دانشکده کشاورزی
گروه آموزشی بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهی

پایان‌نامه کارشناسی ارشد

بررسی امکان تولید متابولیت‌های ثانویه حاصل از زیره سیاه (*Bunium persicum* (Boiss.) B. Fedtsch) از طریق کشت سلولی

سارا خسروی‌نیا

شهریور ۱۳۹۱

دانشکده کشاورزی

پایان نامه کارشناسی ارشد

بررسی امکان تولید متابولیت‌های ثانویه حاصل از زیره سیاه (*Bunium persicum* (Boiss.) B. Fedtsch) از طریق کشت سلولی

سارا خسروی‌نیا

استادان راهنما

دکتر عبدالرضا باقری

دکتر سید مهدی زیارت‌نیا

استاد مشاور

دکتر سید حسن مرعشی

شهریور ۱۳۹۱

دانشگاه فردوسی مشهد

دانشکده کشاورزی، گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهی

از این پایان نامه کارشناسی ارشد توسط سارا خسروی نیا، دانشجوی مقطع کارشناسی ارشد رشته مهندسی کشاورزی - بیوتکنولوژی در کشاورزی، در تاریخ ۱۳۹۱/۶/۱، در حضور هیات داوران دفاع گردید. پس از بررسی‌های لازم، هیات داوران این پایان نامه را با نمره عدد حروف و با درجه مورد تایید قرار دادند/ندادند.

عنوان پایان نامه: بررسی امکان تولید متابولیت‌های ثانویه حاصل از زیره سیاه (***Bunium persicum*** **(Boiss.) B. Fedtsch)** از طریق کشت سلولی

سمت در هیات داوران	نام و نام خانوادگی	مرتبه علمی	گروه	موسسه/دانشگاه	امضاء
داور	**آقای دکتر سعید ملک‌زاده شفارودی**	**استادیار**	**بیوتکنولوژی**	**دانشگاه فردوسی مشهد**	
داور	**خانم دکتر نسرین مشتاقی**	**استادیار**	**بیوتکنولوژی**	**دانشگاه فردوسی مشهد**	
نماینده تحصیلات تکمیلی	**آقای دکتر امین میرشمسی**	**استادیار**	**بیوتکنولوژی**	**دانشگاه فردوسی مشهد**	
استاد راهنما	**آقای دکتر عبدالرضا باقری**	**استاد**	**بیوتکنولوژی**	**دانشگاه فردوسی مشهد**	
استاد راهنما	**آقای دکتر سید مهدی زیارت‌نیا**	**استادیار**	**بیوتکنولوژی**	**پژوهشکده علوم و صنایع غذایی**	
استاد مشاور	**آقای دکتر سید حسن مرعشی**	**دانشیار**	**بیوتکنولوژی**	**دانشگاه فردوسی مشهد**	

تعهدنامه

عنوان پایان‌نامه: بررسی امکان تولید متابولیت‌های ثانویه حاصل از زیره سیاه (*Bunium persicum* (Boiss. B. Fedtsch) از طریق کشت سلولی

اینجانب سارا خسروی‌نیا دانشجوی دوره دکتری/دوره کارشناسی ارشد رشته مهندسی کشاورزی- بیوتکنولوژی در کشاورزی، دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد تحت راهنمایی آقای دکتر عبدالرضا باقری و آقای دکتر سید مهدی زیارت‌نیا، متعهد می‌شوم:

- نتایج ارائه شده در این پایان نامه حاصل مطالعات علمی و عملی اینجانب بوده، مسئولیت صحت و اصالت مطالب مندرج را به طور کامل بر عهده می گیرم.
- در خصوص استفاده از نتایج پژوهشهای محققان دیگر به مرجع مورد نظر استناد شده است.
- مطالب مندرج در این پایان نامه را اینجانب یا فرد یگری به منظور اخذ هیچ نوع مدرک یا امتیازی تاکنون به هیچ مرجعی تسلیم نکرده است.
- کلیه حقوق معنوی این اثر به دانشگاه فردوسی مشهد تعلق دارد. مقالات مستخرج از پایان نامه، ذیل نام دانشگاه فردوسی مشهد (Ferdowsi University of Mashhad) به چاپ خواهد رسید.
- حقوق معنوی تمام افرادی که در به دست آمدن نتایج اصلی پایان نامه تاثیر گذار بوده اند در مقالات مستخرج از رساله رعایت خواهد شد.
- در خصوص استفاده از موجودات زنده یا بافتهای آنها برای انجام پایان‌نامه، کلیه ضوابط و اصول اخلاقی مربوطه رعایت شده است.

تاریخ ۱۳۹۱/۶/۱

نام و امضاء دانشجو:

مالکیت نتایج و حق نشر

- **کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج، برنامه‌های رایانه‌ای، نرم‌افزارها و تجهیزات ساخته شده) متعلق به دانشگاه فردوسی مشهد می‌باشد و بدون اجازه کتبی دانشگاه قابل واگذاری به شخص ثالث نیست.**
- **استفاده از اطلاعات و نتایج موجود در پایان‌نامه بدون ذکر مرجع مجاز نیست.**

چکیده

زیره سیاه [*Bunium persicum* (Boiss.)] از گیاهان ارزشمند و بومی ایران است که بذر آن دارای ترکیبات بسیاری از جمله کومین‌آلدئید می‌باشد، که در صنایع غذایی، آرایشی و دارویی کاربرد دارد. با توجه به پتانسیل‌های کشت سلولی در زمینه تولید مواد دارویی و متابولیت‌های ثانویه، که در سال‌های اخیر به صورت یک رویکرد مهم درآمده است، متاسفانه در زیره سیاه گزارشی در این رابطه وجود ندارد. می‌توان با در نظر گرفتن تجارب موفق دیگر محققان بر استفاده از اثر کشت سلولی بر تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان، انجام این مهم را در زیره سیاه محقق کرد. به همین منظور این مطالعه با هدف بررسی امکان تولید متابولیت‌های ثانویه زیره سیاه به روش کشت سلولی انجام شد. بر این اساس آزمایشاتی برای القاء کالوس از بذر جوانه‌زده در دو محیط کشت MS و B_5 جامد حاوی ترکیب‌های مختلف هورمونی صورت گرفت. پس از استقرار کشت سلولی در محیط کشت MS، به منظور مقایسه مقدار کومین‌آلدئید موجود در سلول‌ها با نمونه بذری از ۳ روش عصاره‌گیری کلونجر، حلال و SCF استفاده گردید و سپس نمونه‌ها با کروماتوگرافی گازی آنالیز شدند. همچنین اعمال چهار محرک اسید سالیسیلیک (۰/۰۱۴، ۰/۰۲۸ و ۰/۰۷۰ گرم بر لیتر)، عصاره مخمر (۰/۱، ۱ و ۲ گرم بر لیتر)، *Fusarium solani* و *Aspergilus niger* (۰/۵، ۱ و ۳ گرم بر لیتر) بر رشد سلولی بررسی شد. نتایج نشان داد که محیط کشت MS جامد حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin و ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA نسبت به سایر ترکیبات منجر به رشد کالوس بیشتری می‌شوند. همچنین روند تغییرات رشد کالوس و سلول نشان داد که استفاده از ترکیب هورمونی ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA نسبت به ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin سبب افزایش بیشتری در درصد کالوس‌زایی و رشد کالوس و سلول می‌گردد. مقدار کومین‌آلدئید در عصاره نمونه بذری که با حلال هگزان، کلونجر و SCF تهیه شده بود به ترتیب ۱۸/۶، ۵۸/۹ و ۰ درصد و در نمونه سلول که با حلال هگزان و SCF بدست آمده بود، به ترتیب ۴/۶ و ۰ درصد بود. در بررسی کروماتوگرافی لایه نازک، یک ترکیب فلورسانس در نمونه سلولی یافت شد که در نمونه شاهد (اندام‌های مختلف گیاه) دیده نشد. شناسایی این ماده که با روش رزونانس مغناطیسی هسته انجام گرفت، نشان داد که این ماده یکی از مشتقات کومارین است. اعمال محرک‌ها پس از ۷۲ ساعت سبب کاهش رشد سلولی نسبت به شاهد شد. این کاهش در مورد عصاره مخمر معنی‌دار نبود ولی در مورد اسید سالیسیلیک و محرک‌های قارچی (در غلظت‌های بالا) در برخی تیمارها معنی‌دار گردید.

کلید واژه‌ها: زیره سیاه، کالوس، کشت سوسپانسیون سلولی، متابولیت‌های ثانویه

سپاسگزاری

سپاس بیکران خداوند بی‌همتا که به بنده عنایت کرد تا بتوانم مرحله‌ای دیگر را در کسب علم به پایان ببرم.

بر خود لازم می‌دانم از اساتید محترم راهنمایم، جناب آقای دکتر باقری و جناب آقای دکتر زیارت‌نیا که با حوصله و مساعدت‌های بی‌دریغ خود برای سامان یافتن این اثر کوشیدند، تشکر کنم.

از پژوهشکده علوم و صنایع غذایی به دلیل ایجاد فرصت برای بنده جهت انجام پایان نامه خود به عنوان بخشی از پروژه آن پژوهشکده تحت عنوان "بررسی سیستم کشت سلولی زیره سیاه (B. Fedtsch) *Bunium persicum* (Boiss.)" برای خصوصیات کمی و کیفی اسانس آن" قدردانی می‌کنم. همچنین از زحمات جناب آقای دکتر قدیر رجب‌زاده به دلیل کمک در تفسیر نتایج آنالیزهای شیمیایی تشکر می‌کنم.

از جناب آقای دکتر مرعشی که زحمت مشاورت این پایان نامه را به عهده داشتند، سپاسگزارم.

با کمال تشکر از اساتید مدعو، جناب آقای دکتر ملک‌زاده شفارودی و سرکار خانم دکتر مشتاقی که زحمت تصحیح و داوری این پایان نامه را متقبل شدند.

از زحمات جناب آقای دکتر میرشمسی نماینده تحصیلات تکمیلی به خاطر همکاری ایشان در برگزاری جلسه دفاع پایان نامه قدردانی می‌کنم.

در پایان از زحمات تمامی عزیزان و دوستانی که به نوعی در انجام این کار بنده را همراهی کردند، کمال تشکر را دارم.

فهرست مطالب

فصل اول- مقدمه ۱

فصل دوم- بررسی منابع ۴

۲-۱ اهمیت گیاهان دارویی ۴

۲-۲ انواع مواد مؤثره گیاهان دارویی ۴

۲-۲-۱ متابولیت‌های اولیه ۵

۲-۲-۲ متابولیت‌های ثانویه ۵

۲-۳ عملکرد متابولیت‌های ثانویه در گیاهان ۶

- علائم هشدار دهنده ۶
- افزایش مقاومت گیاهان در برابر عوامل بیماری‌زا ۶
- جاذب موجودات ۷
- برهم کنش گیاه با گیاه و گیاه با سایر موجودات ۷

۲-۴ تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان در شرایط درون شیشه‌ای ۷

۲-۴-۱ روش کشت کالوس ۸

۲-۴-۲ روش کشت سوسپانسیون سلولی ۹

۲-۴-۳ روش کشت ریشه‌های مویین ۱۱

۲-۴-۴ تولید متابولیت‌های ثانویه در مقیاس وسیع در بیوراکتورها ۱۲

۲-۵ عوامل مؤثر در سنتز متابولیت‌های ثانویه در کشت‌های سوسپانسیون سلولی ۱۳

۲-۵-۱ نمک‌های معدنی ۱۴

- سطوح نیترات ۱۴
- سطوح فسفات ۱۴

۲-۵-۲ نوع و میزان تنظیم‌کننده‌های رشدی ۱۴

۲-۵-۳ منابع کربنی مورد استفاده ۱۵

۲-۵-۴ دما ۱۶

۲-۵-۵ نور ۱۶

۲-۵-۶ pH محیط کشت ۱۶

۲-۵-۷ ترکیبات گازی ۱۷

۲-۵-۸ محرک‌ها ۱۸

- کاربرد محرک‌ها در کشت‌های سوسپانسیون سلولی ۱۸
- کاربرد محرک‌ها در کشت ریشه‌های مویین ۲۰

۲-۶ روش‌های مختلف استخراج و آنالیز متابولیت‌های ثانویه ۲۱
۲-۶-۱ تکنیک‌های استخراج مواد ۲۱
- تقطیر با بخار و استخراج همراه با تقطیر ۲۱
- خالص‌سازی و جداسازی ۲۲
- روش سیال فوق بحرانی ۲۳
- استخراج محدود فاز جامد ۲۳
۲-۶-۲ تکنیک‌های آنالیز و شناسایی مواد دارویی ۲۳
- روش کروماتوگرافی لایه نازک ۲۳
- روش کروماتوگرافی گازی ۲۴
- روش کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا ۲۵
- روش رزونانس مغناطیسی هسته ۲۵
- روش Electronic nose ۲۵
۲-۷ زیره سیاه ۲۸
۲-۷-۱ گیاهشناسی ۲۸
۲-۷-۲ ترکیبات دارویی ۲۹
۲-۷-۳ جوانه‌زنی بذر ۳۲
۲-۷-۴ کشت درون شیشه‌ای ۳۳
فصل سوم- مواد و روش‌ها ۳۵
۳-۱ تهیه ریز نمونه ۳۵
۳-۲ بهینه‌سازی شرایط برای القاء و رشد کالوس ۳۵
۳-۳ اثر محیط کشت MS مایع بر سرعت رشد کالوس ۳۷
۳-۴ استقرار کشت سوسپانسیون سلولی ۳۸
۳-۵ مقایسه مقدار کومین‌آلدئید در نمونه‌های بذری و سلول ۳۸
۳-۵-۱ عصاره‌گیری از سلول‌ها و بذر با حلال ۳۹
۳-۵-۲ اسانس‌گیری از سلول‌ها و بذر با کلونجر ۳۹
۳-۵-۳ اسانس‌گیری از سلول‌ها و بذر با SCF ۳۹
۳-۵-۴ تعیین مقدار کومین آلدئید آزاد شده به داخل محیط کشت ۴۰
۳-۵-۵ آنالیز GC ۴۰
۳-۶ آنالیز با TLC ۴۱
۳-۷ جداسازی و خالص‌سازی ترکیب فلورسانس ۴۱

۳-۸ القاء تنش‌های زیستی و شیمیایی در کشت سوسپانسیون سلولی ۴۲
۳-۸-۱ آماده‌سازی و افزودن محرک‌های زیستی ۴۳
۳-۸-۲ تهیه و افزودن محرک اسید سالیسیلیک ۴۳
۳-۸-۳ بررسی اثر محرک‌ها بر رشد سلولی ۴۳
فصل چهارم- نتایج و بحث ۴۴
۴-۱ بررسی روند جوانه‌زنی بذر زیره سیاه ۴۴
۴-۲ نتایج بهینه‌سازی شرایط برای القاء و رشد کالوس در محیط کشت جامد ۴۵
۴-۳ نتایج اثر محیط کشت MS مایع بر سرعت رشد کالوس ۵۱
۴-۴ بررسی روند رشد سلول‌ها در محیط کشت MS مایع ۵۱
۴-۵ بررسی مقدار کومین‌آلدئید در سلول و بذر ۵۴
۴-۵-۱ مقایسه مقدار کومین‌آلدئید در عصاره سلولی و بذر ۵۶
۴-۵-۲ بررسی روش‌های مختلف عصاره‌گیری بر مبنای مقدار کومین‌آلدئید در نمونه بذری ۵۶
۴-۶ شناسایی ترکیب فلورسانس با NMR ۵۷
۴-۷ نتایج بررسی اثر محرک‌ها بر رشد سلولی ۶۱
فصل پنجم- نتیجه‌گیری کلی و پیشنهادات ۶۵
منابع ۶۷

فهرست شکل‌ها

عنوان شکل	صفحه
شکل ۴- ۱. روند تغییرات درصد جوانه‌زنی بذر زیره سیاه	۴۴
شکل ۴- ۲. مقایسه رنگ کالوس در محیط کشت MS	۴۶
شکل ۴- ۳. اثر ترکیبات مختلف هورمونی محیط کشت MS جامد بر وزن تر و خشک کالوس	۴۷
شکل ۴- ۴. روند تغییرات وزن تر و خشک کالوس زیره سیاه در دو محیط کشت	۵۰
شکل ۴- ۵. روند تغییرات وزن تر کالوس زیره سیاه در محیط کشت MS مایع	۵۱
شکل ۴- ۶. روند تغییرات وزن تر و خشک سلول‌های کشت سوسپانسیون	۵۳
شکل ۴- ۷. کروماتوگرام GC نمونه کومین‌آلدئید استاندارد	۵۴
شکل ۴- ۸. مقایسه ترکیبات در عصاره دی کلرومتان	۵۸
شکل۴- ۹. آزادسازی ترکیب فلورسانس به داخل محیط کشت	۵۸
شکل ۴- ۱۰. جداسازی و خالص‌سازی ترکیب فلورسانس در نمونه سلولی	۵۹
شکل۴- ۱۱. 1H-NMR ترکیب فلورسانس	۶۰
شکل ۴- ۱۲. ساختار کومارین و ترکیب فلورسانس	۶۱

فهرست جدول‌ها

عنوان جدول	صفحه
جدول ۲- ۱. مقدار تولید برخی ترکیبات دارویی حاصل از کشت سلولی در مقایسه با گیاه کامل	۹
جدول ۳- ۱. ترکیب و غلظت‌های هورمونی مورد استفاده در القاء و رشد کالوس	۳۶
جدول ٤- ۱. اثر ترکیبات مختلف هورمونی محیط کشت MS جامد بر درصد کالوس‌زایی	۴۵
جدول ۴- ۲. تأثیر محیط کشت و تیمارهای مختلف هورمونی بر درصد کالوس‌زایی	۴۸
جدول ۴- ۳. مقایسه تعداد و غلظت ترکیبات آنالیز شده با GC در عصاره و اسانس	۵۵
جدول ۴- ۴. اثر سطوح مختلف *Fusarium solani* بر وزن تر و خشک سلول	۶۲
جدول ۴- ۵. اثر سطوح مختلف *Aspergilus niger* بر وزن تر و خشک سلول	۶۲
جدول ۴- ۶. اثر سطوح مختلف عصاره مخمر بر وزن تر و خشک سلول	۶۳
جدول ۴- ۷. اثر سطوح مختلف اسید سالیسیلیک بر وزن تر و خشک سلول	۶۴

فهرست علائم و اختصارها

علامت	معادل انگلیسی	معادل فارسی
2,4-D	2,4-Dichlorophenoxy Acetic Acid	۴،۲ دی‌کلروفنوکسی استیک اسید
AN	*Aspergillum niger*	آسپرژیلوس نایجر
BA	Benzyl Adenine	بنزیل آدنین
FS	*Fusarium solani*	فوزاریوم سلانی
GC	Gas Chromatography	کروماتوگرافی گازی
GC-MS	Gas Chromatography-Mass Spectrometry	کروماتوگرافی گازی- طیف‌سنج جرمی
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا
IBA	Indole Butyric Acid	ایندول بوتریک اسید
Kin	Kinetin	کینتین
MS	Murashige and Skoog	محیط کشت موراشی و اسکوگ (۱۹۶۲)
NAA	Naphthalene Acetic Acid	نفتالین اسید استیک
NMR	Nuclear Magnetic Resonance	رزونانس مغناطیسی هسته
SA	Salicylic Acid	اسید سالیسیلیک
SCF	Supercritical Fluid	سیال فوق بحرانی
TLC	Thin-Layer Chromatography	کروماتوگرافی لایه نازک
YE	Yeast Extract	عصاره مخمر

فصل اول

مقدمه

گیاهان قادر به تولید دامنه گسترده‌ای از ترکیبات زیستی با وزن مولکولی پایین به نام متابولیت‌های ثانویه هستند که معمولاً دارای ساختار پیچیده و منحصر به فردی می‌باشند (ورپورت، ۲۰۰۰). این متابولیت‌ها در حقیقت حاصل فعالیت چرخه‌های بیوسنتزی فرعی هستند که از چرخه‌های بیوسنتزی حیاتی (متابولیسم اولیه) مشتق می‌شوند و می‌توان آن‌ها را پایانه‌های متابولیسم در سلول‌های گیاهی دانست. اگر چه این متابولیت‌ها در واکنش گیاهان به کنش‌های زنده و غیر زنده محیط اطراف آن‌ها نقش‌های کلیدی را بر عهده دارند، اما عدم حضور آن‌ها در یک گونه گیاهی، حیات گیاه را تهدید نمی‌کند و در حقیقت حضور این مواد در گیاه سبب می‌شود که آن گیاه نسبت به گونه‌های رقیب از توان سازش بهتری با محیط و در نتیجه از قدرت رقابت بیشتری برخوردار باشد. از جمله این ترکیبات می‌توان به کاروتنوئیدها، آنتوسیانین‌ها، استرول‌ها و آلکالوئیدها اشاره نمود (کومار و گوپتا، ۲۰۰۸). تاکنون در حدود ۱۰۰/۰۰۰ ماده شیمیایی فعال از ۵۰/۰۰۰ گونه گیاهی جداسازی گردیده است که این فهرست دائماً در حال افزایش بوده و هر ساله در حدود ۴۰۰۰ ترکیب جدید به این فهرست اضافه می‌شود (ورپورت، ۲۰۰۰). گروه مهمی از این متابولیت‌ها که در صنعت مورد توجه می‌باشند، اسانس‌ها هستند که در مواد خوشبوکننده، طعم‌دهنده، محصولات آرایشی و دارویی کاربرد دارند. دسته‌ای دیگر از

این فرآورده‌های طبیعی ترکیبات فلاونوئیدی می‌باشند که به صورت آزاد در بسیاری از گیاهان و یا به صورت ترکیب همراه با گلیکوزیدها وجود دارند (ورپورت و همکاران، ۱۹۹۸).

گیاهان دارویی یکی از منابع عمده تولید این متابولیت‌ها هستند، لیکن برداشت بی‌رویه گیاهان دارویی از رویشگاه‌های طبیعی جهت استحصال ترکیبات مؤثره دارویی سبب شده برخی از این گیاهان در معرض انقراض قرار گیرند و به همین دلیل محصولات دارویی بدست آمده از گیاهان اغلب خیلی گران هستند (حسنلو و همکاران، ۱۳۸۷).

یکی از موارد استفاده از فن‌آوری کشت بافت گیاهی در کشاورزی تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهی است، غالباً مطالعات بسیاری بر روی تولید آن‌ها از طریق کشت سلول‌های گیاهی متمرکز شده است. در حال حاضر با استفاده از کشت سوسپانسیون، امکان تولید برخی از متابولیت‌های ثانویه نظیر ترکیبات آلکالوئیدی ضد سرطان، ویتامین‌ها، آنزیم‌ها، طعم‌دهنده‌ها، رنگدانه‌ها، محرک‌ها و حشره‌کش‌ها که از نظر صنعتی بسیار مورد توجه می‌باشند، وجود دارد. در سال‌های اخیر تولید این فرآورده‌ها از طریق کشت سلول‌های گیاهی به صورت یک رویکرد مهم در تحقیقات کشت سوسپانسیون سلولی درآمده است (اورمزدی و چلبیان، ۱۳۸۴). در بعضی موارد میزان متابولیت‌های موجود در سلول‌های کشت بافتی خیلی بیشتر از میزان آن در گیاه کامل بوده است و یا گاهی این سلول‌ها متابولیت‌هایی تولید می‌کنند که در گیاه اولیه تولید نمی‌شود (حسنلو و همکاران، ۱۳۸۷). با توجه به آنکه سرعت تولید متابولیت‌های ثانویه در طبیعت آهسته است، بنابراین میزان تولید آن اقتصادی نبوده و لذا ایجاد شرایطی برای تولید سریع و انبوه آن‌ها از طریق کشت بافت گیاهی ضروری به نظر می‌رسد. اخیراً هدف صنعت آن است که تکنیک‌های کشت درون شیشه‌ای گیاهی را آن چنان توسعه دهد که تولید متابولیت‌های ثانویه نسبت به استحصال آن‌ها از گیاه کامل یا سنتز آزمایشگاهی ارزان‌تر شود (حسنلو و همکاران، ۱۳۸۷).

زیره سیاه [*Bunium persicum* (Boiss.) B. Fedtsch.] از جمله گیاهان دارویی ارزشمند و بومی ایران است که در نواحی شمالی خراسان، کرمان و شرق زاگرس تا بندرعباس رشد می‌کند (قهرمان، ۱۳۷۲). این گیاه در سال‌های اخیر زراعی شده و در حال حاضر در بعضی نقاط کشور به ویژه استان خراسان کشت می‌گردد و از بذر آن در صنایع غذایی و دارویی استفاده می‌شود (خسروی، ۱۳۸۴). بذر این گیاه حاوی ترکیبات ارزشمندی نظیر کومین‌آلدئید، گاما- ترپینن، پارا- سیمن، بتا- پینن، آلفا- پینن، میرسن و لیمونن است (مقتدر و همکاران، ۱۳۸۸)، که از گذشته‌های دور در میان ایرانیان برای درمان بسیاری از بیماری‌های گوارشی و همچنین به عنوان یک داروی ضد حشره و ضد آسم استفاده شده است. حتی امروزه از آن علاوه بر صنعت غذا و دارو در برخی صنایع آرایشی نیز استفاده می‌شود (صالحی و همکاران، ۲۰۰۸).

در زمینه تولید متابولیت‌های ثانویه به روش کشت سلولی در زیره سیاه گزارشی وجود ندارد و صرفاً مطالعات اندکی در زمینه باززایی این گیاه صورت گرفته است (زیارت‌نیا، ۱۳۷۹؛ واخلو و همکاران، ۱۹۹۰؛ ولی‌زاده و همکاران، ۲۰۰۶). با در نظر گرفتن تجارب موفق دیگر محققان بر روی استفاده از اثر سیستم کشت سلولی بر مقدار و کیفیت متابولیت‌های ثانویه در برخی از گیاهان (تشیما و همکاران، ۱۹۹۸؛ اسکراج و همکاران، ۲۰۰۰)، انجام این مهم در زیره سیاه ممکن به نظر می‌رسد. لذا این مطالعه با هدف بررسی امکان تولید متابولیت‌های ثانویه حاصل از زیره سیاه از طریق کشت سلولی صورت گرفت.

فصل دوم

بررسی منابع

۲-۱ اهمیت گیاهان دارویی

مواد مؤثره موجود در گیاهان دارویی بصورت مستقیم یا غیر مستقیم دارای اثرات درمانی هستند و به عنوان دارو مورد استفاده قرار می‌گیرند. در سال‌های اخیر تمایل و توجه زیادی به داروهای طبیعی که از بخش‌های مختلف گیاه حاصل می‌شود، ایجاد شده است. مطابق اعلام سازمان بهداشت جهانی، بیش از ۸۰ درصد از مردم دنیا هنوز از گیاهان دارویی برای درمان بسیاری از بیماری‌ها استفاده می‌نمایند. تقریباً یک چهارم داروهای تولید شده حاوی عصاره‌های گیاهی یا ترکیباتی هستند که از مواد گیاهی به دست آمده‌اند یا بر اساس ترکیبات گیاهی مدل‌سازی شده‌اند (یانی، ۲۰۰۵).

۲-۲ انواع مواد مؤثره گیاهان دارویی

بررسی متابولیت‌های ثانویه با تجزیه شیمیایی گیاهان دارویی در قرن نوزدهم آغاز شد. نتایج این بررسی‌ها نشان داد که گیاهان دارویی علاوه بر ترکیبات عمومی و اساسی، هر کدام حداقل دارای یک ماده مؤثره ثانویه مخصوص هستند. به طور کلی، متابولیت‌های طبیعی گیاهی را به دو دسته اولیه و ثانویه تقسیم می‌کنند (یازاکی و همکاران، ۲۰۰۸).

۲-۲-۱ متابولیت‌های اولیه

مسیرهای متابولیکی فراوانی در گیاهان وجود دارد که حاصل فعالیت آن‌ها تأمین ترکیبات حیاتی برای گیاه است. این مسیرهای متابولیکی حیاتی را متابولیسم اولیه و فرآورده‌های حیاتی حاصل از آن‌ها را که بطور مستقیم در رشد و متابولیسم دخالت دارند، متابولیت‌های اولیه می‌نامند. وجود این ترکیبات یا مواد اولیه برای موجود زنده ضروری بوده و حیات موجودات زنده به حضور این مواد در پیکر آنان بستگی دارد. این مواد، حاصل سوخت و سازهای اولیه (اساساً ساکاریدها) هستند که در همه گیاهان سبز با عمل فتوسنتز به وجود می‌آیند و شامل کربوهیدارت‌ها، پروتئین‌ها، لیپیدها، اسیدهای نوکلئیک و آب می‌باشند (زمانی، ۱۳۸۴).

۲-۲-۲ متابولیت‌های ثانویه

جنبه دیگری از متابولیسم که می‌توان آن را وجه تمایز گیاهان و جانوران دانست این است که گیاهان و قارچ‌ها مسیرهای متابولیکی متنوعی دارند که از مسیرهای متابولیکی اولیه مشتق می‌شوند و برای بقای موجود نیز ضروری نیستند. این مسیرهای پیرامونی را که بصورت نادر در حیوانات عالی و گاهی در حشرات و بندپایان یافت می‌شوند را مجموعاً متابولیسم ثانویه و فرآورده‌های آن‌ها را متابولیت‌های ثانویه می‌نامند (چینو، ۲۰۰۸).

حضور متابولیت‌های ثانویه برای تداوم حیات گیاه چندان ضروری نیست، ولی می‌توان گفت این مواد سبب ایجاد جریان‌های دفاعی حیاتی می‌شوند. عموماً این مواد که شامل هزاران نوع مختلف می‌باشند در فرم طبیعی به طور خالص یافت نمی‌شوند و به حالت ترکیب شده با عناصر دیگر وجود دارند، که این مسأله باعث تقویت اثرات مکمل آن‌ها می‌شود (امیدبیگی، ۱۳۸۶). برخی از فرآورده‌های ثانویه متابولیکی، مانند لیگنین نقش مهمی در استحکام گیاهان دارند و یا تعدادی از هورمون‌های گیاهی، کاروتنوئیدها و استرول‌ها که از طریق مسیرهای متابولیکی ثانویه تولید می‌شوند، وظیفه حیاتی مهمی در

گیاهان ایفا می‌کنند. بنابراین، این تعریف از متابولیت‌های ثانویه که فاقد وظیفه مشخص حیاتی هستند، در رابطه با همه گیاهان صادق نیست (صفری، ۱۳۸۳).

۲-۳ عملکرد متابولیت‌های ثانویه در گیاهان

علائم هشدار دهنده: در گونه‌های گیاهی مانند توتون، گندم، خیار و برنج، بعد از آن که گیاه توسط یک عامل بیماری‌زا مورد حمله قرار گرفت، ترکیباتی که سبب ایجاد مقاومت در مقابل سایر عوامل می‌شود، تولید می‌گردد. این مقاومت، تحت عنوان مقاومت اکتسابی سیستمیک نامیده می‌شود، زیرا عوامل ایجاد مقاومت، می‌توانند از یک قسمت به قسمت دیگر گیاه منتقل شوند (لاهوتی، ۱۳۷۱).

تا سال‌های اخیر اعتقاد بر این بود که این مقاومت توسط اسید سالیسیلیک در گیاه به وجود می‌آید، اما مطالعات نشان داد که اسید سالیسیلیک قبل از ظهور این مقاومت از طریق آوند آبکش به سایر قسمت‌های گیاه منتقل می‌شود. با وجود اینکه اسید سالیسیلیک به طور قطع برای ایجاد این مقاومت لازم است، ولی علامت هشدار دهنده سیستمیک محسوب نمی‌شود (لاهوتی، ۱۳۷۱).

افزایش مقاومت گیاهان در برابر عوامل بیماری‌زا: گیاهان به طور دائم در معرض تعداد وسیعی از انواع عوامل بیماری‌زا بوده و در راستای مقابله با این تهدید سیستم‌های دفاعی چند لایه‌ای را برای مقاومت در مقابل حمله این عوامل تولید می‌نمایند. از جمله این سیستم‌های دفاعی می‌توان به استفاده از پروتئین‌های ضد قارچ، پلیمرهای ساختمانی و آنتی‌بیوتیک‌ها اشاره نمود. متابولیت‌های ثانویه در ساختن پلیمرهای ساختمانی و تولید آنتی‌بیوتیک‌های مختلف در گیاه نقش دارند. از نظر ساختمانی، فنیل پروپانوئیدها در افزایش توان دفاعی گیاه نقش قابل توجهی دارند. این ترکیبات در ساختمان مهمترین واحدهای ساختمانی پلیمرهای دیواره سلولی نظیر لیگنین و سوبرین که یک پلیمر خارج سلولی متشکل از اسیدهای چرب و ترکیبات فنلی است، وارد می‌شوند. گیاهان در حد وسیعی از ترکیبات فنلی، پلی‌کتیدها و ترپنوئیدها به عنوان آنتی‌بیوتیک استفاده می‌کنند (صفری، ۱۳۸۳).

جاذب موجودات: متابولیت‌های ثانویه علاوه بر دخالت در فعالیت‌های دفاعی گیاه، به عنوان عامل جاذب، توسط موجودات ذره‌بینی خارج از گیاه نیز مورد استفاده قرار می‌گیرند. به عنوان مثال گونه‌های مختلف بیماری‌زای آگروباکتریوم از طریق جذب متابولیت‌های فنلی متصاعد شده از محل‌های زخم، گیاه میزبان را مکان‌یابی می‌کنند. گیاهان خانواده پروانه‌آسا یا بقولات نیز از مشتقات ترکیبات فنلی ناشی از تولید فلاونوئید برای جذب باکتری ریزوبیوم به طرف ریشه‌ها و تولید گره‌های تثبیت کننده ازت استفاده می‌کنند. از نظر نقش حشرات در گرده افشانی، متابولیت‌های ثانویه به عنوان رنگدانه‌های گل و جاذب‌های بو مورد استفاده قرار می‌گیرند (صفری، ۱۳۸۳).

برهم کنش گیاه با گیاه و گیاه با سایر موجودات: بسیاری از متابولیت‌های ثانویه در برهم کنش‌های مهم بین گونه‌های مختلف گیاهان و نیز بین گیاهان و سایر موجودات زنده شرکت می‌کنند. این چنین اثرات متقابل که توسط ویتاکر، آللوشیمی نامیده شد، نقش‌های مهمی در حفظ و تأمین جمعیت‌ها و اجتماعات موجودات زنده ایفا می‌کنند. نوع خاصی از تأثیرات آللوشیمی منحصراً بین گیاهان وجود دارد و در حقیقت برخی از گیاهان با تولید این مواد شیمیایی خاص سبب ممانعت از رشد گیاهان دیگر می‌شوند، که به آن آللوپاتی (دگرآسیبی) گفته می‌شود (لاهوتی، ۱۳۷۱).

۲-۴ تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان در شرایط درون شیشه‌ای

با ظهور بیوتکنولوژی، شاخه جدیدی از تحقیقات در عرصه متابولیت‌های ثانویه گیاهی شکل گرفته است که به بیوتکنولوژی متابولیت‌های ثانویه معروف است. این شاخه بیوتکنولوژی به تولید درون شیشه‌ای متابولیت‌های ثانویه گیاهی و همچنین دست‌ورزی مسیرهای بیوسنتزی متابولیت‌های ثانویه برای تغییر الگوی تولید متابولیت در یک گیاه و یا تولید یک فرآورده ثانویه جدید در آن می‌پردازد. از اواخر دهه ۶۰ میلادی، فناوری کشت بافت به عنوان ابزاری در جهت مطالعه و تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهی معرفی شده است. برخی مزیت‌های تولید متابولیت‌های ثانویه از طریق کشت بافت شامل کنترل

بهینه شرایط کشت، افزودن پیش‌سازهای مورد نیاز برای افزایش بازده و تولید متابولیت‌های ثانویه خاص می‌باشد (راماچادرا و راویشانکر، ۲۰۰۲). در این رابطه از روش‌های زیر برای تولید متابولیت‌های ثانویه استفاده شده است:

۲-۴-۱ روش کشت کالوس

تولید متابولیت‌های با ارزش اغلب به بافت‌های تمایز یافته نظیر کرک‌های غده‌ای و مجاری رزینی بستگی دارد. این قبیل ترکیبات را به طور معمول نمی‌توان در کشت‌های سوسپانسیون سلولی القاء کرد. استفاده از کشت‌های کالوس به جای سوسپانسیون سلولی درختان در برخی موارد منجر به تشکیل مجاری و غده‌هایی می‌شود که فرآورده‌هایی چون ترپن‌ها و روغن‌های فرار در آن‌ها تولید می‌شود. البته این کشت‌های کالوس دارای پتانسیل قابل توجهی در راستای تولید متابولیت‌های ثانویه هستند (یومان، ۱۹۸۷).

نیگرا و همکاران (۱۹۸۷) موفق به تولید سولاسودین از کالوس‌های *Solanum eleagnifolium* شدند. راویشانکار و گروال (۱۹۹۱) نشان دادند که ترکیبات محیط کشت و تنش مواد غذایی، تولید دیوزژنین از کشت‌های کالوس *Dioscorea deltoidea* را تحت تأثیر قرار می‌دهد. همچنین مطالعات انسینا و همکاران (۲۰۰۰) نیز نشان داد که تولید دیوزژنین با استفاده از کشت کالوس *Trigonella foenum-graecum* امکان‌پذیر است. رولیکا و همکاران (۲۰۰۶) موفق به تولید کومارین از کشت کالوس *Ammi majus* L. شدند. گزارش آنتونونی و همکاران (۲۰۰۷) نشان داد که کالوس حاصل از نمونه‌های برگی *Passiflora quadrangularis*، *P. incarnata* و *P. edulis* قادر به تولید فلاونوئیدها است. سیموز و همکاران (۲۰۰۹) نیز تولید ترکیبات آنتوسیانینی را در کشت کالوس *Cleome rosea* گزارش نمودند. گزارش ترجو-تاپیا و همکاران (۲۰۰۸) نشان داد که کشت کالوس *Beta vulgaris* L. قادر به تولید بتاگزانتین است.