کد رهگیری ثبت پروپوزال: ۱۰۳۳۶۰۹

کد رهگیری ثبت پایان نامه: ۲۱۰۸۵۹۵

بسم الله الرحمن الرحيم

کلیه امتیازهای این پایان‌نامه به دانشگاه بوعلی سینا تعلق دارد. در صورت استفاده از تمام یا بخشی از مطالب این پایان‌نامه در مجلات، کنفرانس‌ها و یا سخنرانی‌ها، باید نام دانشگاه بوعلی سینا یا استاد راهنمای پایان‌نامه و نام دانشجو با ذکر مأخذ و ضمن کسب مجوز کتبی از دفتر تحصیلات تکمیلی دانشگاه ثبت شود. در غیر این صورت مورد پیگرد قانونی قرار خواهد گرفت. درج آدرس‌های ذیل در کلیه مقالات خارجی و داخلی مستخرج از تمام یا بخشی از مطالب این پایان‌نامه در مجلات، کنفرانس‌ها و یا سخنرانی‌ها الزامی می‌باشد.

مقالات خارجی

……..……, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran.

مقالات داخلی

.....، گروه .....، دانشکده .....، دانشگاه بوعلی سینا، همدان.

دانشکدهٔ کشاورزی
گروه آموزشی بیوتکنولوژی

پایان نامه برای دریافت درجه کارشناسی ارشد در رشته مهندسی کشاورزی گرایش بیوتکنولوژی

عنوان:

بهینه‌سازی انتقال ژن به ریشه‌های مویین گیاه شیرین بیان با استفاده از *آگروباکتریوم ریزوژنز* حامل ژن گزارشگر *gus*

اساتید راهنما:

دکتر اصغر میرزایی اصل

دکتر خسرو پیری

نگارش:
خدیجه سپه وند

۲۴ بهمن ۱۳۹۱

بارالهـــــــــــــا!

در پیشگاه تو ایستاده‌ام،

و دست هایم را به سوی تو بلند کرده‌ام،

آگاهم که در بندگی ات کوتاهی نموده و در فرمانبری ات سستی کرده‌ام،

اگر راه حیا را می پیمودم از خواستن و دعا کردن می ترسیدم ...

ولـــــــــــــــــــی ...

یـــــــزدانـــــــا!

تو به من آموختی پیروزی یعنی خواستن

تو به من آموختی که غیرممکن را باید از قاموس‌ها محو کرد

پس ...

تورا همیشه سپاس گذارم به پاس نعمات بی دریغت.

تقدیم به آنان که دعای خیرشان بدرقه ی راهم بود؛

پدر و مادر عزیزم

که وجودم برایشان همه رنج است و وجودشان برایم همه مهر...

شانه هایم خمیده محبت و صداقتشان است

و من در قالب این وجود همیشه مدیونشان

اساتید گرانقدرم

به نشانی حق شناسی اندکی در برابر محبت های بی دریغشان...

برادران و خواهرانم

که خداوند نعمت وجودشان را مایه آسایش و آرامشم قرار داده

و وجود گرم دوستانم که

از هر آنچه می خواستم بی نیازم نمودند.

سپاسنامه

سپاس بی حد پروردگار را که زیور خرد بر تن آدمی ارزانی داشت تا حصول ره شریف آدمیت را به دانش آموزی و تجربه اندوزی استوار نماید. چون نیک آموخت دیگران را نیکی بخشد و خیر روا دارد. این همه را در وجود عزیزانی یافتم که راهنمایانی صدیق در آماده سازی اثر حاضر بودند.

پروردگار را به تمامی کسانیکه کاستی هایم را صبورانه چشم پوشی نمودند و دانسته و ندانسته به من نکته ها آموختند، آنچه را عطا فرما که شایسته ایشان است.

اوج سپاسم را به محضر استاد گرانقدرم، جناب آقای **دکتر اصغر میرزایی اصل** تقدیم می دارم که وجودشان بی هیچ گفتنی تفسیر واژه های خوبی و انسانیت است و زحمات بی دریغشان جبران ناپذیر. انجام این تحقیق را مرهون راهنمایی های ارزنده و زحمات بی شائبه ایشان می دانم، با همین واژگان نارسا که ابزار کار روزمرگی اند مراتب سپاسم تقدیم به حضور مستغنی شان.

با تشکر فراوان از راهنمایی های صادقانه استاد فرزانه و گرانقدرم جناب آقای **دکتر خسرو پیری** که حضورشان در تمامی مراحل این پژوهش مایه دلگرمی بود.

و با تشکر عمیق از اساتید گرامی، جناب آقای **دکتر علی دبجو** و جناب آقای **دکتر هدایت باقری** که داوری پایان نامه را بعهده داشتند و از دانش، شعور و حضورشان لبریزم نمودند.

از **سرکار خانم احمدی** به پاس همراهی و همدلی بی دریغشان قدردانی میکنم.

و از همراهی و همکاری همه دوستان خوبم در گروه باغبانی و خاکشناسی و همکلاسی های مهربانم صمیمانه سپاسگزارم.

دانشگاه بوعلی سینا

مشخصات رساله/پایان نامه تحصیلی

عنوان:

بهینه سازی انتقال ژن به ریشه های مویین گیاه شیرین بیان با استفاده از *آگروباکتریوم ریزوژنز* حامل ژن گزارشگر *gus*

نام نویسنده: خدیجه سپه وند

نام اساتید راهنما: دکتر اصغر میرزایی اصل و دکتر خسرو پیری

نام اساتید مشاور:

دانشکده: کشاورزی	**گروه آموزشی: بیوتکنولوژی**	
رشته تحصیلی: مهندسی کشاورزی	**گرایش تحصیلی: بیوتکنولوژی**	**مقطع تحصیلی: کارشناسی ارشد**
تاریخ تصویب پروپوزال:۱۳۹۰/۸/۲۲	**تاریخ دفاع: ۱۳۹۱/۱۱/۲۴**	**تعداد صفحات: ۱۰۹**

چکیده:

شیرین بیان یکی از گیاهان دارویی مهم در جهان است. ریشه شیرین بیان حاوی ساپونین تری ترپن‌های فعال می‌باشد. گلیسیریزین و محصولات هیدرولیز آن، اهمیت زیادی در صنعت دارویی و محصولات غذایی دارند. بسیاری از گونه‌های گیاهی به *آگرو باکتریوم ریزوژنز* حساس می‌باشند و تلقیح آنها با این باکتری منجر به القای ریشه‌های مویین می‌گردد. با استفاده از کشت ریشه‌های مویین، ممکن است میزان متابولیت‌های ثانویه افزایش یابد. تولید پروتئین‌های نوترکیب در ریشه‌های مویین و دستکاری ژنتیکی در مسیر متابولیت‌های ثانویه برای افزایش ماده موثره در این گیاه نیازمند بهینه‌سازی انتقال ژن می‌باشد. به‌این منظور ژن گزارشگر *gus* با استفاده از *آگروباکتریوم ریزوژنز* به گیاه شیرین بیان منتقل شد. برای بررسی میزان تراریختی و تولید ریشه‌های مویین در گیاه شیرین بیان، شش سویه باکتری *آگروباکتریوم ریزوژنز* شامل A4, AR15834, MSU, A7, D7 و AR158 مورد استفاده قرار گرفت. ریشه‌های مویین از ریزنمونه‌های برگی ۲۱ روزه، ۴-۳ هفته پس از تلقیح با باکتری مشاهده شدند. بین سویه‌های مختلف از نظر میزان تراریختی در گیاه شیرین بیان اختلاف معنی‌داری وجود داشت. میانگین تولید ریشه‌های مویین(فراوانی تراریختی) توسط سویه AR15834 به میزان ۴۲ درصد بود که بیشترین درصد تراریختی را نسبت به سایر سویه‌ها نشان داد. همچنین میزان رشد و اندازه ریشه‌های مویین تولید شده توسط سویه‌های AR15834 و D7 نسبت به سویه‌های دیگر بیشتر بود. همچنین برای اولین بار، گیاهچه‌های بذری ۵-۳ روزه که محور زیرلپه آن‌ها زخمی شده بود، برای تولید ریشه‌های مویین در گیاه شیرین بیان مورد استفاده قرار گرفتند. تولید ریشه‌ها در محل زخم درگیاهچه‌ها، ۷-۵ روز پس از تلقیح مشاهده شد و همه گیاهچه‌ها، ریشه‌مویین تولید نمودند. گیاهچه‌های بذری ۵-۳ روزه به‌عنوان مناسب‌ترین ریزنمونه برای تراریختی شیرین بیان با *آگروباکتریوم ریزوژنز* معرفی شدند که از مزایای آن سرعت رشد و فراوانی بالای تراریختی است. ریشه‌های تراریخت در اثر هم‌کشتی گیاهچه‌های بذری ۵-۳ روزه با باکتری AR15834 حامل پلاسمید PBI121 حاوی ژن‌های بتاگلوکورونیداز و مقاومت به کانامایسین به عنوان ژن گزارشگر و نشانگر انتخابی به‌دست آمدند. از غلظت ۲۵ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین برای گزینش گیاهان تراریخت استفاده شد. حضور و بیان ژن‌های انتقال یافته در گیاهان تراریخت توسط سنجش هیستوشیمیایی *GUS* و واکنش PCR تایید شد. فراوانی تراریختی در حدود ۹۰-۸۰ درصد تعیین شد. همچنین پلاسمید PCAMBIA3301 حاوی ژن گزارشگر *gus* اینترون‌دار از باکتری *E.Coli* به سویه AR15834 و D7 *آگروباکتریوم ریزوژنز* منتقل گردید و با روش بهینه شده، ریشه‌های مویین بیان کننده ژن *gus* اینترون‌دار بدست آمد. در این تحقیق تولید گیاهان کامپوزیت با استفاده از *آگروباکتریوم ریزوژنز* در گیاه شیرین بیان انجام شد که گیاهی با ریشه‌های مویین و اندام هوایی غیر تراریخت است. بیان ژن گزارشگر *gus* نیز در این گیاهان مشاهده شد.

واژه‌های کلیدی: شیرین بیان، *آگروباکتریوم ریزوژنز*، ریشه‌های مویین، ژن گزارشگر *gus*، گیاه کامپوزیت

فهرست مطالب صفحه

مقدمه ۱

۱- بررسی منابع

۱-۱- بیوتکنولوژی ٦

۱-۱-۱- بیوتکنولوژی گیاهی ٦

۱-۲- بیوتکنولوژی و گیاهان دارویی ۷

۱-۲-۱- کشت بافت ۷

۱-۲-۲- مهندسی ژنتیک ۸

۱-۲-۳- نشانگرهای مولکولی ۸

۱-۳- تراریختی ژنتیکی ۹

۱-۳-۱- وضعیت محصولات تراریخته در جهان ۹

۱-٤- انتقال ژن ۱۰

۱-۴-۱- تاریخچه‌ی انتقال ژن ۱۰

۱-۴-۲- روش‌های انتقال ژن ۱۱

۱-۵- انتقال ژن با واسطه آگروباکتریوم ۱۲

۱-۵-۱- کاربرد تراریختی با واسطه آگروباکتریوم ۱۲

۱-۵-۲- معرفی آگروباکتریوم ۱۳

۱-۵-۲- آگروباکتریوم ریزوژنز ۱٤

۱-۵-۳- سیستم ناقل‌های دوگانه ۱۹

۱-٦- ریشه‌های مویین ۲۰

۱-۶-۱- تعریف ریشه‌های مویین ۲۰

۱-۶-۲- ویژگی‌ها و مزایای کشت ریشه‌های مویین ۲۲

۱-۶-۳- کاربرد ریشه‌های مویین ۲۲

۱-۶-۴- تایید تراریختی در ریشه‌های مویین ۲۵

۱-۶-۵- عوامل موثر بر ایجاد ریشه‌های مویین ۲٦

فهرست مطالب صفحه

۱-۷- تولید گیاهان مرکب با استفاده از *آگروباکتریوم ریزوژنز* ۲۷

۱-۸- عوامل موثر بر بیان ژن‌های انتقال یافته ۲۸

۱-۹- ژن‌های نشانگر ۲۹

۱-۹-۱- نشانگرهای گزارشگر ۲۹

۱-۹-۲- نشانگرهای گزینشگر ۳۱

۱-۱۰- گیاهان دارویی ۳۲

۱-۱۰-۱- تاریخچه گیاهان دارویی ۳۲

۱-۱۰-۲- اهمیت گیاهان دارویی ۳۳

۱-۱۰-۳- اهمیت اقتصادی گیاهان دارویی ۳٤

۱-۱۱- شیرین بیان ۳۵

۱-۱۱-۱- گیاهشناسی ۳۵

۱-۱۱-۲- خواص دارویی و ترکیبات شیمیایی ۳۵

۱-۱۱-۲- منشاء و دامنه انتشار ۳۷

۱-۱۲- مروری بر تحقیقات پیشین در گیاه شیرین بیان ۳۸

۲- مواد و روش‌ها ٤۱

۲-۱- مواد مورد استفاده ٤۱

۲-۱-۱- مواد گیاهی ٤۱

۲-۱-۲- مواد شیمیایی ٤۱

۲-۱-۳- باکتری ٤۱

۲-۲- کشت باکتری ٤۲

۲-۳- تهیه استوک از باکتری ٤۳

۲-٤- استخراج پلاسمید از باکتری *E.coli* ٤۳

۲-۵- تعیین کمیت و کیفیت DNA پلاسمیدی استخراج شده ٤٦

۲-۵-۱- اسپکتروفتومتری ٤٦

۲-۵-۲- الکتروفورز ژل ٤٧
۲-٦- انتقال پلاسمید PCAMBIA3301 به *آگروباکتریوم ریزوژنز* ٤٨
۲-۶-۱- تهیه *آگروباکتریوم ریزوژنز* مستعد پذیرش DNA خارجی ٤٨
۲-۶-۲- وارد کردن DNA خارجی به داخل سلولهای آگروباکتریوم مستعد پذیرش DNA خارجی ٤٨
۲-۷- تایید تراریختی *آگروباکتریوم ریزوژنز* ٤٩
۲-۷-۱- تایید تراریختی *آگروباکتریوم ریزوژنز* با استفاده از کلونی PCR ٤٩
۲-۷-۲- آغازگرهای مورد استفاده برای واکنش PCR ٤٩
۲-۷-۳- برنامه واکنش زنجیرهای پلیمراز ٥٠
۲-۷-۴- تایید تراریختی باکتری با استفاده از آزمون هیستوشیمیایی *gus* ٥١
۲-۸- کشت بذور شیرین بیان برای تولید گیاهچه های استریل ٥٢
۲-۸-۱- تهیه محیط کشت MS ٥٢
۲-۸-۲- آماده سازی ظروف برای کشت بذور برروی کاغذ صافی مرطوب ٥٤
۲-۹- القاء ریشه‌های مویین با استفاده از *آگروباکتریوم ریزوژنز* ٥٤
۲-۹-۱- تهیه سوسپانسیون باکتری *آگروباکتریوم ریزوژنز* ٥٤
۲-۹-۲- تهیه ریز نمونه گیاهی از شیرین بیان ٥٥
۲-۱۰- القاء ریشه‌های مویین در گیاه شیرین بیان ٥٥
۲-۱۰-۱- تلقیح ریزنمونه‌های برگی شیرین بیان با استفاده از *آگروباکتریوم ریزوژنز* ٥٥
۲-۱۰-۲- بهینه سازی نوع سویه باکتری برای تراریختی شیرین بیان ٥٦
۲-۱۰-۳- تلقیح نمونه های گیاهچه ۵-۳ روزه با *آگروباکتریوم ریزوژنز* ٥٦
۲-۱۱- بررسی میزان رشد و مقدار وزن تر و وزن خشک ریشه‌های حاصل از تلقیح گیاهچه‌های ۵-۳ روزه و ریشه‌های طبیعی ٥٧
۲-۱۲- تولید ریشه‌های مویین تراریخت از نمونه‌های گیاهچه ۵-۳ روزه ٥٧
۲-۱۳- بررسی مقاومت به آنتی بیوتیک ٥٨
۲-۱٤- تولید گیاهان کامپوزیت با استفاده از *آگروباکتریوم ریزوزنز* ٥٨

۲-۱۵- استخراج DNA ژنومی گیاه ۵۹
۲-۱۶- تعیین کمیت و کیفیت DNA ژنومی استخراج شده ٦۲
۲-۱۷- تایید وجود ژن *rolB* در ریشه های تراریخت با استفاده از PCR ٦۲
۲-۱۸- سنجش هیستوشیمیایی *gus* ریشه‌های مویین تراریخت ٦٤
۲-۱۹- آنالیز گیاهان تراریخت با استفاده از PCR ٦۵
۳- نتایج و بحث ٦۷
۳-۱- استخراج پلاسمید PCAMBIA3301 از باکتری *E.coli* ٦۷
۳-۱-۱- تعیین کیفیت DNA پلاسمیدی با استفاده از اسپکتروفتومتری ٦۷
۳-۱-۲- تعیین کیفیت DNA پلاسمیدی با استفاده از الکتروفورز ٦۷
۳-۲- تراریختی سویه‌های آگروباکتریوم با پلاسمید PCAMBIA3301 ..... ٦۸
۳-۳- تایید تراریختی *آگروباکتریوم ریزوژنز* ٦۹
۳-۳-۱- تایید تراریختی *آگروباکتریوم ریزوژنز* با استفاده از کلونی PCR ٦۹
۳-۳-۲- تایید تراریختی باکتری با استفاده از آزمون هیستوشیمیایی *gus* ٦۹
۳-٤- القاء ریشه‌های مویین در گیاه شیرین بیان ۷۰
۳-۴-۱- القا ریشه‌های مویین در ریزنمونه برگی گیاه شیرین بیان ۷۰
۳-۴-۲- تاثیر سویه‌های مختلف *آگروباکتریوم ریزوژنز* بر میزان تولید ریشه‌های مویین درشیرین بیان ۷۳
۳-۴-۳- القاء ریشه‌های مویین به نمونه‌های گیاهچه بذری گیاه شیرین بیان ۷٦
۳-۵- تفاوتهای مورفولوژیکی ریشه‌های مویین حاصل از گیاهچه‌های ۵ روزه و ریشه‌های شاهد ۸۰
۳-٦- مقایسه میزان رشد و مقدار وزن تر و وزن خشک ریشه‌های مویین حاصل از تلقیح گیاهچه‌های ۵-۳ روزه و ریشه‌های طبیعی ۸۱
۳-۷- تولید ریشه‌های مویین تراریخت حاوی ژن گزارشگر *gus* از گیاهچه‌های ۵-۳ روزه ۸۲
۳-۸- بررسی مقاومت به آنتی بیوتیک ۸۳
۳-۹- اثبات تراریختی ریشه‌های مویین از طریق PCR ۸۵
۳-۹-۱- استخراج DNA ژنومی گیاه ۸۵

۳-۹-۲- تایید وجود ژن *rolB* در ریشه‌های تراریخت با استفاده از PCR ۸۶
۳-۱۰- سنجش هیستوشیمیایی *gus* ریشه‌های مویین تراریخت ۸۷
۳-۱۱- آنالیز گیاهان تراریخت با استفاده از PCR ۹۱
۳-۱۲- تولید گیاهان کامپوزیت با استفاده از *آگروباکتریوم ریزوژنز* ۹۲
۳-۱۳- سنجش هیستوشیمیایی *gus* گیاهان کامپوزیت تراریخت ۹۵
بحث نهایی ۹۷
پیشنهادات ۹۸
منابع ۱۰۰

جدول۱-۱- ژن‌های مورد استفاده به عنوان نشانگر گزارشگر و نحوه شناسایی آنها ۳۰
جدول-۱-۲- ژن‌های نشانگر گزینشگر مورد استفاده در انتقال ژن..... ۳۱
جدول ۲-۱- ترکیبات محیط کشت LB مایع ٤۳
جدول ۲-۲- غلظت آنتی بیوتیک‌های مورد استفاده در کشت باکتری ٤۳
جدول ۲-۳- محلول شماره I برای استخراج پلاسمید ٤٥
جدول ۲-٤- محلول شماره II برای استخراج پلاسمید..... ٤٥
جدول ۲-٥- محلول شماره III برای استخراج پلاسمید ٤٦
جدول ۲-٦- ترکیبات لازم برای تهیه بافر TE..... ٤٦
جدول ۲-۷- ترکیبات لازم برای تهیه بافر TBE 5X مورد نیاز برای الکتروفورز ٤۷
جدول ۲-۸- آغازگرهای مورد استفاده برای ژن *bar* ٥۰
جدول ۲-۹- مواد مورد نیاز برای یک واکنش ۲٥میکرولیتری PCR..... ٥۰
جدول ۲-۱۰- برنامه PCR جهت تکثیر قطعه ژن *gus* و ژن *bar*..... ٥۱
جدول۲-۱۱- ترکیبات محلول‌های ذخیرهای محیط کشت MS ٥۳
جدول ۲-۱۲- مقادیر مورد نیاز برای تهیه یک لیترمحیط MS..... ٥٤
جدول ۲-۱۳- توالی آغازگرهای ژن *rolB* ٦۳
جدول ۲-۱٤- مواد مورد نیاز برای یک واکنش ۲٥میکرولیتری PCR..... ٦۳
جدول ۲-۱٥- برنامه PCR بذای تکثیر قطعه ژن *rolB*..... ٦٤
جدول ۲-۱٦- توالی آغازگرهای مورد نیاز برای ژن *gus*..... ٦٥
جدول۳-۱- جدول تجزیه واریانس تراریختی سویه‌های *آگروباکتریوم ریزوژنز* در شیرین بیان ۷٤
جدول ۳-۲- مقایسه ریشه‌های مویین حاصل از گیاهچه‌های ٥-۳ روزه و ریشه‌های طبیعی ۸۱
جدول ۳-۳- نتایج آزمون t مستقل برای مقایسه میانگین وزن خشک ریشه‌های مویین و ریشه‌های شاهد..... ۸۱
جدول ۳-٤- نتایج آزمون t مستقل برای مقایسه میانگین وزن تر ریشه‌های مویین و ریشه‌های شاهد ۸۲

شکل۱-۱- ساختار پلاسمید Ri در *آگروباکتریوم ریزوژنز*(چاندرا، ۲۰۱۲) ۱۶

شکل۱-۲ - مدلی از تعاملات مولکولی در طول انتقال ژن به سلول‌های گیاهی توسط آگروباکتریوم(تزفیرا و سیتوسکی، ۲۰۰۲) ۱۸

شکل-۱-۳- نمایش شماتیک از سیستم ناقل دوگانه(سایت کمبیا) ۱۹

شکل-۱-٤- تولید ریشه‌های مویین توسط *آگروباکتریوم ریزوژنز*(گویلون و همکاران، ۲۰۰٦) ۲۱

شکل-۱-۵- کاربرد کشت ریشه‌های مویین(جئورجیو و همکاران، ۲۰۰۷) ۲۵

شکل۱-٦- گیاه دارویی شیرین بیان ۳۷

شکل ۲-۱- نقشه زنتیکی پلاسمید PBI121 ..... ٤۲

شکل ۲-۲- نقشه ژنتیکی پلاسمید PCAMBIA3301 ..... ٤٤

شکل ۲-۳- کشت گیاهان کامپوزیت در پشم سنگ ۵۹

شکل ۳-۱- نتایج الکتروفورز DNA پلاسمیدی استخراج شده بر روی ژل آگارز یک درصد ٦۸

شکل ۳-۲- مقایسه رشد باکتری‌های تراریخت در محیط کاناما‌یسین(پلیت سمت راست) و بدون کاناما‌یسین(پلیت سمت چپ) ٦۹

شکل ۳-۳- نتایج الکتروفورز ژل آگاروز محصول PCR کلونی‌های باکتری تراریخت با آغازگرهای ژن *bar* ٦۹

شکل ۳-٤- سویه AR15834 حامل پلاسمید PBI121 دارای ژن*gus* ۷۰

شکل ۵-۳- تولید ریشه مویین در گیاه شیرین بیان ۷۱

شکل ۳-٦- مقایسه ریشه‌های مویین طبیعی(الف) و ریشه‌های مویین کالوس زا (ب) ۷۳

شکل۳-۷- نمودار مقایسه میانگین(به روش دانکن و در سطح ۵ درصد) تاثیر نوع سویه باکتری بر میزان تراریختی گیاه شیرین بیان ۷٤

شکل ۳-۸- مقایسه رشد ریشه‌های مویین حاصل از ریزنمونه محور زیرلپه گیاهچه‌های ۵ روزه و ریشه‌های طبیعی ۷۷

شکل ۳-۹- مقایسه میزان رشد ریشه‌های مویین حاصل از گیاهچه‌های ۵-۳ روزه (پلیت‌های پایینی) و ریشه‌های طبیعی(پلیت‌های بالایی) ۸۲

شکل۳-۱۰- تولید ریشه‌های مویین تراریخت از نمونه گیاهچه‌های ۵ روزه ۸۳

شکل۳-۱۱- الکتروفورز DNA ژنومی برای تعدادی ازنمونه‌ها(ریشه‌های مویین) در ژل یک درصد آگارز با نشانگر مولکولی ۱kb ۸٦

شکل ۳-۱۲- الکتروفورز ژل آگارز یک درصد برای تایید وجود ژن *rolB*..... ۸۷

شکل ۳-۱۳- ریشه‌های مویین گیاه شیرین بیان ۵-٤ هفته. ۹۰

شکل ۳-۱٤- سنجش هیستو شیمیایی ریشه‌های مویین تراریخت حاصل از تلقیح نمونه‌های گیاهچه بذری ۵ روزه با *آگروباکتریوم ریزوژنزحاوی* ژن گزارشگر *gus* اینترون‌دار ۹۱

شکل ۳-۱۵- الکتروفورز ژل آگارز یک درصد برای تایید وجود ژن *gus*..... ۹۲

شکل ۳-۱٦- تولید گیاهان کامپوزیت با استفاده از *آگروباکتریوم ریزوژنز* ۹۳

شکل ۳-۱۷- مقایسه رشد ریشه‌های مویین گیاه مرکب در محیط کانامایسین و فاقد کانامایسین ۹٤

شکل ۳-۱۸- نتایج سنجش هیستو شیمیایی *gus* در ریشه‌های مویین گیاه کامپوزیت، ظهور رنگ آبی در گیاهان کامپوزیت تراریخت..... ۹٦

مقدمه

مقدمه

گیاهان دارویی یکی از مهمترین منابع دارویی می‌باشند که از هزاران سال پیش کاربرد داشته‌اند. سازمان بهداشت جهانی تخمین زده است که بیش از ۸۰ درصد از مردم به‌صورت سنتی و یا مدرن از گیاهان دارویی استفاده می‌کنند. بعلاوه برخی از داروهای شیمیایی نیز با الگوبرداری از مواد گیاهی ساخته شده‌اند(تریپاتی و تریپاتی[1]، ۲۰۰۳). اگرچه تقاضا برای این ترکیبات افزایش یافته است اما برخی از این گیاهان، زیستگاه‌های طبیعی محدود دارند و بسته به شرایط محیطی وجغرافیایی محل رویش گیاه، جمع‌آوری آن‌ها با مشکلاتی مواجه است. غلظت پایین این ترکیبات در گیاه، محدودیت منابع طبیعی، تخریب روزافزون جنگل‌ها، مراتع و فضای سبز، نابودی گونه‌های متنوع گیاهی و جانوری، مشکلات مرتبط با اهلی نمودن وکشت زراعی این گیاهان، توجه محققین را به استفاده از راهکارهای فناوری زیستی جهت افزایش تولید و بهره‌وری گیاهان دارویی معطوف نموده است. فناوری زیستی با بهره‌گیری از علوم مختلف مانند بیولوژی، بیوشیمی، ژنتیک و با استفاده از راهکارهای کشت سلول‌ها، اندام‌ها و بافت‌ها، مهندسی ژنتیک و نشانگرهای مولکولی قادر است کارآیی گیاهان را به‌عنوان منابع تجدیدپذیر جهت تولید دارو افزایش دهد(ملاباگال وتسای[2]،۲۰۰۴؛ کومار و گوپتا[3]، ۲۰۰۸).

کشت درون شیشه‌ای[4] سلول، بافت‌ها و اندام‌های گیاهی امکان تکثیر سریع و انبوه بسیاری از گیاهان دارویی مهم را فراهم نموده است. گیاهان تکثیر شده از طریق کشت‌های عاری از بیماری و از لحاظ ژنتیکی و کیفی یکنواخت می‌باشند. نگهداری کشت سلول یا بافت گیاه به‌روش انجماد درنیتروژن مایع، یک روش مناسب جهت حفظ گیاهان دارویی در معرض انقراض می‌باشد. طی سال‌های اخیر کشت سوسپانسیون سلولی و اندام(ساقه و ریشه مویین) جهت تولید متابولیت‌های ثانویه و مطالعه‌ی مسیر بیوسنتز متابولیت‌ها مورد توجه قرار گرفته است. تاکنون کشت سلولی طیف وسیعی از گیاهان دارویی بررسی شده است و ترکیبات مهمی نظیر فلاونوئیدها، تانن‌ها، آلکالوئیدها و ترپنوئیدها از این طریق تولید شده‌اند. ترکیبات محیط کشت، ریزنمونه، شرایط فیزیکی، افزودن پیش سازها، استفاده از القاگرهای زنده و غیر زنده، افزایش نفوذپذیری سلول، دور کردن محصول از محل تولید، بی‌تحرک نمودن سلول‌های گیاهی و انتخاب سلول‌های با کارآیی بالا، از مهمترین فاکتورهای موثر در افزایش تولید متابولیت ثانویه درکشت سلولی می‌باشند(امیدی، فرزین، ۱۳۸۸).

1- Tripathi
2- Mulabagal and Tsay
3- Kumar and Gupta
4 -in vitro

شیرین بیان یکی از گیاهان دارویی مهم در جهان است(هونگ یو لو[1] و همکاران ۲۰۰۸). بیش از چهار هزار سال پیش بومیان دره‌ها و دشت‌های بین‌النهرین، آسیای صغیر و جنوب آسیا ریشه شیرین بیان را به پیشگاه فرمانروایان خود به نشانه عرض عبودیت تقدیم می‌کردند. چینی‌ها آن را پدر بزرگ گیاهان می‌نامیدند. آنان این گیاه را در بسیاری از داروهای ترکیبی برای متوازن کردن سایر ترکیبات به‌کار می‌بردند(عطارزاده، ۱۳۸۲). دیوید سکوریت حکیم یونانی در قرن اول میلادی در کتاب خود شیرین بیان را برای صاف کردن صدا و نرم کردن مزاج توصیه کرده است. ابوعلی سینا نیز در کتاب خود خواص درمانی شیرین بیان را بر شمرده است(فرخ، ۱۳۸۸).

ریشه شیرین بیان به‌عنوان یک شیرین کننده استفاده می‌شود که در موارد بسیاری به‌عنوان افزاینده استفاده می‌شود(کیتاگاوا[2]، ۲۰۰۲). در گیاهان عالی انواع تریترپن‌ها و تریترپن ساپونین‌ها تولید می‌شوند، که به‌دلیل استفاده از آن‌ها در تولید داروها، دترژنت‌ها و انواع لوازم آرایشی، از نظر اقتصادی حائز اهمیت هستند(هایاشی[3]، ۲۰۰۹).

سال‌هاست که انتقال ژن بین گونه‌های گیاهی نقش مهمی در بهبود گیاهان زراعی ایفا کرده است. از سال ۱۹۷۰، پیشرفت قابل ملاحظه‌ای در ابداع ابزارهای لازم برای دستکاری ژنتیکی DNA نوترکیب رخ داده است. فهرست گونه‌های گیاهی که توسط ناقلین DNA گیاهی توسط روش‌های آگرو باکتریوم و روش‌های دیگر تراریخت می‌شوند، به‌طور پیوسته در حال رشد بوده و در حال حاضر توانایی تراریختی به بیش از ۱۲۰ گونه گیاهی در حداقل ۳۵ خانواده گسترش پیدا کرده است(حسینی و همکاران، ۱۳۸۳).

یکی از روش‌های انتقال ژن به گیاهان استفاده از *آگروباکتریوم ریزوژنز*[4] می‌باشد. برای آزمون تراریختی گیاه بوسیله باکتری می‌توان از *آگروباکتریوم تومه فاسینس*[5] و یا *آگروباکتریوم ریزو ژنز* استفاده نمود. آگروباکتریوم یک باکتری گرم منفی و خاکزی است که یک راهکار امیدوار کننده برای تولید متابولیت‌های ثانویه ارائه می‌دهد(هامیل[6] و همکاران، ۱۹۸۷). از *آگروباکتریوم ریزوژنز* معمولا زمانی استفاده می‌شود که نیازی به باززایی گیاه کامل نبوده و تنها اثر یک ژن انتقالی و وضعیت بیان آن در سلول گیاهی مورد بررسی قرار می‌گیرد. بسیاری از گونه‌های گیاهی به *آگرو باکتریوم ریزوژنز* حساس می‌باشند و تلقیح آن‌ها با این باکتری منجر به القای ریشه‌های مویین می‌گردد. این ریشه‌ها در اثر تلفیق بخشی از DNA پلاسمید القاکننده ریشه به درون ژنوم گیاه به وجود می‌آید(نوروزی ۱۳۸۳).

1- Hong-yu lu
2- Kitagawa
3- Hayashi
4 - *Agrobacterium rhizogenes*
5- *Agrobacterium tumefaciens*
6- Hamill