 | 922 | 238 | 208 |
| A4 | 79 | 684 | 324 | 212 |

همچنین گزیم یا سلولهای بافت آوند چوبی در قسمت درونی تر قرار گرفته و فلوئم یا سلولهای بافت آبکش بافت چوب را احاطه کرده است. لایه اپیدرم بیرونی ترین لایه است و معمولا فاقد کوتیکول می باشد. پس از آن سلولهای پارانشیم پوست قرار دارد. در ریشه لایه آندودرم دیده می شود که نزدیک به دستجات آوندی سلولهای مکعبی شکل لایه آندودرم دیده شد. این ساختار در شکل (۱) قابل مشاهده است که این ساختار در نمونههای تراریخت کمی متفاوت می باشد (جدول ۲) بطوری که دستجات آوندی فشرده تر شده و سلولهای پارانشیمی وسعت بیشتری یافته در حدی که سلولهای آندودرم هم بوضوح دیده نمی شوند. در مقایسه ای که اندازه و سایز سلولها و همچنین اندازه سطح لایه های مختلف ریشه با نرم افزار *Imag J* انجام شد و در قسمت نتایج گزارش شده است مشاهده گردید که سطح لایه

تغییرات ریخت‌شناسی ایجاد شده احتمالاً ناشی از عوامل موثر بر تغییرات ژنتیکی گیاه می‌باشد که بر تمایز بافتی و ویژگی‌های آناتومیکی گیاه اثر گذاشته و تغییرات مذکور در ریخت‌شناسی و ساختار بافت‌شناسی گیاه نمایان شده است [۵].

رودس و همکاران نشان داده‌اند که دنبال متاثر نمودن مسیرهای سیگنالینگ توسط ژن‌های سرطان‌زای باکتریایی منتقل شده به سلول‌های گیاهی، تنظیمات مسیرهای تمایز بافتی هم نیز دستخوش تغییراتی می‌شود که این تغییرات در برش‌های عرضی تهیه شده قابل مشاهده است. این تغییرات می‌تواند به رفع محدودیت‌های موجود در مسیر تولید متابولیت‌ها منجر شود. هورمون اکسین در مورفولوژی و تولید متابولیت‌ها در ریشه‌های تراریخت نقش عمده‌ای دارد بطوریکه فنوتیپ ریشه تحت تاثیر بیان ژن‌های اکسین قرار می‌گیرد و در نتیجه مورفولوژی ریشه نیز تغییر می‌کند [۲۳]. از طرفی در ریشه‌های تراریخت بعضی از سلول‌های پارانشیم تمایز یافته و تبدیل به ادیوبلاست می‌شوند که با میکروسکوپ TEM قابل مشاهده است این سلول‌ها برای شرکت در بیوستتوز و تجمع متابولیت‌ها موثرند [۱۴]. نتایج ما نیز نشان داد که قطر ریشه در نمونه تراریخت شده با سویه ۱۵۸۳۴ افزایش یافته است که بافتی برای ذخیره می‌باشد بعلاوه مطالعات ما نشان داد که دلیل افزایش لایه کورتکس نسبت به سایر نمونه‌ها آگروباکتریوم ۱۵۸۳۴ مناسب‌ترین سویه برای تراریخت نمودن گیاه لوف‌ها می‌باشد. باتوجه به نقشی که اکسین‌های کد شده توسط آگروباکتریوم ریزو ژنز در تغییرات مورفولوژیک و تولید آلکالوئیدها در نمونه‌های تراریخت با این باکتری دارد [۲۳] و همچنین تغییراتی که در سلول‌های پارانشیمی نمونه‌های تراریخت شده در جهت تمایز به

جدول ۲: مقایسه اندازه سلول‌های پارانشیم در نمونه‌های تراریخت و غیر تراریخت

| Sample | Paranchym cells (µm) |
|--------|----------------------|
| Ctrl | 175 |
| 15834 | 328 |
| 9534 | 184 |
| A4 | 164 |

بحث

در این مطالعه نشان داده شد که سویه‌های مختلف قادرند در گیاه لوف‌ها ایجاد ریشه موئین بنمایند. بعلاوه ایجاد ریشه ترانس ژن قادر است که میزان تولید زیست توده را افزایش دهد [۲۱]. این با مطالعات زمانزاده و همکاران مطابقت دارد که نشان داده‌اند که میزان اکسین در نمونه‌های تراریخت شده با سویه ۱۵۸۳۴ نسبت به نمونه‌های غیر تراریخت افزایش داشته که این با افزایش ریشه‌زایی مطابقت دارد [۴].

همچنین با توجه به اثرات متفاوت سویه‌های مختلف آگروباکتریوم بر گونه‌های مختلف گیاهی در مطالعه‌ای که بر روی گیاه کاسنی انجام شده بود با توجه به رشد سریع ریشه‌های موئین در شرایط عاری از هورمون در سویه ۱۵۸۳۴ نسبت به سایر سویه‌ها نه تنها افزایشی در میزان متابولیت‌دیده نشد بلکه نتایج حاکی از کاهش میزان ترکیبات فنولی در این گیاه بود [۵]. تاکنون در گیاهان *Gentianalutea*, *Daturastramonium*, *Limoniumsinutum* از طریق این باکتری ریشه‌های موئین ایجاد و سپس بوسیله باززایی از این ریشه‌ها گیاهان تراریخت تولید گردیده است [۹، ۱۲]. ریشه‌های تراریخت دارای رشد متفاوت نسبت به نمونه‌های غیر تراریخت هستند [۲۳].

در مطالعه‌ای که کبیرنتاج و همکاران بر روی اثرات سویه‌های مختلف آگروباکتریوم بر گیاه کاسنی انجام دادند با توجه به اثرات چندگانه ژن‌های این باکتری،

شده از ریشه های تراریخت تنباکو (*Nicotianatabacum*)، مجله علمی پژوهشی سلول و بافت، جلد ۱، شماره ۲، ۱-۷.

[۵] سارا کبیرنتاج، الناز قطبی راوندی*، فرخنده رضانژاد و بهزاد شاهین کلپیر. ۱۳۹۲. تأثیر سویه های مختلف آگروباکتریوم رایزوزنبر میزان بیوسنتز ترکیبات فنولی و کلروژنیک اسید در ریشه های موئین گیاه کاسنی. مجله علمی پژوهشی زیست فناوری گیاهان زراعی، ۶۹-۷۹.

[۶] سید طباطبایی ابراهیم، ۱۳۹۴، کشت بافت و سلول گیاهی، انتشارات دانشگاه تهران.

[۷] مظفریان، ولی ا... ۱۳۹۱. کتاب شناخت گیاهان دارویی و معطرایران. انتشارات فرهنگ معاصر.

[۸] مظفریان، ولی ا... ۱۳۷۳. کتاب فرهنگ نام های گیاهان دارویی ایران. چاپ چهارم. انتشارات فرهنگ معاصر.

[9] Baiza AMet al, 2000, Genetic stability of hairy root cultures of *Daturastramonium*. Plant cell tissue and org culture. 59: 9-17.

[10] Bevan MW, Chilton MD, 1982, T-DNA of the *Agrobacterium* Ti and Ri plasmids, Annu Rev Genet., 16: 357-84.

[11] Błażejewska K et al, 2017, Mature *Luffa* Leaves (*Luffacylindrica* L.) as a Tool for Gene Expression Analysis by Agroinfiltration, Front Plant Sc, 21(8): 228.

[12] Gururaja HB et al, 2006, *Agrobacteriumrhizogenes* mediated genetic transformation resulting in hairy root formation is enhanced by ultrasonication and acetosyringonetreatment. Electronic J. of Biotech. 9 (4): 349-357.

[13] Gurusamy PD, Schäfer H, Ramamoorthy S, 2017, Biologically active recombinant humanerythropoietin expressed in hairy root cultures and regenerated plantlets of *Nicotianatabacum* L. PLoS One, 12 (8): e018236.

[14] Iranbakhsh A.R, Oshaghi M. A, Ebadi M, 2007, Growth and Production Optimization of Tropane Alkaloids in *Daturastramonium*

سمت ادیوبلاست ها که سلول هایی موثر برای شرکت در بیوسنتز و تجمع متابولیت ها هستند رخ داده است [۱۴] احتمال افزایش تولید متابولیت لوفین را در سویه های تراریخت شده با آگروباکتریوم رایزوزنهای ۹۵۳۴ و ۱۵۸۳۴ و A۴ بالا خواهد برد که باید مورد بررسی قرار گیرد.

تشکر قدردانی

از سرکار خانم دکتر اردبیلی، خانم امیا، خانم داعی زاده، جناب آقای دکتر سامانی و جناب آقای مهندس مهرجو جهت کمک در انجام این پروژه سپاس گذاری می نمایم.

منابع

[۱] افسانه صمدی، مراد جعفری*، ناصر عباسپور، محمدرضا دینی ترکمانی، ۱۳۹۳، القا و بهینه سازی شرایط رشد ریشه های موئین گیاه سنبل الطیب (*Valerianaofficinalis* L). حاصل از تلقیح آگروباکتریوم رایزوزن (*Agrobacteriumrhizogenes*)، مجله سلول و بافت، ۲۳-۳۰.

[۲] پورخسروانی محسن، ولی عباسعلی، مسعود معیری. ۱۳۸۸. بررسی ارتباط مورفولوژی گیاهی با خصوصیات مورفومتری گونه (نبکاهای روماریا تورسستانیکا). پژوهش های جغرافیای طبیعی. ۹۹-۱۱۳.

[۳] حسینی. ۱۳۹۱. کاربرد بیوتکنولوژی در افزایش بهره وری گیاهان دارویی.

[۴] زمانزاده زهرا، احسانپور علی اکبر، امینی فریبا، ۱۳۹۲، بررسی میزان اکسین در گیاهان باززایی

- Cell Suspension Culture, Pakistan Journal of Biological Science, 10 (8): 1236-1242.
- [15] Liling Liu¹, Rupeng Wang, Wei He¹, Fengtian He², and Gang Huang, 2010, Cloning and soluble expression of mature α -luffin from *Luffacylindrica* and its antitumor activities in vitro, *ActaBiochimBiophys*, 42: 585-592.
- [16] Liu. L., Wang. R, He. W, F. He, and G. Huang, 2010, "Cloning and soluble expression of mature α -luffin from *Luffacylindrica* and its antitumor activities in vitro," *ActaBiochimBiophys Sin*, vol. 42, pp. 585-592.
- [17] Luigi sanitadiToppi, Paola Gorini, et al, 1996, Production of ribosome-inactivating protein from hairy root culture of *Luffacylindrica* (L.) Roem. *Plant cell reports*. 15: 910-913.
- [18] Oboh, O. and Aluyor, E. O, 2009, *Luffa Cylindrica* an emerging cash crop. *African J of Agricultural Res* 4(8), 684-688.
- [19] Omosum G et al, 2008, Growth and anatomy of *Amaranthushybridus* as affected by different crude oil concentrations. *Am-Eurasian J Sci*, 3(1):70-74.
- [20] Skoog F, Murashig T, 1962, A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures, *Physiologia Plantarum* Volume 15, Issue 3, Pages 473-497
- [21] Srivastava S1, Srivastava AK, 2007, Hairy root culture for mass-production of high-value secondary metabolites, *Crit Rev Biotechnol*, Jan-Mar;27(1):29-43.
- [22] Sutharshana, 2013, Protective Role of *Luffa Cylindrica*. *J.Pharm, Sci. & Res*. Vol. 5(9), 184-186.
- [23] Vivanca JM, Guimaraes RL, Flores HE, 2002, The biosynthetic potential of roots, *Underground plant metabolism*, pp 1045-1064