فصلنامه (علمی – پژوهشی)

زیست شناسی تکوینی

سال دهم، شماره ۲، بهار ۱۳۹۷

بررسی ساختار ریشه‌های مویین 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 دریافت: ۹۶/۱۲/۰۸ تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۴/۱۰

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 ۱۵۸۳۴و۹۵۳۴ 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 نمونه های تراریخت ساختارآوندی نسبت به نمونه کنترل فشرده‌تر شده است. بطوریکه اندازه سطح گزیلم در ریشه‌های ترا ریخت مجاور شده با آگروباکتریوم‌ها نسبت به نمونه کنترل بیشتر شده و به شرح زیر می‌باشد: ۱۵۸۳۴(۳۹۳/ ۵ µm)> A4 (۳۲۴/۶ µm) >۹۵۳۴(۲۳۸/ ۸ µm)>. کنترل(۱۷۵µm). 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 مویین ناشی از ۱۵۸۳۴ نسبت به نمونه کنترل بیشتر بوده است و بترتیب ۱/۶۷ و ۴/۱۵ و ۱/۸برابر کنترل گردیده است ... نتایج این تحقیق تایید کننده‌ی اثر سویه‌های*Agrobactrium 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: اگروباکتریوم رایزوژنز، لوفین،RIP.

مقدمه

گیاه لیف از خانواده Cucurbitaceae با نام علمی *Luffacylindrica* می‌باشد که گیاهی است یکساله و بالارونده است[۸].

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 مهار کنندگی 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 مورداستفاده قرار می‌دهند [۷]. گیاه لوفا تقریبا در تمام نقاط جهان بخصوص در کشورهای جنوب شرقی آسیا قابل کشت می‌باشد [۱٦].

بدلیل خواص دارویی و آنتی توموری لوفین تکنیک‌های مختلفی برای افزایش تولیدآن در گیاه لوفا انجام شده است [۱۵]. ازجمله این تکنیک‌ها استفاده از کشت بافت و همچنین آگروباکتریوم رایزوژنز جهت ایجاد ریشه‌های مویین روش مناسبی برای افزایش متابولیت‌های ثانویه بخصوص ترکیبات دارویی در گونه‌های مختلف گیاهی می‌باشد چراکه ریشه‌های مویین بدلیل رشد سریع و داشتن انشعابات فراوان وافزایش میزان زیست توده دارای ظرفیت بیوسنتزی بیشتر از ریشه های طبیعی است [۳،۲۳].

اگروباکتریوم یک نوع باکتری گرم منفی خاکزی است آگروباکتریوم می‌تواند DNA را به تعداد قابل ملاحظه‌ای از دولپه‌ای‌ها و تک لپه‌ای‌ها در گونه‌های نهاندانه و بازدانگان منتقل نماید پلاسمید در اثر عفونت باباکتری آگروباکتریوم رایزوژنز وارد گیاه می‌شود.

امروزه آگروباکتریوم رایزوژنز با انتقال Ri پلاسمید خود به سلول گیاه باعث افزایش هورمون اکسین و ایجاد ریشه‌های مویین درگیاه می‌شود و به این ترتیب بر افزایش متابولیت‌های گیاهی اثر می‌گذارد [۱۰].

این حقیقت که تولید متابولیت‌های ثانویه معمولا در بافت‌های تمایز یافته زیادتر بوده و از لحاظ ژنتیکی نیز از ثبات بیشتری برخوردار می‌باشد ریشه‌های مویین را به تکنیکی جایگزین برای استفاده در جهت تولید متابولیت‌های ثانویه تبدیل کرده است [۱]. همچنین گیاه لوفا سیلیندریکا گیاهی مناسب برای بیان ژن‌های مختلف در مطالعات بیوتکنولوژی با استفاده از تکنیک آگروباکتریوم رایزوژنز می‌باشد که در مطالعات مختلف مورد توجه قرار گرفته است [۱۱].

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

درتحقیقی تولید پروتئین نوترکیب EPO با مجاورت گیاه تنباکو با آگروباکتریوم رایزوژنز انجام شده است [۱۳]. بررسی تغییرات آناتومیکی گیاه نیز دارای اهمیت فراوان می‌باشد علاوه بر استفاده در سیستماتیک، در بیان تغییرات ژنتیکی واثرات 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 سلو لها وسایر 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 استکه بررسی اثرات آنها بر ویژگی‌های مورفولوژیکی و تشریحی گیاه لوفا برای اولین بار در ایران وجهان انجام می‌شود. در بررسی‌های انجام شده تاکنون مقاله‌ای در این زمینه

یافت نشد. بعلاوه اثر سویه‌های مختلف آگروباکتریوم بر گونه‌های مختلف گیاهی کاملا 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 لوفا سیلیندریکا (*Luffacylindrica*) بود که از خانواده کدوییان می‌باشد. بذرگونه گیاهی مورد نظر از دانشگاه صنعت آب وبرق تهیه شدو پس از استریل شدن بذرهای گیاهی روی محیط Murashigskoog(MS) کشت داده شدند [۲۰].

باکتری‌های مورد استفاده در این پژوهش، سویه‌های ۱۵۸۳٤ و ۹۵۳٤ و A4 از گونه آگروباکتریوم رایزوژنز بودند که توسط سرکار خانم دکتر افقی از مرکز پژوهش‌های علمی وصنعتی هدیه شد. کشت یک تک کلون باکتری در ۱۰ میلی‌لیتر محیط TSB حاوی ۵۰ ماکروگرم در میلی‌لیتر ریفامپسین در شرایط تاریکی و دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد انجام شد.

بعد از ٤۸ ساعت سوسپانسیون باکتری‌ها با.۰/٤– OD:۰/٦ بادور 2300G به مدت ۱۰ دقیقه سانتریوفوژ شدند سپس محیط رویی خارج شد و میزان ۱۰ سی سی از محیطMS مایع که قبلا تهیه شده بود به پلیت باکتری اضافه شد. سوسپانسیون باکتری و محیط‌کشت در چاهک‌های پلیت ۹٦ 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 محیط‌کشت بدون 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 مجددا شستشو انجام شد. در نهایت برش‌های گیاه در پتری دیش های حاوی محیط MS بدون آنتی‌بیوتیک حاوی آگار که قبلا تهیه شده بود کشت داده شدند. پتری‌دیش‌ها داخل فویل پیچیده شدند تا شرایط تاریکی فراهم شودودر انکوباتور ۲۸ درجه قرار گرفتند. ریزنمونه‌ها بعد از ۲٤ 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 ورشد گیاه بعد از گذشت ۳۰ روز از زمان مجاورت باکتری و گیاه از ریشه گیاه غیر تراریخت و نمونه‌های تراریخت نمونه‌گیری انجام شد بطوری‌که قطعاتی به طول ۱/۵ تا ۲ سانتی‌متر از ناحیه نزدیک به انتهای ریشه پایین‌تر از ناحیه مریستمی 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–ائوزین انجام شد [٦]. برای حفظ نمونه‌ها و جلوگیری از خشک شدن و تغییر شکل آنها و نیز برای مشاهدات لازم با میکروسکوپ نوری برش‌ها برروی لام سوار شدند. پس از مطالعه لام‌ها از نمونه‌های مناسب با

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 ۱۵۸۳٤ 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 ۱۵۸۳٤ به میزان ۳/۲ میلی‌گرم، در نمونه ۹۵۳٤ وزن خشک ریشه ۲/٦ میلی‌گرم، نمونه A4 وزن خشک ریشه۱/۳ میلی‌گرم و درنمونه کنترل ۱.٦ میلی‌گرم بود. همانطور که مشاهده می‌شود بیشترین میزان زیست توده ریشه در نمونه ۱۵۸۳٤ بود.

در برش عرضی از ریشه، بافت اپیدرم یک لایه بوده و در زیر آن بافت پارانشیم و کورتکس که چند لایه قرار داردو 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 می شود. سلول‌های لایه پارانشیم نسبت به نمونه کنترل بزرگتر بنظر می‌آید و از فشردگی کمتری برخوردار است و در عوض سیستم آوندی فشرده ترشده 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 ٦٤/۱ میکرو متر بود در نمونه ۱۵۸۳٤ این ضخامت ۲٦٦/۱ میکرومتر، نمونه ۹۵۳٤ برابر با٤۷/۱ میکرومترو در نمونه A4 میزان ۷۹/۱ میکرومتر بود. همانطور که در نتایج مشاهده می‌شود قطر لایه اپیدرم در نمونه‌های تراریخت شده سویه‌های ۱۵۸۳٤ وA4 نسبت به نمونه کنترل افزایش یافته و در نمونه تراریخت شده با سویه ۹۵۳٤ 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 ۷۹٤ میکرومتر اندازه‌گیری شد. نمونه ۱۵۸۳٤ این اندازه برابر با ۱۳۲۸ میکرومتر بود. در نمونه ۹۵۳٤ اندازه این لایه ۹۲۲/۷ میکرومتر بود و در نمونه A4 این لایه ٦۸٤/۳ میکرومتر اندازه‌گیری شد. همانطور که در نتایج ذکر شد ضخامت لایه کورتکس در نمونه تراریخت شده با سویه ۱۵۸۳٤ از همه بیشت و سپس نمونه ۹۵۳٤ بیشترین ضخامت را دارد. در نمونه تراریخت شده با سویه A4 سطح این لایه نسبت به نمونه کنترل کاهش یافته است. ناحیه گزیلم نیز اندازه‌گیری شد که نتایج آن بصورت زیر بود. سطح گزیلم در نمونه کنترل ۱۰۷۵ میکرومتر گزارش شد که این سطح در نمونه تراریخت شده با سویه ۱۵۸۳٤ به میزان ۳۹۳/۵ میکرومترو در نمونه ۹۵۳٤ به‌میزان ۲۳۸.۸ میکرومترو در نمونه A4 به میزان ۳۲٤/٦ میکرومتر اندازه‌گیری شد. ناحیه فلوئم نیز اندازه‌گیری شد که به شرح زیر بود. در نمونه کنترل سطح لایه

فلوئم ۷٤۰ میکرومتر بود این ناحیه در نمونه تراریخت شده با سویه ۱۵۸۳٤ به اندازه ۲۸۲/۲ میکرومتر در نمونه ۹۵۳٤ برابر با ۲۰۸/۹ میکرومتر و در نمونه تراریخت شده با A4/۵۲۱۲ 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).

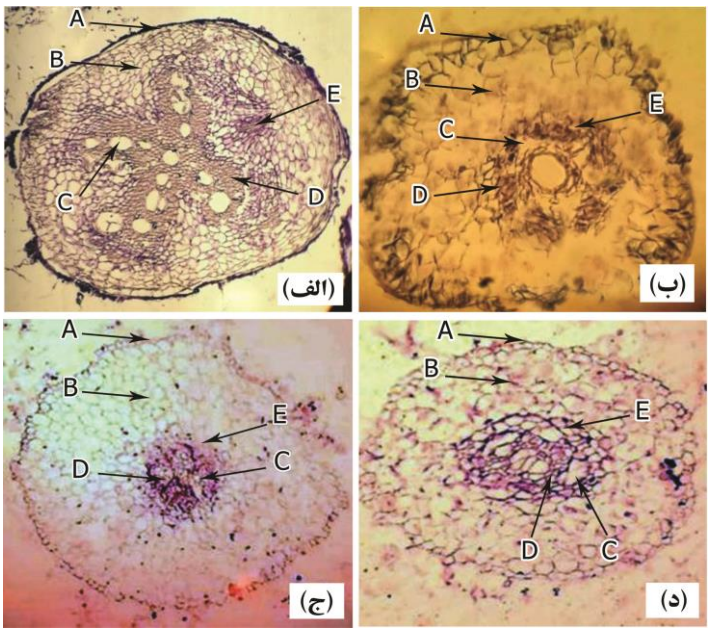
شکل(۲) برش‌های عرضی ریشه را با بزرگنمایی ۴۰X ابژکتیو نشان می‌دهد که در این بزرگنمایی اندازه سلول‌های پارانشیمی در نمونه‌های مختلف بررسی شد.

به‌این ترتیب که سایز سلول‌های پارانشیمی در نمونه کنترل بطور میانگین ۱۷۵.۸ میکرومتر بود. در نمونه ۱۵۸۳٤ سایز سلول‌های پارانشیم بطور میانگین ۳۲۸ میکرومتر بود. در نمونه ۹۵۳٤ این اندازه بطور میانگین برابر با ۱۸٤/٤ میکرومتر و در نمونه A۴ برابر با ۱٦٤/۹ میکرومتر بود.

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 ۹۵۳٤. اندازه سلول‌های پارانشیمی در نمونه ۱۵۸۳٤ از همه بزرگ‌تر بود.

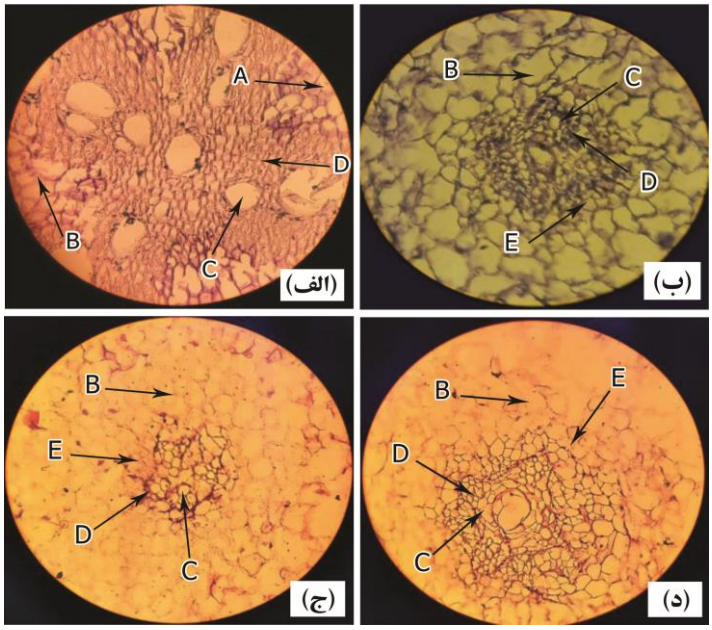
بررسی اثر سویه‌های ۱۵۸۳٤، ۹۵۳٤ و A4 آگروباکتریوم رایزوژنزبرروی گیاه لوفا از طریق کشت بافت برای اولین بار در این طرح در ایران و جهان انجام گرفت.

در بررسی مورفولوژیک و تشریحی گیاه لوفا 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 کدوییان مجتمع و کنار هم هستند. دستجات آوندی بصورت روی هم (Bi-Collateral) قرار گرفته است[۵].



شکل (۱) برش عرضی ریشه گیاه بزرگنمایی۱۰x ابژکتیو

الف) گیاه کنترل غیرتراریخت، ب) گیاه تراریخت با سویه ۱۵۸۳٤،ج) گیاه تراریخت با سویه۹۵۳٤، د) گیاه تراریخت باسویه A4 A) اپیدرم، B) کورتکس (اپیدرم)، C) گزیلم، D) فلوئم، E) اندودرم



شکل (۲) برش عرضی ریشه گیاه بزرگنمایی۴۰X ابژکتیو

الف) گیاه کنترل غیرتراریخت، ب) گیاه تراریخت با سویه ۱۵۸۳٤، ج) گیاه تراریخت با سویه۹۵۳٤،

د)گیاه تراریخت باسویهA۴

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

همچنین گزیلم یا سلول‌های بافت آوند چوبی در قسمت درونی‌تر قرارگرفته و فلوئم یا سلول‌های بافت آبکش بافت چوب را احاطه کرده است.لایه اپیدرم بیرونی‌ترین لایه است و معمولا فاقد کوتیکول می‌باشد.پس از آن سلول‌های پارانشیم پوست قرار دارد. در ریشه لایه آندودرم دیده می‌شود 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 می‌باشد (جدول ۲) بطوری‌که دستجات آوندی فشرده‌تر شده و سلول‌های پارانشیمی وسعت بیشتری یافته در حدی که سلول‌های آندودرم هم بوضوحدیده نمی‌شوند. در مقایسه‌ای که اندازه و سایز سلول‌ها وهمپنین اندازه سطح لایه‌های مختلف ریشه با نرم‌افزار Imag J انجام شد و در قسمت نتایج گزارش شده است مشاهده گردید که سطح لایه پارانشیم و ناحیه آوندی و همچنین اندازه سلول‌های پارانشمی در نمونه‌های مختلف متفاوت است. همانطور که در نتایج می‌بینیم سطح لایه کورتکس در نمونه ۱۵۸۳٤ 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 ۱۵۸۳٤ 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)	Pheloem (µm)
Ctrl	64	794	1075	740
15834	266	1328	393	283
9534	47	922	238	208
A4	79	684	324	212

جدول ۲: مقایسه اندازه سلول های 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 لوفا ایجاد ریشه مویین 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 ۱۵۸۳٤ نسبت به نمونه‌های غیر تراریخت افزایش داشته که این با افزایش ریشه‌زایی مطابقت دارد [٤].

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 ریشه های مویین در شرایط عاری از هورمون در سویه ۱۵۸۳٤ نسبت به سایر سویه نه تنها افزایشی در میزان متابولیتدیده نشد بلکه نتایج حاکی از کاهش میزان ترکیبات فنولی در این گیاه بود [۵]. تاکنون در گیاهان *Gentianalutea, Daturastramoniom, Limoniumsinutum* از طریق این باکتری ریشه‌های مویین ایجاد و سپس بوسیله باززایی از این ریشه‌ها گیاهان تراریخت تولید گردیده است [۹،۱۲]. ریشه‌های تراریخت دارای رشد متفاوت نسبت به نمونه های غیر تراریخت هستند [۲۳].

در مطالعه‌ای که کبیرنتاج و همکاران برروی اثرات سویه‌های مختلف آگروباکتریوم بر گیاه کاسنی انجام دادند با توجه به اثرات چندگانه ژن‌های این باکتری، تغییرات ریخت‌شناسی ایجاد شده احتمالا 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 به 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 تغیرات 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 ژن های 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 بیوسنتز و تجمع متابولیت‌ها موثرند [۱٤]. نتایج ما نیر نشان داد که قطر ریشه در نمونه تراریخت شده با سویه ۱۵۸۳٤ افزایش یافته است که بافتی برای ذخیره می‌باشد بعلاوه مطالعات ما نشان داد که بدلیل افزایش لایه کورتکس نسبت به سایر نمونه‌ها آگروباکتریوم ۱۵۸۳٤مناسب-ترین سویه برای تراریخت نمودن گیاه لوفا می‌باشد. باتوجه به نقشی که اکسین‌های کد شده توسط آگروباکتریوم رایزو ژنز در تغییرات مورفولوژیک و تولید آلکالوییدها در نمونه‌های تراریخت با این باکتری دارد [۲۳] وهمچنین تغییراتی که در سلول‌های پارانشیمی نمونه‌های تراریخت شده در جهت تمایز به

سمت ادیوبلاست‌ها که سلول‌هایی موثر برای شرکت در بیوسنتز و تجمع متابولیت‌ها هستند رخ داده است [١٤] احتمال افزایش تولید متابولیت لوفین را در سویه‌های تراریخت شده با آگروباکتریوم رایزوژنزهای ١٥٨٣٤و٩٥٣٤ وA٤ بالا خواهد برد که باید مورد بررسی قرار گیرد.

تشکر قدردانی

از سرکار خانم دکتر اردبیلی، خانم امیا، خانم داعی‌زاده، جناب آقای دکتر سامانی وجناب آقای مهندس مهرجو جهت کمک در انجام این پروژه سپاس‌گزاری می‌نماییم.

منابع

[١] افسانه صمدی، مراد جعفری*، ناصر عباسپور، محمدرضا دینی ترکمانی، ١٣٩٣، القا و بهینه‌سازی شرایط رشد ریشه‌های موئین گیاه سنبل الطیب (*ValerianaofficinalisL*). حاصل از تلقیح آگروباکتریوم رایزوژنز (*Agrobacteriumrhizogenes*)، مجله سلول و بافت، ٢٣-٣٠.

[٢] پورخسروانی محسن، ولی عباسعلی، مسعود معیری. ١٣٨٨. بررسی ارتباط مورفولوژی گیاهی با خصوصیات مورفومتری گونه (نبکاهای روماریا تورسستانیکا). پژوهش‌های جغرافیای طبیعی. ٩٩-١١٣.

[٣] حسینی.١٣٩١. کاربرد بیوتکنولوژی در افزایش بهره وری گیاهان دارویی.

[٤] زمانزاده زهرا، احسانپور علی‌اکبر، امینی فریبا، ١٣٩٢، بررسی میزان اکسین در گیاهان باززایی شده از ریشه‌های تراریخت تنباکو (*Nicotianatabacum*)، مجله علمی پژوهشی سلول و بافت، جلد ١، شماره ٢، ١-٧.

[٥] سارا کبیرنتاج، الناز قطبی‌راوندی*، فرخنده رضانژاد و بهزاد شاهین کلیبر. ١٣٩٢. تأثیر سویه-های مختلف اگروباکتریوم رایزوژنزبر میزان بیوسنتز ترکیبات فنولی و کلروژنیک اسید در ریشه‌های موئین گیاه کاسنی. مجله علمی پژوهشی زیست فناوری گیاهان زراعی، ٦٩-٧٩.

[٦] سید طباطبایی ابراهیم، ١٣٩٤، کشت بافت و سلول گیاهی، انتشارات دانشگاه تهران.

[٧] مظفریان، ولی ا....١٣٩١. کتاب شناخت گیاهان دارویی و معطرایران. انتشارات فرهنگ معاصر.

[٨] مظفریان، ولی ا... . ١٣٧٣. کتاب فرهنگ نام‌های گیاهان دارویی ایران. چاپ چهارم. انتشارات فرهنگ معاصر.

[9] Baiza AMet al, 2000, Geneticstability of hairy root culturs 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] BłażejewskaK 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, Agrobactriumrhizagenes mediated genetic transformation resulting in hairy root formation is inhanced by ultrasonication and acetosyringonetreatment.Electronic J. of Biotech. 9 (4): 349-357.

[13] Gurusamy PD, Schäfer H, Ramamoorthy S, 2o17, Biologically active recombinant humanerythropoietinexpressed 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*

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 a-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 Agricultrual.Res 4(8), 684-688.
[19] Omosum G et al, 2008, Growthandanatomy of Amarantthushybridus 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, Protectiv 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