بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه کردستان

دانشکده کشاورزی

گروه زراعت و اصلاح نباتات

پایان نامه:

برای دریافت درجه کارشناسی ارشد در رشته بیوتکنولوژی کشاورزی

عنوان:

القای ریشه‌های مویین و تولید رسوراترول در چند ژنوتیپ انگور با استفاده از آگروباکتریوم رایزوژنز

پژوهشگر

سید مهدی حسینی

استاد راهنما

دکتر بهمن بهرام نژاد

اساتید مشاور

دکتر آریو امامی فر

دکتر حامد دولتی بانه

اسفند ۱۳۹۲

کلیه حقوق مادی و معنوی مترتب بر نتایــج مطالعات،

ابتکارات و نوآوری های ناشی از تحقیق موضوع

این پایان‌نامه (رســاله) متعلق به دانشــگاه کردستان است.

تعهد نامه

اینجانب سید مهدی حسینی دانشجوی کارشناسی ارشد رشته زراعت و اصلاح نباتات گرایش بیوتکنولوژی دانشگاه کردستان، دانشکده کشاورزی گروه زراعت و اصلاح نباتات، تعهد می‌نمایم که محتوای این پایان نامه نتیجه تلاش و تحقیقات خود بوده و از جایی کپی برداری نشده و به پایان رسانیدن آن نتیجه تلاش و مطالعات مستمر اینجانب و راهنمایی و مشاوره اساتید بوده است.

مهندس سید مهدی حسینی

۱۳۹۲/۱۲/۱۳

این تحفه ناقابل تقدیم به

چشم های منتظر، لب های دعاگو و دست های پر مهر

مادرم

تقدیم به دستان پر مهر

پدرم

که تنها دستی است که اگر کوتاه از دنیا هم باشد، از تمام دستها بلندتر است

و به

همسرم

اسطوره زندگیم، پناه خستگیم و امید بودنم

ای هستی بخش، وجود مرا بر نعمات بی کرانت توان شکر نیست. ذره ذره وجودم برای تو و نزدیک شدن به تو می تپد.

اکنون که به لطف حضرت حق، توفیق انجام این رساله نصیبم شده، بر خود لازم میدانم از همه عزیزانی که به نوعی در انجام این رساله بر من منت نهاده و از هیچ لگی، مضایقه نکردند، تشکر و سپاسگزاری نمایم.

از مادر مهربان و همسر عزیزم که الگوی صبر و بردباری در زندگی ام هستند و در طول این مدت از بسیاری از خواسته های خود گذشتند، کمال تشکر و قدردانی را دارم.

از استاد راهنمای محترم خود جناب آقای دکتر بهرام نژاد که در تمام مراحل و بخش های مختلف رساله، با پیگیری و درایت بی نظیرشان، هدایت و پیشبرد امر را بر عهده داشته اند و با صبر بی شائبه خود الگوی اخلاقی بنده در تمام مراحل زندگی ام خواهند بود؛ نهایت سپاس را دارم و برایشان از خداوند منان آرزوی توفیق روز افزون را خواستارم.

از اساتید ارجمند جناب آقای دکتر امامی فر و آقای دکتر دولتی بانه که زحمت مشاوره پایان نامه را بر عهده داشتند و با همکاری صادقانه و نظرات سازنده خویش، باعث غنی تر شدن هر چه بیشتر پژوهش حاضر گردیدند، تشکر و قدردانی می کنم.

از خانم شهیدی کارشناس آزمایشگاه بیوتکنولوژی و آقای رحمانی مسئول آزمایشگاه بیولوژی جنگل و نیز مسئولین آزمایشگاه فیزیولوژی باغبانی به خاطر کمک ها و همکاری های بی دریغ شان، تشکر و قدردانی می کنم.

از همکلاسی های خوبم و تمامی دانشجویان گروه بیوتکنولوژی و باغبانی که در طول دوران کارشناسی ارشد یاری گر بنده بودند، بسیار سپاسگزارم.

در پایان بر خود لازم می دانم از آقای مهندس قدرت الله زینلی که دوستی با ایشان را موهبتی از موهبت های خداوند به خود میدانم، کمال تشکر و قدردانی را داشته باشم.

در نهایت سعادت و موفقیت روز افزون این عزیزان را از خداوند متعال خواهانم.

چکیده:

رسوراترول یک ترکیب پلی فنولیکی با وزن مولکولی کم است که به گروهی از فیتوالکسین‌ها (phytoalexins) به نام استیلبن‌ها (stilbenes) تعلق دارد. رسوراترول و پیسید (picied) از جمله مهم‌ترین استیلبن‌ها هستند که نقش مهمی در سیستم دفاعی گیاهان در مقابله با عوامل بیماری زا و به‌ویژه قارچ‌ها دارند. رسوراترول یک ترکیب آنتی اکسیدان است که بیشتر در انگورهای قرمز تجمع می‌یابد و می‌تواند در حفظ سلامتی انسان نقش مؤثری داشته باشد، به‌طوری‌که از رشد سلول‌های سرطانی جلوگیری کرده و ابتلا به بیماری‌های قلبی عروقی را کاهش می‌دهد. این ماده به طور طبیعی در مقادیر اندک در اندام‌های مختلف درخت مو مانند ساقه، برگ و میوه تولید می‌شود، اما در پاسخ گیاه به تنش‌های زیستی و غیر زیستی میزان آن افزایش فراوانی می‌یابد. جهت افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه‌ی با ارزش، از ابزارهای مختلف بیوتکنولوژی و فنون کشت بافت استفاده می‌شود. از کشت ریشه‌های مویین به عنوان یک منبع مهم و پایدار برای تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان استفاده می‌شود. در این تحقیق جهت القای ریشه‌های مویین و افزایش تولید رسوراترول در دو ژنوتیپ انگور وحشی و نیز رقم رشه، از سه سویه مختلف آگروباکتریوم رایزوژنز (ArA4، Ar318 و LAB9402) استفاده گردید که سویه ArA4 از دو سویه دیگر کارآمدتر بود. عوامل مختلفی از قبیل نوع ریزنمونه، سن گیاهچه، غلظت‌های مختلف سوسپانسیون باکتری، مدت زمان آلودگی و مدت هم کشتی ریزنمونه‌ها با باکتری، برای افزایش تراریختی مورد بررسی قرار گرفت. تلقیح ریزنمونه میانگره به مدت ۴۸ ساعت با باکتری (با غلظت سوسپانسیون ۰/۸)، بالاترین درصد تراریختگی را به دنبال داشت. به‌منظور تعیین بهترین محیط کشت جهت رشد بهتر ریشه‌های مویین، نتایج نشان داد که محیط کشت ½MS، برای رشد ریشه‌ها مناسب بود. جهت تأیید تراریختی ریشه‌های مویین تولید شده، آنالیز PCR با استفاده از آغازگر اختصاصی ژن *rolB* انجام پذیرفت. پس از تکثیر ریشه‌های مویین، میزان تولید رسوراترول با استفاده از دستگاه HPLC ارزیابی گردید. نتاج حاصل نشان داد میزان رسوراترول در ریشه‌های مویین نسبت به ریشه‌های طبیعی ژنوتیپ‌های مورد استفاده، به میزان قابل توجهی افزایش داشت. به‌منظور افزایش تولید و بررسی ترشح رسوراترول به محیط کشت از دو محرک سدیم استات و متیل جازمونات به ترتیب با غلظت‌های ۱۰/۲ mM و ۱۰۰ µM در ریشه‌های مویین القا شده از میانگره ژنوتیپ وحشی W16 و سویه ArA4 استفاده گردید که نتایج حاصل از TLC، نشان داد که سدیم استات نسبت به متیل جازمونات، سطح بالاتری از رسوراترول را در ریشه‌های مویین تولید کرده و نیز میزان بیشتری از رسوراترول را به محیط کشت ترشح داده است.

کلمات کلیدی : رسوراترول، انگور، ریشه مویین، تراریختگی، HPLC

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

مقدمه..... ۱

فصل اول (کلیات و پیشینه تحقیق)..... ۶

۱-۱ تاریخچه انگور..... ۶

۱ -۲ ارزش غذایی انگور..... ۶

۱-۳ متابولیت‌های ثانویه گیاهی..... ۷

۱-۳-۱ نقش متابولیت‌های ثانویه گیاهی..... ۷

۱-۳-۲ انواع متابولیت‌های ثانویه..... ۸

۱-۴ معرفی متابولیت ثانویه رسوراترول..... ۹

۱-۴-۱ اهمیت متابولیت ثانویه رسوراترول..... ۱۱

۱-۵ بیوتکنولوژی و تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهی..... ۱۱

۱-۵-۱ نقش بیوتکنولوژی در جهت تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهی با خواص ویژه..... ۱۱

۱-۵-۲ کشت بافت..... ۱۲

۱-۶ تاریخچه شناسایی و معرفی آگروباکتریوم..... ۱۴

۱-۶-۱ ساختار اولیه پلاسمید Ri..... ۱۵

۱-۶-۲ مکانیسم مولکولی انتقال DNA از آگروباکتریوم به سلول گیاهی..... ۱۶

۱-۷ ریشه‌های مویین در گیاهان..... ۱۹

۱-۷-۱ خصوصیات و کاربرد ریشه‌های مویین..... ۲۰

۱- ۷-۲ استفاده از ریشه‌های مویین جهت تولید متابولیت‌های ثانویه..... ۲۱

۱-۸ راهکارهای افزایش میزان متابولیت‌های ثانویه در ریشه‌های مویین..... ۲۳

۱-۸-۱ تغییر در ترکیبات مواد غذایی محیط کشت..... ۲۳

۱-۸-۲ استفاده از لاین‌هایی از ریشه های مویین که بالاترین عملکرد را دارا هستند ۲۳
۱-۸-۳ استفاده از تکنیک مهندسی متابولیت ۲۴
۱-۸-۴ استفاده از محرک‌ها ۲۴
فصل دوم (مواد و روش‌ها) ۲۵
۲-۱ مواد گیاهی ۲۵
۲-۲ سویه باکتری‌های مورد استفاده : ۲۵
۲-۳ محیط کشت های مورد استفاده ۲۶
۲-۳-۱ محیط کشت‌های گیاهی و طرز تهیه آن‌ها ۲۶
۲-۳-۲ محیط کشت باکتری و طرز تهیه آن ۲۷
۲-۴ ضد عفونی سطحی ریزنمونه‌های گره ۲۸
۲-۵ القاء ریشه‌های مویین به وسیله *A.rhizogenes* در ژنوتیپ‌های مورد استفاده انگور ۲۸
۲-۵-۱ تلقیح ریزنمونه‌ها با باکتری ۲۹
۲-۵-۲ انتقال ریز نمونه‌ها از محیط هم‌کشتی به محیط کشت دارای آنتی‌بیوتیک ۲۹
۲-۵-۳ تکثیر ریشه‌های مویین در محیط مایع و جامد ۲۹
۲-۵-۴ اطمینان از حذف کامل باکتری ۳۰
۲-۵-۵ عوامل مورد بررسی در افزایش تراریختی ۳۰
۲-۶ تأیید وجود ژن rol B موجود در ریشه‌های مویین ۳۰
۲-۷ استخراج DNA از ریشه‌های مویین ۳۱
۲-۷-۱ ضد عفونی کردن تجهیزات و محلول‌های مورد استفاده ۳۲
۲-۷-۲ استخراج پلاسمید با روش حجم کم از باکتری ها ۳۲
۲-۸ واکنش PCR ۳۲
۲-۸-۱ تفکیک محصولات تکثیر شده در PCR ۳۳
۲-۹ بهینه کردن محیط کشت جهت تکثیر ریشه‌های مویین ۳۴

۲-۱۰ تعیین بهترین سویه باکتری بر القای ریشه مویین در هر ژنوتیپ..... ۳۴

۲-۱۱ مقایسه بیشترین زی‌توده تولید شده توسط سویه ArA4 در ژنوتیپ‌های مورد استفاده..... ۳۴

۲-۱۲ تعیین میزان ماده موثره ریشه‌های مویین با استفاده از دستگاه HPLC..... ۳۵

۲-۱۲-۱ عصاره گیری از ریشه‌های مویین..... ۳۵

۲-۱۲-۲ اندازه گیری رسوراترول..... ۳۶

۲-۱۲-۳ تزریق نمونه‌ها به ستون HPLC..... ۳۶

۲-۱۳ تعیین تاثیر محرک‌ها بر افزایش رسوراترول در ریشه‌های مویین و میزان ترشح آن به محیط کشت با استفاده از TLC..... ۳۷

۲-۱۳-۱ متیل جازمونات و سدیم استات..... ۳۷

۲-۱۳-۲ عصاره گیری از محیط کشت‌ها و ریشه‌های مویین..... ۳۷

۲-۱۳-۳ آنالیز نمونه‌ها با TLC..... ۳۷

فصل سوم (نتایج)..... ۳۹

۳-۱ بررسی تاثیر نوع محیط کشت جهت کشت درون شیشه‌ایی ژنوتیپ‌های مورد استفاده..... ۳۹

۳-۲ نتایج بهینه سازی شرایط القاء ریشه مویین..... ۴۰

۳-۳ بررسی و تأیید ریشه های مویین به روش مولکولی..... ۴۳

۳-۴ بررسی القاءریشه‌های مویین..... ۴۴

۳-۴-۱ تأثیر نوع سویه باکتری بر مدت زمان لازم جهت ظهور، تعداد و طول ریشه های مویین..... ۴۵

۳-۴-۲ مقایسه محیط کشت‌های مختلف از نظر میزان رشد لاین‌ها..... ۴۹

۳-۵ مقایسه میزان رشد زی‌توده نهایی لاین‌ها..... ۵۱

۳-۶ بررسی و مقایسه میزان تولید رسوراترول در ریشه طبیعی و ریشه مویین..... ۵۳

۳-۷ بررسی اثر محرک‌ها بر روی مقدار رسوراترول در ریشه‌ها و ترشح رسوراترول به محیط کشت آنها..... ۵۵

فصل چهارم (بحث)..... ۵۸

۴-۱ مطالعه و بررسی رشد گیاهچه‌ها..... ۵۸

۴-۲ مطالعه ایجاد ریشه های مویین ۵۸

۴-۳ بررسی شرایط بهینه‌سازی افزایش تراریختی در نمونه‌ها ۶۰

۴-۴ ارزیابی میزان رشد لاین‌ها ۶۲

۴-۵ ارزیابی اثر متیل جازمونات و سدیم استات به‌عنوان محرک بر روی میزان رسوراترول ریشه‌های مویین ۶۳

نتیجه گیری کلی ۶۶

پیشنهادات ۶۷

پیوست‌ها ۶۸

فهرست منابع ۷۱

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول ۱-۱ تعدادی از گیاهان دارویی که ریشه‌های مویین در آن‌ها به منظور تولید متابولیت‌های ثانویه با اهمیت‌شان القاء گردیده است..... ۱۴

جدول ۲-۱ ترکیبات مورد نیاز برای تهیه یک لیتر محیط کشت MS و ۱/۲MS..... ۲۶

جدول۲-۲ نوع و مقدار مواد تشکیل دهنده برای یک لیتر محیط کشت LB..... ۲۷

جدول ۳-۱ نتایج مربوط به تاثیر نوع محیط کشت بر کشت درون شیشه‌ایی رقم رشه و ژنوتیپ‌های وحشی W2 و W16..... ۳۹

جدول ۳-۲ میزان رسوراترول به دست آمده از لاین‌های مختلف..... ۵۵

فهرست اشکال

عنوان **صفحه**

شکل ۱-۱ ساختار شیمیایی چند آلکالوئید مهم..... ۸

شکل۱- ۲ ساختار شیمیایی رسوراترول..... ۱۰

شکل ۱- ۳ ساختار پلاسمید Ri در آگروباکتریوم..... ۱۶

شکل ۱-۴ پردازش T-DNA..... ۱۸

شکل ۱-۵ فرآیند کلی انتقال ماده ژنتیکی از آگروباکتریوم به سلول گیاهی..... ۱۹

شکل ۳- ۱ اثر سن گیاهچه بر درصد تراریختگی ریزنمونه‌های رقم رشه جهت القای ریشه‌های مویین..... ۴۰

شکل ۳-۲ تأثیر طول مدت آلودگی بر درصد تراریختگی ریزنمونه‌های رقم رشه جهت القای ریشه‌های مویین..... ۴۱

شکل ۳-۳ اثر غلظت‌های مختلف سوسپانسیون باکتری (OD) بر درصد تراریختگی ریزنمونه‌های رقم رشه جهت القای ریشه‌های مویین..... ۴۲

شکل ۳-۴ اثر مدت هم کشتی بر درصد تراریختگی ریزنمونه‌های رقم رشه..... ۴۲

شکل۳- ۵ تصویر ژل آگارز با الکتروفورز برای تعیین ژن rolB توسط آنالیز PCR در ریشه‌های ترانسفورم شده به‌وسیله آگروباکتریوم رایزوژنز سویه Ar318..... ۴۳

شکل۳- ۶ تصویر ژل آگارز با الکتروفورز برای تعیین ژن rolB توسط آنالیز PCR در ریشه‌های ترانسفورم شده به‌وسیله آگروباکتریوم رایزوژنز سویه LAB9402 ..... ۴۴

شکل۳-۷ تصویر ژل آگارز با الکتروفورز برای تعیین ژن rolB توسط آنالیز PCR در ریشه‌های ترانسفورم شده به‌وسیله آگروباکتریوم رایزوژنز سویه ArA4..... ۴۴

شکل ۳-۸ مراحل تولید گیاهچه تا تولید ریشه مویین در ریزنمونه میانگره رقم رشه با سویه ArA4..... ۴۵

شکل ۳-۹ اثر نوع سویه و نوع ریزنمونه در مدت زمان ظهور ریشه‌های مویین در هر ریزنمونه رقم رشه..... ۴۶

شکل ۳-۱۰ اثر نوع سویه و نوع ریزنمونه بر تعداد ریشه‌های مویین القا شده در هر ریزنمونه رقم رشه..... ۴۷

شکل ۳-۱۱ اثر نوع سویه و نوع ریزنمونه بر طول ریشه‌های مویین القا شده در هر ریزنمونه رقم رشه..... ۴۸

شکل ۳-۱۲ تاثیرمحیط کشت‌های مختلف بر رشد ریشه‌های مویین..... ۴۹

شکل ۳-۱۳ زی‌توده نهایی لاین گزینشی در محیط‌های مختلف..... ۵۰

شکل ۳-۱۴ زی‌توده لاین گزینشی برحسب وزن خشک در هر نمونه برداری..... ۵۰

شکل ۳-۱۵ میزان رشد لاین گزینشی در محیط کشت MS و۱/۲MS در نمونه‌برداری‌های ۱۰، ۲۰ و ۳۰ روزه..... ۵۱

شکل ۳-۱۶ زی‌توده نهایی لاین‌های رقم رشه ۵۲

شکل ۳-۱۷ زی‌توده نهایی لاین‌های ژنوتیپ W16 ..... ۵۳

شکل ۳-۱۸ زی‌توده نهایی لاین‌های ژنوتیپ W2..... ۵۴

شکل ۳- ۱۹ کروماتوگرام HPLC با طول موج ۳۰۶ نانومتر مربوط به استاندارد رسوراترول..... ۵۴

شکل ۳- ۲۰ کروماتوگرام HPLC با طول موج ۳۰۶ نانومتر مربوط به بیشترین مقدار رسوراترول در ریشه مویین بدست آمده از ریزنمونه‌های تراریخت میانگره ژنوتیپ وحشی W16 با سویه ArA4..... ۵۴

شکل ۳-۲۱ کروماتوگرام HPLC با طول موج ۳۰۶ نانومتر مربوط به مقدار رسوراترول در ریشه‌های طبیعی یا شاهد بدست آمده از ریزنمونه‌های غیر تراریخت ژنوتیپ وحشی W16..... ۵۴

شکل ۳- ۲۲ تصویر TLC مربوط به میزان رسوراترول در ریشه‌های مویین تیمار نشده، ریشه‌های مویین تیمار شده با سدیم استات و ریشه‌های مویین تیمار شده با متیل جازمونات..... ۵۶

شکل ۳- ۲۳ تصویر TLC مربوط به میزان رسوراترول ترشح شده به محیط کشت تیمار نشده، محیط کشت‌های تیمار شده با سدیم استات و محیط کشت‌های تیمار شده با متیل جازمونات..... ۵۶

مقدمه

با ابداع علم بیوتکنولوژی که آن را مجموعه‌ای از متون و روش‌ها می‌دانند، جهت تولید، تغییر و اصلاح فراورده‌های به‌نژادی گیاهان و جانوران و تولید ریز سازواره‌ها برای کاربردهای ویژه، از ارگانیسم‌های زنده استفاده می‌کند و نیز شکوفایی تحقیقات در زمینه بیوتکنولوژی گیاهی, تولید انبوه مواد ثانویه گیاهی مورد توجه قرار گرفت و شاخه‌ای از تحقیقات بیوتکنولوژی گیاهی به تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهی در شرایط درون شیشه ای و همچنین دستورزی مسیرهای بیوسنتزی متابولیت‌های ثانویه اختصاص یافت. هدف از این فن‌آوری کنترل الگوی تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهی به‌منظور تولید دلخواه آن‌ها در یک گیاه و یا حتی تولید یک فراورده ثانویه جدید در گیاه می‌باشد. ابزارهای بیوتکنولوژی و تکنیک‌های آن راه‌گشای تحقیقات جدید برای درک چگونگی عملکرد بدن‌های سالم می‌باشد. با شناخت از اساس مولکولی سلامت و بیماری، بیوتکنولوژی منجر به پیشرفت روش‌های جدید برای درمان و جلوگیری از بیماری‌ها می‌شود از این‌رو بیوتکنولوژی جاذبه‌های بااهمیتی برای جلوگیری، تشخیص و درمان بیماری دارد. بیوتکنولوژی و تولیدات آن جهت حفظ سلامت انسان، در روش‌های تشخیص بر پایه بیوتکنولوژی، امکان تشخیص زودهنگام و با حساسیت بالا را مهیا می‌کند. در زمینه علوم پزشکی و دارویی، بیوتکنولوژی گیاهان دارویی کاربردهای زیادی را دارند: از جمله تولید داروها، داروهای زیستی، تشخیص، ژن درمانی و مهندسی بافت (اصغری، ۱۳۸۵).

مسیرهای متابولیکی فراوانی در گیاهان وجود دارد که حاصل فعالیت آن‌ها تامین ترکیبات حیاتی لازم برای رشد و متابولیسم گیاه است. این مسیرهای متابولیکی را متابولیسم اولیه و فراورده‌های حاصل از آن‌ها را که به‌طور مستقیم در رشد و متابولیسم گیاهی دخالت دارند متابولیت‌های اولیه می‌نامند. مسیرهای سنتز کربوهیدرات‌ها، لیپیدها، پروتئین‌ها, اسیدهای نوکلئیک و... از جمله مسیرهای متابولیکی اولیه می‌باشند که این فراورده‌ها بیشتر در سنتز اجزای یاخته‌ای نقش دارند. جنبه دیگری از متابولیسم وجود دارد که از مسیرهای متابولیکی اولیه مشتق می‌شوند. محصولات این متابولیسم به‌ندرت در فعالیت‌های متابولیکی دخالت دارند و آن را متابولیسم ثانویه و فرآورده‌های حاصل از آن را متابولیت‌های ثانویه می‌نامند. از جمله این متابولیت‌ها می‌توان به تولید آلکالوئیدها[۱], فنول‌ها[۲], روغن‌های ضروری[۳], استروئیدها[۴], تانن‌ها[۵], لیگنین‌ها[۶] و... اشاره کرد. به‌عبارتی

[۱] Alkaloids
[۲] Phenolics
[۳] Essential oils
[۴] Steroids
[۵] Tannins
[۶] Lignins

دیگر متابولیت‌های ثانویه گیاهی، ترکیباتی آلی هستند که به‌صورت مستقیم در فعالیت‌های زیستی گیاه، مثل رشد، نمو و تولید مثل دخیل نمی‌باشند و نسبت به متابولیت‌های اولیه، که برای بقاء زندگی گیاه ضروری‌اند، ساختار شیمیایی پیچیده‌تری را دارا می‌باشند. متابولیت‌های ثانویه درحقیقت حاصل فعالیت چرخه‌های بیوسنتزی فرعی هستند که از چرخه‌های بیوسنتزی حیاتی (متابولیسم اولیه) مشتق می‌شوند. متابولیسم ثانویه در بافت‌های مختلف گیاه، در مقادیر متنوعی تولید می‌شود و در صنایع داروسازی، آرایشی و بهداشتی، عطرسازی، رنگرزی و طعم‌دار کردن، کاربرد پیدا کرده‌اند. (Kim *et al*., 2002).

یکی از کاربردهای مهم بیوتکنولوژی تراریخت نمودن گیاهان برای اهداف خاص مثل عملکرد بیشتر، القای صفتی خاص نظیر، ایجاد مقاومت در برابر تنش‌های زنده و غیر زنده می‌باشد. برای رسیدن به این هدف، می‌توان از طریق فنون کشت بافت و تکنیک‌های مختلف انتقال ژن، تعدادی از ژن‌های مهم را به گیاهان هدف انتقال داد، تا پس از استقرار در بخش‌های فعال ژنوم گیاه میزبان، سبب بروز صفت یا صفت‌های ویژه‌ای گردند. یکی از اهداف مورد نظر در امر تولید متابولیت‌های ثانویه، انتقال ژن مولد ریشه‌های مویین می‌باشد. بر این اساس در این تحقیق، بعد از بهینه کردن یک روش مناسب جهت استقرار ژنوتیپ‌های مورد استفاده در شرایط درون شیشه‌ایی، به القاء ریشه‌های مویین در ریزنمونه‌های مختلف ژنوتیپ‌های مورد استفاده و تولید متابولیت ثانویه رسوراترول با استفاده از آگروباکتریوم رایزوژنز پرداخته شده است. چنین تحقیقاتی در رابطه با گیاهانی که دارای ترکیبات دارویی ویژه هستند، از اهمیت زیادی برخوردار می‌باشد، چراکه با القاء و تکثیر ریشه‌های مویین می‌توان میزان تولید برخی متابولیت‌های ثانویه که به طور طبیعی در گیاهان به میزان کمی تولید می‌شوند را افزایش داد. انگور یکی از گیاهان با خواص دارویی مهم بوده و متابولیت‌های ثانویه تولید شده من جمله رسوراترول، از نظر دارویی، بسیار ارزشمند می‌باشند. رسوراترول به صورت طبیعی در مقادیر اندک در بخش‌های مختلف مو مانند ساقه ، برگ و میوه ساخته می‌شود اما در پاسخ گیاه به تنش‌های زیستی و غیرزیستی میزان آن افزایش قابل توجهی می‌یابد (Fritzemeier and Kindl, 1981; Jeandet et al., 2002). بنابراین لازم به‌نظر می‌رسد تا با به‌کارگیری فناوری‌های زیستی، راه حل مناسبی برای این مشکل نمایان شود، به‌طوری‌که به‌توان مقدار مواد موءثره مفید در این گیاه را به‌صورت معنی‌داری افزایش داد. در این راستا با هدف افزایش کمّی میزان متابولیت‌های ثانویه رسوراترول موجود در انگور، فناوری ریشه مویین در گیاه مورد نظر، مورد بررسی و مطالعه قرار گرفت.

۱- فصل اول (کلیات و پیشینه تحقیق)

۱-۱- تاریخچه انگور

انگور گیاهی بوته‌ایی، رونده، چوبی و خزان کننده است. این گیاه از خانواده *Vitaceae* و یا *Ampelidiaceae* و از جنس *Vitis* است. گونه *Vitis vinifera*، دارای شاخه‌های نرم و قابل انعطاف، پیچک‌دار و رونده می‌باشد. جنس *Vitis* دارای دو زیر جنس به نام‌های *Muscadinia* و *Euvitis* که اولی دارای ۴۰ کروموزوم و دومی دارای ۳۸ کروموزوم است. انگور معمولی از زیر جنس *Euvitis* و از انگورهای وحشی اروپایی است که در سراسر جهان حدود ۵ هزار رقم را شامل می‌شود. انگورهایی که در ایران کشت می‌شوند، از گروه اروپایی و گونه‌ایی با نام علمی *Vitis vinifera* می‌باشد (تفضلی و همکاران، ۱۳۷۰).

۱-۲- ارزش غذایی انگور

انگور از نظر ارزش غذایی و خواص پزشکی، میوه‌ایی فرا سودمند است. ارزش غذایی انگور به‌دلیل وجود مواد قندی از جمله ساکارز، اسید سیتریک، اسید مالیک، تارتاریک و مواد معدنی مانند کلسیم، منیزیم، آهن، منگنز و سیلیس بسیار بالاست. همچنین، حاوی ویتامین‌های A، B و C می‌باشد (تفضلی و همکاران، ۱۳۷۰). این میوه، در پاسخ به تنش‌های زنده و غیر زنده، متابولیت‌های ثانویه با ارزشی تولید می‌کند. از جمله این متابولیت‌های ثانویه، رسوراترول است که انگور و فراورده‌های آن مهم‌ترین منبع این ترکیب پلی فنولیکی هستند (Tassoni et al., 2005; Langcake and Pryce, 1976; Kodan et al., 2001; Jeandet et al., 1995; Krasnow and Murphy, 2004). رسوراترول ترکیبی آنتی اکسیدان است که بیشتر در انگورهای قرمز تجمع می‌یابد (Jeandet et al., 2002) و می‌تواند در حفظ سلامتی انسان نقش مؤثری داشته باشد، به طوری‌که از رشد سلول‌های سرطانی

جلوگیری کرده و ابتلا به بیماری‌های قلبی ـ عروقی را کاهش می‌دهد (Folts, 2002; Frankel et al., 1995).

۱-۳- متابولیت‌های ثانویه گیاهی

متابولیت‌های ثانویه دسته‌ای از مواد طبیعی در گیاهان هستند که مطالعه در مورد آن‌ها در طی ۵۰ سال اخیر افزایش یافته است. این مولکول‌ها که عمدتاً وزن مولکولی پایینی هم دارند، علاوه بر اینکه نقش عمده‌ای در سازگاری گیاهان به محیط اطراف دارند، به‌عنوان منبع مهمی از مواد دارویی نیز مطرح می‌باشند (Mulabagal and Tsay, 2004). ترکیبات شیمیایی مهمی که برای مصارف مختلف از منابع گیاهی استخراج می‌شوند عمدتاً از متابولیت‌های ثانویه هستند که در گونه‌های مختلف گیاهی یافت می‌شوند. این ترکیبات بسیار متنوع بوده و حتی ممکن است الگوی تولید آن‌ها در گونه‌های متعلق به یک تیره نیز متفاوت باشد (Zhang et al., 2004; Ramawat, 2003) متابولیت‌های ثانویه در حقیقت حاصل فعالیت چرخه‌های بیوسنتزی فرعی هستند که از چرخه‌های بیوسنتزی حیاتی (متابولیسم اولیه) مشتق می شوند (Dixon and Gonzales, 1996)، به صورت کلی اصطلاح متابولیت‌های ثانویه دامنه وسیعی از ترکیبات نامشابه را که همان مواد موثره گیاهان دارویی می‌باشند را دربر می‌گیرد. به عقیده بسیاری از دانشمندان ارائه تعریف جامعی از متابولیت‌های ثانویه مشکل است (Jesus and Weathers, 2003).

به طور کلی در سیستم‌های مختلف گیاهی متابولیت‌های ثانویه به‌ویژه آن‌هایی‌که دارای خواص دارویی هستند، از اندام‌های مختلف گیاه قابلیت استخراج دارند. به این صورت که ترکیباتی مثل رسوراترول و پسید[۱] در ساقه ، برگ و میوه انگور (Fritzemeier and Kindl, 1981; Jeandet et al., 2002)، آجمالیس از ریشه *Catharanthus roseus* (پروانش)، نیکوتین از برگ *Nicotinana* و کوئینین[۲] و تاکسول[۳] از پوست *Cinchona* و Taxus baccata (سرخدار)، استخراج می‌شوند، یا افدرین که تقریباً در تمام اندام‌های گیاه *Ephedra* (ازمک)، تولید می‌شود، در برخی موارد گزارش شده است که برخی متابولیت‌های ثانویه در سنین مختلف رشدی تولید می‌شوند که می‌توان به *Papaver somniferum* (خشخاش)، اشاره کرد که متابولیت‌های ثانویه در مرحله بلوغ در گیاه تجمع می‌یابند (Kokate, 2006).

۱-۳-۱- نقش متابولیت‌های ثانویه گیاهی

با توجه به تعریف متابولیت‌های ثانویه، این ترکیبات محصولات زائد و مولکول‌های بی‌مسئولیت برای گیاهان به شمار نمی‌روند، اکثر متابولیت‌های ثانویه نقش‌های کلیدی در واکنش گیاهان به

[۱] Picied
[۲] Koeinin
[۳] Taxol

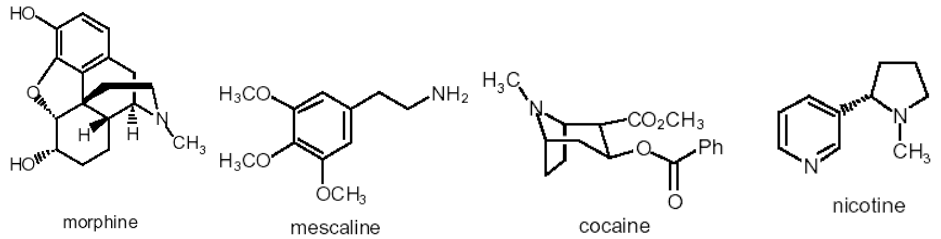
تنش‌های زنده و غیرزنده موجود در محیط اطراف را بر عهده دارند (Jesus and Weathers, 2003) این ترکیبات در مواردی از قبیل: جذب حشراتی که به گرده افشانی کمک می‌کنند، دفاع شیمیایی از گیاهان در برابر میکروارگانیسم‌ها و حشرات نقش ویژه‌ایی را دارند. اثرات آنتی‌بیوتیکی، ضد قارچی و ضد ویروسی بعضی از متابولیت‌های ثانویه شناخته شده است، از این‌رو قادر به حفاظت از گیاهان در برابر پاتوژن‌ها و مواد ضد جوانه‌زنی یا سمی برای سایر گیاهان (آللوپاتی) هستند. به‌علاوه بعضی از متابولیت‌های ثانویه تشکیل دهنده‌ی ترکیبات مهم جذب کننده نورUV هستند که مانع خسارت زدن به برگ، توسط امواج نور UV می شوند (Wink, 1988). در واقع وجود این ترکیبات در گیاه، توان سازش بهتر با محیط و توان رقابت بیشتری را نسبت به گونه‌های رقیب به آن می‌دهد (Jesus and Weathers, 2003). با این وجود دلیل اصلی توجه بشر به متابولیت‌های ثانویه گیاهی، مصارف بسیار گسترده‌ای است که این فراورده‌ها در داروسازی، صنایع غذایی، کشاورزی و صنعت دارند (Ming et al., 2003).

۱-۳-۲- انواع متابولیت‌های ثانویه

متابولیت‌های ثانویه بر اساس ساختمان شیمیایی مولکول‌های تشکیل دهنده‌شان در چهار دسته طبقه‌بندی می‌شوند، شامل گلیکوزیدها، روغن‌های فرار (اسانس‌ها)، آلکالوئیدها که ساختمان شیمیایی مشخص دارند و دسته چهارم که شامل سایر متابولیت‌ها از جمله فلاونوئیدها، موسیلاژها، ویتامین‌ها، تانن‌ها و اسید سالسیلیک هستند بدلیل ناهماهنگی و گسترش ساختمان‌های شیمیایی‌شان در سه گروه قبلی جای نمی‌گیرند (امید بیگی، ۱۳۸۴).

الف- آلکالوئیدها

شکل ۱-۱ ساختار شیمیایی چند آلکالوئید مهم را نشان می‌دهد، آلکالوئیدها از جمله ترکیباتی ازت‌دار و قلیایی هستند که گیاهان در شرایطی خاص آن‌ها را تولید می‌کنند و هنوز به درستی نقش‌شان در گیاهان مشخص نشده است، عمدتاً به دلیل خواص دارویی و کاربردهای پزشکی مورد توجه قرار گرفته‌اند (امید بیگی، ۱۳۸۴).



شکل۱- ۱- ساختار شیمیایی چند آلکالوئید مهم (Jesus and Weathers, 2003).