بسم الله الرحمن الرحیم

بسمه تعالی

تاییدیه اعضای هیات داوران حاضر در جلسه دفاع از رساله دکتری

خانم نرگس خانپور دانشجوی مقطع دکتری رشته **علوم گیاهی** به شماره دانشجویی **۸۷۵۶۵۲۰۰۳** رساله واحدی خود را با عنوان "**بررسی اثرفنیل آلانین ومتیل جاسمونات بر میزان اکتئوزید، فعالیت آنزیم وبیان ژن فنیل آلانین آمونیا لیاز (PAL) در کشت سلول Scrophularia striata** در تاریخ **۱۳۹۲/۱۲/۱۸** روز یکشنبه ساعت **۱۲:۳۰** در اتاق **شماره ۵۰۰۹** دانشکده علوم زیستی ارائه کردند.

اعضای هیات داوران نسخه نهایی این رساله را از نظر فرم و محتوا تایید کرده است و پذیرشِ آنرا برای تکمیل درجه دکتری پیشنهاد می‌کنند.

اعضای هیأت داوران	نام و نام خانوادگی	رتبهٔ علمی	امضاء
۱ - استاد راهنما	آقای دکتر مظفر شریفی	دانشیا ر	
۲- استاد مشاور	آقای دکتر مهردادبهمنش	دانشیا ر	
۳- استاد ناظر داخلی	خانم دکترفائزه قناتی	دانشیا ر	
۴- استاد ناظر داخلی	آقای دکتر حسن زارع مایوان	دانشیا ر	
۵ -استادناظرخارجی	آقای دکتروحید نیکنام	استا د	
۶- استادناظر خارجی	آقای دکتر محمدرضا نقوی	استا د	
۷- نماینده تحصیلات تکمیلی	آقای دکتر حسن زارع مایوان	دانشیا ر	

آیین‌نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهش‌های علمی دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه: با عنایت به سیاست‌های پژوهشی و فناوری دانشگاه در راستای تحقق عدالت و کرامت انسان‌ها که لازمه شکوفایی علمی و فنی است و رعایت حقوق مادی و معنوی دانشگاه و پژوهشگران، لازم است اعضای هیأت علمی، دانشجویان، دانش‌آموختگان و دیگر همکاران طرح، در مورد نتایج پژوهش‌های علمی که تحت عناوین پایان‌نامه، رساله و طرح‌های تحقیقاتی با هماهنگی دانشگاه انجام شده است، موارد زیر را رعایت نمایند:

ماده ۱- حق نشر و تکثیر پایان نامه/ رساله و درآمدهای حاصل از آنها متعلق به دانشگاه می باشد ولی حقوق معنوی پدید آورندگان محفوظ خواهد بود.

ماده ۲- انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان‌نامه/ رساله به صورت چاپ در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی باید به نام دانشگاه بوده و با تایید استاد راهنمای اصلی، یکی از اساتید راهنما، مشاور و یا دانشجو مسئول مکاتبات مقاله باشد. ولی مسئولیت علمی مقاله مستخرج از پایان نامه و رساله به عهده اساتید راهنما و دانشجو می‌باشد.

تبصره: در مقالاتی که پس از دانش‌آموختگی بصورت ترکیبی از اطلاعات جدید و نتایج حاصل از پایان‌نامه/ رساله نیز منتشر می‌شود نیز باید نام دانشگاه درج شود.

ماده ۳- انتشار کتاب، نرم افزار و یا آثار ویژه (اثری هنری مانند فیلم، عکس، نقاشی و نمایشنامه) حاصل از نتایج پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرح‌های تحقیقاتی کلیه واحدهای دانشگاه اعم از دانشکده‌ها، مراکز تحقیقاتی، پژوهشکده‌ها، پارک علم و فناوری و دیگر واحدها باید با مجوز کتبی صادره از معاونت پژوهشی دانشگاه و براساس آئین نامه های مصوب انجام شود.

ماده ۴- ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه یافته‌ها در جشنواره‌های ملی، منطقه‌ای و بین‌المللی که حاصل نتایج مستخرج از پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرح‌های تحقیقاتی دانشگاه باید با هماهنگی استاد راهنما یا مجری طرح از طریق معاونت پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

ماده ۵- این آیین‌نامه در ۵ ماده و یک تبصره در تاریخ ۸۷/۴/۱ در شورای پژوهشی و در تاریخ ۸۷/۴/۲۳ در هیأت رئیسه دانشگاه به تایید رسید و در جلسه مورخ ۸۷/۷/۱۵ شورای دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب در شورای دانشگاه لازم‌الاجرا است.

«اینجانب نرگس خانپور اردستانی دانشجوی رشته فیزیولوژی گیاهی ورودی سال تحصیلی ۱۳۸۸-۱۳۸۷ مقطع دکتری دانشکده علوم زیستی متعهد می‌شوم کلیه نکات مندرج در آئین نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهش‌های علمی دانشگاه تربیت مدرس را در انتشار یافته های علمی مستخرج از رساله تحصیلی خود رعایت نمایم. در صورت تخلف از مفاد آئین نامه فوق الاشعار به دانشگاه وکالت و نمایندگی می‌دهم که از طرف اینجانب نسبت به لغو امتیاز اختراع بنام بنده و یا هر گونه امتیاز دیگر و تغییر آن به نام دانشگاه اقدام نماید. ضمناً نسبت به جبران فوری ضرر و زیان حاصله بر اساس برآورد دانشگاه اقدام خواهم نمود و بدینوسیله حق هر گونه اعتراض را از خود سلب نمودم»

امضا: نرگس خانپور اردستانی

تاریخ: ۱۳۹۳/۱۰/۱۸

آیین نامه چاپ پایان‌نامه (رساله)های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان نامه (رساله)های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس، مبین بخشی از فعالیتهای علمی - پژوهشی دانشگاه است بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می‌شوند:

ماده ۱: در صورت اقدام به چاپ پایان نامه (رساله)ی خود، مراتب را قبلاً به طور کتبی به «دفتر نشر آثار علمی» دانشگاه اطلاع دهد.

ماده ۲: در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه) عبارت ذیل را چاپ کند:

«کتاب حاضر، حاصل رساله دکتری نگارنده در رشته **فیزیولوژی گیاهی** است که در سال **۱۳۹۲** در دانشکده **علوم زیستی** دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی جناب آقای دکتر **مظفر شریفی** و مشاوره جناب آقای دکتر **مهرداد بهمنش** از آن دفاع شده است.»

ماده ۳: به منظور جبران بخشی از هزینه‌های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت چاپ) را به «دفتر نشر آثار علمی» دانشگاه اهدا کند. دانشگاه می‌تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر درمعرض فروش قرار دهد.

ماده ۴: در صورت عدم رعایت ماده ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرس، تأدیه کند.

ماده ۵: دانشجو تعهد و قبول می‌کند در صورت خودداری از پرداخت بهای خسارت، دانشگاه می‌تواند خسارت مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند؛ به علاوه به دانشگاه حق می‌دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در ماده ۴ را از محل توقیف کتاب‌های عرضه شده نگارنده برای فروش، تامین نماید.

ماده ۶: اینجانب **نرگس خانپور اردستانی** دانشجوی رشته **فیزیولوژی گیاهی** مقطع **دکتری** تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می‌شوم.

نام و نام خانوادگی: **نرگس خانپور اردستانی**

تاریخ و امضا: **۱۳۹۳/۱۰/۱۸**

دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم زیستی

رساله دکتری

زیست شناسی- فیزیولوژی گیاهی

عنوان:

بررسی اثر فنیل‌آلانین و متیل‌جاسمونات بر میزان اکتئوزید، فعالیت آنزیم و بیان ژن فنیل‌آلانین آمونیا لیاز (PAL) درکشت سلول *Scrophularia striata*

نگارش:

نرگس خانپور اردستانی

استاد راهنما:

دکتر مظفر شریفی

استاد مشاور:

دکتر مهرداد بهمنش

اسفند ۱۳۹۲

تقدیم به:

مادرم به زلالی چشمه

و

پدرم به استواری کوه

به پاس سالهای صبوریشان .....

تشکر و قدردانی

نام بعضی نفرات روشنم می دارد

قوتم می بخشد

راه می اندازد

نام بعضی نفرات.....

سپاس و ستایش از آن خداوندی است که بنده کوچکش را در دریای بیکران اندیشه، قطره ای ساخت تا وسعت آن را از دریچه اندیشه های ناب آموزگارانی بزرگ به تماشا نشیند. ای هستی بخش، وجود مرا بر نعمات بی کرانت توان شکر نیست...

مراتب قدردانی خالصانه خویش را از زحمات استاد ارجمند و گرانمایه ام جناب آقای **دکتر شریفی** که در مراحل انجام این پروژه بار راهنمایی های ارزنده ایشان را یاری نمودند، ابراز می دارم.

از استاد مشاور ارجمندم جناب آقای **دکتر بهمنش** که در طول این تحقیق، بار، نمودها و تشویق های خود مرا مورد لطف خویش قرار دادند صمیمانه سپاسگزارم.

هم چنین تشکر و سپاس خود را به این عزیزان تقدیم می نمایم:

خواهرم و برادر عزیزتر از جانم

اعضاء محترم هیأت داوران جناب آقای دکتر نیکنام، دکتر نقوی و دکتر زارع مایوان و هم چنین سرکار خانم دکتر قنائی که زحمت باز خوانی و داوری این رساله را به عهده داشتند.

اساتید گرانقدر گروه علوم گیاهی جناب آقای دکتر کاظم پور او صالو و سرکار خانم دکتر زرین کمر، برای کمک های ارزشمندشان

سرکار خانم خرمی شاد، مسئول آزمایشگاه علوم گیاهی برای زحمات بیدریغ شان

دوستانم به واسطه تمام هدلی هایشان

دانشجویان گروه علوم گیاهی دانشگاه تربیت مدرس

و

آقای **محمد بحرانی** که بدون یاری ایشان طی این مسیر رویایی بیش نبود.

از خدا می خواهم که توان سپاسگزاری از **پدر و مادر عزیزم** و نعمت نیکی کردن به این دو بزرگوار را به من عطا کند که در تمام طول زندگی، پشتوانه ام مهربانی ها، حمایت ها و راهنمایی های ایشان بود.

چکیده

گل میمونی سازویی، *Scrophularia striata* Boiss. از گیاهان دارویی بومی ایران است که حاوی فنیل‌اتانوئید گلیکوزید اکتئوزید می‌باشد. فنیل‌اتانوئید گلیکوزیدها دسته بزرگی از متابولیت‌های ثانوی با طیف گسترده‌ای از فعالیت-های زیستی مانند آنتی‌اکسیدان، ضد التهاب، ضد درد و ضد تومور هستند. به دلیل پراکنش محدود این گیاه در دنیا، جوانه‌زنی اندک بذرهای آن، خطر انقراض به واسطه برداشت بی‌رویه و پیچیده و گران بودن ساخت شیمیایی اکتئوزید، کشت بافت یک روش جایگزین مناسب برای کاهش مشکلات تولید این ماده است. هم‌چنین دست‌ورزی محیط‌های کشت سلولی با محرک‌ها یکی از راهکارهای مهم جهت القای متابولیسم ثانوی و تولید متابولیت‌های ارزشمند می‌باشد. در این پژوهش، ابتدا محیط کشت بهینه جهت القای کالوس انتخاب و کشت سلول راه‌اندازی شد. سپس به بررسی اثر فنیل‌آلانین و متیل‌جاسمونات بر تولید اکتئوزید، فعالیت آنزیم و بیان ژن فنیل‌آلانین آمونیا لیاز (PAL) پرداخته شد. علاوه بر این، مسیرهای فرعی انشعاب یافته از فنیل‌پروپانوئیدها نیز مطالعه گردید. کالوس با منشا ساقه، در محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA همراه با ۲ میلی‌گرم بر لیتر BA به عنوان محیط بهینه برای کشت سلولی تعلیقی انتخاب شد. اثر سه غلظت فنیل‌آلانین بر رشد، زنده مانی و میزان اکتئوزید سلولی مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد که غلظت ۱ میلی‌مولار فنیل‌آلانین بر رشد و زنده مانی اثر منفی ندارد و در عین حال سبب بیش‌ترین افزایش در میزان اکتئوزید می‌شود (۱۳/۲۶ میکروگرم بر گرم وزن تر). اگرچه در این مطالعه، در فعالیت و بیان ژن آنزیم PAL در سلول‌های تحت تیمار نسبت به نمونه‌های شاهد تغییر معنی‌داری مشاهده نگردید. به منظور بررسی تاثیر متیل‌جاسمونات، سلول‌ها با سه غلظت متیل‌جاسمونات در روز هفتم تیمار و پس از ۲۴ ساعت برداشت شدند. نتایج نشان داد غلظت ۰/۱ میلی‌مولار متیل‌جاسمونات بدون تاثیر منفی بر رشد و زنده مانی سلول‌ها، بیش‌ترین تاثیر را بر تولید اکتئوزید دارد. بالاترین مقدار تولید اکتئوزید در سلول‌های تیمار شده با غلظت ۰/۱ میلی‌مولار متیل-جاسمونات ۴۸ ساعت پس از تیمار مشاهده شد (۳۴/۶۳ میکروگرم بر گرم وزن تر). نتایج نشان داد این غلظت متیل-جاسمونات با تغییر در بیان ژن و فعالیت آنزیم PAL باعث افزایش میزان اکتئوزید شده است. در حضور متیل-جاسمونات افزایش اکتئوزید، ترکیبات فنولی و توان آنتی‌اکسیدانی با کاهش شاخص‌های تنش اکسیداتیو هماهنگ می‌باشد. لذا احتمال داده می‌شود که متیل‌جاسمونات اثر قابل توجهی بر بیوسنتز این ترکیبات داشته و با القای پارامترهای مختلف پاسخ‌های دفاعی نظیر مسیر بیوسنتزی فنیل‌پروپانوئیدی و فنیل‌اتانوئید گلیکوزیدی باعث افزایش ساخت این ترکیبات در سلول‌ها شده است و افزایش فعالیت و میزان بیان ژن PAL می‌تواند موید این فرض باشد.

واژه‌های کلیدی: اکتئوزید، بیان ژن، فنیل‌آلانین، کشت سلولی، متیل‌جاسمونات، *Scrophularia striata*

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول (مقدمه) ۱
۱-۱کلیات ۲
۱-۲ جنس *Scrophularia* ۳
۱-۲-۱ گل میمونی سازوئی، گل میمونی شیاردار .*Scrophularia striata* Boiss ۳
۱-۲-۲ اهمیت دارویی گیاه *Scrophularia striata* ۴
۱-۳ فنیل‌اتانوئید گلیکوزیدها ۵
۱-۴ اکتئوزید ۱۰
۱-۴-۱ پراکنش اکتئوزید ۱۱
۱-۴-۲ بیوسنتز اکتئوزید ۱۳
۱-۵ کشت بافت ۱۵
۱-۶ استفاده از محرک‌های مختلف در کشت‌های در شیشه ۱۶
۱-۶-۱ افزودن پیش‌ماده ۱۷
۱-۶-۲ نقش الیسیتورهای زیستی و غیر زیستی در افزایش تولید متابولیت‌های ثانوی ۱۷
۱-۶-۲-۱ متیل جاسمونات ۱۹
۱-۷ سابقه تحقیق ۲۰
۱-۸ اهداف تحقیق ۲۲
فصل دوم (مواد و روش‌ها) ۲۴
۲-۱ جمع‌آوری و کشت بذرها ۲۵
۲-۲ تهیه محیط کشت و کشت بافت ۲۵
۲-۲-۱ اثر غلظت‌های مختلف NAA و BA بر القای کالوس و تولید اکتئوزید در کشت جامد ۲۶
۲-۳ کشت سلولی تعلیقی ۲۷
۲-۳-۱ بررسی منحنی رشد در کشت سلولی تعلیقی ۲۷
۲-۳-۲ اندازه گیری رشد و درصد زنده مانی سلول‌ها ۲۸
۲-۴ استخراج اکتئوزید ۲۸
۲-۵ بهینه سازی روش تشخیص و استخراج اکتئوزید به وسیله HPLC ۲۹
۲-۵-۱ بهینه سازی روش HPLC ۲۹
۲-۵-۱-۱ رسم منحنی کالیبراسیون ۲۹
۲-۵-۱-۲ اعتبار سنجی روش ۳۰
۲-۵-۱-۲-۱ بررسی محدوده خطی بودن ۳۰
۲-۵-۱-۲-۲ تعیین حد تشخیص (LOD) و حد تعیین مقدار (LOQ) ۳۰
۲-۵-۱-۲-۳ انتخابی بودن روش ۳۰
۲-۵-۱-۲-۴ بررسی دقت روش ۳۰
۲-۵-۱-۲-۵ بررسی صحت روش ۳۱

۲-۵-۲ بهینه سازی استخراج اکتئوزید ۳۱
۲-۶ انتخاب تیمارها و اعمال آن‌ها در محیط کشت تعلیقی سلولی ۳۲
۲-۷ آنالیزهای بیوشیمیایی ۳۳
۲-۷-۱ استخراج و اندازه‌گیری مقدار پروتئین‌های محلول جهت بررسی فعالیت آنزیم PAL ۳۳
۲-۷-۱-۱ محلول‌های مورد نیاز ۳۳
۲-۷-۱-۲ استخراج پروتئین‌های محلول و سنجش آن ۳۳
۲-۷-۱-۳ تهیه استانداردهای پروتئینی با استفاده از سرم آلبومین گاوی (BSA) ۳۴
۲-۷-۱-۴ بررسی فعالیت آنزیم PAL ۳۴
۲-۷-۲ تعیین فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز ۳۵
۲-۷-۳ تعیین فعالیت آنزیم کاتالاز و پراکسیداز ۳۶
۲-۷-۳-۱ روش استخراج پروتئین ۳۶
۲-۷-۳-۲ تعیین فعالیت آنزیم کاتالاز ۳۶
۲-۷-۳-۳ تعیین فعالیت آنزیم پراکسیداز ۳۶
۲-۷-۴ تعیین مقدار پراکسید هیدروژن (H_2O_2) ۳۶
۲-۷-۵ تعیین میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشا ۳۷
۲-۷-۶ سنجش و اندازه‌گیری فنول کل، فلاونوئید و فلاونول ۳۷
۲-۷-۷ استخراج کربوهیدرات‌های محلول ۴۰
۲-۷-۷-۱ تعیین مقدار کربوهیدرات‌های محلول با استفاده از اسپکتروفتومتری ۴۱
۲-۷-۷-۲ رسم نمودار استاندارد ۴۱
۲-۸ بررسی‌های مولکولی ۴۲
۲-۸-۱ محلول‌ها و بافرها ۴۲
۲-۸-۱-۱ آب دیونیزه تیمار شده با DEPC ۴۲
۲-۸-۱-۲ بافر الکتروفورز TBE (۵X) ۴۲
۲-۸-۱-۳ بافر سنگین کننده (Stock Solution) ۴۳
۲-۸-۱-۴ محلول اتیدیوم برماید (۱۰ mg/mL) ۴۳
۲-۸-۲ استخراج RNA کل ازسلول‌های جداکشت *S. striata* ۴۳
۲-۸-۳ الکتروفورز ژل آگارز ۴۴
۲-۸-۴ واکنش رونویسی معکوس و سنتز cDNA از mRNA ۴۵
۲-۹ طراحی آغازگرها ۴۵
۲-۹-۱ آماده سازی آغازگرها ۴۶
۲-۹-۲ طراحی واکنش PCR ۴۶
۲-۱۰ تجزیه و تحلیل آماری ۴۷
فصل سوم (نتایج) ۴۸
۳-۱ بررسی اثر تیمارهای هورمونی در کشت قطعات جداکشت ۴۹
۳-۱-۱ اثر غلظت‌های مختلف هورمونی بر تشکیل کالوس قطعات جداکشت ۴۹
۳-۱-۲ اثر غلظت‌های مختلف هورمونی بر شاخص‌های رشد کالوس ۴۹
۳-۱-۳ اثر غلظت‌های مختلف هورمونی بر تولید اکتئوزید در قطعات جداکشت ۵۰
۳-۲ کشت سلولی تعلیقی ۵۳

۳-۲-۱ اندازه گیری رشد سلولی و تعیین منحنی رشد سلول ۵۳
۳-۲-۲ درصد زنده مانی و شکل سلول‌ها در کشت سلولی تعلیقی ۵۴
۳-۲-۳ اندازه‌گیری میزان اکتئوزید سلول‌ها ۵۵
۳-۳ بهینه سازی روش تشخیص و استخراج اکتئوزید به وسیله HPLC ۵۶
۳-۳-۱ بهینه سازی روش HPLC ۵۶
۳-۳-۱-۱ رسم منحنی کالیبراسیون ۵۸
۳-۳-۱-۲ اعتبار سنجی روش HPLC ۵۸
۳-۳-۱-۲-۱ محدوده خطی بودن ۵۸
۳-۳-۱-۲-۲ حد تشخیص و حد تعیین مقدار ۵۸
۳-۳-۱-۲-۳ انتخابی بودن ۵۸
۳-۳-۱-۲-۴ دقت ۵۹
۳-۳-۱-۲-۵ صحت ..... ۶۱.
۳-۳-۲ تعیین روش بهینه استخراج اکتئوزید ..... ۶۱.
۳-۴ بررسی تاثیر غلظت‌های مختلف فنیل‌آلانین در کشت تعلیقی *S. striata* ۶۴
۳-۴-۱ اثر غلظت‌های مختلف فنیل‌آلانین بر رشد، زنده مانی و میزان اکتئوزید سلولی ۶۴
۳-۴-۲ تاثیر غلظت منتخب فنیل‌آلانین بر رشد سلول ۶۵
۳-۴-۳ تاثیر غلظت منتخب فنیل‌آلانین بر میزان اکتئوزید ۶۶
۳-۴-۴ تاثیر غلظت منتخب فنیل‌آلانین بر فنول کل، فلاونوئید و فلاونول ۶۷
۳-۴-۵ تاثیر غلظت منتخب فنیل‌آلانین بر محتوای کربوهیدارت‌های محلول ۶۹
۳-۴-۶ تاثیر غلظت منتخب فنیل‌آلانین بر فعالیت PAL ۶۹
۳-۵ بررسی تاثیر غلظت‌های مختلف متیل‌جاسمونات در کشت تعلیقی *S. striata* ۷۱
۳-۵-۱ اثر غلظت‌های مختلف متیل‌جاسمونات بر رشد، زنده مانی و میزان اکتئوزید سلولی ۷۱
۳-۵-۲ تاثیر غلظت منتخب متیل‌جاسمونات بر رشد سلول ۷۲
۳-۵-۳ تاثیر غلظت منتخب متیل‌جاسمونات بر میزان اکتئوزید ..... ۷۳.
۳-۵-۴ تاثیر غلظت منتخب متیل‌جاسمونات بر فنول کل، فلاونوئید و فلاونول ..... ۷۴.
۳-۵-۵ تاثیر غلظت منتخب متیل‌جاسمونات بر محتوای کربوهیدارت‌های محلول ..... ۷۶.
۳-۵-۶ تاثیر غلظت منتخب متیل‌جاسمونات بر فعالیت PAL ۷۶
۳-۵-۷ تاثیر متیل‌جاسمونات بر فعالیت دستگاه آنتی‌اکسیدان ۷۷
۳-۵-۷-۱ تاثیر غلظت منتخب متیل‌جاسمونات بر فعالیت سوپراکسید دیسموتاز ۷۷
۳-۵-۷-۲ تاثیر غلظت منتخب متیل‌جاسمونات بر فعالیت پراکسیداز ۷۸
۳-۵-۷-۳ تاثیر غلظت منتخب متیل‌جاسمونات بر فعالیت کاتالاز ۷۹
۳-۵-۸ تاثیر غلظت منتخب متیل‌جاسمونات بر مقدار پراکسید هیدروژن ۸۰
۳-۵-۹ تاثیر غلظت منتخب متیل‌جاسمونات بر پراکسیداسیون لیپیدهای غشا ۸۰
۳-۶ نتایج حاصل از بررسی‌های مولکولی ۸۲
۳-۶-۱ بررسی کیفیت RNA استخراج شده و سنتز cDNA ۸۲
۳-۶-۲ تعیین دمای مناسب Annealing برای ژن PAL ۸۳
۳-۶-۳ تعیین توالی نوکلئوتیدی (Partial cDNA) اکتین و فنیل‌آلانین آمونیا لیاز (PAL) ۸۳
۳-۶-۴ تاثیر غلظت منتخب فنیل‌آلانین بر بیان ژن آنزیم PAL ۸۷

۳-۶-۵ تاثیر غلظت منتخب متیل‌جاسمونات بر بیان ژن PAL ۸۸
فصل چهارم (بحث، نتیجه‌گیری و پیشنهادات) ۸۹
۴-۱ بهینه سازی روش تشخیص و استخراج اکتئوزید، اولین گام جهت شناسایی اکتئوزید در کشت سلولی ۹۰
۴-۲ کشت سلولی و بررسی انباشت اکتئوزید ۹۱
۴-۲-۱ بهینه سازی محیط کشت ۹۲
۴-۲-۲ کشت سلولی تعلیقی راهکاری جهت بهبود تولید اکتئوزید ۹۵
۴-۳ فنیل‌آلانین پیش ماده‌ای مناسب برای افزایش تولید اکتئوزید در کشت سلولی *S. striata* ۹۶
۴-۴ متیل‌جاسمونات موثر بر تقویت مسیر بیوسنتزی اکتئوزید ۱۰۲
نتیجه‌گیری ۱۱۳
پیشنهادات ۱۱۴
منابع ۱۱۵

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول ۱-۱ پراکنش اکتئوزید در گونه‌های گیاهی ۱۲
جدول ۲-۱ مواد مورد نیاز برای تهیه محیط MS ۲۶
جدول ۲-۲ مواد بافر TBE (۵X)..... ۴۳
جدول ۲-۳ مواد بافر سنگین کننده..... ۴۳
جدول ۲-۴ مواد مورد نیاز برای ساخت cDNA..... ۴۵
جدول ۲-۵ توالی آغازگرهای مورد استفاده در Semi quantitative RT-PCR..... ۴۶
جدول ۲-۶ آماده سازی نمونه‌ها برای واکنش PCR..... ۴۶
جدول ۲-۷ برنامه گرادیان PCR برای ژن *ACT*..... ۴۷
جدول ۲-۸ برنامه گرادیان PCR برای ژن *PAL*..... ۴۷
جدول ۳-۱ تاثیر هورمون‌های NAA و BA بر تشکیل، شاخص‌های رشد، وزن تر و وضعیت کالوس در قطعات جداکشت ساقه ۵۱
جدول ۳-۲ تاثیر هورمون‌های NAA و BA بر تشکیل، شاخص‌های رشد، وزن تر و وضعیت کالوس در قطعات جداکشت برگ..... ۵۲
جدول ۳-۳ درصد زنده مانی سلول‌ها در دوره کشت سلولی تعلیقی *S. striata*..... ۵۵
جدول ۳-۴ مشخصات برنامه سرعت جریان و شیب غلظت فاز متحرک مورد استفاده در HPLC..... ۵۷
جدول ۳-۵ سطح زیر منحنی غلظت‌های مختلف اکتئوزید استاندارد..... ۶۰
جدول ۳-۶ دقت روش HPLC جهت شناسایی اکتئوزید..... ۶۰
جدول ۳-۷ صحت روش HPLC جهت شناسایی اکتئوزید..... ۶۱

فهرست اشکال

عنوان **صفحه**

شکل ۱-۱ گیاه *Scrophularia striata* ۴
شکل ۱-۲ پیش ماده‌های ساختاری متابولیت‌های ثانوی از متابولیت اولیه حاصل می‌شوند ۶
شکل ۱-۳ مسیرهای اصلی بیوسنتز متابولیت‌های ثانوی و ارتباط آن‌ها با متابولیسم اولیه ۷
شکل ۱-۴ مسیر بیوسنتزی شیکیمات - کوریسمات منجر به تشکیل آمینو اسیدهای آروماتیک از جمله L- فنیل‌آلانین می‌شود ۸
شکل ۱-۵ ساختار عمومی فنیل‌اتانوئید گلیکوزیدها ۹
شکل ۱-۶ ساختار اکتئوزید ۱۰
شکل ۱-۷ مسیر بیوسنتزی اکتئوزید ۱۴
شکل ۲-۱ منحنی استانداردپروتئین ۳۴
شکل ۲-۲ منحنی استاندارد فنول کل ۳۸
شکل ۲-۳ منحنی استاندارد فلاونوئید ۳۹
شکل ۲-۴ منحنی استاندارد فلاونول ۴۰
شکل ۲-۵ منحنی استاندارد کربوهیدرات ۴۲
شکل ۳-۱ القای کالوس و کشت تعلیقی *S. striata* ۵۳
شکل ۳-۲ منحنی رشد سلولی و میزان اکتئوزید در کشت تعلیقی *S. striata* ۵۴
شکل ۳-۳ سلول‌های کشت تعلیقی *S. striata* ۵۵
شکل ۳-۴ غربال‌گری جذب اکتئوزید استاندارد در طول موج ۲۴۰ تا ۴۰۰ نانومتر ۵۶
شکل ۳-۵ کروماتوگرام اکتئوزید استاندارد با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر ۵۷
شکل۳-۶ منحنی کالیبراسیون اکتئوزید ۵۸
شکل ۳-۷ کروماتوگرام عمومی الف) یک نمونه ب) نمونه Spike شده ۵۹
شکل ۳-۸ تاثیر غلظت‌های مختلف اتانول و متانول روی استخراج اکتئوزید در کشت تعلیقی *S. striata* ۶۲
شکل ۳-۹ تاثیر زمان‌های مختلف استخراج بر محتوای اکتئوزید در کشت تعلیقی *S. striata* ۶۲
شکل ۳-۱۰ تاثیر زمان‌های مختلف سونیکاسیون بر استخراج اکتئوزید در کشت تعلیقی *S. striata* ۶۳
شکل ۳-۱۱ اثر غلظت‌های مختلف فنیل‌آلانین بر رشد، زنده مانی و میزان اکتئوزید سلولی در کشت تعلیقی *S. striata* ۶۵
شکل ۳-۱۲ تغییرات رشد سلولی در طول زمان تحت تاثیر غلظت ۱ میلی‌مولار فنیل‌آلانین در کشت تعلیقی *S. striata* ۶۶
شکل ۳-۱۳ تغییرات اکتئوزید در طول زمان تحت تاثیر غلظت ۱ میلی‌مولار فنیل‌آلانین در کشت تعلیقی *S. striata* ۶۷
شکل ۳-۱۴ تاثیر فنیل‌آلانین ۱ میلی‌مولار بر فنول کل، فلاونوئید و فلاونول در کشت تعلیقی *S. striata* ۶۸
شکل ۳-۱۵ تغییرات کربوهیدرات محلول در طول زمان تحت تاثیر غلظت ۱ میلی‌مولار فنیل‌آلانین در کشت تعلیقی *S. striata* ۶۹
شکل ۳-۱۶ فعالیت آنزیم PAL در طول زمان تحت تاثیر غلظت ۱ میلی‌مولار فنیل‌آلانین در کشت تعلیقی *S .striata* ۷۰

شکل ۳-۱۷ اثر غلظت‌های مختلف متیل‌جاسمونات بر رشد، زنده مانی و میزان اکتئوزید سلولی در کشت تعلیقی *S. striata*..... ۷۲
شکل ۳-۱۸ تاثیر متیل‌جاسمونات ۰/۱ میلی‌مولار بر رشد سلولی در کشت تعلیقی *S. striata*..... ۷۳
شکل ۳-۱۹ تاثیر متیل‌جاسمونات ۰/۱ میلی‌مولار بر میزان اکتئوزید در کشت تعلیقی *S. striata*. ۷۴
شکل ۳-۲۰ تاثیر متیل‌جاسمونات ۰/۱ میلی‌مولار بر فنول کل، فلاونوئید و فلاونول در کشت تعلیقی *S. striata*..... ۷۵
شکل ۳-۲۱ تاثیر متیل‌جاسمونات ۰/۱ میلی‌مولار بر محتوای کربوهیدرات محلول در کشت تعلیقی *S. striata*..... ۷۶
شکل ۳-۲۲ تاثیر متیل‌جاسمونات ۰/۱ میلی‌مولار بر فعالیت آنزیم PAL در کشت تعلیقی *S. striata*..... ۷۷
شکل ۳-۲۳ تاثیر متیل‌جاسمونات ۰/۱ میلی‌مولار بر فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در کشت تعلیقی ۷۸
شکل ۳-۲۴ تاثیر متیل‌جاسمونات ۰/۱ میلی‌مولار بر فعالیت آنزیم پراکسیداز در کشت تعلیقی *S. striata*.... ۷۹
شکل ۳-۲۵ تاثیر متیل‌جاسمونات ۰/۱ میلی‌مولار بر فعالیت آنزیم کاتالاز در کشت تعلیقی *S. striata*..... ۷۹
شکل ۳-۲۶ تاثیر متیل‌جاسمونات ۰/۱ میلی‌مولار بر میزان پراکسید هیدروژن در کشت تعلیقی *S. striata*. ۸۰
شکل ۳-۲۷ تاثیر متیل‌جاسمونات۰/۱ میلی‌مولار بر پراکسیداسیون لیپید (مقدار MDA) در کشت تعلیقی*S. striata* ۸۱
شکل ۳-۲۸ الف) طرح الکتروفورز بررسی کیفیت RNA کل، استخراج شده از سلول‌های *S. striata*. ب) تعیین کیفیت cDNA با استفاده از PCR با آغازگرهای اکتین..... ۸۲
شکل ۳-۲۹ الکتروفورز شیب دمایی محصولات RT-PCR مربوط به ژن *PAL* روی ژل آگارز ۱٪..... ۸۳
شکل ۳-۳۰ همردیفی ژن اکتین در *S. striata*..... ۸۵
شکل ۳-۳۱ همردیفی ژن *PAL* در*S. striata*..... ۸۶
شکل ۳-۳۲ تغییرات بیان ژن *PAL* در در طول زمان تحت تاثیر غلظت ۱ میلی‌مولار فنیل‌آلانین در کشت تعلیقی *S. striata* ۸۷
شکل ۳-۳۳ تغییرات بیان ژن *PAL* در در طول زمان تحت تاثیر غلظت ۰/۱ میلی‌مولار متیل‌جاسمونات در کشت تعلیقی *S. striata*..... ۸۸

فصل اول

مقدمه

۱-۱ کلیات

استفاده از گیاهان دارویی به منظور درمان با تاریخ زندگی انسان هم زمان است (Sesterhenn et al., 2007). در طول هزاران سال در امپراطوری‌های ایران باستان، بین‌النهرین، مصر، چین، یونان و روم از فرآورده‌های طبیعی در طب سنتی به عنوان منبع درمانی استفاده می-کردند. امروزه نیز بیش از ۵۰٪ داروها متشکل از یک یا چندین فرآورده طبیعی است که از ۲۵۰۰۰ گونه گیاهی منشا گرفته‌اند (Cragg and Newman, 2005). گرایش روزافزون به استفاده از گیاهان دارویی و داروهای گیاهی در جهان توجهی ویژه به این گیاهان را برانگیخته است. این گیاهان منحصر بفردترین منبع داروهای تامین سلامت برای بیش‌تر جمعیت جهان هستند. ترکیبات فعال زیستی که در حال حاضر از گیاهان استخراج می‌شود به عنوان افزودنی‌های مواد غذایی، رنگدانه‌ها، رنگ‌ها، حشره‌کش‌ها، لوازم آرایشی و عطر به کار می‌روند (Balandrin and Klocke, 1988). ترکیبات فعال زیستی در گیاهان متعلق به گروه شناخته شده‌ای با وزن مولکولی پایین موسوم به متابولیت‌های ثانوی هستند. این مولکول‌ها نقش اصلی در سازگاری و تقابل گیاه با محیط ایفا می-کنند، علاوه بر آن منبع مهمی از مواد دارویی به حساب می‌آیند (Ravishankar and Rao, 2002). تولید این ترکیبات در گیاهان پایین بوده (کمتر از ۱٪ وزن خشک) و به شرایط فیزیولوژیکی و

مرحله نمـوی گیاه وابسـته است (Oksman-caldenty and Inze, 2004). در کنار روند رو به تزاید استفاده از گیاهان، کمبود اطلاعات دارویی و درمانی در گروه بزرگی از فرآورده‌های طب گیاهی، یک مشکل بزرگ می‌باشد (Fong, 2002).

گیاه *Scrophularia striata* یک گیاه بومی ایران است که در مناطق سردسیر و کوهستانی زاگرس رشد می‌کند و از قدیم‌الایام به عنوان یک گیاه دارویی کاربرد داشته است. برخلاف تاثیرات دارویـی شناخته شده این گیاه، در مورد ترکیبات موثره موجود در آن اطلاعات بسیار کمی در دسـت مـی-باشد. این تحقیق با هدف شناسایی ترکیبات طبیعی آن و بررسی امکان افزایش تولید این ترکیبات در کشت‌های در شیشه طراحی شد.

۱-۲ جنس *Scrophularia*

جنس *Scrophularia* L. شامل حدود ۳۰۰ گونه، یکی از مهم‌ترین جنس‌های متعلق به تیره Scrophulariaceae است. این جنس دارای گیاهانی پایا یا دوساله و به ندرت یک‌ساله و علفی و یا بوته‌هایی در پایه سخت و کمی چوبی هستند (قهرمان، ۱۳۷۳). جنس *Scrophularia* در ایران شامل ۶۰ گونه و زیرگونه چند ساله، دوساله و یک‌ساله بوده که ۲۸ گونه آن انحصاری ایران است. بسیاری از گونه‌های *Scrophularia* از گذشته در کشورهای آسیایی به عنوان دارو برای درمان اگزما، زخم، گواتر، زخم معده، سرطان، فیستول، گال، تومور، پسوریازیس و تاثیرات التهابی به کار می‌رفته است (Heather and Henderson, 1994; Azadmehr et al., 2009).

۱-۲-۱ گل میمونی سازوئی، گل میمونی شیاردار *Scrophularia striata* Boiss.

گیاه *Scrophularia striata* Boiss. پایا به ارتفاع ۳۰ تا ۹۰ سانتی‌متر و ایستاده. ساقه‌ها متعدد، بدون کرک، منشعب، زاویه‌دار، با شیارهای ظریف طولی در سطح، دارای شاخه‌های کم و بیش برگ‌دار و ایستاده گسترده، منتهی به خوشه گرزنی پرگل و در قاعده برگ‌دار. برگ‌ها متناوب، پایینی‌ها؛ سرنیزه‌ای، بطور نامحسوس دمبرگ‌دار، با دندانه‌های بزرگ اره‌ای گاه مضاعف و سینوسی، میانی‌ها؛ بطور نامنظم و عمیقا چند بخشی، با تقسیمات گسترده، منحصرا مثلثی- سرنیزه‌ای،

کشیده و ممتد، قطعه انتهایی سه بخشی، در بالای ساقه بدون دمبرگ و باریک شده در قاعده. گل-ها کوچک، تقریبا بدون پایه، ارغوانی مایل به بنفش، مجتمع در خوشه گرزن‌های برگک‌دار و پرگل، شامل گرزن‌های متناوب و منحصرا دمگل‌دار (شکل ۱-۱) (قهرمان، ۱۳۶۵).

شکل ۱-۱ گیاه *Scrophularia striata* الف) گیاه کامل ب) گل‌آذین ج) بذر

۱-۲-۲ اهمیت دارویی گیاه *Scrophularia striata*

گل میمونی سازویی یک گیاه دارویی در ایران و برخی کشورهای دیگر نظیر کره جنوبی و چین است (Salavati et al., 2013) که در طب سنتی برای درمان بیماری‌های مختلفی از جمله آلرژی، روماتیسم و اختلالات التهابی مزمن استفاده شده است (Schinella et al., 2002; Bas et al., 2007). هم‌چنین در طب قدیم چین، این گیاه برای درمان بیماری‌های قلبی مورد استفاده قرار می‌گرفته است (English, 2010).

مردم ساکن استان ایلام سالهاست که به صورت تجربی از این گیاه (با نام محلی تشنه‌داری) به صور مختلف از قبیل جوشانده خوراکی، بخور و ضماد در درمان بیماری‌های متفاوت از جمله التهاب و عفونت چشم و گوش، سوختگی‌های پوستی، زخم‌های عفونی، درد و اختلالات گوارشی، سرماخوردگی، هموروئید، کورک و غیره استفاده می‌کنند (شوهانی و همکاران، ۸۸). از سرشاخه‌های مخلصه این گیاه نیز به عنوان مقوی معده استفاده می‌شود (شرافتی چالشتری و همکاران، ۱۳۸۷). همواره اعتقاد بر این بوده است که این گیاه علاوه بر این که باعث تسریع التیام زخم می‌گردد و نیز

از عفونت‌های شایع باکتریایی در زخم جلوگیری می‌کند، دارای اثرات ضد میکروبی، ضد تومور و ضد التهاب است (زمانیان عضدی و همکاران، ۱۳۹۱).

براساس تحقیقات انجام گرفته، عصاره این گیاه در کاهش بسیاری از عوامل التهاب نظیر پروستا گلندین E2، اینترلوکین β-۱، اینترلوکین ۲ و اینترلوکین ۴ بسیار موثر بوده و سبب کاهش ادم می‌شود. علاوه بر موارد فوق، این گیاه منبعی غنی از گلیکوترپنوئیدها و ورباسکوساپونین A است که در کاهش تورم و درد بسیار موثرند (Schinella et al., 2002). بسیاری از خواص دارویی این جنس را به حضور فنیل‌اتانوئید گلیکوزیدها نسبت می‌دهند.

۱-۳ فنیل‌اتانوئید گلیکوزیدها

فنیل‌اتانوئید گلیکوزیدها دسته بزرگی از متابولیت‌های ثانوی در گیاهان هستند که فعالیت‌های زیستی مختلفی از خود نشان می‌دهند. این ترکیبات محلول در آب بوده و بطور گسترده‌ای در سلسله گیاهی پراکنش یافته‌اند.

بخشی از تشکیل این ماده از مسیر فنیل‌پروپانوئیدی انجام می‌شود. مسیر بیوسنتری فنیل-پروپانوئیدها در گیاه از مسیر شیکمات (تولیدکننده آمینواسیدهای حلقوی) آغاز می‌شود و مسئول فراهم کردن پیش ماده‌های لازم برای تشکیل طیف وسیعی از متابولیت‌های ثانوی است. این مسیر در ساخت بیشتر ترکیبات فنولی در گیاه اهمیت دارد که در آن پیش‌سازهای کربوهیدراتی مشتق شده از مسیرهای گلیکولیز و پنتوز فسفات به آمینواسیدهای حلقوی تبدیل می‌گردند (Heldt and Piechulla, 2004; Saufi, 2007). شکل ۱-۲ نشان می‌دهد که چگونه متابولیت‌های حاصل از فرایندهای بنیادی فتوسنتز، گلیکولیز و چرخه کربس به منظور تهیه حدواسط‌های بیوسنتزی متابولیت‌های ثانوی با فرایندهای مولد انرژی جفت می‌شوند.