بسم الله الرحمن الرحيم

دانشکده علوم

بخش زیست‌شناسی

پایان‌نامه تحصیلی برای دریافت درجه کارشناسی ارشد رشته زیست شناسی

گرایش فیزیولوژی گیاهی

اثر پلی پلوئیدی القایی با کلشی سین بر رشد، گلدهی و ترکیبات ترپنوئیدی گیاه شاهدانه *(cannabis sativa L.)*

مؤلف:

مهسا باقری

استاد راهنما:

دکتر حکیمه منصوری

استاد مشاور:

دکتر فاطمه نصیبی

شهریور ۹۲

این پایان نامه به عنوان یکی از شرایط احراز درجه کارشناسی ارشد به

گروه زیست شناسی

دانشکده علوم

دانشگاه شهید باهنر کرمان

تسلیم شده است و هیچگونه مدرکی به عنوان فراغت از تحصیل دوره مزبور شناخته نمیشود.

دانشجو :	خانم مهسا باقری
اساتید راهنما :	خانم دکتر حکیمه منصوری
استاد مشاور:	خانم دکتر فاطمه نصیبی
داور۱:	خانم دکتر زهرا اسرار
داور۲:	خانم دکتر بتول کرامت
نماینده تحصیلات تکمیلی :	آقای دکتر مهدی موسوی
معاونت آموزشی و پژوهشی دانشکده :	آقای دکتر عباس مرادیان

حق چاپ محفوظ و مخصوص به دانشگاه شهید باهنر کرمان است.

تقدیم به :

پدر عزیزم که تکیه‌گاه و راهنمایم در تمام مراحل زندگی است.

مادر مهربانم که محبتش زندگی‌ام را معنا می‌بخشد.

خواهر و برادرانم که از هیچ تلاشی در مسیر پیشرفتم دریغ نکردند.

تشکر و قدردانی

سر بر آستان جلال پروردگار می‌سایم که دگر بار توفیق انـدوختن دانشـی را روزیـم نمـود و از او مدد می‌گیرم تا سپاسم را به تمامی آنان که گام‌های استوار و دستان پر لطفشان تکیـه‌گـاه خسـتگی راهم بود، پیشکش کنم.

با سپاس بی‌پایان از خانواده‌ام که در طی دوران تحصیلم همچون پشتوانه‌ای محکم، مایـه دلگـرمیم بوده‌اند.

در توانایی انجام ایـن تحقیـق افتخـار آن را داشـتم تـا از محضـر علـم و ادب بسـیاری از مدرسـین گرانقدر بهره‌ها گرفته و سودها جویم. جای آن دارد تا خالصانه‌ترین مراتب قدردانی خود را نسبت به لطف این بزرگ اندیشان به پاس رهنمودهای ارزنده‌شان تقدیم کنم.

بهترین سپاس‌ها تقدیم به استاد بزرگوارم سرکار خانم دکتر منصوری کـه بـا ژرف‌نگـری، علـم و بینش خود راهنمای من بودند و در طی این دوره هر آنچه در توان داشتند، از من دریغ ننمودند.

از استاد مشاور محترم سرکار خانم دکتر نصیبی سپاسگزارم نه تنها به خاطر هر آنچه به نام دانش از ایشان آموخته‌ام بلکه به پاس هر آنچه به نام انسانیت از ایشان فرا گرفته‌ام.

از داوران محترم سرکار خانم دکتر اسرار و سرکار خـانم دکتـر کرامـت کـه زحمـت مطالعـه ایـن پایان‌نامه را تقبل نمودند، بی نهایت سپاسگزارم.

از تمامی استادان بزرگوار و دلسوز در بخـش زیسـت‌شناسـی کـه در طـی دوره کارشناسـی ارشـد افتخار شاگردی‌شان را داشتم، سپاسـگزارم و از جنـاب آقـای دکتـر عبـاس نـژاد (ریاسـت محتـرم بخش) و تمامی کارمندان و کارکنان بخش زیست‌شناسی که به سرانجام رسـاندن ایـن اثـر جـز بـه همراهی ایشان امکان پذیر نبود، سپاسگزارم.

از دانشجویان محترم مقطع دکتری آقایان مظفری، جعفری، زارع، علوی سپاسگزارم.

همچنین از همکلاسی‌های خوبم خانم‌ها زنگنه، دریایی، براتی، صادقی و آقـای آذرخـش کـه هـر یک به نوعی در انجام این پایان‌نامه مرا یاری دادند، سپاسگزارم.

چکیده

القای پلی پلوئیدی در گیاهان ارزشمند ازلحاظ اقتصادی، مدت زمان زیادی است که مورد آزمایش قرار می‌گیرد. القای تتراپلوئیدی در گیاه شاهدانه *(Cannabis sativa L.)* با روش قطره چکان و با غلظت‌های مختلف (۰/۰، ۰/۱ و ۰/۲ درصد) کلشی سین به مدت زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت صورت گرفت. معیارهایی که برای انتخاب بهترین غلظت کلشی سین در نظر گرفته شد شامل درصد زنده مانی گیاهچه ها، تعداد گیاهان تتراپلوئید و میکسوپلوئید بود. با افزایش مدت زمان تیمار، درصد گیاهان تتراپلوئید و درصد زنده مانی کاهش یافت. مناسب‌ترین شرایط برای القای تتراپلوئیدی خالص، تیمار مریستم رأسی گیاهچه های ۷ روزه با ۰/۲۰ درصد کلشی سین به مدت ۲۴ ساعت با نتیجه‌ی ۷۳/۳۳ درصد زنده مانی و ۴۳/۳۳ درصدگیاه تتراپلوئید بود. همچنین بیشترین گیاهان میکسوپلوئید دراثر تیمار ۰/۱ درصد به مدت ۲۴ ساعت به دست آمد. آنالیز فلوسایتومتری به منظور تعیین سطح پلوئیدی انجام شد. صفات مورفولوژیکی و آناتومی گیاهان تتراپلوئید القایی و دیپلوئید و همچنین ویژگی‌های بیوشیمیایی گیاهان دارای سطوح پلوئیدی مختلف، مورد بررسی قرار گرفت. اندازه‌ی روزنه‌ی اپیدرم برگ گیاهان تتراپلوئید بزرگ‌تر از گیاهان دیپلوئید بود درحالی که این گیاهان تراکم روزنه‌ای کمتری داشتند. شاخص برگ و ارتفاع گیاهان تتراپلوئید کاهش معنی داری در مقایسه با گیاهان دیپلوئید نشان داد. همچنین برش عرضی ساقه این گیاهان تفاوت‌هایی را از نظر ساختار تشریحی نشان داد. مقدار کلروفیل کل و کاروتنوئیدها در گیاهان تتراپلوئید درمقایسه با گیاهان دیپلوئید تفاوت معنی داری نداشت. میزان قندهای احیا کننده، قندهای محلول، نشاسته، پروتئین کل و فلاوونوئید کل در گیاهان میکسوپلوئید در مقایسه با گیاهان تتراپلوئید و دیپلوئید افزایش معنی داری پیدا کرده است. همچنین در گیاهان تتراپلوئید در مقایسه با گیاهان شاهد، پروتئین کل، فلاوونوئید کل و نشاسته افزایش معنی داری نشان داد. از طرف دیگر میزان THC، سلولز، قند محلول و احیا کننده در گیاهان تتراپلوییید کمتر از دیپلوئید بود. بنابراین، القای پلی پلوئیدی علاوه بر اثرات مورفولوژیکی ثابت شده، در صفات بیوشیمیایی گیاه نیز تأثیر دارد.

واژگان کلیدی: شاهدانه، پلی پلوئیدی، صفات آناتومی و مورفولوژی، صفات بیوشیمیایی.

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

۱- مقدمه ۱
۱-۱-تاریخچه گیاهان دارویی ۲
۱-۲- معرفی گیاه مورد مطالعه ۲
۱-۳- ترکیبات ثانویه گیاهی ۴
۱-۳-۱- فلاوونوئید ها ۴
۱-۳-۲- ترپنوئید ها ۵
۱-۳-۲-۱- کانابینوئید های شاهدانه ۶
۱-۳-۲-۱-۱-تاریخچه ۶
۱-۳-۲-۱-۲- ویژگی و عملکرد کانابینوئید های شاهدانه ۷
۱-۳-۲-۱-۳- بیوسنتز کانابینوئید های شاهدانه ۹
۱-۴- تریکوم های شاهدانه ۱۳
۱-۴-۱- توزیع، عملکرد و شکل تریکوم های شاهدانه ۱۳
۱-۵- پلی پلوئیدی ۱۵
۱-۵-۱- پلی پلوئیدی در گیاهان ۱۶
۱-۵-۲- پلی‌پلوئیدی مصنوعی (دستورزی عدد کروموزومی) ۱۷
۱-۵-۳- آلوپلی پلوئیدی ۱۸
۱-۵-۴- اتوپلی پلوئیدی ۱۹
۱-۵-۵- میکسوپلوئیدی ۲۳
۱-۶- اهداف پژوهش ۲۳
۲- مواد و روش‌ها ۲۵
۲-۱- القای تتراپلوئیدی ۲۶
۲-۱-۱- تیمار مریستم رأسی نوشاخه‌ها ۲۶
۲-۲- بررسی‌های ساختاری گیاهان تیمار و شاهد ۲۶
۲-۲-۱- اندازه‌گیری ابعاد سلول‌های نگهبان روزنه به منظور انتخاب اولیه‌ی پلی‌پلوئیدها ۲۶
۲-۳- آنالیز فلوسیتومتری گیاهان شاهد و پلی‌پلوئیدهای احتمالی ۲۷

۲-۳-۱- آماده سازی نمونه‌ها و نحوه‌ی انجام آنالیز فلوسیتومتری ۲۷
۲-۴- مقایسه‌ی ویژگی‌های ریخت‌شناسی و ساختاری گیاهان تتراپلوئید و شاهد ۲۷
۲-۴-۱- روش مقایسه برخی ویژگی‌های ریخت‌شناسی و ساختاری گیاهان تتراپلوئید و شاهد. ۲۷
۲-۴-۱-۱- اندازه‌گیری طول و عرض سلول‌های نگهبان روزنه و تراکم روزنه ۲۸
۲-۴-۱-۲- بررسی تراکم تریکوم پایه دار ۲۸
۲-۴-۱-۳- بررسی پارامترهای رشدی ۲۸
۲-۴-۱-۳-۱- مقایسه‌ی وزن‌تر ساقه و ریشه گیاهان تتراپلوئید و دیپلوئید ۲۸
۲-۴-۱-۳-۲- مقایسه‌ی ارتفاع گیاهان تتراپلوئید و دیپلوئید ۲۹
۲-۴-۱-۴- مقایسه‌ی شاخص برگ گیاهان تتراپلوئید و دیپلوئید ۲۹
۲-۴-۱-۵- مقایسه‌ی سطح برگ گیاهان تتراپلوئید و دیپلوئید ۲۹
۲-۴-۱-۶- مقایسه‌ی برش عرضی برگ تتراپلوئید و دیپلوئید ۲۹
۲-۴-۱-۶-۱- مطالعات تشریحی ۲۹
۲-۴-۱-۷- مقایسه‌ی برش عرضی ساقه دیپلوئید و تتراپلوئید ۳۰
۲-۵- مطالعات بیوشیمیایی ۳۰
۲-۵-۱- اندازه گیری مقدار رنگیزه های گیاهی ۳۰
۲-۵-۱-۱- سنجش مقدار کلروفیل و کاروتنوئید ۳۰
۲-۵-۲- اندازه گیری مقدار قندهای محلول (TSC) با استفاده از معرف آنترون ۳۱
۲-۵-۲-۱- تهیه عصاره ۳۱
۲-۵-۲-۲- تهیه معرف ۳۱
۲-۵-۲-۳- روش اندازه گیری ۳۱
۲-۵-۲-۴- رسم منحنی استاندارد گلوکز ۳۱
۲-۵-۳- استخراج و اندازه‌گیری قندهای احیا کننده ۳۲
۲-۵-۳-۱- تهیه‌ی عصاره ۳۲
۲-۵-۳-۲- روش اندازه گیری ۳۲
۲-۵-۳-۳- رسم منحنی استاندارد گلوکز ۳۲
۲-۵-۴- استخراج و اندازه گیری نشاسته ۳۲
۲-۵-۴-۱- استخراج ۳۲
۲-۵-۴-۲- رسم منحنی استاندارد ۳۳

۲-۵-۵- اندازه گیری آنتوسیانین ۳۳
۲-۵-۵-۱- تهیه‌ی عصاره ۳۳
۲-۵-۵-۲- روش اندازه گیری ۳۳
۲-۵-۶- اندازه گیری فلاوونوئید کل ۳۴
۲-۵-۶-۱- تهیه ی عصاره ۳۴
۲-۵-۶-۲- روش اندازه گیری ۳۴
۲-۵-۷- اندازه گیری پروتئین کل ۳۴
۲-۵-۷-۱- تهیه عصاره پروتئینی ۳۴
۲-۵-۷-۲- سنجش مقدار پروتئین کل به روش برادفورد ۳۵
۲-۵-۷-۳- تهیه معرف بیوره ۳۵
۲-۵-۷-۴- رسم منحنی استاندارد ۳۵
۲-۵-۸- استخراج و اندازه گیری سلولز ۳۵
۲-۵-۸-۱- مراحل استخراج و اندازه گیری ۳۶
۲-۵-۸-۲- تهیه‌ی معرف استیک/نیتریک ۳۶
۲-۵-۸-۳- تهیه‌ی معرف آنترون ۳۶
۲-۵-۸-۴- رسم منحنی استاندارد ۳۶
۲-۵-۹- سنجش عناصر بافت گیاهی به روش ICP-OES ۳۷
۲-۵-۹-۱- هضم اسیدی نمونه‌های گیاهی خشک ۳۷
۲-۵-۹-۲- ساخت استانداردهای Mix جهت دستگاه ICP ۳۷
۲-۵-۱۰- اندازه گیری فسفر باروش کالریمتری ۳۸
۲-۵-۱۰-۱- رسم منحنی استاندارد ۳۸
۲-۵-۱۱- اندازه گیری میزان THC و CBD ۳۹
۲-۵-۱۱-۱-آماده سازی نمونه گیاهی برای اندازه گیری THC و CBD ۳۹
۲-۵-۱۱-۲- تهیه‌ی عصاره ۳۹
۲-۵-۱۱-۳- اندازه گیری میزان THC و CBD با روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا ۳۹
۲-۵-۱۱-۴- رسم منحنی استاندارد ۳۹
۲-۶- سنجش کیفی پروتئین‌های برگ و ریشه ی گیاه دیپلوئید و گیاهان پلی پلوئید با الکتروفورز عمودی ۴۰

۲-۶-۱- روش تهیه‌ی ژل آگارز ۴۰
۲-۶-۲- محلول رنگ بر ژل..... ۴۱
۲-۷- عملیات آماری ۴۱
۳- نتایج ۴۲
۳-۱- القای پلی‌پلوئیدی ۴۳
۳-۱-۱- القای پلی‌پلوئیدی در گیاهچه‌های تیمار شده با کلشی‌سین ۴۳
۳-۱-۲- نتایج آزمایشات فلوسیتومتری..... ۴۴
۳-۱-۳- مقایسه‌ی برخی ویژگی‌های ریخت‌شناختی در گیاهان تتراپلوئید و دیپلوئید ۴۶
۳-۱-۳-۱- اندازه‌گیری طول و عرض سلول‌های نگهبان روزنه و تراکم روزنه‌ها..... ۴۷
۳-۱-۳-۲- بررسی تراکم تریکوم غده ای..... ۴۸
۳-۱-۳-۳- مقایسه‌ی وزن‌تر (FW) ساقه و ریشه گیاهان تتراپلوئید و دیپلوئید ۴۸
۳-۱-۳-۴- مقایسه‌ی ارتفاع گیاهان تتراپلوئید و دیپلوئید ۴۸
۳-۱-۳-۵- مقایسه‌ی شاخص برگ گیاهان تتراپلوئید و دیپلوئید..... ۴۸
۳-۱-۳-۶- مقایسه‌ی سطح برگ گیاهان تتراپلوئید و دیپلوئید ۴۹
۳-۱-۳-۷- مقایسه‌ی برش عرضی برگ تتراپلوئید و دیپلوئید..... ۴۹
۳-۱-۳-۸- مقایسه‌ی برش عرضی ساقه تتراپلوئید و دیپلوئید..... ۵۰
۳-۱-۴-گلدهی گیاهان شاهد و تتراپلوئید..... ۵۱
۳-۲- مطالعات بیوشیمیایی..... ۵۱
۳-۲-۱- اندازه گیری مقدار رنگیزه های گیاهی ۵۱
۳-۲-۱-۱- سنجش مقدار کلروفیل و کاروتنوئید..... ۵۱
۳-۲-۲- اندازه گیری مقدار قند محلول..... ۵۲
۳-۲-۳- اندازه گیری مقدار قند احیاکننده..... ۵۳
۳-۲-۴- اندازه گیری مقدار نشاسته ۵۴
۳-۲-۵- اندازه گیری مقدار آنتوسیانین ۵۴
۳-۲-۶- اندازه گیری مقدار فلاوونوئید کل..... ۵۵
۳-۲-۷- اندازه گیری مقدار پروتئین کل ۵۵
۳-۲-۸- اندازه گیری مقدار سلولز..... ۵۶
۳-۲-۹- اندازه گیری عناصر ۵۷

۳-۲-۱۰- اندازه گیری مقدار CBD و THC ۵۷
۳-۲-۱۱- نتایج حاصل از بررسی کیفی پروتئین های برگ و ریشه ی گیاه شاهد و گیاهان پلی پلوئید از طریق الکتروفورز ۵۹
۴- بحث و نتیجه‌گیری ۶۱
۴-۱- القای تتراپلوئیدی ۶۲
۴-۱-۱- مقایسه‌ی برخی ویژگی‌های ریختی میان گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید انتخاب شده با استفاده از فلوسیتومتری ۶۳
۴-۲- اثر سطح پلوئیدی بر میزان ترکیبات بیوشیمیایی ۶۵
۴-۳- نتیجه گیری کلی ۶۹
۴-۴- پیشنهادها ۷۰
۵- منابع ۷۱

فصل اول

مقدمه

۱-۱- تاریخچه گیاهان دارویی

قدمت شناخت خواص دارویی گیاهان به دوران قبل از تاریخ بر می‌گردد و به طور دقیق مشخص نیست که گیاهان از چه زمانی به عنوان دارو مورد استفاده‌ی بشر قرار گرفته‌اند. اطلاعات به دست آمده از متون تاریخی و سنگ نوشته‌ها حاکی از آن است که مصریان و چینیان در زمره‌ی اولین جمعیت‌های بشری بوده‌اندکه در حدود ۲۷ قرن قبل از میلاد مسیح، از گیاهان به عنوان دارو استفاده می‌نموده‌اند. مردم یونان باستان، خواص دارویی برخی از گیاهان را به خوبی می‌دانسته‌اند. بقراط و شاگرد وی ارسطو و دیگر حکیمان یونان باستان، اهمیت زیادی برای گیاهان در درمان بیماری‌ها قائل بوده‌اند و یکی از شاگردان ارسطو به نام تئوفراستوس، بنیان‌گذار مکتب گیاه درمانی بوده است. در ایران استفاده از گیاهان دارویی از دوران هخامنشیان رایج بوده است. در قرون هشتم تا دهم میلادی، دانشمندان ایرانی نظیر ابوعلی‌سینا و محمد زکریای رازی، به دانش گیاه درمانی رونق زیادی بخشیدند. در قرون هفده و هجده میلادی، اروپائیان به پیشرفت‌های بزرگی در زمینه گیاه درمانی و استفاده از گیاهان دارویی دست یافتند و از قرن نوزدهم، کوشش‌های زیادی 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 دارد (امیدبیگی، ۱۳۷۴). کاشت شاهدانه به دلیل اهمیت اقتصادی آن برای مصارف گوناگون از جمله غذایی، دارویی و تولید فیبر که از ساقه‌ی آن گرفته می‌شود، تاریخچه‌ی طولانی دارد (Ware and Tawfik, 2005).

۱-۲- معرفی گیاه مورد مطالعه

شاهدانه با نام علمی *Cannabis sativa L.* گیاه یکساله علفی و از خانواده‌ی Cannabaceae است. در اصل بومی آسیای معتدل است و اکنون به میزان وسیعی در تمام جهان گسترده است که به دلیل خصوصیات دارویی آن در طب سنتی به وفور مورد استفاده قرار گرفته است. گیاه شاهدانه یکی از اولین گیاهان صنعتی غیر خوراکی بوده که توسط انسان کشت شده است. شاهدانه دارای یک ژنوم دیپلوئید (2n = 20) باکاریوتیپ متشکل از ۹ اتوزوم و یک جفت کروموزوم جنسی است (x و y)؛ گیاهان ماده هموگامت (XX) و گیاهان نر هتروگامت (XY) هستند با سیستم تعادلی X به اتوزوم، که نوع جنسیت را کنترل می‌کند (Ming *et al.*, 2011). خواص دارویی منحصر به فرد شاهدانه به دلیل وجود کانابینوئید ها می باشد، گروهی متشکل از بیش از ۱۰۰ ترکیب طبیعی که معمولاً در گل های جنس ماده تجمع می‌یابند (Elsohly, 2005; Mehmedic, 2008).

شاهدانه از طریق دانه انتشار می‌یابد و هنگامی که دانه‌ی آن در مکانی در معرض نور خورشید با خاک سبک دارای زهکشی مناسب و مواد غذایی و آب فراوان قرار گیرد به سرعت رشد می‌کند. شاهدانه می‌تواند طی ۴ تا ۸ ماه فصل رویشی از بهار تا پائیز، تا ارتفاع ۵ متر (۱۶ پا) رشد کند. دانه‌ها معمولا در ۳ تا ۷ روز جوانه می‌زنند. طی ۲ الی ۳ ماه اول رشد، گیاهچه های جوان به افزایش طول روز با رشد رویشی سریع‌تر واکنش نشان می‌دهند که با افزایش تعداد برگچه در هر برگ قابل شناسایی است. در اواخر فصل رویشی (بعد از اوج گرمای تابستان)، روزهای کوتاه‌تر (در واقع شب‌های بلند تر) گلدهی را القا می‌کند و دوره زندگی کامل می‌شود. شاهدانه زمانی که در معرض طول روزکوتاه ۱۲ الی ۱۴ ساعت یا کمتر قرار گیرد (طول شب ۱۰ الی ۱۲ ساعت یا بیشتر که به عرض جغرافیایی خاستگاه آن بستگی دارد) شروع به گلدهی می‌کند. هرچند یک شکست تاریکی می‌تواند گلدهی را مختل کند و بلوغ را به تأخیر بیاندازد، برعکس، یک یا دو طول روز کوتاه، می تواندگلدهی را القا کند که ممکن است دروواریته های دارای بلوغ زودرس غیر قابل بازگشت باشد. اگر یک گیاه به میزان کافی رشد، مثلاً از لحاظ تولید دانه یا تولید رزین برسد، شاخه‌های گل دهنده از نقاط رویشی کوچک قرار گرفته در پایه‌ی دمبرگ ها که از گره‌های موجود در امتداد ساقه منشأ می‌گیرند، شروع به رشد می‌کنند. دوره‌ی گل دهی با کاهش تعداد دمبرگ به همراه تغییر از رشد رویشی و تجمع زیتوده به منظور القای گلدهی، باروری، بلوغ دانه و تولید رزین قابل شناسایی است (Clarke,1981). شاهدانه به طور طبیعی گیاهی دو پایه است (گل‌های نر و ماده بر روی گیاهان مجزا تکامل می‌یابند)، تعیین جنسیت گیاه از نظر مورفولوژی قبل از گلدهی غیرقابل تشخیص است. با وجود این Mandolino و Ranalli (1999) کاربرد موفقیت آمیز آنالیز تصادفی DNA چند شکلی تغییر یافته را برای تشخیص مارکر های DNA مخصوص نر گزارش دادند و DNA چند شکلی مربوط به ماده نیز توسط Hong و همکاران توصیف شده است (Hong *et al.*, 2003). تکامل گل درگیاهان نر وماده بسیار متفاوت است. درحالی که گل‌های نر با ۵ گلبرگ و پرچم‌های واضح برروی خوشه‌ی بی پایه در امتداد شاخه‌ی نسبتاً عمودی بدون برگ، آویزان هستند؛ گل‌های ماده نامشخص هستند که توسط خوشه‌های متراکم و برگچه های کوچک احاطه شده‌اند و در پایه‌ی برگ اصلی در امتداد شاخه قرار دارند. دانه‌های گرده برای رسیدن به گل‌های ماده به جریان‌های باد نیاز دارند که پیامد آن باروری و تولید دانه است. گرده‌ی زیست پذیر می‌تواند توسط باد تا مسافت‌های طولانی حمل شود (Small *et al.*, 2003). گیاهان نر تولید گرده را بعد از ۲ تا ۴ هفته متوقف می‌کنند و معمولاً قبل از اینکه دانه‌ها در گیاه ماده برسند، می‌میرند. دانه در هر گل ماده در عرض ۳ تا ۸ هفته می‌رسد و یا توسط

پرندگان و جوندگان خورده می‌شود، یا بر روی زمین می‌افتد جایی که ممکن است بهار آینده تندش کند. این دانه دوره‌ی زندگی ۴ تا ۶ ماهه خود را کامل می‌کند. یک گیاه ماده‌ی بزرگ قادر است تا نیم کیلوگرم دانه تولید کند. دانه‌های شاهدانه منبع مناسبی از اسیدهای چرب ضروری و پروتئین‌های هضم شونده هستند و برای استفاده به عنوان غذای کامل یا مکمل‌های رژیمی مناسب هستند. اسیدهای چرب نقش‌های فیزیولوژیکی بسیار مهمی دارند و روغن دانه‌ی شاهدانه ماده مغذی ارزشمندی است (Deferne and pate, 1996). تحقیقات اخیر ثابت کرده است که استعمال روزانه‌ی روغن دانه‌ی شاهدانه در درمان ناراحتی‌های گوش، بینی و گلو مؤثر است (Grigoriev, 2002).

۱-۳- ترکیبات ثانویه گیاهی

شاهدانه ترکیبات ثانویه‌ی گوناگونی مانند فلاوونوئید ها، ترپنوئید ها (کانابینوئید ها)، آلکالوئیدها، لیگانامیدها وآمیدهای فنولی تولید می‌کند (Flores-Sanchez and Verpoorte, 2008).

۱-۳-۱- فلاوونوئیدها

در بین ترکیبات فنولی گیاهان، فلاوونوئید ها بیشتر مورد توجه قرار دارند، زیرا به نظر می‌رسد که آن‌ها در تمامی قسمت‌هایی که متابولیت های ثانویه‌ی گیاه نقش داشته‌اند دخیل بوده‌اند (Dakora, 1995). گزارش شده است که فلاوونوئید ها و سایر ترکیبات فنولی که از مسیر بیو سنتز فنیل پروپانوئید ها آمده‌اند، اثرات فیزیولوژیکی گوناگونی مانند فعال کننده و بازدارنده‌ی آنزیم، کلاتور فلز، آنتی اکسیدان، جمع کننده‌ی رادیکال آزاد، تنظیم کننده‌ی رونویسی، هورمون‌های گیاهی و به عنوان موتاژن، آنتی موتاژن، سرطان زا، ضد سرطان، سیتوتوکسیک، آنتی نئوپلاستیک، مواد ضد حساسیت و ضد آلرژی بر گیاهان و جانوران دارند. در گیاهان نشان داده شده که فلاوونوئیدها در جلوگیری از تخریب اشعه ماوراء بنفش، تغذیه معدنی، استرس خشکی و گرما، گرده افشانی و پراکندگی دانه (با ویژگی رنگشان) و به عنوان عوامل شیمیایی محافظ دائمی در برابر گیاهان دیگر، میکروب‌های بیماری زا، قارچ، حشرات و علفخواران نقش دارند. در نتیجه‌ی پاسخ ویژه‌ی گیاه به تغییر محیط اطرافش، فلاوونوئید ها و سایر متابولیت های فنولی ویژه تولید می‌شوند و تجمع می یابند (Dixon and Pative, 1995; Hahlbrock and Scheel,1989; Laks and Pruner,1989; Snyder and Nicholson, 1990).

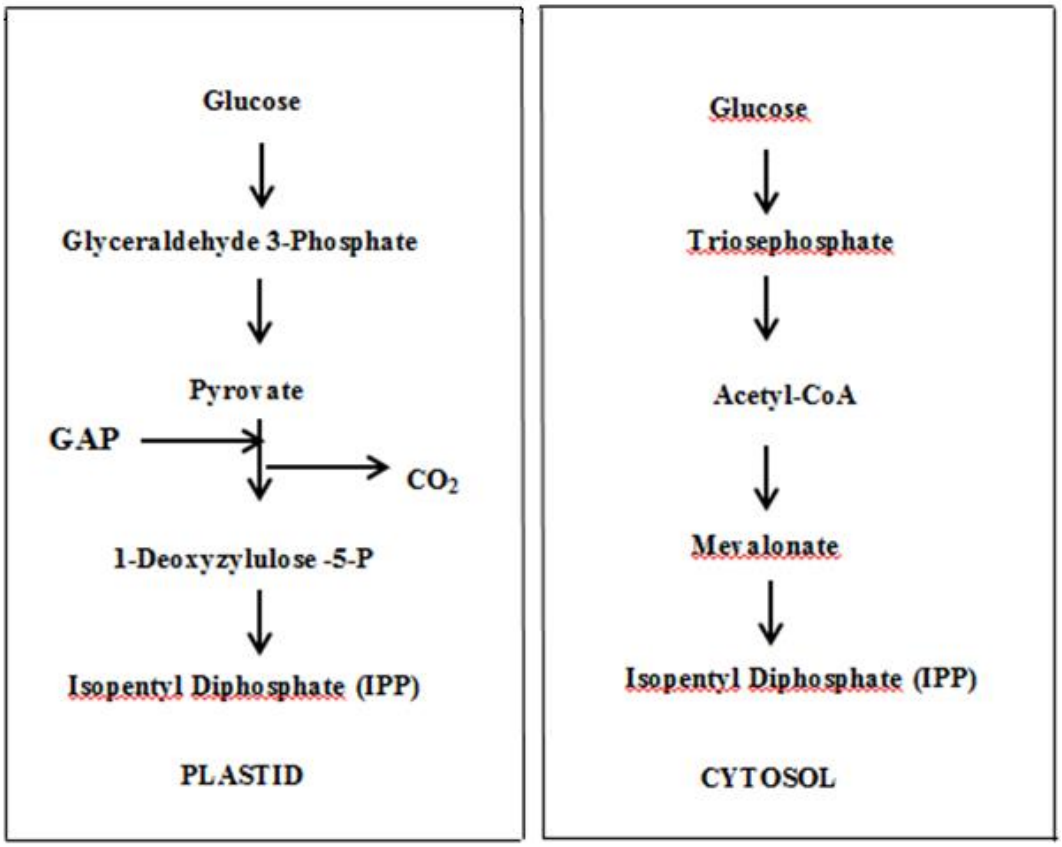
بیوسنتز فلاوونوئید در گیاهان دائمی است، در طی رشد و نمو نرمال مانند رشد رویشی و تکامل ارگان تولید مثلی، به صورت داخلی کنترل می شود (Heller and Forkmann, 1988). بیوسنتز

فلاوونوئید همچنین ممکن است با محرک خارجی مثل تغییر در نور و دما نیز تحریک شود (Hahlbrock and Scheel,1989). بیوسنتز یا تغییر و تبدیل فلاوونوئید های دائمی می‌تواند هدفمند باشد یا با تخریب گیاه با عوامل فیزیکی (باد، استرس خشکی، یخ زدگی، اوزون، یونهای فلزات سنگین، علف کش های خاص)، حمله‌ی علفخواران، حیوانات گله‌ای، هجوم حشرات (باکتری‌ها و قارچ‌ها) تحریک گردد (Ebel and Mithofer, 1998).

۱-۳-۲- ترپنوئیدها

این دسته بدون شک بزرگ‌ترین دسته‌ی متابولیت‌های ثانویه گیاهی بوده که بیش از ۲۷۰۰۰ مورد از آن‌ها گزارش گردیده است. ترپنوئیدها نه تنها از نظر گستردگی، بلکه از لحاظ ساختاری نیز بسیار متنوعند (Banthorpe and Charlwood, 1980). طبقه‌بندی ترپنوئیدها براساس تعداد واحد ایزوپرنوئید موجود در ساختارشان صورت می‌پذیرد.

پیش ساز اصلی در مسیر بیوسنتزی ترپنوئید ها، ایزوپنتنیل پیروفسفات (IPP) است. دو مسیراصلی سنتز IPP شناسایی شده است. یکی مسیر استات/ موالونات است که در سیتوزول (جزء سیال سیتوپلاسم) انجام می‌شود؛ در حالی که مسیر دیگر که اخیراً کشف شده است مسیر پیرووات/گلیسرآلدهید- ۳- فسفات است و در اندامک غشایی درون سلولی تخصص یافته‌ای به نام پلاستید (یا به طورمشخص لکوپلاست) رخ می‌دهد (Hallahan and Gray, 2000). این دو مسیردر شکل (۱-۱) نشان داده شده‌اند. بیوسنتز ترپن به طور مفصل توسط Croteau (۱۹۷۹) و Johnson (۱۹۹۹) مرور شده است.



شکل ۱-۱ دو مسیر بیوسنتز ایزوپنتنیل دی فسفات (IPP) در گیاهان که در پلاستید (سمت چپ) و سیتوزول (سمت راست) رخ می دهد.

۱-۳-۲-۱- کانابینوئید های شاهدانه

۱-۳-۲-۱-۱- تاریخچه

فیتوشیمی شاهدانه تا یک قرن بعد از زمان Von Bibra نامشخص بود. اولین کار انجام شده توسط Von Bibra، در نوشته‌ی معتبر Mechoulam درمورد شاهدانه آورده شده است که شامل شیمی، فارماکولوژی، متابولیسم و اثرات طبی شاهدانه می‌باشد (Mechoulam, 1973). کار انجام شده توسط Von Bibra در سال ۱۸۴۸ چاپ شده است (De Courtive, 1848; Gastinel, 1848).

Wood و همکارانش در اواخر قرن نوزدهم برای اولین بار موفق به جداسازی کانابینول خالص شدند (Wood *et al.*, 1899). بعد ازکارهای قابل ملاحظه‌ی صورت گرفته توسط سایر محققین، Mechoulam و Gaoni موفق به جداسازی ماده اصلی شاهدانه، (–)-Δ^1-۳،۴-ترانس-تتراهیدروکانابینول، شدند (Mechoulam and Gaoni, 1964). دوسال بعد، دومین ایزومر فعال کانابینول، (–)-Δ^6-۳،۴-ترانس- تتراهیدروکانابینول جداسازی شد (Hively *et al.*, 1966).

این ترکیبات و سایر کانابینوئیدها در گیاهان تازه به فرم اسیدهای کربوکسیلیک (اسیدهای تتراهیدرو کانابینول) مربوطه وجود دارند، که توسط حرارت، سوختن یا تجزیه‌های شیمیایی به فرم‌های فعال تبدیل می‌شوند.

۱-۳-۲-۱-۲- ویژگی و عملکرد کانابینوئید های شاهدانه

کانابینوئید ها یک گروه از ترکیبات ترپنوفنولیک ۲۱ کربنه هستند که فقط در گیاه شاهدانه یافت می‌شوند (Mechoulam and Gaoni, 1967). با پیشرفت در علم شیمی، سنتز کانابینوئید هایی مانند نابیلون (nabilone) (Ward and Holmes, 1985) و آجولمیک اسید (ajulemic acid) (Burstein *et al.*, 2004) انجام شد و گیرنده‌های داخلی کانابینوئیدی لیگاندهای شیمیایی گوناگون (اندوکانابینوئیدها مانند آناندامید،۲-آراشیدونویل گلیسرول) (Di Marzo, and Fontana, 1994)، کشف شد و از آن به بعد، واژه‌ی فیتوکانابینوئید برای این ترکیبات ویژه‌ی شاهدانه پیشنهاد شد (Pate, 1999). تجمع کانابینوئید ها بیشتر در تریکوم های غده‌ای گیاه دیده شده است (Hammond and Mahlberg, 1977). از مجموع ۵۳۷ ترکیب اصلی، ۱۰۹ فیتوکانابینوئید در شاهدانه گزارش شده است (Slade and Elsohly, 2009).

ترکیبات اصلی به صورت رزین در تریکوم های غده‌ای گیاهان ماده فراوان‌ترند و از زمانی که گل‌ها برای اولین بار ظاهر می‌شوند تا زمان بالغ شدن دانه‌ها تولید می‌گردند (Duke, 2001).

بر پایه‌ی میزان تتراهیدروکانابینوئید، گیاه شاهدانه دارای انواع فیبری و دارویی می‌باشد. ترکیب و میزان کانابینوئید در بین گیاهان شاهدانه بسیارمتغیر است. گیاهانی که دارای THCA[۱] بالا و CBDA[۲] پائین هستند ماری جوآنا[۳] نامیده می‌شوند، در حالی که گیاهانی که دارای THCA پائین و CBDA بالا هستند همپ[۴] نامیده می‌شوند. تفاوت‌های بسیاری در بین کانابینوئیدهای درون این کموتیپ های اصلی وجود دارد. اصلاح گیاه شاهدانه به منظور استفاده‌ی دارویی، در چند دهه‌ی اخیر منجر به افزایش ۱۱ درصدی میانگین سطوح THC در وزن خشک گلهای ماده شاهدانه شده است؛ با این روش، سطح THC در بعضی گیاهان تا ۲۳ درصد هم افزایش یافته است (Elsohly and Slade, 2005; Mehmedic *et al.*, 2010). خصوصیات دارویی و درمانی نژاد های *C.sativa* و THC گزارش شده است و توسط بسیاری از محققان مورد بررسی قرار گرفته است

---

[۱] تتراهیدروکانابینولیک اسید

[۲] کانابیدیولیک اسید

[3] marijuana

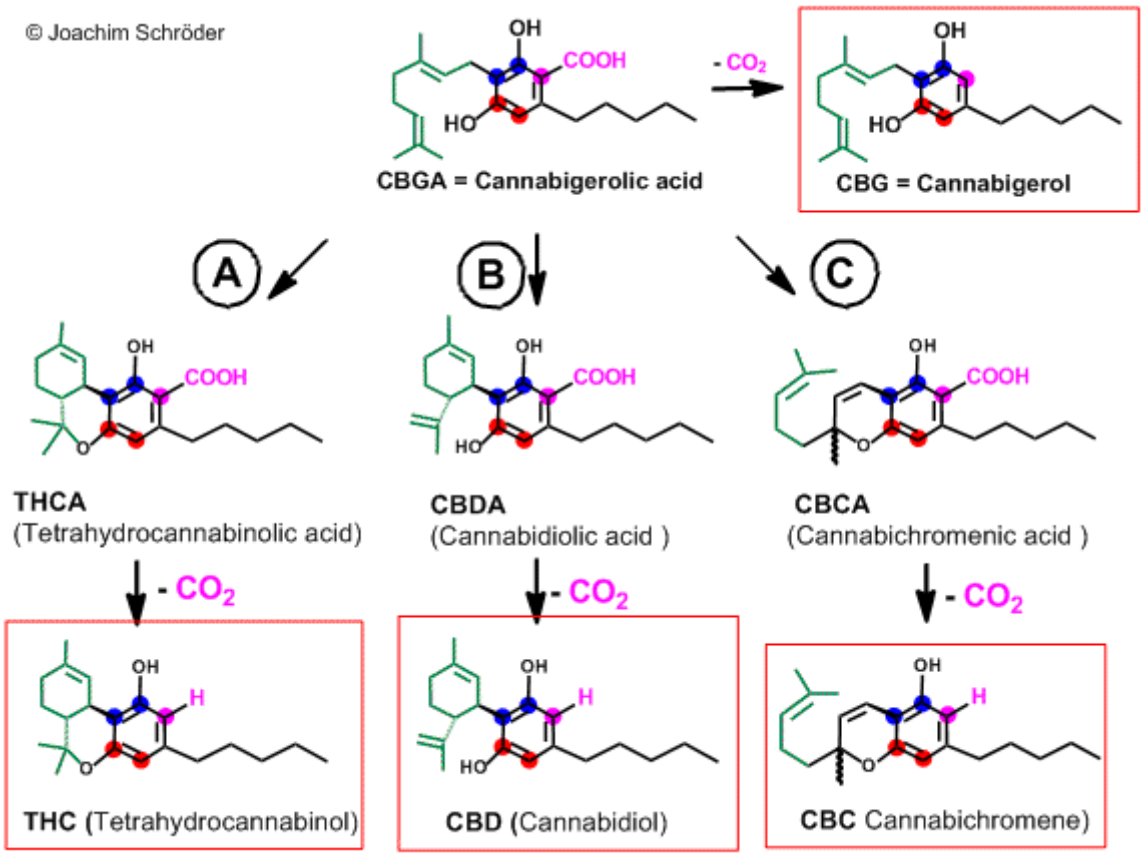
[4] hemp

(Brenneisen *et al.*, 1996). علاوه بر Δ^{9}- تتراهیدروکانابینول، دیگر کانابینوئید های اصلی شاهدانه شامل تتراهیدروکانابیوارین (THCV)، کانابیدیول (CBD)، کانابیکرومن (CBC)، کانابیگرول (CBG) و کانابینول (CBN) هستندکه در شکل ۱-۲ نشان داده شده‌اند.

Δ^{8}- تتراهیدروکانابینول، یکی دیگر از ایزومرهای بسیار مشابه با Δ^{9}- تتراهیدروکانابینول است که به ندرت یافت می‌شود (تصورمی شود که مصنوعی باشد) و اثر دارویی آن از THC کمتر است (Small and Marcus, 2003).

تتراهیدروکانابینول شاهدانه، ارزش تجاری بسیار بالایی در زمینه‌ی داروسازی دارد. به این دلیل که *C.sativa* منبع طبیعی THC است، تلاش برای انتخاب واریته های شاهدانه دارای بیشترین سطح ممکن تتراهیدروکانابینول در جریان است. با وجود این، به واسطه‌ی آلوگاموس[1] (باروری دورگه) ذاتی گونه‌ها، حفاظت از پروفایل شیمیایی گونه‌های تولید کننده‌ی تتراهیدروکانابینول انتخاب شده و رشدکرده از دانه، تحت شرایط مزرعه‌ای بسیار مشکل است. برای تولید وسیع شاهدانه، حفظ هموژنتیکی گیاهان کاشته شده مهم است. این امر با انتخاب مواد گیاهی دارای پروفایل شیمیایی مطلوب به دنبال تکثیر این گیاهان یا به صورت رویشی یا ریز ازدیادی[2] میسر می گردد.

[1] allogomous
[2] micropropagation



شکل ۱-۲- ساختمان مولکولی انواعی از کانابینوئید های اصلی شاهدانه.

۱-۳-۲-۱-۳- بیوسنتز کانابینوئید های شاهدانه

با وجود اینکه بیوسنتز کانابینوئید ها در سطح بیوشیمیایی یا ژنتیکی نامعلوم است، چندین آنزیم کلیدی برای مثال پلی کتید سنتاز و دو آنزیم اکسیدوسیکلاز شامل تتراهیدروکانابینولیک سنتاز *(THCAS)* و کانابیدیولیک اسید (CBDA) سنتاز شناسایی شده اندکه اسیدهای کانابینوئیدی اصلی را می سازند (Taura *et al.*, 2009; Potter *et al.*, 2008).

THC و CBDA به دلیل داشتن ۵ زنجیره‌ی کربنی که به نیمه‌ی آروماتیکی متصل هستند، کانابینوئید های «پنتیل» نامیده می‌شوند (شکل ۱-۳). از کانابینوئید های پنتیل دیگر کانابیکروم (CBC) و کانابیگرول (CBG) هستند. تمامی این‌ها آنالوگ‌های پروپیل دارند. اولین مرحله در سنتز کانابینوئید های پنتیل واکنش ادغام ژرانیل پیروفسفات (GPP) با الیوتولیک اسید[1] است. نتیجه تولید CBGA است که پیش ساز بلافصل سه کانابینوئید پنتیل اصلی THCA (Fellermeier *et*

[1] olivetolic acid