

## فصل اول

### مقدمه

گیاهان عالی حاوی گستره‌ی وسیعی از مواد شیمیایی مفید برای مصارف دارویی، چاشنی‌های غذایی، مواد معطر، رنگ‌کننده و نرم‌کننده هستند. این مواد در واقع جزئی از متابولیت‌های ثانویه گیاهی بوده که از تنوع شیمیایی گسترده‌ای برخوردار و حتی ممکن است الگوی تولید آنها در گونه‌های متعلق به یک تیره گیاهی نیز فوق العاده متنوع باشد. این مواد در حقیقت حاصل فعالیت چرخه‌های بیوستتزی فرعی بوده که از چرخه‌های بیوستتزی حیاتی (متابولیسم اولیه) مشتق می‌شوند و می‌توان آنها را پایانه‌های متابولیسم در سلول‌های گیاهی دانست.

بذرالبنج گیاه دارویی مهمی از خانواده سولاناسه می‌باشد، گیاهان این جنس حداقل دارای ۱۱ گونه بوده که *Hyoscyamus muticus* و *H. niger* از مهمترین آنها می‌باشند. بذرالبنج مصری با نام علمی *H. muticus* (۲۸=۲x=۲n) بومی مناطق نیمه بارانی مصر، سودان، عربستان، ایران، افغانستان و شمال هند است و در ایران در نواحی مرکزی، جنوبی و جنوب شرقی گزارش شده است (بیوندی<sup>۱</sup> و همکاران، ۲۰۰۲).

آتروپین، هیوسیامین و اسکوپولامین، متابولیت‌های ثانویه گیاهی از گروه آلکالوئیدهای تروپانی بوده که در بذرالبنج نیز تولید می‌شوند. این مواد آنتی‌کلینرژیک بوده و سیستم عصبی پاراسمپاتیک را متأثر نموده و شدیداً سمی‌اند. این مواد در پزشکی برای آرام نمودن علائم بیماری پارکینسون، گشاد کردن مردمک چشم،

<sup>1</sup> Biondi

افزایش ضربان قلب، کاهش ترشح عرق و اسید معده، آرام کننده تشنج عضلات صاف و سرفه‌های شدید بکار می‌روند. همچنین عصاره برگ‌های تر آن در تسکین درد و برگ‌های خشک آن به عنوان سیگار به منظور خواص ضد آسمی کاربرد دارد (اوکسمان کالدنتی<sup>۱</sup>، لاونیا<sup>۲</sup>، ۱۹۸۶).

این مواد در ریشه گیاه سنتز شده و سپس به قسمت‌های دیگر منتقل می‌گردند. سنتز شیمیایی و مصنوعی این ترکیبات پیچیده و میزان تولید آنها بطور طبیعی کم می‌باشد. بنابراین اصلاح کنندگان گیاهی سعی در استفاده از روشهای نوین بیوتکنولوژیک جهت افزایش میزان تولید آلکالوئیدها و همچنین کاهش هزینه‌های تولید این متابولیت‌ها دارند.

توسعه تکنیک‌های کشت درون شیشه‌ای مزیت‌های عمده‌ای را نسبت به کشت طبیعی جهت بدست آوردن مواد دارویی فراهم آورده است. به همین جهت امروزه محققان زیادی در سراسر دنیا در زمینه بیوتکنولوژی متابولیت‌های ثانویه در حال تحقیق و مطالعه می‌باشند. راه حل‌های مختلفی با استفاده از سیستم‌های /این ویترو برای بهبود تولید ترکیبات ثانویه گیاهی بکار گرفته شده است، اما متأسفانه تاکنون فقط تولید تعداد معدودی از متابولیت‌های ثانویه گیاهی به این روش، از نظر اقتصادی و تجاری مقرون به صرفه بوده است. تراریخته نمودن گیاه با استفاده از سیستم وکتور طبیعی آگروباکتریوم رایزوزنز<sup>۳</sup> راه حل جدیدی برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه می‌باشد، آگروباکتریوم رایزوزنز، باکتری خاکزی گرم منفی و مولد بیماری ریشه موین در گیاهان می‌باشد که با انتقال قسمتی از ژنوم خود بنام T-DNA به ژنوم گیاه باعث ایجاد بیماری ریشه موین در گیاه می‌شود. ریشه‌های موین از سرعت و ثبات رشدی قابل ملاحظه‌ای برخوردار می‌باشند. این ریشه‌ها کاربردهای مختلفی داشته که یکی از مهمترین آنها استفاده در تولید پایدار این ویترو متابولیت‌های

---

<sup>1</sup>. Oksman-caldentey

<sup>2</sup>. Lavania

<sup>3</sup>. *Agrobacterium rhizogenes*

ثانویه گیاهی می‌باشد. تا به امروز تولید کشت‌های ریشه مویین در بیش از صد گونه گیاهی امیدهای زیادی را جهت تولید مواد فیتوشیمیایی و پروتئین‌های با اهمیت ایجاد کرده است. در این راستا القای ریشه مویین در جهت تولید آلکالوئیدهای تروپانی، در گونه‌های مختلف بذر البنج نیز انجام شده و در طول دهه اخیر پیشرفت‌های چشمگیری جهت تحریک تولید و تجمع متابولیت‌های ثانویه جهت اقتصادی‌تر کردن استفاده از ریشه‌های مویین صورت گرفته است.

در بسیاری از گونه‌های گیاهی مضاعف نمودن کروموزومی با تغییرات چشمگیر در تولید متابولیت‌های ثانویه به مانند متابولیت‌های اولیه همراه است. بعضی از این تغییرات شامل افزایش کلی در فعالیت آنزیمی، تنوع آیزوژیمی و تغییر در مواد شیمیایی و افزایش اندازه بخش‌های رویشی و زایشی گیاه می‌باشد. چنین پتانسیل اساسی را می‌توان جهت تجاری کردن تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی که به افزایش سطح پلوئیدی جواب مثبت می‌دهند به کاربرد.

تحقیقات مختلف صورت پذیرفته در حوزه کشت‌های ریشه مویین گیاهان مختلف، بالاخص تحقیقات اخیر انجام شده در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی مشهد (قدمی و همکاران ۱۳۸۶؛ ذوالعلی و همکاران ۲۰۰۷؛ فارسی و همکاران ۱۳۸۴ و مشتاقی، ۱۳۸۲) حاکی از پتانسیل بالای ریشه‌های مویین داتوره و بذربنجم در تولید آلکالوئیدهای تروپانی است. القاء ریشه مویین در بذربنجم سبب افزایش تولید بیوماس و تولید آلکالوئید به مقدار برابر با گیاه طبیعی گردیده است (ذوالعلی و همکاران، ۲۰۰۷). از طرفی القاء تتراپلوئیدی در گیاه بذربنجم مصری با افزایش تولید آلکالوئیدهای تروپانی و بیوماس گیاه همراه بوده است (لاوانیا، ۱۹۸۶). با این وجود تاکنون هیچ گزارشی در مورد تاثیر سطح پلوئیدی بر ریشه‌های مویین بذربنجم وجود ندارد. بنابراین به نظر می‌رسد با تلفیق دو راهبرد مذکور در گیاه بذربنجم مصری، یعنی اعمال تتراپلوئیدی به روی ریشه‌های مویین سریع‌الرشد آن، انتظار می‌رود که بتوان از مزایای هر دو راهبرد بهره‌مند گردید.

نظر به موارد یاد شده در این مقدمه مختصر، تحقیق حاضر با اهداف زیر انجام شد:

۱- تولید گیاهان تتراپلوئید پایدار و خالص بذرالبنج مصری.

۲- یافتن روشی سریع و کارا جهت جداسازی گیاهان با سطوح پلوئیدی مختلف.

۳- القاء ریشه موین در گیاهان دیپلوئید.

۴- تولید احتمالی ریشه‌های موین تتراپلوئید از ریشه‌های موین دیپلوئید یا گیاهان مادری تتراپلوئید.

۵- اندازه‌گیری و مقایسه مقدار بیوماس تولید شده در گیاهان و ریشه‌های موین دیپلوئید و تتراپلوئید تحت

محیط کشت و غلظت‌های مختلف ساکارز.

۶- اندازه‌گیری و مقایسه میزان آلکالوئید تروپانی اسکوپولامین در گیاهان و ریشه‌های موین بدست آمده

از آنها.

### بررسی منابع

#### ۱-۲ مروری بر متابولیت های ثانویه گیاهی

##### ۱-۱-۲ تاریخچه

قدمت شناخت خواص دارویی گیاهان به دوران قبل از تاریخ بر می گردد و دقیقا مشخص نیست که گیاهان از چه زمانی بعنوان دارو مورد استفاده بشر قرار گرفته اند. اطلاعات بدست آمده از متون تاریخی و سنگ نوشته ها حاکی از آن است که مصری ها و چینی ها در زمره اولین جمعیت های بشری بوده اند که فراتر از ۲۷ قرن قبل از میلاد مسیح، از گیاهان بعنوان دارو استفاده می نموده اند. مردم یونان باستان، خواص دارویی برخی از گیاهان را به خوبی می دانسته اند. بقراط و شاگرد وی ارسطو و دیگر حکیمان یونان باستان، اهمیت زیادی برای گیاهان در درمان بیماری ها قائل بوده اند و یکی از شاگردان ارسطو بنام تئوفراستوس، بنیانگذار مکتب گیاه درمانی بوده است.

در ایران استفاده از گیاهان دارویی از دوران هخامنشیان رایج بوده است. با ورود اسلام به ایران، جامعترین و کاملترین دستورات پزشکی و بهداشتی و در کنار آن دستورات طب النبوی، طب الصادق و طب باقر در اختیار مردم قرار گرفت. در قرون هشتم تا دهم میلادی، دانشمندان ایرانی نظیر ابوعلی سینا و محمد زکریای رازی، به دانش گیاه درمانی رونق زیادی بخشیدند. آنها گیاهان فراوانی را در این زمینه معرفی کردند و

کتاب‌های معروفی چون قانون و الحاوی را تالیف نمودند. در قرن سیزدهم، ابن بیطار مطالعات فراوانی را در مورد خواص دارویی گیاهان انجام داد و خصوصیات بیش از ۱۴۰۰ گیاه دارویی را در کتاب‌های خود بیان داشت. در قرون هفده و هیجده میلادی، اروپائیان به پیشرفت‌های بزرگی در زمینه گیاه درمانی و استفاده از گیاهان دارویی دست یافتند و از قرن نوزدهم، کوشش‌های همه‌جانبه‌ای جهت استخراج مواد موثره از گیاهان دارویی و تعیین معیارهای معینی برای تجویز و مصرف آنها شروع شد که این تحقیقات تا به امروز ادامه یافته و همچنان با سرعت هر چه بیشتر به پیش می‌رود.

## ۲-۱-۲ ویژگی متابولیت‌های ثانویه گیاهی

یکی از ویژگی‌های گیاهان ظرفیت سنتز گسترده‌ی وسیعی از ترکیبات با وزن مولکولی پایین می‌باشد که متابولیت‌های ثانویه نامیده می‌شوند. بسیاری از مؤلفان در داشتن تعریف مناسبی از متابولیت‌های ثانویه دچار مشکل می‌باشند (ورپورت<sup>۱</sup>، ۱۹۹۹). بنت و بنتلی تعریف زیر را درباره متابولیت‌های ثانویه بیان کرده‌اند:

متابولیت‌های عمومی: یک حد واسط متابولیکی یا فراورده‌ای که در اغلب سیستم‌های زنده یافت شده و برای رشد و حیات ارگانسیم ضروری بوده و توسط تعدادی مسیر بیوشیمیایی بیوسنتز می‌گردد.

متابولیت‌های ثانویه: یک حدواسط یا فراورده متابولیکی که به عنوان یک فراورده اختصاصی در گروه تاکسونومی خاصی یافت می‌شود، برای رشد و حیات ارگانسیم بوجود آورنده آن ضروری نبوده و از یک یا چندین متابولیت عمومی بیوسنتز می‌گردد (بنت و بنتلی<sup>۲</sup>، ۱۹۸۹).

متابولیت‌های ثانویه تنوع شیمیایی گسترده‌ای داشته بطوریکه هر ارگانسمی متابولیت‌های ثانویه مربوط به خود را دارا می‌باشد. بعضی از آنها ممکن است با متابولیت‌های ارگانسیم‌های دیگر مرتبط یا کاملاً غیر مرتبط باشند (ورپورت، ۱۹۹۹). هر چند که فقط ۲۰-۳۰ درصد گیاهان عالی از نظر متابولیت‌ها مورد بررسی قرار

<sup>1</sup> verpoorte

<sup>2</sup> Bennett and Bentley

گرفته‌اند با این وجود ده‌ها هزار متابولیت ثانویه از آنها جداسازی و شناسایی گردیده است. در دهه اخیر مشخص گردید که متابولیت های ثانویه فراورده‌های زاید یا به عبارتی مولکول‌های غیرعملکردی نمی‌باشند بلکه اکثر آنها نقش مهمی در گیاهان تولید کننده آنها ایفا می‌نمایند (ورپورت، ۱۹۹۹).

هنوز دانش ما در مورد وظیفه متابولیت‌های ثانویه محدود است، اما در حال حاضر بطور کلی مشخص شده است که این مواد در برهم‌کنش ارگانسیم با محیط دخالت دارند. برای مثال در مقاومت به آفات و بیماری‌ها، به عنوان جاذب موجودات گرده افشانی‌کننده و یا به‌عنوان یک ترکیب سیگنال (کروته و همکاران، ۲۰۰۰) و نهایتاً این‌که متابولیت های ثانویه برای بقاء گیاه تولید کننده آن اهمیت دارند. ورپورت (۱۹۹۹) تعریف بهتری برای متابولیت های ثانویه بیان داشته است: متابولیت های ثانویه ترکیباتی هستند با فراوانی کم در گروه های تاکسونومیک که برای حیات یک ارگانسیم (سلول) ضروری نبوده، اما در برهم‌کنش ارگانسیم (سلول) با محیط خود نقش داشته بنابراین قدرت بقاء ارگانسیم را افزایش می‌دهند. از این نظر که متابولیت های ثانویه برای بقاء ارگانسیم در اکوسیستم آن ضروری اند، بنابراین متابولیت های ثانویه به میزان زیادی با توانایی تکاملی و سازش پذیری گیاه، در محیط دائماً در حال تغییر مرتبط‌اند (فاجینی<sup>۲</sup>، ۱۹۹۹).

## ۲-۱-۳ انتقال، ذخیره و گردش مجدد متابولیت های ثانویه گیاهی

در گیاهان، بیوسنتز متابولیت های ثانویه بخش بندی شده است و تجمع، ذخیره و آزادشدن آنها اغلب منحصر به اندام ها یا بافت‌های کاملاً تخصصی می‌باشد (کروته و همکاران، ۲۰۰۰). ترکیبات محلول در آب عملاً در واکوئل ذخیره شده در حالی که مواد لیوفیلیک در مجراهای رزینی، شیرابه‌ها، کرک‌های ترش‌حی، خارها، غشاهای تیلاکوئیدی و یا کوتیکول باقی می‌مانند (ویرمن<sup>۳</sup>، ۱۹۸۱). اغلب مواد در سیتوپلاسم، شبکه

<sup>1</sup> Croteau

<sup>2</sup> Facchini

<sup>3</sup> Wiermann

آندوپلاسمی یا اندامک ها سنتز شده و در صورت آبدوست بودن به واکوئل حمل می گردند. این مواد مجبور به عبور از تونوپلاست بوده که به بسیاری از متابولیت های ثانویه قطبی غیر قابل نفوذ است. بنابراین برای تعدادی از آلکالوئیدها و فلاونوئیدها، یک ترانسپورتر مخصوص تعریف شده است که ترکیبات را به واکوئل پمپ می کند. (دیوس نیومن و ژنک<sup>۱</sup>، ۱۹۸۴). همچنین کانژوگه شدن متابولیت های ثانویه با گلو تاسیون، در سیتوپلاسم و انتقال آنها بواسطه حاملان وابسته به ATP به واکوئل برای تعدادی از متابولیت های کانژوگه شده پیشنهاد گردیده است. ترکیبات لیوفیلیک نه تنها قادر به برهم کنش با غشاهای زیستی میکرووب ها و علف خوارها بوده، بلکه با غشاهای زیستی گیاهان تولید کننده آنها نیز تداخل می یابند (وینک<sup>۲</sup>، ۱۹۹۷). بنابراین به منظور اجتناب از خود مسمومیتی توسط این ترکیبات، گیاهان قادر به ذخیره آنها در واکوئل نبوده و معمولاً آنها را در کوتیکول و سلولها یا مجاری رزینی مرده که توسط غشای زیستی احاطه نشده بلکه توسط یک سد غیر قابل نفوذ محاصره گردیده اند، ذخیره می کنند. برای مثال روغن های ضروری مونوترپنی در نعنای وحشی<sup>۳</sup> در طول تکامل برگ، درون کرک های ترشچی<sup>۴</sup> تجمع می یابد. (مک گراوی و کروت<sup>۵</sup>، ۱۹۹۵).

در بسیاری از موارد مکان بیوسنتز محدود به یک اندام مانند ریشه ها، برگ ها یا میوه ها بوده، اما پردازش و تجمع آنها در چندین بافت گیاهی دیگر انجام می شود. در این موارد آوندهای چوب و آبکش مسیر انتقالی برای جابجایی متابولیت های ثانویه می باشند. در حالی که برای مثال ریشه های گیاهان خانواده سیب زمینی (سولاناسه) تولید کننده ترکیبات پایه از قبیل نیکوتین و هیوسیامین بوده که این ترکیبات از طریق آوند چوبی به اندامهای هوایی منتقل می شوند و برگ ها نه تنها محل تجمع آنها بوده بلکه مکانی برای تبدیل آنها به محدوده

---

1. Deus-neuman and zenk

2. Wink

3. peppermint

4. Glandular trichome

5. Mc Garvey and Croteau



گسترده‌ای از ترکیبات دیگر می‌باشد (پال بیس<sup>۱</sup> و همکاران، ۲۰۰۱). در برگ گیاهان خانواده سولاناسه حضور ۵۰ تا ۱۰۰ آلکالوئید مختلف چندان غیر معمول نمی‌باشد و تمام این ترکیبات از یک ترکیب اصلی که در ریشه سنتز می‌گردد مشتق می‌شوند (بالدوین<sup>۲</sup>، ۱۹۹۸). بر عکس، آلکالوئیدهای آکوتینی و پیرو لیدیزینی نمونه‌هایی از ترکیبات آلی مهمی هستند که توسط آوند آبکش به مکان ذخیره ای خود انتقال می‌یابند. (وینک، ۱۹۹۸). همچنین ذخیره ممکن است مخصوص به بافت و سلول باشد. در تعدادی از گیاهان متابولیت‌های ثانویه در ایدیوپلاست‌ها و به میزان بیشتری در کرک‌های ترش‌حی (مانند ترپنوئیدها در آرتیمیزیان)، کرک‌های گزنده (مانند آمین‌ها در خانواده گزنه) یا در خود اپیدرم یافت شده‌اند (ویرمن، ۱۹۸۱). لازم به ذکر است که آلکالوئیدهای تروپانی و نیکوتینی در واکوئل سلول‌ها تجمع می‌یابند (وینک، ۱۹۹۸).

معمولاً در گیاهان یک ساله گل‌ها، میوه‌ها و بذور بطور اخص غنی از متابولیت‌های ثانویه‌اند. در گونه‌های چند ساله مقدار زیادی از متابولیت‌ها در پیاز، ریشه و پوست ریشه و ساقه یافت می‌گردند. چندین متابولیت ثانویه دیگر فراورده‌های نهایی متابولیسمی نبوده و با سرعت منظمی گردش مجدد می‌یابند. در طول جوانه زنی مخصوصاً متابولیت‌های نیتروژن دار مانند آلکالوئیدها، آمینواسیدهای غیر پروتئینی، گلیکوزیدهای سیانوژنیک و بازدارنده‌های پروتئازی متابولیزه شده و به عنوان منبع جهت رشد استفاده می‌گردند (وینک، ۱۹۹۱). همچنین غلظت برخی از متابولیت‌های ثانویه مانند آلکالوئیدهای کونولیزیدین، نیکوتین، آتروپین، مونوترپن‌ها و فنیل پروپانوئیدها به طور روزمره تغییر کرده که این خود حاکی از یک برهم کنش فعال بین سنتز و بازچرخش آنها است (وینک، ۱۹۹۷).

---

<sup>1</sup>. PalBais  
<sup>2</sup>. Baldwin

## ۲-۱-۴ عملکرد متابولیت های ثانویه

هر چند که متابولیت‌های ثانویه برای هزاران سال توسط انسان به عنوان رنگ‌ها (مانند ایندیگو<sup>۱</sup> و شیکونین<sup>۲</sup>)، طعم دهنده‌ها (مانند وانیلین<sup>۳</sup> و کاپسایسین<sup>۴</sup>)، عطرها (رز و روغن اسطوخودوس)، محرک‌ها (مانند کافئین<sup>۵</sup> و نیکوتین<sup>۶</sup>)، هالوسینوژن‌ها (مانند مورفین<sup>۷</sup> و کوکائین<sup>۸</sup>)، حشره کش‌ها (مانند نیکوتین و پیرین<sup>۹</sup>)، سموم (مانند کونین<sup>۱۰</sup> و استریکنین<sup>۱۱</sup>) و حتی به عنوان مواد دارویی (مانند آتروپین<sup>۱۲</sup>، کونین<sup>۱۳</sup> و کدئین<sup>۱۴</sup>) به کار رفته اند، اما عملکرد آنها در گیاه هنوز یک موضوع قابل بحث است. این فرضیه که متابولیت‌های ثانویه به عنوان فراورده‌های زائد گیاهی بوده و هیچ وظیفه ای ندارند به خاطر مشاهدات ذیل دچار شکست شده است:

۱- فراوره های زاید جزء اختصاصی و ضروری حیوانات هتروتروف بوده که قادر به تجزیه کامل مواد غذایی خود برای تولید انرژی نمی‌باشند. این ارگانسیم‌ها فراورده‌های زاید غنی از ازت را برای مثال در قالب اوره دفع می‌کنند. اما گیاهان اتوتروف بوده و بنابراین نیازمند مکانیسم‌های تدفیی پیچیده نمی‌باشند. به علاوه نیتروژن یک ماده غذایی ضروری برای گیاهان است. نتیجه این که تولید مواد تدفیی حاوی ازت، از قبیل آلکالوئیدها که اغلب در بافت‌های جوان و فعال و نه پیر از نظر متابولیکی یافت شده ، که طبق فرضیه مذکور منطقی به نظر نمی‌رسد (وینک، ۱۹۹۹).

1. Indigo
2. Shikonin
3. Vanillin
4. Capsaicin
5. Caffeine
6. Nicotine
7. Morphine
8. Cocaine
9. Piperine
10. Conine
11. Striknin
12. Atropine
13. Quinine
14. Codeine

۲- متابولیت‌های ثانویه اغلب فراورده نهایی متابولیسمی (ویژگی که برای فراورده‌های زاید قابل انتظار است) نبوده و بسیاری از آنها توسط گیاه قابل متابولیزه شدن می‌باشند (وینک، ۱۹۹۹). برای مثال اسید آمینه‌های غیر پروتئینی و گلیکوزیدهای سیانوژنیک اغلب به میزان زیادی در بذرخانواده بقولات ذخیره می‌گردند و در طول جوانه زنی، این ترکیبات تجزیه شده که نشان دهنده استفاده مجدد از نیتروژن آنها توسط بذور در حال جوانه زنی است (بل<sup>۱</sup>، ۱۹۸۰).

۳- متابولیت‌های ثانویه اغلب ترکیبات خیلی پیچیده‌ای بوده که به شیوه مخصوص بافتی و نمودی تنظیم می‌گردند که این ویژگی برای یک فراورده زائد بدون هیچ عملکردی شگفت انگیز است (وینک ب، ۱۹۹۹). از طرفی این مطلب که متابولیت‌های ثانویه به عنوان ترکیبات دفاعی علیه علف خوارها نقش دارند، برای سال‌ها مورد بحث قرار گرفته است. این فرضیه در دهه اخیر بیان گردیده و دلایل آزمایشگاهی زیادی آن را حمایت می‌کنند (هارتمن<sup>۲</sup>، ۱۹۹۶) چندین متابولیت ثانویه علیه ویروس‌ها، باکتری‌ها، قارچ‌ها، گیاهان رقابتی و مخصوصاً علیه گیاه خواران تکامل یافته اند (وینک ب، ۱۹۹۹). برای مثال گوجه فرنگی توسط آزاد سازی متابولیت‌های فرار مختلفی که از تجزیه کاروتنوئیدها ایجاد می‌شوند، در برابر حشرات علفخوار دفاع می‌کند (کولبی<sup>۳</sup> و همکاران، ۱۹۹۸). به همین طریق در مخروطیان حمله حشرات توسط تولید مستمر و القاپذیر اولئورزین<sup>۴</sup> که یک ترکیب مونوسزکوئی و دی ترپنوئیدی تجمع یابنده در محل جراحت جهت کشتن حشرات مهاجم و التیام زخم است، خنثی می‌گردد (تراپ و کروتو<sup>۵</sup>، ۲۰۰۱).

متابولیت‌های ثانویه گیاهی علاوه بر وظیفه تدافعی، در برهمکنش‌های گیاه- محیط نقش زیستی حساسی دارند. این مواد می‌توانند به عنوان ترکیبات سیگنال جهت جلب حیوانات یا حشرات برای گرده افشانی

1. Bell

2. Hartmann

3. Colby

4. Oleoresin

5. Trapp and Croteau

(مانند مونوترپن های معطر، آنتوسیانین های رنگی یا کارتنوئیدها) و پراکنش بذر به گیاهان کمک کنند (کراک<sup>۱</sup> و همکاران، ۱۹۹۷). همچنین بعضی از متابولیت های ثانویه همراه با سایر ترکیبات قادر به انجام وظایف فیزیولوژیکی خاص می باشند، برای مثال آنها می توانند به عنوان ترکیبات انتقال دهنده و ذخیره کننده ازت سمی یا به عنوان محافظت کننده در برابر اشعه ماوراءبنفش به گیاه کمک کنند. به علاوه بعضی از ترپن های بزرگتر، مانند استرول ها و کارتنوئیدها، ترکیبات غشایی مهمی بوده و برای انتقال الکترون و فتوسنتز ضروری می باشند. همچنین بعضی از متابولیت های ثانویه به عنوان پیش سازهای متابولیک هورمون های گیاهی مهمی مانند اسید آبسزیک، براسینو استروئیدها و اسید جیبرلیک مورد استفاده قرار می گیرند (فاجینی، ۱۹۹۹؛ کروت، ۲۰۰۰).

## ۲-۲ طبقه بندی متابولیت های ثانویه گیاهی

گیاهان طیف وسیعی از متابولیت های ثانویه را تولید کرده که اغلب بر اساس خصوصیات شیمیایی، منشأ گیاهی یا بیوسنتزی آنها طبقه بندی می گردند. متابولیت های ثانویه شامل سه گروه اصلی ترپنوئیدها، آلکالوئیدها و ترکیبات فنولی می باشند (وینک، ۱۹۹۹).

### ۱-۲-۲ ترپنوئیدها

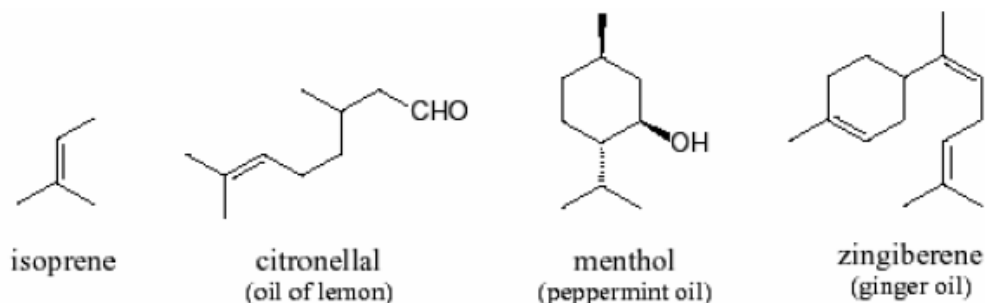
این دسته بدون شک بزرگترین دسته متابولیت های ثانویه گیاهی بوده که بیش از ۲۷۰۰۰ مورد از آنها گزارش گردیده است. ترپنوئیدها نه تنها از نظر گستردگی، بلکه از لحاظ ساختاری نیز به میزان زیادی متنوع اند و در آنها صدها اسکلت کربن متفاوت و گروههای عاملی زیادی دیده می شود. بر خلاف چنین تنوعی، تمام ترپنوئیدها توسط یک روش معمول سنتز یعنی الحاق واحدهای C<sub>۵</sub> با یک ساختار ایزوپنتونوئیدی به وجود می آیند. (بانترف و چارلود<sup>۲</sup>، ۱۹۸۰).

<sup>۱</sup>. Crock

<sup>۲</sup>. Banthorpe and Charlwood

طبقه‌بندی ترپنوئیدها بر اساس تعداد واحد ایزوپرنوئید موجود در ساختارشان صورت می‌پذیرد. بزرگترین دسته آنهایی هستند که از ترکیبات با دو واحد ایزوپرنوئیدی (مونوترپن‌ها)، سه واحد ایزوپرنوئیدی (سزکوئی‌ترین‌ها)، چهار واحد ایزوپرنوئیدی (دی‌ترین‌ها)، شش واحد ایزوپرنوئیدی (تری‌ترین‌ها) و هشت واحد ایزوپرنوئیدی (تترترین‌ها) تشکیل شده‌اند.

مونوترپن‌ها در تمام گیاهان عالی موجود بوده و بسیاری از آنها توسط خصوصیات از قبیل مزه یا بو مانند سیترونلال در لیمو و منتول در نعناع بسادگی قابل تشخیص می‌باشند. از مثالهای دیگر ترین‌ها در گیاهان می‌توان سزکوئی‌ترین‌ها مانند زنجبیرین و آرتیمیزینین، دی‌ترین‌های هورمون مانند از قبیل اسید جیبرلیک و استرول‌ها مانند لانوسترول تترترینی را نام برد (گرشزن و کرئیس<sup>۱</sup>، ۱۹۹۹). در شکل ۱-۲ تعدادی از ترپنوئیدهای دارای اهمیت تجاری نشان داده شده‌اند.

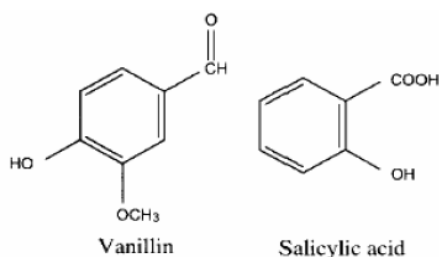


شکل ۱-۲: نمونه‌هایی از ترپنوئیدها با اهمیت تجاری و نقش پایه‌ای مشخص (بانترف و چارلود، ۱۹۸۰)

<sup>۱</sup>. Gershenzon and Kreis

## ۲-۲-۲ فنول‌های گیاهی

ترکیبات فنولی در برگ‌برنده محدوده گسترده‌ای از موادی هستند که دارای حلقه آروماتیکی حامل یک استخلاف هیدروکسیلی بوده (شکل ۲-۲) و در حالی که تعداد چشمگیری از چنین ترکیباتی در جانوران موجودند، اغلب آنها دارای منشأ گیاهی اند (بریلمن<sup>۱</sup>، ۱۹۹۹). در حقیقت در بین فنول‌های گیاهی، که تاکنون چندین هزار مورد از آن‌ها گزارش شده است، فلاونوئیدها بزرگترین گروه را تشکیل داده‌اند. به هر حال کینون‌های فنولی، لیگنان‌ها، گزانتان‌ها، کومارین‌ها و سایر گروه‌ها به تعداد قابل ملاحظه‌ای همانند فنول‌های تک حلقه‌ای موجود می‌باشند (کروته، ۲۰۰۰). عملاً تمامی پلی‌فنل‌های گیاهی توسط فنیل‌آلانین، آنزیم شیکیمات و از طریق مسیر شیکیمیک اسید تولید می‌گردند و تولید آنها توسط فنیل‌آلانین آمونیوم لیاز<sup>۲</sup> و اسید سینامیک وساطت می‌شود. آنزیم PAL، آنزیم کلیدی سنتز فنول‌هاست که فنولاسیون فنیل‌آلانین را کاتالیز می‌کند. از این نظر که فنول‌ها تنوع ساختمانی گسترده‌ای دارند نقش فیزیولوژیکی واحدی برای انجام ترکیبات وجود نداشته، اما غالباً بعنوان مواد بازدارنده رشد عمل می‌کنند (راماوات و مریلون<sup>۳</sup>، ۱۹۹۹).



شکل ۲-۲: تعدادی از فراورده‌های فنولی طبیعی گیاهی (بریلمن، ۱۹۹۹)

1. Briemann  
2. Phenylalanine Ammonium Lyase (PAL)  
3. Ramavat and Merillon

## ۲-۲-۳ آلکالوئیدها

### ۲-۳-۱ تاریخچه آلکالوئیدها

اولین بار، واژه آلکالوئید به معنی شبه قلیا را، یک داروشناس آلمانی بنام W. Meibner به کار برد. بعدها مشخص گردید که خاصیت قلیائی بدلیل حضور یک اتم نیتروژن پایه می‌باشد. ارائه یک تعریف دقیق برای آلکالوئید آسان نیست. اوایل، آلکالوئیدها را بعنوان "ترکیبات گیاهی طبیعی حاوی یک اتم نیتروژن پایه در یک حلقه هتروسیکلیک" تعریف می‌نمودند. اما با کشف آلکالوئیدهای بیشتر، خصوصیات بیشتری به این تعریف اضافه گردید. از این قرار که (۱) ساختمان مولکولی پیچیده‌ای دارند، (۲) از فعالیت‌های دارویی بارزی برخوردارند و (۳) به سلسله گیاهان محدود می‌گردند. بعداً آلکالوئیدها را بعنوان فرآورده‌های گیاهی با پایه ازت، غالباً از نظر اپتیکی فعال و برخوردار از هتروسیکل‌های نیتروژن بعنوان واحد ساختمانی با یک فعالیت فیزیولوژیکی شناخته شده تعریف نمودند.

پلتیر در سال ۱۹۸۲، این تعریف را برای آلکالوئیدها بکار برد: "یک آلکالوئید، یک ترکیب آلی حلقوی حاوی نیتروژن در حالت اکسیداسیون منفی است که از توزیع محدود در موجودات زنده برخوردار است". بعضی اوقات، ترسیم خط جداکننده‌ای بین آلکالوئیدهای واقعی و بازهای گیاهی امکانپذیر نیست. بازهای ساده‌ای همچون متیل آمین، تری متیل آمین، و دیگر آلکیل آمین‌های زنجیره صاف، بعنوان آلکالوئید در نظر گرفته نمی‌شوند. ترکیبات دیگری نظیر بتائین‌ها، کولین و موسکارین نیز توسط برخی متخصصان از آلکالوئیدها جدا می‌شوند. این ترکیبات از اسیدهای آمینه سنتز می‌شوند و در گروه آمین‌های بیولوژیکی یا پروتوآلکالوئیدها گروهبندی می‌شوند، زیرا که نیتروژن آنها در یک حلقه هتروسیکلیک قرار نگرفته است. حتی ویتامین B1 (تیامین) با وجود آنکه دارای یک حلقه ازت دار هتروسیکلیک است و نقش شناخته شده‌ای نیز دارد، در بین آلکالوئیدها جای نمی‌گیرد. به طور کلی، آلکالوئید به معنی شبه قلیا است و خاصیت قلیائی یکی از

ویژگیهای مهم این گروه از ترکیبات در نظر گرفته می‌شود، اما برخی از ترکیبات خنثی نظیر کلشی سین که از گل حسرت<sup>۱</sup> استخراج می‌شود و نیتروژن آن در یک گروه آمیدی قرار دارد، بعنوان یک آلکالوئید محسوب می‌گردد. زیرا که از ویژگی‌های دیگر همچون خصوصیات دارویی مهم و توزیع محدود در گیاهان برخوردار است. پپیرین از فلفل سیاه<sup>۲</sup>، بتائین‌ها نظیر استاکیدرین و تریگونلین از دیگر ترکیبات خنثی هستند که در گروه آلکالوئیدها قرار می‌گیرند (راموات و مریلون<sup>۳</sup>، ۱۹۹۹).

حدود ۵۰۰۰ نوع آلکالوئید در ۱۵ درصد از گیاهان متعلق به ۱۵۰ خانواده گیاهی شناخته شده است. تیره‌های گیاهی مهم تولید کننده آلکالوئید عبارتند از: Apocynaceae، Solanaceae، Rutaceae، Ranunculaceae، Papilionaceae، Papaveraceae، Rubiaceae. آلکالوئیدها در گیاهان معمولاً بصورت نمک‌های اسیدهای آلی نظیر اسیدهای استیک، اگزالیک، سیتریک، مالیک، لاکتیک، تارتاریک، تانیک و غیره وجود دارند. بعضی از آلکالوئیدهای پایه‌ای ضعیف (مانند نیکوتین) بصورت آزاد در طبیعت وجود دارند. تعداد اندکی از آلکالوئیدها نیز بصورت گلیکوزید با قندهایی همچون گلوکز، رامنوز و گالاکتوز حضور می‌یابند که آلکالوئیدهای گروه سولانین مانند پپیرین بصورت آمیدها و آتروپین و کوکائین بصورت استرهای اسیدهای آلی، از این گروهند (راموات و مریلون، ۱۹۹۹).

آلکالوئیدهای گیاهی ممکن است بصورت سیستمیک در سراسر گیاه حضور داشته باشند و یا در مقادیر زیاد در اندامهای خاص مانند ریشه، پوست ساقه یا بذر تجمع یابند. در نهان‌دانگان، آلکالوئیدها در دولپه‌ای‌ها بسیار متداول تر از تک‌لپه‌ای‌ها می‌باشند. اگر چه که آلکالوئیدها را بعنوان محصولات گیاهی در نظر می‌گیرند

---

<sup>1</sup>. *Colchicum autumnale*

<sup>2</sup>. *Piper nigrum*

<sup>3</sup>. Ramvat and Merilon



اما ترکیبات مشابهی در جانوران و گیاهان پست نیز گزارش شده است. آلکالوئیدها از پروانه‌ها، جلبک‌ها، جلبک‌های سبز - آبی، قارچ‌ها و باکتری‌ها نیز جداسازی گردیده‌اند (لی و لیگود<sup>۱</sup>، ۱۹۹۹).

## ۲-۲-۳-۲ آلکالوئیدهای تروپانی

آلکالوئیدهای هیوسیامین<sup>۲</sup>، آتروپین<sup>۳</sup> و اسکوپولامین<sup>۴</sup> یا هیوسین<sup>۵</sup>، اساساً در گیاهان تیره سولاناسه یافت می‌شوند و از نظر داروشناسی بعنوان ترکیبات آنتی‌کلینژیک گروه بندی می‌گردند. بیش از ۳۰ آلکالوئید در داتوره وجود دارد. *Datura stramonium* و *D. innoxia* به ترتیب منبع اصلی هیوسیامین و اسکوپولامین می‌باشند. دیگر گونه‌های گیاهی که حاوی آلکالوئیدهای تروپانی هستند عبارتند از گونه‌های جنس *Hyoscyamus*، هیبریدهای *D. leichhardtii*، *D. myoproides* و *Atropa belladonna* آتروپین در سال ۱۸۳۱ توسط مین از *A. belladonna* استخراج گردید. کوکائین از کاکائو<sup>۶</sup>، اولین داروی بیهوشی موضعی بود که کشف گردید (نیمن<sup>۷</sup>، ۱۸۵۹).

## ۲-۲-۳-۳ عملکرد آلکالوئیدها در گیاهان

فعالیت‌های بیولوژیکی آلکالوئیدها در گیاهان بوضوح شناخته شده نیست، اما واضح است که آنها برای یک فعالیت منفرد در گیاهان تولید نمی‌شوند. فعالیت‌های زیر برای آلکالوئیدها در گیاهان مختلف مشاهده شده است (لی و لیگود، ۱۹۹۹، راموات و مریلون، ۱۹۹۹).

۱- مواد ذخیره‌ای تامین کننده نیتروژن، اما در این مورد شواهد اندکی وجود دارد.

۲- مواد سمی که گیاهان را در مقابل حشرات و حیوانات حفظ می‌نمایند.

---

1. Lea and Leegood  
2. Hyoscyamine  
3. Atropine  
4. Scopolamine  
5. Hyoscine  
6. *Erythroxylon coca*  
7. Nieman

۳- محرک ها یا تنظیم کننده های گیاهی، بعنوان مثال آلکالوئیدها رشد جوانه را در چاودار و یولاف محدود می نمایند و کلشی سین نیز از تقسیم سلولی ممانعت می نماید.

۴- منابعی برای ساخت پروتئین

۵- مواد دفعی گیاهان

۶- بازدارندگی فعالیت های آنزیمی نیز توسط آلکالوئیدها شناخته شده است.

## ۲-۲-۳-۴ خواص دارویی آلکالوئیدهای تروپانی

آتروپین، هیوسیامین و اسکوپولامین (هیوسین)، مواد آنتی کلینرژیکی هستند که سیستم عصبی پاراسمپاتیک را تحت تاثیر قرار داده و گستره وسیعی از فعالیت های دارویی را بروز می دهند. این آلکالوئیدها از قدیمی ترین داروها هستند. علاوه بر استفاده دارویی، دارای خصوصیات تخدیری و سمی نیز می باشند. این مواد در پزشکی برای آرام نمودن علائم بیماری پارکینسون، گشاد کردن مردمک چشم و افزایش ضربان قلب، خنثی کردن سستی ماهیچه های صاف ناشی از ترکیبات فسفره آلی، و کاهش ترشح عرق و اسید معده مورد استفاده قرار می گیرند. تاثیر اسکوپولامین بر سیستم اعصاب مرکزی از هیوسیامین قویتر است و اثرات جانبی نامطلوب کمتری بر جای می گذارد. این ماده برای معالجه بیماری های حرکتی و تولید مشتقات دارویی برای اختلالات معده مورد استفاده قرار می گیرد (سوون<sup>۱</sup> و همکاران، ۲۰۰۱).

آتروپین سبب فلج کامل اعصاب محیطی پاراسمپاتیک می گردد و اثر آن بصورت گشاد کننده مردمک چشم، ضد ترشح بزاق و خشک کننده ترشحات، ضد تشنج و باعث انبساط عروق خونی سطحی و قرمز شدن پوست می گردد. مقدار کم آتروپین موجب تحریک تنفس و قلب می شود. مصرف موضعی آن سبب بی حسی یا فلج ناقص اعصاب حسی می گردد. آتروپین ابتدا سبب تحریک و سپس ایجاد فلج در بعضی از مراکز مغزی و

<sup>۱</sup>. Sevon

نخاعی می‌شود. هیوسیامین قادر است انقباضاتی را که در اثر بکار بردن گلوکزیدهای ملین در روده‌ها ایجاد می‌شود، بدون کم کردن اثر مسهلی آنها برطرف نماید. اثر اسکویولامین مشابه هیوسیامین است، ولی روی مراکز عصبی موثرتر می‌باشد (سوون و همکاران، ۲۰۰۱).

## ۲-۲-۳-۵ بیوسنتز آلکالوئیدهای تروپانی

به علت اهمیت اقتصادی آلکالوئیدهای تروپانی مطالعات گسترده‌ای برای کشف مسیرهای بیوسنتزی آنها از سال ۱۹۵۰ توسط ادوارد لئی<sup>۱</sup> با استفاده از ردیاب‌های ایزوتوپی صورت گرفته است (سوون و همکاران، ۲۰۰۱). کشتهای ریشه موئن بدست آمده از تلقیح *A. rhizogenes* برای توضیح مسیرهای بیوسنتزی آلکالوئیدهای تروپانی بوسیله آزمایشهای تغذیه ایزوتوپ، بطور گسترده‌ای مورد استفاده قرار گرفته‌اند. اما علی‌رغم تحقیقات گسترده، مسیر بیوسنتزی آلکالوئیدهای تروپانی بطور کامل تشریح نگردیده است. مخصوصاً آنزیم‌های دخیل در بیوسنتز آنها چندان شناخته شده نیستند. آلکالوئیدهای تروپانی، دارای یک حلقه پیرولیدین و یک حلقه پیریدین می‌باشند که اتم نیتروژن و دو اتم کربن را به اشتراک می‌گذارند (لئی، ۱۹۹۰).

با تزریق اسید آمینه اورنیتین رادیواکتیو به گیاه ملاحظه کرده‌اند که این اسید آمینه بدون اینکه وضعیت فضایی اتمهای آن تغییر کند، تشکیل حلقه پیرولیدین مولکول تروپان را می‌دهد. سه اتم کربن باقیمانده از استات مشتق می‌شود و بدین وسیله مولکول پیریدین تشکیل می‌گردد. عمل متیلاسیون بوسیله انتقال عامل متیل از مولکول مناسبی مانند متیونین انجام می‌شود و سبب تکمیل مولکول تروپین می‌گردد. فنیل آلانین نیز پیش‌ساز اسید تروپیک می‌باشد. آزمایش با استفاده از کربن رادیواکتیو نشان داده است که زنجیر کناری اسید آمینه فنیل آلانین طی این تبدیل، تغییر وضعیت مولکولی نیز می‌دهد. استریفیکاسیون اسید تروپیک به آتروپین تولید

<sup>۱</sup> Edvard leete

هیوسیامین می‌کند. اسکوپولامین توسط یک سیستم آنزیمی اختصاصی (h6h) تولید می‌گردد که واکنش‌های آن در شکل ۲-۳ نشان داده شده‌اند.

## ۲-۳ اهمیت دارویی و تجاری متابولیت‌های ثانویه گیاهی

بشر برای هزاران سال فراورده‌های طبیعی را به عنوان منبع تمام داروها مورد استفاده قرار داده است و در این میان گیاهان عالی بیشترین سهم را در تولید اغلب این مواد دارویی داشته‌اند. با تولید داروهای سنتتیک در طول قرن اخیر استفاده از گیاهان دارویی کاهش یافت؛ اما با مشخص شدن اثرات جانبی این داروها و عدم وجود این اثرات در گیاهان دارویی مجدداً توجه به آنها زیاد گردید. امروزه فراورده‌های طبیعی و مشتقات و آنالوگ‌های آنها، هنوز بیش از ۵۰ درصد کل داروهای مورد استفاده کلینیکی را تشکیل می‌دهند که سهم فراورده‌های طبیعی گرفته شده از گیاهان عالی ۲۵ درصد کل می‌باشد (ژن<sup>۱</sup>، ۱۹۹۸).

طبق برآورد سازمان بهداشت جهانی<sup>۲</sup> (۲۰۰۲) ۸۰ درصد مردم در کشورهای در حال توسعه جهت مراقبت‌های بهداشتی اولیه خود به طب سنتی تکیه دارند و حدود ۸۵ درصد از داروهای سنتی مستلزم استفاده از عصاره‌های گیاهی است. این بدین معنی است که حدود ۴-۳/۵ میلیارد نفر از مردم جهان از گیاهان به عنوان دارو استفاده می‌کنند (دی اسمیت<sup>۳</sup>، ۱۹۹۷). در ایالات متحده داروهای با منشأ گیاهی حدود ۲۵ درصد داروهای تجویزی را شامل می‌شوند که در دهه اخیر ارزش آن معادل حدود ۱۵/۵ میلیارد دلار می‌باشد. از ۱۹۸۳ تا ۱۹۹۴، ۳۹ درصد داروهای تولیدی دارای منشأ طبیعی بوده‌اند که شامل فراورده‌های اصیل طبیعی، فراورده‌های نیمه سنتزی گرفته شده از فراورده‌های طبیعی و داروهای سنتزی بر اساس مدل‌های فراورده‌های طبیعی می‌باشند.

<sup>1</sup>. GEN

<sup>2</sup>. World Health Organization

<sup>3</sup> De smet