مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
دوره اول، شماره ۲، پاییز و زمستان ۱۳۹۱
صفحه ۹۳-۱۰۲

انتقال ژن‌های اینترفرون گامای انسانی- اولئوسین به گیاه گلرنگ

(*Carthamus tinctorius* L.)

اطهر یقطین[۱]، مختار جلالی‌جواران[۲*]، قاسم کریم‌زاده[۳]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس
۲- دانشیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس
۳- دانشیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس
* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی:jalali.mokhtar@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۹۰/۲/۳ - تاریخ پذیرش: ۹۱/۸/۹)

چکیده

استفاده از گیاهان به عنوان منبع تولید دارو از قدیم مورد توجه بشر بوده است. زیست‌فناوری پیشرفته این امکان را فراهم می‌کند که پروتئین‌های با ارزش دارویی در گیاهان تولید شود. در این پژوهش ترکیب سازه ژنی اینترفرون گامای انسانی-اولئوسین که تحت پیشبرنده بذری Napin در پلاسمید pBI121 و در آزمایشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس کلون شده و به اگروباکتریوم سویه LBA4404 انتقال یافته بود، به گیاه گلرنگ منتقل شد. ریزنمونه‌های لپه‌ای از گیاه گلرنگ رقم زراعی پدیده برای تراریزش مورد استفاده قرار گرفتند و تعدادی گیاه تراریخته احتمالی به دست آمد. گیاهان تراریخته بر روی محیط MS همراه با ویتامین B5 حاوی ۰/۰۹ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۱ میلی‌گرم در لیتر TDZ و نیز ٤٠ میلی‌گرم در لیترآنتی بیوتیک کانامایسین انتخاب شدند. تجزیه مولکولی گیاهان تراریخته (T_0) با استفاده از پی.سی.آر، وجود سازه ژنی اینترفرون گامای انسانی به همراه اولئوسین را در گیاهان تراریخته تایید کرد.

واژه‌های کلیدی

اگروباکتریوم
انتقال ژن
ژن‌های اینترفرون گامای انسانی-اولئوسین
کشاورزی مولکولی
گلرنگ

مقدمه

استفاده از گیاهان به‌عنوان سیستم‌های تولید پروتئین، در مقایسه با سایر سیستم‌ها مزایای ویژه‌ای از قبیل موارد زیر دارد: ۱- صرف هزینه کمتر در این سیستم نسبت به سایر سیستم‌های تولید پروتئین حیوانات، فرمانتورها و بیورآکتورها. ۲- نیاز به ساختار ساده و تخصص کمتر جهت کاشت، داشت و برداشت، و در مجموع کار با گیاهان. ۳- عدم وجود عوامل بیماری‌زای مشترک با انسان از قبیل پریون، ویریون و... در گیاهان و عدم احتمال آلوده‌سازی محصول نهایی. ٤- توانایی گیاهان عالی در تولید پروتئین‌های یوکاریوتی با تاخوردگی و گلیکوزیلاسیون صحیح و فعالیت قابل قبول (Horn *et al.*, 2004).

بیان ژن در بافت‌های مختلف گیاهی امکان‌پذیر است، اما بیان پروتئین در بذر موجب تجمع پایدار آن در غلظت نسبتا بالا و حجم کم و فشرده می‌شود که برای ذخیره‌سازی و استخراج مناسب است. استفاده از بذور روغنی و بیان پروتئین نوترکیب در ترکیب با اولئوسین تمام مزایای بیان در بذر از جمله ظرفیت بالای تولید، افزایش پایداری و از همه مهم‌تر سهولت در تخلیص را دارد. اولئوسین سبب هدف‌گیری صحیح پروتئین به اندام‌های روغنی بذر شده و سبب استخراج راحت‌تر و ارزان‌تر از آن می‌شود (Van Rooijen and Moloney, 1995).

گلرنگ (*Carthamus tinctorius* L.) یک گیاه دارای بذر روغنی است که امروزه با هدف استخراج روغن از آن کشت می‌شود. دانه گلرنگ دارای ۲۵ تا ٤۰ درصد روغن و ۱۲ تا ۲۰ درصد پروتئین است (Yazdi-Samadi and Abd-Mishani, 2007). وجود سطوح بالایی از اسیدهای چرب غیراشباع لینولئیک و اولئیک در روغن حاصل از بذر گلرنگ سبب کیفیت مرغوب آن شده و از نظر مواد مغذی با روغن زیتون قابل مقایسه می‌سازد (Dajue and Mündel, 1996).

خودگشنی، خوراکی نبودن بخش‌های رویشی گیاه، پایداری در آب و هوای گرم و خشک و سطح زیر کشت پایین گلرنگ (Singh and Nimbkar, 2007) سبب شد تا به‌عنوان گیاه میزبان جهت انتقال ژن اینترفرون گامای انسانی در ترکیب با اولئوسین انتخاب شود.

اینترفرون‌ها از جمله پروتئین‌هایی هستند که ارزش درمانی بالایی دارند و خواص ضد ویروسی آنها به اثبات رسیده است. تولید اینترفرون گاما در بدن در واکنش به فعالیت میکروب‌ها و محصولات آنها رخ می‌دهد و به‌عنوان عامل مختل کننده همانندسازی و رشد ویروس‌ها شناخته می‌شود (Kontsek and Kontsekova, 1997). به همین علت است که علاقه شدیدی برای تولید اینترفرون از منابع دائمی، ایمن و ارزان وجود دارد. به علاوه از این جهت که این پروتئین وزن زیادی ندارد (۲۵-۲۰ کیلو دالتون) (Sareneva *et al.*, 1996)، جهت انتقال در ترکیب با اولئوسین مناسب به نظر می‌رسد (Ling, 2007).

با روشن شدن این مسئله که اتصال ژن اولئوسین و ژن *GUS* تحت کنترل پیشبرنده بذری موجب هدف گیری صحیح پروتئین تولید شده به اجسام روغنی می‌شود، این فرضیه به وجود آمد که شاید بتوان پروتئین اولئوسین را برای هدف گیری پروتئین خارجی مورد استفاده قرار داد. چنین سیستمی روشی بسیار مناسب برای ذخیره پروتئین نوترکیب در اجسام روغنی بذر و در نتیجه تخلیص راحت‌تر پروتئین نوترکیب ارایه می‌کند (Van Rooijen and Moloney, 1995).

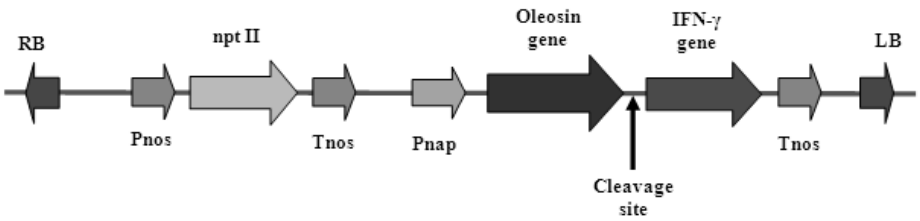
مواد و روش‌ها

در این پژوهش از باکتری *Agrobacterium tmefaciens* سوش LBA4404 جهت انتقال ترکیب سازه ژنی اینترفرون گاما-اولئوسین تهیه شده توسط باقری و همکاران در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس استفاده شد (Bagheri *et al.*, 2008). این باکتری دارای ژن مقاومت به آنتی بیوتیک کانامایسین جهت بیان در باکتری و گیاه است. به علاوه این باکتری دارای ژن‌های اینترفرون گاما (۵۰۰bp) و اولئوسین (۹۰۰bp) بوده و ژن اولئوسین در ناحیه بالادستی ژن اینترفرون قرار گرفته است (شکل ۱).

جهت تایید وجود ژن در باکتری، Colony PCR انجام شد (جدول ۱). آغازگرهای اختصاصی مستقیم و معکوس مورد استفاده، به ترتیب مربوط به ژن‌های اولئوسین و اینترفرون گاما بوده و عبارت هستند از

F: 5′- TT**GGATCC**ATGACGGATACAGCTAGAAC-3′

R: 5′-CAT**GAGCTC**TTAGGACCGACCGTTTTGGA-3′



شکل ۱- تصویر شماتیک سازه pBI121-IFN-γ-Oleosin حاوی پیشبرنده Napin، ژن اولئوسین، جایگاه برش و ژن اینترفرون گاما، Pnos و Tnos: پیشبرنده و خاتمه دهنده Nos، Pnap: پیشبرنده Napin.

Figure 1- schematic diagram of pBI121-IFN-γ-Oleosin construct contaning Napin promoter, oleosin gene, cleavage site and γ-interferon gene, Pnos and Tnos: nos promoter and terminator, Pnap: Napin promoter.

جدول ۱- شرایط پی.سی.آر جهت تکثیر ژن‌های اینترفرون گاما – اولئوسین.

Table 1- PCR conditions to amplify interferon gamma-oleosin.

تعداد چرخه cycles	مرحله phase	حرارت °C Temperature (°C)	مدت زمان (دقیقه) Time (min)
1	Hot start واسرشت‌سازی اولیه	95	5
30	Denaturation واسرشت‌سازی	95	1
	Annealing اتصال آغازگر	62	1
	Extension گسترش	72	1.5
1	Final Extension گسترش نهایی	72	10

به منظور کشت باکتری و گیاه به ترتیب از محیط کشت LB[1] (Bertani, 1951) و محیط کشت MS[2] (Murashige and Skoog, 1962) به همراه ویتامین‌های محیط کشت B5 (Gamborg *et al.*, 1968) استفاده شد. آنتی بیوتیک‌های استرپتومایسین و سفوتاکسیم نیز به ترتیب جهت گزینش اگروباکتریوم در محیط کشت باکتری و گیاه مورد استفاده قرار گرفت.

به منظور تهیه ریزنمونه، بذرهای گلرنگ رقم زراعی پدیده که از مؤسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج تهیه شده بود، ابتدا توسط اتانول ۷۰ درصد و پس از یک بار آبشویی به وسیله هیپوکلریت ۱ درصد ضدعفونی شده، سپس۳ بار توسط آب مقطر استریل آبشویی شد. بذرها بعد از خشک شدن بر روی کاغذ صافی استریل، در محیط کشت جوانه‌زنی که حاوی محیط کشت ۱/۲MS بدون هورمون‌های گیاهی بود، کشت شدند و در اتاق رشد با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. بعد از ۶ روز برگ‌های لپه‌ای پس از حذف جوانه انتهایی به مدت ۲ روز بر روی محیط کشت MS (pH=۵/۸) حاوی هورمون قرار داده شدند. هورمون‌های مورد استفاده به میزان ۰/۰۹ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۱ میلی‌گرم در لیتر TDZ در نظر گرفته شد. جهت تراریزش، کشت اگروباکتریوم حاوی ژن‌های سازه اینترفرون گامای انسانی–اولئوسین که توسط باقری و همکاران تهیه شده بود، در محیط LB مایع دارای ۵۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین در

1- Lauri and Bertani
2- Murashige and Skoog

دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد بر روی تکان‌دهنده[3] ۲۰۰ rpm انجام شد (Bagheri *et al.*, 2008). رسوب سلول‌های باکتری در محیط مخصوص آلوده‌سازی اگروباکتریوم[4] شامل نمک‌های MS همراه با ۲۰ گرم گلوکز (pH=۵/۲) و فاقد هورمون به صورت سوسپانسیون در آمده و جهت تراریزش از آن استفاده شد. برگ‌های لپه‌ای به مدت ۱۰ دقیقه در محیط سوسپانسیون اگروباکتریوم قرار داده شدند و سپس به محیط هم کشتی که محیط MS همراه با ویتامین B5 و حاوی ۰/۰۹ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۱ میلی گرم در لیتر TDZ و فاقد آنتی بیوتیک بوده انتقال پیدا کردند. مدت زمان نگهداری در این محیط و در شرایط تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، ٤٨ ساعت در نظر گرفته شد. در هنگام آماده سازی ریزنمونه‌ها باید دقت شود تا مریستم انتهایی، در انتهای دمبرگ باقی نماند. زیرا به دلیل رشد سریع، با آنتی بیوتیک کنترل نمی‌شود. به علاوه چنانچه انتهای دمبرگ بیش از حد قطع گردد، از توان باززایی کاسته می‌شود. بهترین مدت زمان تماس قاعدهٔ دمبرگ‌های گلرنگ با سوسپانسیون باکتریایی، ۱۰ دقیقه گزارش شده است (Sankara Rao and Rohini, 1999). پس از مرحله هم‌کشتی، ریزنمونه‌ها به محیط القای شاخه‌زایی حاوی همان تیمار هورمونی به همراه ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم و ٤٠ میلی‌گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک کانامایسین انتقال یافته و هر سه هفته به محیط جدید مشابه واکشت شدند. پس از ٦ هفته، نوساقه‌ها از قاعده دمبرگ‌های لپه‌ای جدا شده و به محیط طویل شدن شاخه حاوی ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۱ میلی‌گرم در لیتر کینتین[5] انتقال یافتند. به منظور بررسی گیاهان باززایی شده بر سطح محیط کشت انتخابی (احتمالا تراریخته) جهت استخراج دی.ان.ای ژنوم گیاهی روش CTAB مورد استفاده قرار گرفت (Ausubel *et al.*, 1994). پس از حصول اطمینان از کیفیت و کمیت دی.ان.ای استخراجی تکثیر آن توسط روش پی.سی.آر و آغازگرهای اختصاصی انجام شد. در نهایت قطعات تکثیر شده بر روی ژل آگارز ۱ درصد مورد بررسی قرار گرفتند.

3- Shaker
4- Infection Medium
5- kinetin

نتایج و بحث

در ابتدا حضور سازه ژنی اینترفرون گاما-اولئوسین در اگروباکتریوم تأیید شد (شکل ۲).

کمترین میزان آنتی بیوتیک غلظت ٤٠ میلی‌گرم در لیتر در محیط کشت باززایی بود که در آن ریزنمونه‌های غیر تلقیح شده (شاهد) قادر به رشد نبودند و به تدریج ریزنمونه‌ها به رنگ زرد و قهوه‌ای درآمده و از بین رفتند (شکل ۳).

ریزنمونه‌ها، ۲ تا ۳ روز بر روی محیط هم کشتی قرار گرفته و سپس به محیط کشت انتخابی (حاوی کانامایسین ٤٠ میلی‌گرم در لیتر و سفاتوکسیم ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر و بدون هورمون) منتقل شدند. پس از دو تا سه هفته، ریزنمونه‌های تلقیح شده، جوانه‌هایی تولید کردند. در حالی که هیچ گونه باززایی بر روی ریزنمونه‌های شاهد (بدون تلقیح با اگروباکتریوم) دیده نشد.

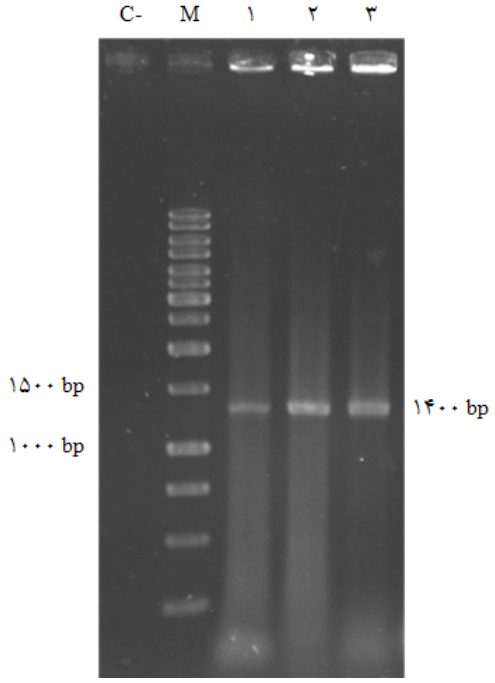
ریزنمونه‌ها هر سه هفته یکبار به محیط جدید مشابه واکشت شدند. تعدادی از جوانه‌های تولید شده بر روی محیط گزینشگر (حاوی آنتی‌بیوتیک)، سبز و زنده مانده و بقیه به علت عدم دریافت ژن مقاومت به کانامایسین از بین رفتند (شکل ٤-الف). به نظر می‌رسد نوساقه‌های زنده مانده و باززایی شده احتمالا ژن اینترفرون گاما-اولئوسین و مقاومت به آنتی‌بیوتیک را دریافت کرده‌اند (شکل ٤-ب).

ریزنمونه‌هایی که در این شرایط سبز باقی ماندند، به محیط کشت طویل‌سازی ساقه (حاوی ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم و ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۱ میلی‌گرم در لیتر kinetin) منتقل شدند (شکل ۵). در نهایت تعدادی نمونه که در محیط بدون هورمون ریشه‌دار شده بودند، پس از طویل شدن بر روی محیط مربوطه، به پرلیت و خاک سبک منتقل شدند (شکل ٦).

گیاهان گلرنگ تراریخته احتمالی[6] پس از انتخاب روی محیط حاوی کانامایسین، به وسیله پی.سی.آر با آغازگرهای اختصاصی مورد بررسی بیشتر قرار گرفتند. نتیجه پی.سی.آر با این آغازگرها تکثیر قطعه bp ۱٤۰۰ بود که در گیاهان تراریخته قابل تشخیص است، ولی در گیاهان غیرتراریخته باندی مشاهده نشد (شکل ۷).

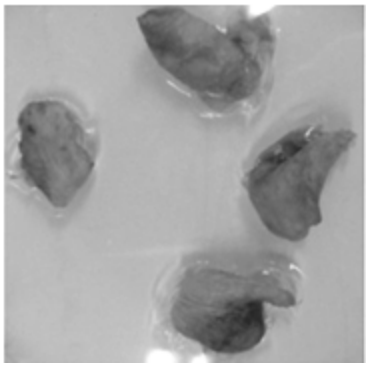
آزمایش‌ها نشان داد که میزان باززایی در نمونه‌های تلقیح شده بسیار کمتر از نمونه‌های غیر تلقیح شده است. علل دقیق مربوط

6- Putative Transgenic Plants



شکل ۲- تأیید حضور سازه ژنی اینترفرون گاما–اولئوسین در اگروباکتریوم به روش Colony PCR؛ C-: کنترل منفی، M: مارکر مولکولی Ladder Mix (شرکت فرمنتاز)، ۱، ۲ و ۳: چاهک‌های اگروباکتریوم دارای ژن.

Figure 2- colony PCR analysis of interferon gamma-oleosin of *agrobacterium*; C-: negative control, M: Ladder Mix, lane 1, 2 and 3: *agrobacterium* containing genes.

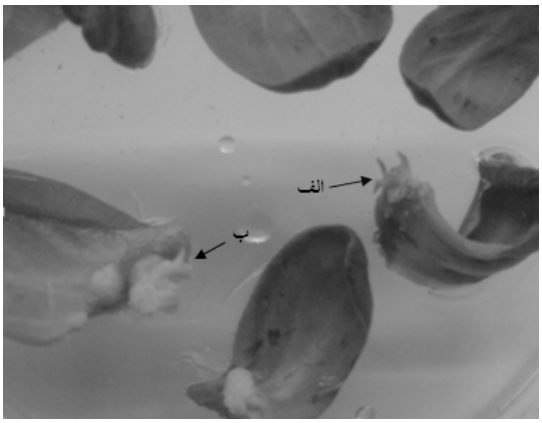


شکل ۳- عدم باززایی و از بین رفتن ریزنمونه‌های غیر تراریخته گلرنگ در محیط حاوی ٤٠ میلی گرم در لیتر کانامایسین.

Figure 3- noregeneration and destroying of safflower explants in medium containing 40 mg l^{-1} kanamycin.

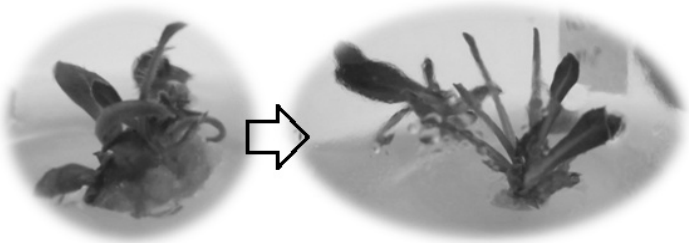
به این امر شناخته شده نیست، اما گفته می‌شود ممکن است یکی از دلایل آن ایجاد واکنش فوق حساسیت[7] (HR) در ریزنمونه‌های گلرنگ در مواجهه با اگروباکتریوم باشد (Orlikowska *et al.*, 1995). واکنش فوق حساسیت یکی از پاسخ‌های دفاعی گیاه است که بیشتر به سرعت سبب مرگ سلولی نواحی اطراف محل آلودگی شده و موجب تجمع مواد ضد میکروبی در آن بخش می‌شود و در نهایت سلول‌های آسیب دیده نکروزه می‌شوند (Richter and Ronald, 2000). به طور معمول در انتقال ژن با اگروباکتریوم به گیاهان، استوسیرینگون سبب افزایش خاصیت بیماری‌زایی و در نتیجه افزایش بازده تراریزش در گیاهان می‌شود (Stachel *et al.*, 1986). اما پژ.هش‌ها نشان می‌دهد که احتمالا دارد ایجاد واکنش فوق حساسیت موجب غیرفعال شدن بیماری‌زایی باکتری شده و اثری بر تراریزش گلرنگ ندارد. در

7- Hypersensitive Reaction



شکل ٤- الف) سفید شدن و از بین رفتن جوانه‌های غیر تراریخته گلرنگ بر روی محیط گزینشگر؛ ب) جوانه‌های باززایی شده احتمالاً تراریخته

Figure 4- a) white regeneration of non-transformed plants on screening medium; b) putative transformed plants



شکل ٥- انتقال ریزنمونه‌های باززایی شده گلرنگ به محیط طویل سازی.

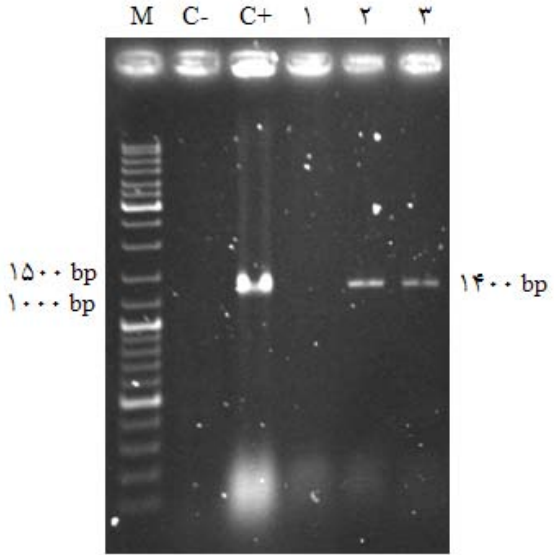
Figure 5- transferring of regeneration plant to shoot elongation medium

شکل ٦- انتقال گیاهچه‌های ریشه‌دار شده گلرنگ به پرلیت و خاک

Figure 6- transferring of rooted plants to perlit and soil

مورد عدم تأثیر استوسیرینگون بر تراریزش نتایج مشابهی توسط Rohini و Rao به دست آمده است (Rohini and Sankara Rao, 2000). به همین علت استوسیرینگون در این آزمایش مورد استفاده قرار نگرفت.

در مجموع وجود آنتی بیوتیک کانامایسین در محیط کشت سبب کاهش رشد و باززایی در گیاهان تراریخته و غیر تراریخته می‌شود (Rohini and Sankara Rao, 2000) و به نظر می‌رسد این امر به علت اثرهای بازدارندگی آنتی‌بیوتیک باشد. جهت انتقال ژن، باززایی مستقیم گیاه از قطعات برگ لپه‌ای نسبت به باززایی به واسطه تشکیل کالوس بسیار مناسب‌تر به نظر می‌رسد. به این



شکل ۷- آنالیز دی.ان.ای ژنومی با استفاده از تکنیک پی.سی.آر؛ M: مارکر مولکولی Ladder Mix (شرکت فرمنتاز)، چاهک -C: کنترل منفی (بدون دی.ان.ای)، چاهک +C: کنترل مثبت، چاهک ۱: دی.ان.ای ژنومی گیاه غیر تراریخته، چاهک‌های ۲ و ۳: دی.ان.ای ژنومی استخراج شده از گیاهان تراریخته حاوی ژن‌های اینترفرون گاما-اولئوسین.

Figure 7- PCR analysis of transgenic plants; M: Ladder Mix, C-: negative control, C+: positive control, lane 1: genomic DNA of non-trnasformed plant, lane 2 and 3: extracted genomic DNA of putative transgenic plant containing genes. interferon gamma-oleosin.

علت که تغییرات سوماکلونال[8] ناشی از کشت کالوس را می‌توان با استفاده از این روش حذف کرد (Ying *et al.*, 1992).

شیشه‌ای شدن به معنی ظهور ناهنجاری‌هایی مانند بافت‌ها یا اندام‌هایی با ظاهر غیرطبیعی، آغشته به آب، ضخیم، نیمه شفاف و شکننده در کشت بافت گیاهی است (Gaspar, 1991). گلرنگ یک گیاه مخصوص نواحی خشک و نیمه خشک و گرم است و می‌تواند به خوبی از سد شرایط کم آبی عبور کند. به همین علت به افزایش میزان رطوبت در محیط واکنش نشان می‌دهد. یکی از اولین علایم وجود رطوبت اضافی در محیط، شیشه‌ای شدن است که با کلروز و نکروز گیاه همراه است (شکل ۸). این پدیده به راحتی توسط ایجاد شرایط بهینه در دما، ترکیبات محیط کشت و تهویه کنترل می‌شود. به همین علت استفاده از محیط طویل‌سازی حاوی ترکیب نمک‌های MS و سیتوکنین پایین و نیز استفاده از آگار به جای فیتاژل (Debergh *et al.*, 1992) سبب شد این پدیده به شدت کاهش یابد.

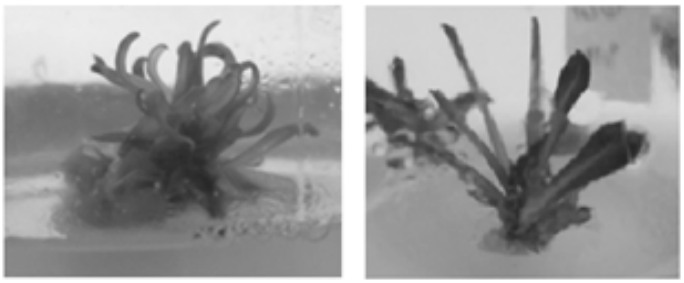
استفاده از TDZ در ترکیب با NAA نسبت به استفاده از BAP در ترکیب با NAA، سبب باززایی بهتر در گلرنگ می‌شود (Debergh *et al.*, 1992). هورمون گیاهی BAP پدیده شیشه‌ای شدن را افزایش می‌دهد. در حالی که TDZ تولید گیاهچه‌های قوی را تقویت می‌کند (Orlikowska and Dyer, 1993). همچنین وجود IBA در محیط کشت، سبب افزایش شیشه‌ای شدن می‌شود (Sankara Rao and Rohini, 1999). بهترین ترکیب تیماری جهت القای باززایی در گلرنگ که یک گیاه علفی[9] به شمار می‌رود، ترکیب NAA و TDZ است. در صورتی که به طور معمول TDZ جهت باززا کردن گیاهان چوبی[10] به کار می‌رود (Huetteman and Preece, 1993).

سن گیاه مادری جهت تهیه ریزنمونه به منظور القای باززایی اهمیت فراوان دارد. ریزنمونه‌های ٤ تا ۷ روزه خیلی بیشتر از ریزنمونه‌های ۲ تا ۳ روزه و ۸ تا ۱۵ روزه باززا می‌شوند (Nikam and Shitole, 1999). نتایج مشابهی از اثر سن گیاه مادری بر میزان باززایی در آفتابگردان (Paterson and Everett, 1985)، لوبیا و نخود (Angelini and Allavena, 1989) گزارش شده است.

می‌توان گفت باززایی مطلوب گلرنگ به عوامل مختلفی از جمله

8- Somaclonal Variation

9- Herbaceous
10- Woody Species



الف ب

شکل ۸- نمونه‌ای از گیاهچه الف) طبیعی و ب) شیشه‌ای شده گلرنگ.

Figure 8- sample of a) normal and b) vitrified plant

ژنوتیپ گیاه، سن گیاه مادری، محل تهیه ریزنمونه و اندازه ریزنمونه بستگی دارد. به عنوان مثال در این پژوهش هیچ موفقیتی در باززا کردن گیاهان از هیپوکوتیل و برگ ارقام مورد استفاده به دست نیامد. همچنین به طور تجربی بهترین سن جهت باززایی، ریزنمونه‌های ۵ تا ۷ روزه شناخته شدند. به علاوه باززایی و تولید نوساقه فقط در ناحیه قاعده ریزنمونه برگ‌های لپه‌ای کامل و بدون برش اتفاق افتاد و نتایج مشابه از سایر پژوهش‌ها نیز حاصل شده است (Basalma *et al.*, 2010).

منابع

1. Angelini RR, and Allavena A. 1989. Plant regeneration from immature cotyledon explant cultures of bean (*P. coccineus* L.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 19(2): 167-174.
2. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, and Struhl K. 1994. Current Protocols in Molecular Biology. New York City, NY: John Wiley & Sons, Inc.
3. Bagheri Kh, Jalali Javaran M, Mahboudi F, Moeini A, and Zebarjadi A. 2008. Designing and construction of gamma interferon-oleosin fusion and transformation in *Brassica napus*. Modern Genetic Journal, 3(3): 49-57. (In Farsi).
4. Basalma D, Uranbey S, and Mirici S. 2010. TDZ × IBA induced shoot regeneration from cotyledonary leaves and *in vitro* multiplication in safflower (*Carthamus tinctorius* L.). African Journal of Biotechnology, 7(8): 960-966.
5. Bertani G. 1951. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology, 62:293-300.
6. Debergh P, Aitken-Christie J, Cohen D, Grout B, Arnold S, Zimmerman R, and Ziv M. 1992. Reconsideration of the term 'Vitrification' as used in micropropagation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 30(2): 135-140.
7. Dajue L, and Mündel HH. 1996. Safflower, *Carthamus tinctorius* L. International Plant Genetic Resources Institude, Rome, Italy.
8. Gaspar T. 1991. Vitrification in micropropagation. Biotechnology in Agriculture and Forestry, (17): 116-126.
9. Gamborg O, Miller RA, and Ojima K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Experimental Cell Research, 50(1): 151-158.
10. Horn M, Woodard S, and Howard J. 2004. Plant molecular farming: systems and products. Plant Cell Reports, 22(10): 711-720.
11. Huetteman CA, and Preece JE. 1993. Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 33(2): 105-119.
12. Kontsek P, and Kontsekova E. 1997. Forty years of interferon. Acta Virologica, Slovakia, 41: 349-354.
13. Ling H. 2007. Oleosin fusion expression systems for the production of recombinant proteins. Biologia, 62(2): 119-123.
14. Murashige T, and Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Plant Physiology, 15(3): 473-497.
15. Nikam T, and Shitole M. 1999. *In vitro* culture of Safflower L. cv. Bhima: initiation, growth optimization and organogenesis. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 55(1): 15-22.
16. Orlikowska TK, and Dyer WE. 1993. *In vitro* regeneration and multiplication of safflower (*Carthamus tinctorius* L.). Plant Science, 93(1-2): 151-157.
17. Orlikowska TK, Cranston HJ, and Dyer WE. 1995. Factors influencing *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation and regeneration of the safflower cultivar 'Centennial'. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 40(1): 85-91.

18. Paterson K, and Everett N. 1985. Regeneration of *Helianthus annuus* inbred plants from callus. Plant Science, 42(2): 125-132.
19. Richter TE, and Ronald PC. 2000. The evolution of disease resistance genes. Plant Molecular Biology, 42(1): 195-204.
20. Rohini V, and Sankara Rao K. 2000. Embryo transformation, a practical approach for realizing transgenic plants of safflower (*Carthamus tinctorius* L.). Annals of Botany, 86(5): 1043-1049.
21. Sankara Rao K, and Rohini V. 1999. Gene transfer into Indian cultivars of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) using *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Biotechnology, 16: 201-206.
22. Sareneva T, Mortz E, Tolo H, Roepstorff P. and Julkunen I. 1996. Biosynthesis and N-glycosylation of Human Interferon-gamma: Asn25 and Asn97 Differ Markedly in How Efficiently They are Glycosylated and in Their Oligosaccharide Composition. Federation of European Biochemical Societies Journal, 242(2): 191-200.
23. Singh V, and Nimbkar N. 2007. Safflower (*Carthamus tinctorius* L.). Genetic Resources, Chromosome Engineering, and Crop Improvement, 4: 167-194.
24. Stachel SE, Nester EW, Zambryski PC. 1986. A plant-cell factor induces *Agrobacterium tumefaciens vir* gene expression. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 83:379-383.
25. Van Rooijen GJH, and Moloney MM. 1995. Plant seed oil-bodies as carriers for foreign proteins. Biotechnology, 13(1): 72–77.
26. Yazdi-Samadi B, and Abd-Mishani S. 2007. Breeding field crops. Markaz Nashr Daneshgahi, 6th. Ed. Tehran, Iran. (In Farsi).
27. Ying M, Dyer WE, and Bergman JW. 1992. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) cv.'Centennial'. Plant Cell Reports, 11(11): 581-585.