ژنتیک نوین
دوره نوزدهم، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۳
صفحه ۱۴۶- ۱۳۷

بررسی خصوصیات زراعی و فیتوشیمیایی گیاه تراریخت جنسینگ هندی *(Withania somnifera)* با روش Inplanta transformation

Study of agronomic and phytochemical characteristics of transgenic Indian ginseng plant *(Withania somnifera)* by inplanta transformation method.

نسیبه سلطانی‌نژاد[۱]، سید احمد سادات‌نوری*[۲]، علی ایزدی‌دربندی[۲]، علی فدوی[۳]، فاطمه امینی[۴]، محمد حسین میرجلیلی[۵]

۱- دانشجوی دکتری ژنتیک و به نژادی گیاهی گروه علوم زراعی و اصلاح نباتات دانشکده فناوری کشاورزی ابوریحان، دانشگاه تهران، پاکدشت، تهران، ایران

۲- استاد، دانشیار، گروه علوم زراعی و اصلاح نباتات دانشکده فناوری کشاورزی ابوریحان، دانشگاه تهران، پاکدشت، تهران، ایران

۳- دانشیار، گروه علوم صنایع غذایی دانشکده فناوری کشاورزی ابوریحان، دانشگاه تهران، پاکدشت، تهران، ایران

۴-استادیار، گروه علوم زراعی و اصلاح نباتات دانشکده فناوری کشاورزی ابوریحان، دانشگاه تهران، پاکدشت، تهران، ایران

۵- استاد، گروه کشاورزی، پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

Soltaninejad N[1], Sadat-Noori SA*[2], Izadi-Darbandi A[2], Fadavi A[3], Amini F[4], Mirjalili MH[5]

1- PhD Student of genetics and plant breeding, Department of Agronomy and Plant Breeding sciences, Aburaihan Faculty of Agricultural Technology, University of Tehran, Pakdasht, Tehran, Iran
2- Professor of the Department of Agronomy and Plant Breeding Sciences, Aburaihan Faculty of Agricultural Technology, University of Tehran, Pakdasht, Tehran, Iran
3- Associate Professor of the Department of Food Industry Sciences, Aburaihan Faculty of Agricultural Technology, University of Tehran, Pakdasht, Tehran, Iran
4- Assistant Professor of the Department of Agronomy and Plant Breeding Sciences, Aburaihan Faculty of Agricultural Technology, University of Tehran, Pakdasht, Tehran, Iran
5- Professor of the Department of Agriculture, Research Institute of Medicinal Plants and Raw Materials, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی:noori@ut.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۵/۲۷ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۷/۲۶)

چکیده

آشواگاندا یا جنسینگ هندی *(Withania somnifera)* به‌دلیل وجود گروهی از لاکتون‌های استروئیدی به نام ویتانولیدها اهمیت قابل توجهی در خانواده Solanaceae دارد. به‌دلیل مقادیر محدود این متابولیت‌ها در ریشه و برگ گیاه در شرایط طبیعی و تقاضای زیاد صنعت داروسازی، استفاده از روش ریشه مویین برای افزایش تولید این متابولیت‌ها اهمیت دارد. برای القای باکتری در شرایط آزمایشگاهی نیاز به کشت بافت و مراحل انجام آن می‌باشد، اما امروزه روشی جایگزین و ساده به‌عنوان روش تراریختی بدون استفاده از کشت بافت استفاده می‌شود که نیاز به کشت بافت ندارد و می‌تواند گیاه تراریخت با مقدار زیادی متابولیت ثانویه تولید نماید. در این آزمایش در محل گره اول گیاهچه تولید شده، *اگروباکتریوم رایزوژنز* سویه A4 از محل زخم به درون گیاه تزریق شد. ۱۵ روز بعد ریشه مویین ظاهر و پس از رشد گیاه تراریخته در گلخانه، خصوصیات رشدی (حجم و مساحت ریشه و ...) اندازه‌گیری و آنالیزهای فیتوشیمیایی روی گیاهان تراریخت و شاهد انجام شد. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی در ۳ تکرار اجرا شد. گیاهان تراریخته از لحاظ صفات زراعی مورد مطالعه طول ریشه (۱/۱۲ برابر)، حجم ریشه (۲ برابر)، مساحت ریشه (۱/۴۹ برابر) نسبت به شاهد برتری داشتند. در نتیجه این بررسی فعالیت آنزیم کاتالاز و میزان فلاونوئید در گیاهان تراریخته نسبت به شاهد کمتر بود. نتایج همبستگی نشان داد آنزیم کاتالاز و میزان فلاونوئید با طول، حجم و مساحت ریشه همبستگی مثبت و معنی‌دار دارند. بر اساس نتایج این پژوهش، روش تراریختی بدون استفاده از کشت بافت می تواند به‌عنوان یک روش مفید در این گیاه برای افزایش ریشه مویین بدون افزایش در فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی معرفی شود.

واژه‌های کلیدی

تراریخته
Inplanta transformation
Withania somnifera

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

مقدمه

آشواگاندا یا جنسینگ هندی *(Withania somnifera)* از خانواده Solanaceae یک گیاه دارویی معتبر در سیستم گیاهان دارویی سنتی هند به شمار می‌رود (Kaileh et al. 2007). خواص دارویی این گیاه به وجود گروهی از لاکتون‌های استروئیدی نسبت داده شده است که به‌عنوان ویتانولیدهای[1] موجود در برگ و ریشه شناخته می‌شوند (Sangwan et al. 2004). با توجه به شیوع بیماری‌های مختلف از جمله بیماری‌های مربوط به سیستم اعصاب مانند افسردگی و غیره و همچنین شیوع سرطان‌های مختلف در جوامع بشری لازم است برای حل این معضل‌ها اقداماتی انجام شود. گیاه دارویی جنسینگ هندی به‌دلیل دارا بودن ترکیبات مهم مانند ویتافرین آ[2] در برگ و ریشه و ویتانولید آ[3] و ب[4] و ... در ریشه در این زمینه حائز اهمیت است. تاکنون ۷۷ نوع ویتانولید از این گیاه استخراج شده است (Kim S et al. 2019). خواص فارماکولوژیکی این گیاه شامل خواص ضد التهاب (Bhatacharya et al. 1997)، ضد سرطان (Gupta and Rana. 2007; Bargagna-Mohan et al., 2007) ضد اضطراب (Dhuley 1998) تعدیل‌کننده (Archana and Namasivayam 1999) ضد دیابت (Bhattacharya and Muruganandam 2003)، ضد میکروبی (Hemalatha et al., 2004) و قلبی و عروقی (Choudhary 1995) می‌باشد. با توجه به میزان کم این متابولیت‌ها در ریشه و برگ گیاه در شرایط طبیعی و چند ساله بودن گیاه و نیاز زیاد صنایع دارویی، جهت افزایش تولید این متابولیت‌ها در این گیاه استفاده از روش ریشه مویین می‌تواند تا حدی مشکل را رفع نماید. ریشه مویین یک نوع بیماری است که توسط باکتری اگروباکتریوم رایزوژنز در گیاه ایجاد می‌شود. بیماری ریشه مویین از انتقال و تلفیق کاربردی بخش ویژه‌ای از پلاسمید Ti به درون کروموزوم‌های گیاه نتیجه می‌شود. فقط بخش کوچکی از پلاسمید Ti که T-DNA یا DNA منتقل شونده نام دارد به ژن هسته‌ای گیاه منتقل و در آن‌جا تلفیق می‌شود.

انتقال T-DNA با ورود باکتری‌ها به یک زخم گیاهی شروع می‌شود. ایجاد زخم، حداقل در ناحیه‌ای از گیاه، یک رویداد الزامی برای فرآیند انتقال است و ممکن است تا حدی برای ساخته شدن ترکیبات خاصی توسط گیاه که بیان ژن‌ها را تحریک می‌نمایند مورد نیاز باشد. برای القای باکتری در شرایط آزمایشگاهی نیاز به کشت بافت و مراحل انجام آن می‌باشد، اما امروزه روشی جایگزین و ساده به‌عنوان روش تراریختی بدون استفاده از کشت بافت [5] استفاده می‌شود که نیاز به کشت بافت ندارد و می‌تواند گیاه تراریخت با مقدار زیادی متابولیت ثانویه تولید نماید. شناخته شده‌ترین و پرکاربردترین روش تراریختی بدون استفاده از کشت بافت، روش غوطه‌وری گل است که برای *Arabidopsis thaliana* توسعه یافته است (Chlough and Bent 1998). در این روش جوانه‌های گل را در سوسپانسیون آگروباکتریوم فرو می‌برند و یا اینوکلوم آگروباکتریوم را روی جوانه می‌ریزند تا تماس بین سلول‌های زاینده و آگروباکتریوم برقرار شود. دانه‌های این گل‌ها با سرعت کم اما ثابت تبدیل می‌شوند. مکانیسم تبدیل غوطه‌وری گل بر اساس سازگاری سلول‌های تخمک به آگروباکتریوم است (Bent 2000) در حال حاضر، تبدیل آرابیدوپسیس منحصراً با استفاده از روش غوطه‌وری گل انجام می‌شود. روش‌های غوطه‌وری گل برای برنج (Ratanasut et al. 2017)، گندم (Zale et al. 2009)، تربچه (Curtis and Nam 2001) و *Medicago* (Trieu et al. 2000) *truncatula* گزارش شده است. در روش دیگر از روش تراریختی بدون استفاده از کشت بافت، روی گیاه اصلی در مرحله دو برگی ناحیه مریستمی ساقه مورد هدف قرار می‌گیرد و تزریق باکتری در این ناحیه انجام می‌شود. در مورد استفاده از این روش مشکل اصلی در باز تولید گیاه پس از انتقال می‌باشد. هدف از این تحقیق تولید گیاه نوترکیب با قابلیت تولید ریشه مویین زیاد جهت افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه نظیر ویتانولیدها و ویتافرین آ و بررسی‌های فیتوشیمیایی روی ریشه‌های مویین تولید شده در این گیاه می‌باشد.

[1] Withanolides
[2] Withaferin A
[3] Withanolide A
[4] Withanolide B
[5] Inplanta transformation

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی:

بذر *Withania somnifera* از گیاهان کاشته شده در گلخانه آموزشی گروه علوم زراعی و اصلاح نباتات پردیس ابوریحان دانشگاه تهران جمع‌آوری و جهت انجام آزمایش مورد استفاده قرار گرفت. بذرها ابتدا از میوه خارج و به صورت متراکم به‌علت ریز بودن بذر در خاک کوکوپیت در سینی کشت کاشته شد. پس از جوانه زنی بذر و در مرحله دو برگچه‌ای گیاهان به‌صورت تک بوته جدا و در خاک کوکوپیت کشت شدند و در اتاق کشت با شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفتند پس از دو هفته از انتقال به اتاق کشت و استقرار کامل بوته‌ها در خاک و سازگاری با شرایط محیطی، گیاهان برای تلقیح استفاده شدند.

آماده کردن باکتری:

جهت انجام روش تراریختی بدون استفاده از کشت بافت باید باکتری اگروباکتریوم برای تلقیح آماده شود. برای آماده‌سازی باکتری ابتدا باکتری اگرباکتریوم سویه A4 به‌صورت سوسپانسیون در محیط عصاره مخمر[1] کشت داده شد و در شرایط تاریکی در شیکر انکوباتور با ۹۰ دور در دقیقه و دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. بعد از گذشت ۴۸ ساعت پس از اندازه‌گیری چگالی نوری[2] باکتری رشد یافته، مورد استفاده قرار گرفت. برای آماده سازی باکتری جهت انجام تلقیح مقدار ۳۰۰ میکرولیتر از باکتری کشت داده شده به‌صورت سوسپانسیون و ۳۰۰ میکرولیتر گلیسرول روی محیط عصاره مخمر حاوی آگار انتقال داده شد و پلیت‌ها در تاریکی در اتاق رشد با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از گذشت ۴۸ ساعت باکتری رشد یافته از روی پلیت‌ها جمع‌آوری و توسط سرنگ انسولین در محل گره اول گیاه زخم‌زنی انجام شد و باکتری به محل زخم تزریق شد (Guoguo et al. 2024; Lazo et al. 1991). گیاهان در شرایط کنترل شده (رطوبت ۶۰ تا ۷۰ درصد) در اتاق رشد نگهداری شدند.

انتقال به گلخانه:

پس از گذشت ۱۵ روز از زمان تلقیح، ریشه مویین ظاهر شد و بعد از یک ماه فرصت برای افزایش تعداد ریشه مویین و قابلیت انتقال، ریشه اصلی از گیاه جدا و گیاهچه‌ها با ریشه مویین به خاک منتقل شدند و مجدد به مدت ۲ هفته در شرایط اتاق رشد قرار گرفتند. پس از استقرار ریشه در خاک و شروع به رشد گیاه، گیاهان به گلخانه با همان شرایط قبل منتقل و سازگاری گیاهان در شرایط گلخانه انجام شد.

تأیید تراریختی:

DNA کل از کلون‌های ریشه‌های مویین با استفاده از کیت آزمایشگاهی شرکت زیست فناوری کاوش پارسیان و روش مربوط به آن، استخراج و برای آزمایشات مولکولی استفاده شد. توالی آغازگرها به‌صورت زیر بود:

rolC 5′ TAACATGGCTGAAGACGACC 3′ (آغازگر مستقیم) و 5′ AAACTTGCACTCGCCATGCC 3′ (آغازگر معکوس)، *rolA* 5′ TGGAATTAGCCGGACTAAAC 3′ (آغازگر مستقیم) و 5′ GCGTACGTTGTAATGTGTTG 3′ (آغازگر معکوس) و *rolB* AGTTCAAGTCGGCTTTAGGC 5′ 3′ (آغازگر مستقیم) و 5′ TCCACGATTTCAACCAGTAG 3′ (آغازگر معکوس) .

واکنش PCR شامل یک چرخه واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه به مدت ۵ دقیقه، واسرشت در دمای ۹۴ درجه به مدت یک دقیقه، اتصال آغازگرها در دمای ۵۷ درجه به مدت یک دقیقه، گسترش در دمای ۷۲ درجه به مدت یک دقیقه و ۳۰ ثانیه و گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه به مدت ۵ دقیقه بود. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر انجام شد. نوارهای DNA پس از الکتروفورز در ژل آگارز ۰/۸ درصد در دستگاه ژل داک پس از گذشت ۶۰ تا ۹۰ دقیقه قابل مشاهده است.

بررسی‌های زراعی:

طول ریشه

بر اساس الگوی رشد ریشه‌ها ۴۰ روز بعد از شروع رشد گیاه در گلخانه طول ریشه با خط‌کش اندازه‌گیری شد.

حجم ریشه

حجم معینی آب درون مزون ریخته و ریشه گیاه شاهد و تراریخته هر کدام مجزا درون مزون قرار گرفت و بر اساس مقدار بالا آمدن آب در مزون حجم ریشه بر حسب مترمکعب محاسبه شد.

سطح ریشه

[1] YEB
[2] optical density (OD)

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

از فرمول زیر به‌دست آمد: (Alizade, 1384)

$$\text{سطح ریشه}(cm2) = 2\left(\text{حجم ریشه، میلی لیتر}\right) * \pi * (\text{طول ریشه، } cm)$$

بررسی‌های فیتوشیمیایی

استخراج عصاره آنزیمی و پروتئینی:

از روش پیشنهادی (Gapińska Skłodowska et al. 2008) با اندکی تغییرات جهت استخراج عصاره استفاده شد. این عصاره برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، گایاکول پراکسیداز، آسکوربات پراُکسیداز و همچنین پروتئین کل مورد استفاده قرار گرفت.

اندازه‌گیری پروتئین:

برای اندازه‌گیری پروتئین از روش (Bradford 1976) استفاده شد. جهت رسم منحنی استاندارد پروتئین از آلبومین سرم گاوی رقیق شده با آب‌مقطر به مقدارهای صفر، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰، ۷۰، ۸۰ میکرولیتر استفاده شد.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز:

فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) با کاهش مقدار H_2O_2 در طول موج ۲۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (Aebi 1983). مخلوط واکنش شامل ۵۰ میلی‌مولار بافر فسفات با pH=7 و ۱۵ میلی‌مولار پر اکسید هیدروژن بود. واکنش با اضافه نمودن یک میلی‌لیتر مخلوط واکنش و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی در حجم نهایی یک و نیم میلی‌لیتر صورت گرفت تغییرات جذب در طول موج ۲۴۰ نانومتر به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر به مدت ۶۰ ثانیه قرائت و فعالیت آنزیم کاتالاز با استفاده از ضریب خاموشی (39/4 Mm-1 cm-1) مشخص و بـه صورت واحد بر میلی‌گرم پروتئین بر دقیقه ثبـت و گزارش شد. (Nicholls and Schonbaum 1963).

میزان فعالیت آنزیم کاتالاز طبق فرمول زیر به‌دست آمد.

$$A = \frac{\Delta A240 \times df \times 1000 \times 1/5}{\varepsilon t}$$

A: فعالیت ویژه آنزیم بر اساس میکرومول آنزیم H_2O_2 تجزیه شده در یک دقیقه و در یک میلی‌لیتر عصاره پروتئین

ε: ضریب خاموشی پراکسید هیدروژن

t: مدت زمان واکنش آنزیم بر حسب ثانیه

ΔA240: تفاضل جذب در 240 نانومتر در شروع و پایان واکنش

df: فاکتور رقت (df=50)

۱۰۰۰= تبدیل میلی‌مولار به میکرومولار

۱/۵: واکنش در کووت ۱/۵ میلی‌لیتری انجام شد.

سپس فرمول زیر محاسبه شد:

$$B = A/C$$

B = فعالیت ویژه آنزیم بر حسب میکرومول تجزیه شده در یک دقیقه و در یک میلی‌گرم پروتئین.

C = غلظت پروتئین بر حسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (mg/ml).

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز:

مخلوط واکنش برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز شامل بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار، اسید آسکوربیک ۰/۵ میلی‌مولار، آب اکسیژنه ۰/۱۵ میلی‌مولار، EDTA ۰/۱ میلی‌مولار می‌باشد. درون کووت ۱/۵ میلی‌لیتری به میزان یک میلی‌لیتر مخلوط واکنش و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی ریخته و با قرار دادن در دستگاه اسپکتروفتومتری فعالیت آنزیم مورد نظر با ضریب خاموشی ($2/8\ Mm^{-1}\ cm^{-1}$) در مدت زمان ۶۰ ثانیه در طول موج ۲۹۰ نانومتر ثبت شد (Nakano and Asada 1981).

$$A = \frac{\Delta A290 \times df \times 1000 \times 1/5}{\varepsilon t}$$

سپس فرمول زیر محاسبه شد.

$$B = A/C$$

B = فعالیت ویژه آنزیم بر حسب میکرومول تجزیه شده در یک دقیقه و در یک میلی‌گرم پروتئین.

C = غلظت پروتئین بر حسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (mg/ml).

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز

مخلوط واکنش برای اندازه‌گیری فعالیت این آنزیم شامل ۵۰ میلی‌مولار بافر فسفات پتاسیم و ۱۳ میلی‌مولار گایاکول است. در کووت دستگاه اسپکتروفتومتری مقدار ۳۳ میکرولیتر عصاره آنزیمی، یک میکرولیتر مخلوط واکنش ۲/۵ میکرولیتر پراکسید هیدروژن ۵ میلی‌مولار ریخته می‌شود. با قرار دادن کووت در دستگاه اسپکتروفتومتری فعالیت این آنزیم در مدت ۶۰ ثانیه در طول موج ۴۷۰ نانومتر با ضریب خاموشی ($26/6\ Mm^{-1}\ cm^{-1}$) اندازه‌گیری شد (Chance and Maehly 1955). سپس فرمول زیر محاسبه شد.

$$B = A/C$$

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

$$A = \frac{\Delta A470 \times df \times 1000 \times 1/5}{\varepsilon t}$$

B = فعالیت ویژه آنزیم بر حسب میکرومول تجزیه شده در یک دقیقه و در یک میلی‌گرم پروتئین.

C = غلظت پروتئین بر حسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (mg/ml).

استخراج عصاره فنول و فلاونوئید

۵۰ میلی‌گرم از نمونه پودر شده ریشه‌های مویین را در ۵ میلی‌لیتر حلال متانول تقطیر شده مخلوط می‌کنیم. مخلوط حاصل به مدت یک ساعت در دستگاه التراسونیک تحت عمل استخراج قرار گرفت. سپس سانتریفوژ به مدت ۱۵ تا ۲۰ دقیقه با ٤٤۰۰ دور در دقیقه انجام شد. محلول رویی برای سنجش فنول و فلاونوئید استفاده شد.

اندازه‌گیری میزان فنل کل:

در هر چاهک ۲۵ میکرولیتر غلظت‌های مختلف گالیک اسید (سه تکرار) ریخته و سپس ۱۲۵ میکرولیتر فولین ۱۰ درصد و ۱۰۰ میکرولیتر سدیم کربنات ۷/۵ درصد تزریق شد. پلیت پس از پوشانده شدن در فویل روی شیکر قرار گرفت و یک ساعت و نیم بعد در دستگاه الایزا ریدر با طول موج ۷٦۰ نانومتر قرائت شد. نمودار کالیبراسیون در اکسل رسم شد.

محلول‌های فولین ۱۰ درصد و سدیم کربنات ۷/۵ درصد رقیق شده با آب‌مقطر برای اندازه‌گیری میزان فنل کل تهیه شد (فولین پس از رقیق‌سازی باید دور از نور نگهداری شود). درون هر چاهک از هر نمونه مقدار ۲۵ میکرولیتر عصاره، ۱۲۵ میکرولیتر محلول فولین و ۱۰۰ میکرولیتر محلول سدیم کربنات (سه تکرار) ریخته شد. پلیت با فویل پوشانده شده و روی شیکر به مدت یک ساعت و نیم قرار داده شد، سپس در طول موج ۷٦۵ نانومتر با دستگاه الایزا ریدر قرائت شد (Kamtekar et al. 2014). میزان محتوی فنل کل بر اساس واکنش‌گر فولین طبق معادله y= bx+a به‌دست آمد.

Y= جذب‌های خوانده شده از نمونه‌ها

X= غلظت

اندازه‌گیری میزان فلاونوئید کل:

جهت ترسیم منحنی کالیبراسیون فلاونوئید از غلظت‌های مختلف روتین (۱۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) استفاده شد. درون هر چاهک پلیت مقدار ۲۵ میکرولیتر روتین، ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر و ۷/۵ میکرولیتر سدیم نیتریت ۵ درصد در سه تکرار ریخته شد. شش دقیقه بعد ۷/۵ میکرولیتر آلومینیوم کلرید ۱۰ درصد، ۱۰۰ میکرولیتر سدیم هیدروکسید چهار درصد و ۱۰ میکرولیتر آب‌مقطر به چاهک‌ها اضافه شد. پلیت را با فویل پوشانده و پس از گذشت ۳ دقیقه روی شیکر قرار گرفت. ۱۵ دقیقه بعد جذب محلول‌ها در طول موج ۵۱۰ نانومتر با دستگاه الایزا ریدر اندازه‌گیری شد.

طبق معادله y= bx+a که در آن y برابر با مقدار جذب‌های خوانده شده از نمونه‌ها و x مقدار غلظت نمونه‌ها است، نمودار کالیبراسیون در اکسل رسم شد.

برای هر نمونه مقدار ۲۵ میکرولیتر از عصاره، ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر، ۷/۵ میکرولیتر سدیم نیتریت پنج درصد درون چاهک‌ها ریخته شد. پس از گذشت ٦ دقیقه ۷/۵ میکرولیتر آلومینیوم کلرید ۱۰ درصد و ۱۰۰ میکرولیتر سدیم هیدروکسید چهار درصد و ۱۰ میکرولیتر آب‌مقطر درون هر چاهک اضافه شد. پلیت توسط فویل آلومینیومی پوشانده و پس از ۳ دقیقه درون شیکر قرار گرفت. بعد از ۱۵ دقیقه جذب محلول‌ها در طول موج ۵۱۰ نانومتر با دستگاه الایزا ریدر انجام شد (Kamtekar et al. 2014).

آنالیز آماری:

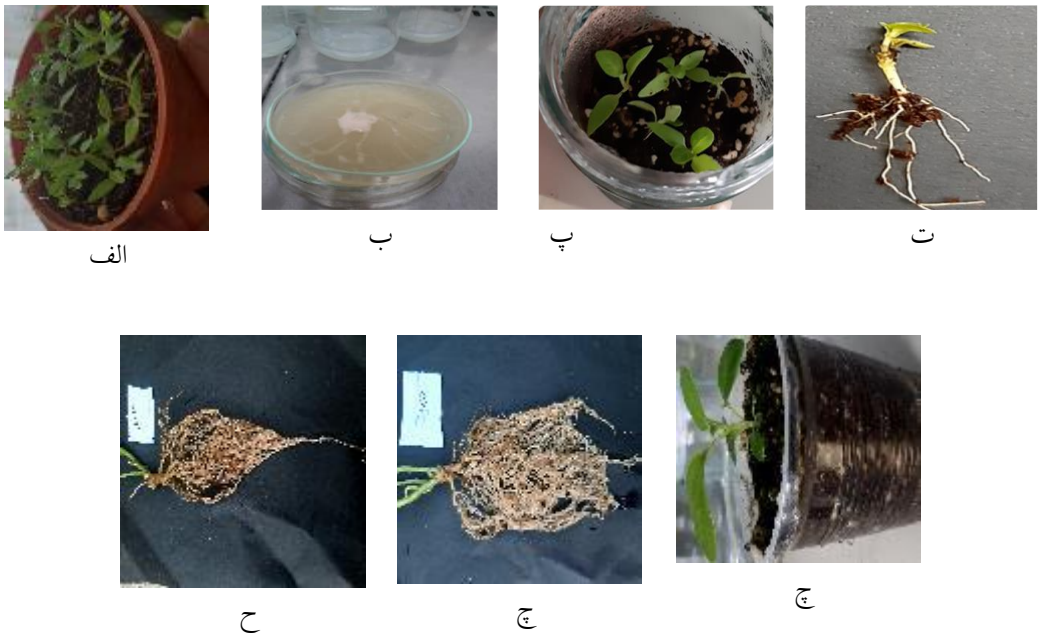
آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار اجرا شد. آنالیز داده‌ها شامل تجزیه واریانس داده‌ها، مقایسه میانگین داده‌ها و همبستگی داده‌ها (همبستگی پیرسون) با استفاده از نرم‌افزار SPSS ver 22 انجام شد. ترسیم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel انجام شد.

نتایج

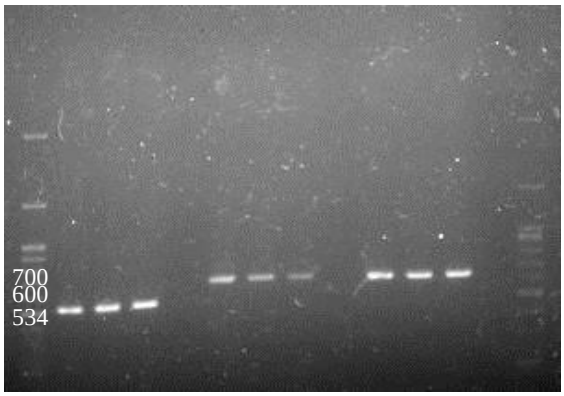
روش تراریختی بدون استفاده از کشت بافت در بسیاری از گیاهان به‌منظور کاهش زمان تولید ریشه مویین در مقیاس زیاد و عدم به‌کارگیری روش‌های کشت بافت، اجرا شده و موفقیت‌آمیز بوده است (Estrada-Navarrete G et al. 2006; Vieweg MF et al. 2004; Chen et al. 2019; Mortensen et al. 2019; Hu et al. 2019; Amined et al. 2019) در این تحقیق ۱۵ روز پس از آلوده‌سازی گیاه در محل گره اول از طریق زخم ایجاد شده، ریشه

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

مویین ظاهر شد و یک ماه و نیم بعد گیاه از محل ریشه مویین بعد از رشد کافی ریشه‌ها جدا و سازگاری برای گیاه در شرایط گلخانه (دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ٦٥ تا ۷۰ درصد) ایجاد شد و ریشه مویین در حجم زیاد تولید شد (شکل ۱). تأیید تراریختی ریشه‌های مویین انجام شد (شکل ۲). نتایج تجزیه واریانس داده‌ها برای صفات اندازه‌گیری شده در (جدول ۱) آورده شده است. بر اساس نتایج تجزیه واریانس گیاهان تراریخته و شاهد از لحاظ صفات زراعی مانند طول ریشه، حجم ریشه، مساحت ریشه اختلاف معنی‌داری را نشان دادند. از لحاظ میزان فلاونوئید نیز اختلاف آن‌ها معنی‌دار بود. نتایج مقایسه میانگین صفات بین دو گروه گیاهان شاهد و تراریخته با آزمون t انجام شد که نتایج آن در (شکل ۳) آمده است.



شکل ۱- مراحل تولید ریشه مویین در گیاه جنسینگ هندی *(Withania somnifera)* با روش تراریختی بدون استفاده از کشت بافت الف: تولید گیاهچه ب: آماده‌سازی باکتری اگروباکتریوم رایزوژنز سویه A4 پ: ریشه مویین ظاهر شده بعد از تلقیح ت: ریشه مویین رشد یافته ج: گیاهچه رشد یافته چ: ریشه مویین ح: ریشه گیاه شاهد

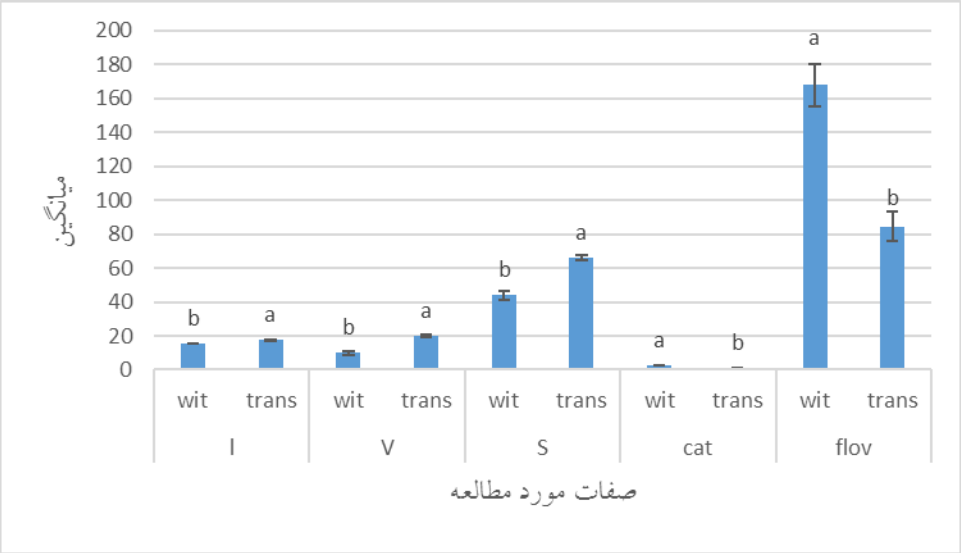


شکل ۲- تأیید تراریختی ریشه مویین حاصل از تلقیح گیاهچه‌های جنسینگ هندی *(Withania somnifera)* با روش تراریختی بدون استفاده از کشت بافت با رول‌های آ، بی، سی. کنترل منفی گیاه غیر تراریخت در نظر گرفته شده است. (سایز مارکر ۱۰۰-۳۰۰۰ جفت‌باز)

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس صفات مورد مطالعه در ریشه مویین حاصل از روش تراریختی بدون استفاده از کشت بافت در گیاه جنسینگ هندی *(Withania somnifera)*

منابع تغییر	درجه آزادی	طول ریشه (سانتی متر)	حجم ریشه (مترمکعب)	مساحت ریشه(سانتی مترمربع)	پروتئین (میلی گرم بر میلی لیتر)	آنزیم کاتالاز (واحد بر میلی‌گرم پروتئین بر دقیقه)	آنزیم گایاکول پراکسیداز(واحد بر میلی‌گرم پروتئین بر دقیقه)	آنزیم آسکوربات پراکسیداز(واحد بر میلی‌گرم پروتئین بر دقیقه)	میزان فنل (میلی گرم گالیک اسید بر گرم وزن خشک ریشه)	میزان فلاونوئید (میلی گرم روتین بر گرم وزن خشک ریشه)
ژنوتیپ	۱	٦**	۱۵۰**	۷۲٤/۹**	۳٦/۳۵۹ns	٤/۳۵۲**	۱/۳۵ns	۰/۰۰۷ns	۳۹/۵۷۸ns	۱۰٤۱٦/٦٦**
خطا	٤	۰/۲۵۰	۲/۵	۱٤/٦۵	۲۲/٤۵۱	۰/۰٤۵	۹/۳۳	۰/۵۱٤	۲٦/۲٦۳	۳٤۱/٦٦
ضریب تغییرات	۵	۳/۰۳	۱۰/۵	٦/۹۵	۱۸/٤	۱۱/۷	۱۷/۹	۲۷/۹	۱۰/۸	۱٤/٦



شکل ۳- نتایج مقایسه میانگین صفات مورد مطالعه با آزمون t بین گیاهان شاهد و تراریخته در ریشه مویین حاصل از روش تراریختی بدون استفاده از کشت بافت در گیاه دارویی جنسینگ هندی *(Withania somnifera)*

l: طول ریشه (سانتی‌متر) v: حجم ریشه (مترمکعب) s: مساحت ریشه (سانتی‌مترمربع) cat: آنزیم کاتالاز (واحد بر میلی‌گرم پروتئین بر دقیقه) gpx: آنزیم گایاکول پراکسیداز (واحد بر میلی‌گرم پروتئین بر دقیقه) Apx: آنزیم آسکوربات پراکسیداز (واحد بر میلی‌گرم پروتئین بر دقیقه) pro: پروتئین (میلی‌گرم بر میلی لیتر) phe: میزان فنل (میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم وزن خشک ریشه) flov: میزان فلاونوئید (میلی‌گرم روتین بر گرم وزن خشک ریشه) control: گیاه شاهد transgenic: گیاه تراریخته

جدول ۲- نتایج همبستگی بین صفات مورد مطالعه در گیاه جنسینگ هندی *(Withania somnifera)* با استفاده از روش تراریختی بدون استفاده از کشت بافت

	طول ریشه (سانتی متر)	حجم ریشه (مترمکعب)	مساحت ریشه(سانتی مترمربع)	آنزیم کاتالاز (واحد بر میلی گرم پروتئین بر دقیقه)	آنزیم آسکوربات پراکسیداز(واحد بر میلی گرم پروتئین بر دقیقه)	آنزیم گایاکول پراکسیداز(واحد بر میلی گرم پروتئین بر دقیقه)	پروتئین (میلی گرم بر میلی لیتر)	میزان فنل (میلی گرم گالیک اسید بر گرم وزن خشک ریشه)	میزان فلاونوئید (میلی گرم روتین بر گرم وزن خشک ریشه)
طول ریشه (سانتی متر)	۱/۰۰								
حجم ریشه (مترمکعب)	۰/۹۸۶**	۱/۰۰							
مساحت ریشه(سانتی مترمربع)	۰/۹۸۷**	۰/۹۹۹**	۱/۰۰						
آنزیم کاتالاز (واحد بر میلی گرم پروتئین بر دقیقه)	-۰/۹۱۴*	-۰/۹۵۵**	-۰/۹۴۵**	۱/۰۰					
آنزیم آسکوربات پراکسیداز(واحد بر میلی گرم پروتئین بر دقیقه)	-۰/۰۴	-۰/۰۱	-۰/۰۴	-۰/۲۲	۱/۰۰				
آنزیم گایاکول پراکسیداز(واحد بر میلی گرم پروتئین بر دقیقه)	-۰/۵۸	-۰/۵۸	-۰/۵۶	۰/۶۷	-۰/۵۲	۱/۰۰			

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

پروتئین (واحد بر میلی گرم پروتئین بر دقیقه)	۰/۶۰	۰/۶۰	۰/۵۸	-۰/۶۸	۰/۴۷	-۰/۹۹۷**	۱/۰۰	
میزان فنل (میلی گرم گالیک اسید بر گرم وزن خشک ریشه)	-۰/۲۸	-۰/۳۸	-۰/۳۸	۰/۳۷	۰/۳۴	-۰/۴۱	۰/۳۸	۱/۰۰
میزان فلاونوئید (میلی گرم روتین بر گرم وزن خشک ریشه)	-۰/۸۹۷*	-۰/۹۲۵**	-۰/۹۲۹**	۰/۸۵۹*	۰/۲۷	۰/۲۶	-۰/۲۹	۰/۶۶

نتایج مقایسه میانگین صفات مورد مطالعه نشان داد که گیاهان تراریخته نسبت به شاهد از لحاظ طول ریشه، حجم ریشه، مساحت ریشه، میزان فنل، فلاونوئید و آنزیم کاتالاز تفاوت نشان دادند.

نتایج همبستگی بین صفات مورد مطالعه در (جدول ۲) آمده است. بر اساس نتایج به‌دست آمده بین میزان فلاونوئید با حجم ریشه و مساحت ریشه و مساحت ریشه با طول و حجم ریشه و آنزیم کاتالاز با حجم و مساحت ریشه همبستگی معنی‌دار بر اساس یافته‌های این مقاله وجود دارد.

بحث

روش تراریختی بدون استفاده از کشت بافت یک ابزار ارزشمند در پیشرفت رشد گیاه تراریخته است. این روش به‌طور کامل از استفاده از مراحل کشت بافت جلوگیری و به‌طور قابل توجهی به زمینه بیوتکنولوژی گیاهی کمک می‌کند (Karthik et al. 2020). در طول دهه گذشته، این روش به‌دلیل صریح بودن، قابلیت اطمینان و مقرون به‌صرفه بودن، شناخت و تأیید گسترده‌ای در بین محققان به‌دست آورده است. روش تراریختی بدون استفاده از کشت بافت یک رویکرد بیوتکنولوژیکی پیشرفته است که برای معرفی ژن‌های خارجی به گیاهان برای اهداف مختلف، از جمله افزایش ویژگی‌هایی مانند مقاومت به بیماری، بهره‌وری و محتوای فیتوشیمیایی استفاده می‌شود. این روش شامل اصلاح ژنتیکی سلول‌های گیاهی برای ایجاد گیاهان تراریخته با ویژگی‌های مطلوب می‌باشد. گیاه دارویی جنسینگ هندی به‌دلیل وجود ترکیب فعال ویتانولید و بسیاری از ویژگی‌های دارویی آن اهمیت قابل توجهی دارد. در تحقیق انجام شده با روش مذکور گیاهان تراریخته تولید شد. گیاهان تراریخته تولید شده از طریق روش تراریختی بدون استفاده از کشت بافت الگوهای رشد و مورفولوژی تغییر یافته را در مقایسه با گیاهان شاهد از خود نشان دادند. این تغییرات ممکن است بر عواملی مانند ارتفاع بوته، اندازه برگ و بر رشد کلی گیاه و پتانسیل عملکرد تأثیر بگذارد. گیاهان تراریخته نسبت به شاهد طول ریشه (۱/۱۲ برابر)، حجم ریشه (۲ برابر)، مساحت ریشه (۱/۴۹ برابر) بالاتری را نشان دادند. از طریق تجزیه و تحلیل فیتوشیمیایی، محققان می‌توانند ترکیبات فعال زیستی کلیدی موجود در گیاهان تراریخته جینسینگ هندی را که از طریق روش تراریختی بدون استفاده از کشت بافت توسعه یافته‌اند، شناسایی و تعیین کنند. این تجزیه و تحلیل به ارزیابی هرگونه تغییر در ترکیب فیتوشیمیایی ناشی از تغییرات ژنتیکی کمک می‌کند و رویکردهایی را در مورد مزایای بالقوه این پروفایل‌های تغییر یافته ارائه می‌دهد. مطالعات مقایسه‌ای بین گیاهان جنسینگ هندی تراریخته و گیاهان شاهد، محققان را قادر می سازد تا تفاوت‌ها را در محتوای فیتوشیمیایی و ترکیب آن ارزیابی کنند. با مقایسه سطوح ترکیبات فعال زیستی محققان می‌توانند تأثیر اصلاح ژنتیکی را بر مشخصات فیتوشیمیایی گیاه و پیامدهای بالقوه برای خواص دارویی آن ارزیابی کنند. ترکیبات فنلی به‌عنوان دهنده هیدروژن به‌صورت یک آنتی اکسیدان مؤثر به شمار می‌آیند (Zhang and Tasco 2016). فلاونوئیدها خاصیت ضد میکروبی دارند و به گیاهان کمک می‌کنند در برابر عوامل بیماری‌زا مانند باکتری‌ها و قارچ‌ها دفاع کنند. میزان فلاونوئید در این تحقیق در گیاهان تراریخته با روش تراریختی بدون استفاده از کشت بافت به‌طور معنی‌داری نسبت به شاهد کاهش نشان داد. فعالیت هیدروژن پراکسیداز با افزایش فعالیت کاتالاز، آسکوربات و پراکسیداز گیاه همراه است و با افزایش فعالیت این آنزیم‌ها درمجموع غلظت هیدروژن

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

پراکسید در گیاه کم می‌شود (Kumar et al. 2012). کاتالاز یکی از آنزیم‌هایی است که در فرایند سم‌زدایی رادیکال‌های آزاد شرکت دارد و پراکسیدهیدروژن را به آب و اکسیژن تبدیل می‌کند. احتمالاً افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز برای غلبه بر افزایش پراکسیدهیدروژن است که به سیستم مهارکنندهٔ گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) برای خنثی‌کردن آثار نامطلوب آن در پایداری غشای سلولی نیاز دارد (Nasibi 2010). قابل ذکر است که روش تراریختی بدون استفاده از کشت بافت کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز در گیاهان تراریخته تولید شده در مقایسه با گیاهان شاهد را نشان داد. در این تحقیق با تلقیح گیاه با باکتری و بررسی آنزیم‌های آنتی اکسیدانتی رادیکال‌های آزاد زیاد تولید نشدند و فعالیت این آنزیم‌ها در گیاهان شاهد نسبت به تراریخته بیشتر بود. بر اساس یافته‌های این پژوهش بدون ایجاد تنش در گیاه می‌توان با این روش گیاهان تراریخت تولید نمود که بدون نیاز به پروسه کشت بافت در زمان کمتری بتوانیم حجم زیادی ریشه برای استحصال ماده مؤثره مورد نظر داشته باشیم. در نتیجه، بررسی ویژگی‌های زراعی و فیتوشیمیایی گیاهان تراریخته جینسنگ هندی با استفاده از روش تراریختی بدون استفاده از کشت بافت چشم‌اندازهای امیدوارکننده‌ای را برای افزایش بهره‌وری کشاورزی و بازگشایی برنامه‌های درمانی جدید آشکار می‌کند. همبستگی بین صفات مورد مطالعه نشان داد آنزیم کاتالاز و مقدار فلاونوئید با صفات طول ریشه، حجم ریشه و مساحت ریشه همبستگی مثبت و معنی‌دار دارند. یافته‌های ارائه‌شده در این مطالعه راه را برای روش‌ها و کاربردهای تحقیقاتی آینده در بهره‌گیری از پتانسیل *Withania somnifera* برای بهبود کشاورزی و سلامت انسان هموار می‌کند. در تحقیقات آینده در این گیاه مقدار ماده مؤثره ویتانولید در گیاهان شاهد با گیاهان تراریخته حاصل از روش تراریختی بدون استفاده از کشت بافت با روش‌های مختلف کروماتوگرافی مانند HPLC پیشنهاد می‌شود مورد بررسی قرار گیرد.

سپاسگزاری

از دانشکده فناوری کشاورزی ابوریحان دانشگاه تهران و پژوهشکده گیاهان دارویی دانشگاه شهید بهشتی که امکانات لازم برای انجام این پروژه را در اختیار گذاشتند تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

Aebi HE (1983) Catalase. In: Bergmeyer HU, Ed, Methods of Enzymatic Analysis, Verlag Chemie, Weinhem 273-286.

Aminedi R, Dhatwalia D, Jain V, Bhattacharya R (2019) High efficiency in planta transformation of Indian mustard *(Brassica juncea)* based on spraying of floral buds. Plant Cell Tissue Organ Culture.

Archana R and Namasivayam A (1999) Antistressor effect of *Withania somnifera*. Journal of Ethnopharmacology, 64: 91-93.

Bargagna-Mohan P, Hamza A, Kim Y, Ho YK, Mor-Vaknin N and Wendschlag N (2007) The tumor inhibitor and antiangiogenic agent withaferin A targets the intermediate filament protein vimentin. Cell Press, 14: 623-34.

Bent A (2000) Arabidopsis in Planta Transformation. Uses, Mechanisms, and Prospects for Transformation of Other Species. Plant Physiology 124:1540-1547.

Bhattacharya SK, Satyan KS and Ghosal S (1997) Antioxidant activity of glycowithanolides from *Withania somnifera*. Indian Journal of Experimental Biology 35:236-239.

Bhattacharya SK and Muruganandam AV (2003) Adaptogenic activity of *Withania somnifera*: an experimental study using a rat model of chronic stress. Pharmacology, Biochemistry and Behavior 75:547-555.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical biochemistry 72:248-254.

Chance B, Maehly AC (1955) Assay of catalases and peroxidases.

Chen G, Zeng F, Wang J, Ye X, Zhu S, Yuan L (2019) Transgenic wucai (*Brassica campestris* L.) produced via Agrobacterium-mediated anther transformation in planta. Plant Cell Reports 38:577-586.

Choudhary MI, Shahwar DE, Parween Z, Jabbar A, I A, Rahman AU (1995) Antifungal steroidal lactones from *Withania coagulans*. Phytochemistry 40:1243-1246.

Clough SJ, Bent A (1998) Floral dip: A simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. Plant Journal 16:735-743.

Curtis IS, NAM HG (2001) Transgenic radish (*Raphanussativus* L. *Longipinnatus Bailey*) by floral-dip method–plant development and surfactant are important in

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

optimizing transformation efficiency. Transgenic Research 10:363-371.
Dhuley JN (1998) Effect of ashwagandha on lipid peroxidation in stress-induced animals. Journal of Ethnopharmacology 60:173-178.
Estrada-Navarrete G et al. (2006). *Agrobacterium rhizogenes* transformation of the Phaseolus spp.: a tool for functional genomics. Molecular Plant-Microbe Interactions 19:1385-93.
Gapińska M, Skłodowska M, Gabara B (2008) Effect of short-and long-term salinity on the activities of antioxidative enzymes and lipid peroxidation in tomato.
Guoguo M, Chen A, Wang Y, Li S, Wu M, Hu Y, Liu X, Hou X (2024) A simple and efficient in planta transformation method based on the active regeneration capacity of plants, Plant Communications 100822.
Hemalatha S, Wahi AK, Singh PN, Chansouria JPN (2004) Hypoglycemic activity of *Withania coagulans* Dunal in streptozotocin-induced diabetic rats. Journal of Ethnopharmacology 93:261-264.
Hu D, Bent AF, Hou X, Li Y (2019) Agrobacterium-mediated vacuum infiltration and floral dip transformation of rapid-cycling *Brassica rapa*. BMC Plant Biology:19.
Kaileh M, Vanden Berghe W, Heyerick A, Horion J, Piette J, Libert C, De Keukeleire D, Essawi T, Haegeman G (2007) Withaferin a strongly elicits IkappaB kinase beta hyperphosphorylation concomitant with potent inhibition of its kinase activity. Journal of Biological Chemistry 282:4253-4264.
Kamtekar S, Keer V & Patil V (2014). Estimation of phenolic content, flavonoid content, antioxidant and alpha-amylase inhibitory activity of marketed polyherbal formulation. Journal of Applied Pharmaceutical Science 4:061-065.
Karthik K, Nandiganti M, Thangaraj A, Singh S, Mishra P, Sharma M, Singh N, Dash P, Sreevathsa R (2020) Transgenic cotton (*Gossypium hirsutum* L.) to combat weed vagaries: utility of an apical meristem-targeted in planta transformation strategy to introgress a modified CP4-EPSPS gene for glyphosate tolerance. Front. Plant Science. 11:768.
Kim S, Yu JS, Lee JY, Choi SU, Lee J, Kim K.H (2019) Cytotoxic withanolides from the roots of Indian Ginseng *(Withania somnifera)*. Nature Product 82:765-773. doi: 10.1021/acs.jnatprod.8b00665.
Kumar N, Ebel RC and Roberts PD (2011) Superoxide dismutase activity in kumquat leaves infected with *Xanthomonas axonopodis* pv. citri. Horticulture Science Biotechnology 86:62-68.
Lazo GR, Stein PA, Ludwig RA (1991) A DNA Transformation– Competent Arabidopsis Genomic Library in Agrobacterium. Biotechnology 9:963-967.
Mortensen S, Bernal-Franco D, Cole LF, Sathitloetsakun S, Cram EJ, Lee- Parsons CWT (2019) Easi transformation: an efficient transient expression method for analyzing gene function in *Catharanthus roseus* seedlings.
Mishra LC, Singh BB, Dagenais S (2000) Scientific basis for therapeutic use of *Withania somnifera* (Ashwagandha): a review. Alternative Medicine. Review 5:334-346.
Nakano Y, Asada K (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in *spinach chloroplasts*. Plant and cell physiology 22:867-880.
Nasibi F (2010) Effect of different concentrations of sodium nitroprusside (SNP) pretreatment on oxidative damages induced by drought stress in the tomato plant. Iranian Journal of Plant Biology 9:36-74 (in Farsi).
Ratanasut K, Rod-In W, Sujipuli K (2017) In planta Agrobacterium- Mediated transformation of rice. Rice Science 24:181-186.
Sangwan RS, Chaurasiya ND, Misra LN, Lal P, Uniyal GC, Sharma R, Sangwan NS, Suri KA, Qazi GN and Tuli R (2004) Phytochemical variability in commercial herbal products and preparations of *Withania somnifera* (Ashwagandha). Current Science 86:461-465.
Trieu AT, Burleigh SH, Kardailsky IV, Maldonado-Mendoza IE, Versaw WK, Blaylock LA, Shin, H, Chiou TJ, Katagi H, Dewbre GR, Weigel D, Harrison MJ (2000) Transformation of Medicagotruncatula via infiltration of seedlings or flowering plants with Agrobacterium. Plant Journal 22:531-541.
Vieweg MF, Fruhling M, Quandt HJ, Heim U, Baumlein H, Puhler A, Kuster H, Andreas M (2004) The promoter of the *Vicia faba* L. gene VfLb29 is specifically activated in the infected cells of root nodules and the arbuscular-containing cells of mycorrhizal roots from different legume and non-legume plants. Molecular Plant-Microbe Interactions 17:62-9.
ZALE JM, AGARWAL S, LOAR S, STEBER CM (2009) Evidence for stable transformation of wheat by floral dip in *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell Reports 28:903-913. Zhang H and Tsao R (2016) Dietary polyphenols, oxidative esters, and antioxidant and anti-inflammatory effects. Current Opinion in Food Science 52:4026-4037.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]