بسم الله الرحمن الرحيم

همه امتیازات این پایان‌نامه به دانشگاه لرستان تعلق دارد. در صورت استفاده از تمام یا بخشی از مطالب در مجلات، کنفرانس‌ها یا سخنرانی‌ها، باید نام دانشگاه لرستان(یا استاد یا اساتید راهنمای پایان‌نامه) و نام دانشجو با ذکر مأخذ و ضمن کسب مجوز کتبی از دفتر تحصیلات تکمیلی دانشگاه ثبت شود. در غیر این صورت مورد پیگرد قانونی قرار خواهد گرفت.

دانشگاه لرستان

دانشکده کشاورزی

پایان‌نامه

بهینه‌سازی کشت بافت گیاه دارویی *Papaver somniferum L.*

نگارش

فرشته ترابیان زلیوا

استاتید راهنما

دکتر فرهاد نظریان فیروزآبادی

دکتر احمد اسماعیلی

استاد مشاور

دکتر هادی احمدی

پایان‌نامه برای دریافت درجه کارشناسی ارشد در:

رشته کشاورزی- گرایش اصلاح نباتات

شهریور ماه ۱۳۹۰

چکیده

Papaver somniferum L. یکی از گیاهان دارویی متعلق به خانواده خشخاش است. (این گیاه) حاوی آلکالوییدهای دارویی بااهمیتی از جمله مورفین، کدیین، پاپاورین و نوسکاپین است. با وجود آن‌که تحقیقات زیادی در زمینه کشت بافت این گیاه(جنین‌زایی و باززایی) انجام شده است، اما هنوز هم یک روش قابل اطمینان در دسترس نیست. به منظور بررسی مرحله کال‌زایی در این گیاه یک آزمایش فاکتوریل با پنج تکرار و هر تکرار هشت ریزنمونه در قالب طرح کاملاً تصادفی طراحی شد. فاکتورهای مورد مطالعه شامل: محیط پایه (MS و B5)، 2,4-D (۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر)، BAP (۰/۱ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر)، اسید اسکوربیک (۰ و ۱۵ میلی‌گرم در لیتر)، دوره نوری (تاریکی کامل و روشنایی (۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی))و ریزنمونه(ریشه ، هیپوکتیل و کوتیلدون) بودند. داده‌ها با استفاده از تجزیه واریانس آنالیز شدند و میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن و در سطح احتمال ۰/۰۵ مقایسه شدند. القاء کالوس در محیط B5 قابل توجه بود و نتایج این مرحله از آزمایش نشان داد که محیط B5 نتایج بهتری از محیط MS تولید کرد. از میان دو سطح اکسین، محیط تکمیل شده با غلظت کمتر 2,4-D القاء کالوس بهتری را در مقایسه با غلظت بالاتر 2,4-D نشان داد. از میان دو سطح سیتوکینین، القاء کالوس در محیط دارای ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BAP بهتر بود و القاء کالوس با افزایش غلظت سیتوکینین کاهش یافت. نتایج نشان داد که از میان دو دوره نوری، تاریکی شرایط بهتری برای تحریک تشکیل کالوس بود. از همه انواع ریزنمونه کالوس به دست آمد اما در هیپوکتیل تعداد کالوس تولید شده بالاتر بود. از میان دو سطح اسکوربیک اسید استفاده شده در این آزمایش، القاء کالوس در محیط بدون اسید اسکوربیک بالاتر بود.

به منظور بررسی جنین‌زایی سوماتیکی، قطعات کالوس به سه محیط مختلف MS بدون هورمون، MS تکمیل شده با دو میلی‌گرم در لیتر BAP و MS تکمیل شده با دو میلی‌گرم در لیتر Kin منتقل شدند. کاهش غلظت تنظیم کننده رشد در محیط کشت رشد و نمو جنین را بهتر کرد. رشد و جوانه-زنی جنین‌های سوماتیکی در محیط MS بدون تنظیم کننده رشد موفقیت‌آمیز بود و محیط MS بدون هورمون نتایج بهتری را در مقایسه با محیط MS تکمیل شده با BAP و Kin داد.

سپاسگزاری

کلمات در ستایش تو اینگونه آغاز می‌شوند و شکل می گیرند و بعد دری باز می شود و دری بسته می‌شود. خورشیدی می‌آید و خورشیدی می‌رود و بعد هوا، هوای تو می‌شود. چرا که کلمات اینگونه‌اند چرا که تو کلمه‌ای و پیش از هر ابتدایی، کلمه را پادرمیانی کرده‌ای که باشد و هست. چقدر هم بوی تو را دارد. هنوز وقتی شکل می گیرد و بلند می‌شود، عطرش تمام جان و اندیشه را فرا می گیرد. دست می‌رساند به بودن، به شدن و اینکه قطره‌ای در هزار توی آینه‌ها به خویش نظر اندازد و دلی بردارد برای رسیدن، برای رها شدن و راهی شدن. کلمات اینگونه‌اند و اینگونه است که سمت تو مقدس است. سمت تو که بی نشان و صمیمی است. و چه اندک و بسیارند کسانیکه خورشیدهای ساکت راهند و نامیده می شوند به گل، ماه و آدمی در ادامه خود به او دل می‌بندند و به او سلام می کنند و اینگونه می‌شود که نام می‌بریم از امکان و شدن، از فراهم آوردن خشنودیت که لم یشکر المخلوق لم یشکر الخالق است.

از زحمات اساتید راهنمای عزیز آقایان دکتر فرهاد نظریان و دکتر احمد اسماعیلی قدردانی می‌نمایم.

از استاد بزرگوار، جناب آقای دکتر هادی احمدی که امر مشاوره این پایان نامه را پذیرفتند سپاسگزارم.

قدردان مهربانی ها و زحمات بی دریغ مسئول محترم آزمایشگاه بیوتکنولوژی سرکار خانم پروین نوروزی مقدم هستم و بهترین ها را برایش آرزو می کنم.

از جناب آقای دکتر رضا شیرزادیان و جناب آقای دکتر بهمن زاهدی که افتخار داده و داوری این پایان نامه را پذیرفتند، کمال تشکر را دارم.

و سپاس فراوان خود را نثار کلیه عزیزانی می‌نمایم که مرا در به انجام رسیدن این پایان نامه یاری نمودند.

و با تقدیر و تشکر از مادر مهربانم

و برادر عزیزم علی

فصل اول: مقدمه

۱-۱مقدمه ۱۲

فصل دوم: کلیات و بررسی منابع

۲-۱کلیات ۱۶

۲-۱-۱پیشینه و پراکنش گیاه دارویی خشخاش(*P. Somniferum* L.) ۱۶

۲-۱-۲خصوصیات گیاه‌شناسی ۱۶

۲-۱-۳مواد مؤثره ۱۷

۲-۱-٤موارد استفاده و خواص ۱۷

۲-۱-۵کشت بافت و جنین‌زایی سوماتیکی ۱۸

۲-۲سابقه پژوهش ۲۳

فصل سوم: مواد و روش‌ها

۳-۱مواد ۳۲

۳-۱-۱ماده گیاهی ۳۲

۳-۱-۲مواد کشت بافت ۳۲

۳-۲روش اجرای آزمایش ۳۲

۳-۲-۱تهیه محیط کشت بذر ۳۲

۳-۲-۳کشت بذر و تهیه ریزنمونه ۳۳

۳-۲-٤تهیه استوک ۳۳

۳-۲-۵تهیه محیط کال‌زایی ۳۳

۳-۲-٦کشت کالوس ۳۴

۳-۲-۷شرایط کشت برای کال‌زایی ۳۴

۳-۲-۸جنین‌زایی و باززایی ۳۴

۳-۳آنالیز آماری ۳۶

فصل چهارم: نتایج و بحث

٤-١کال‌زایی ۳۹

٤-٢جنین‌زایی ۶۳

٤-٣نتیجه‌گیری ۷۲

٤-٤پیشنهادات ۷۲

پیوست

پیوست ۱ ..... ۷۵

پیوست۲ ..... ۷۶

منابع و مأخذ

منابع داخلی و خارجی: ۷۸

شکل‌ها

شکل(۲-۱): اجزای گیاه *P. somniferum*..... ۱۷

شکل(۲-۲): جنین‌زایی سوماتیکی و جنین‌زایی زیگوتیکی در دو لپه‌ایها..... ۱۹

شکل(۴-۱): تشکیل کالوس در *P. Somniferum* L. ۳۹

شکل(۴-۲): نمودار اثر متقابل محیط × BAP بر درصد کال‌زایی ۴۴

شکل(۴-۳): نمودار اثر متقابل BAP × 2,4-D بر درصد کال‌زایی ۴۵

شکل(۴-۴): نمودار اثر متقابل محیط × اسید اسکوربیک بر درصد کال‌زایی..... ۴۶

شکل(۴-۵): نمودار اثر متقابل BAP × اسید اسکوربیک بر درصد کال‌زایی ۴۷

شکل(٤-٦) نمودار اثر متقابل محیط × دوره نوری بر درصد کال‌زایی..... ۴۸

شکل(۴-۷): نمودار اثر متقابل 2,4-D × دوره نوری بر درصد کال‌زایی ۴۹

شکل(۴-۸): نمودار اثر متقابل BAP × دوره نوری بر درصد کال‌زایی ۵۰

شکل(٤-۹): نمودار اثر متقابل محیط×ریزنمونه بر درصد کال‌زایی ۵۱

شکل(٤-۱۰): نمودار اثر متقابل 2,4-D × ریزنمونه بر درصد کال‌زایی..... ۵۳

شکل(۴-۱۱): نمودار اثر متقابل BAP × ریزنمونه بر درصد کال‌زایی ۵۵

شکل(۴-۱۲): نمودار اثر متقابل اسید اسکوربیک × ریزنمونه بر درصد کال‌زایی ۵۷

شکل(٤-۱۳): نمودار اثر متقابل دوره نوری × ریزنمونه بر درصد کال‌زایی ۵۹

شکل(٤-١٤): جنین‌زایی سوماتیکی در *P. somniferum* L. ۶۳

شکل(٤-۱۵): نمودار مرحله جنین‌زایی آزمایش شماره ۱..... ۶۶

شکل(٤-١٦): نمودار مرحله جنین‌زایی آزمایش شماره ۲..... ۷۰

شکل(۴-۱۷): باززایی در گیاه *Papaver somniferum* L. ۷۳

جداول

جدول(۳-۱): تیمارهای که برای نمو و رشد جنین در مرحله جنین‌زایی استفاده شد..... ۳۵
جدول(۳-۲): تیمارهای مرحله کال‌زایی استفاده شده برای آزمایش شماره یک ۳۵
جدول(۳-۳): تیمارهای مرحله کال‌زایی استفاده شده برای آزمایش شماره دو ۳۶
جدول(۴-۱): تجزیه واریانس آزمایش مرحله کال‌زایی ۴۲
جدول(۴-۲): مقایسه میانگین اثر متقابل محیط×BAP بر درصد کال‌زایی ۴۴
جدول(۴-۳): مقایسه میانگین اثر متقابل BAP×2,4-D بر درصد کال‌زایی ۴۵
جدول(۴-۴): مقایسه میانگین اثر متقابل محیط×اسید اسکوربیک بر درصد کال‌زایی..... ۴۶
جدول(۴-۵): مقایسه میانگین اثر متقابل BAP×اسید اسکوربیک بر درصد کال‌زایی ۴۷
جدول(۴-۶): مقایسه میانگین اثر متقابل محیط×دوره نوری بر درصد کال‌زایی..... ۴۸
جدول(۴-۷): مقایسه میانگین اثر متقابل 2,4-D×دوره نوری بر درصد کال‌زایی..... ۴۹
جدول(۴-۸): مقایسه میانگین اثر متقابل BAP×دوره نوری بر درصد کال‌زایی..... ۵۰
جدول(۴-۹): مقایسه میانگین اثر متقابل محیط×ریزنمونه بر درصد کال‌زایی ۵۱
جدول(۴-۱۰): مقایسه میانگین اثر متقابل 2,4-D×ریزنمونه بر درصد کال‌زایی ۵۲
جدول(۴-۱۱): مقایسه میانگین اثر متقابل BAP×ریزنمونه بر درصد کال‌زایی ۵۴
جدول(۴-۱۲): مقایسه میانگین اثر متقابل اسید اسکوربیک×ریزنمونه بر درصد کال‌زایی..... ۵۶
جدول(۴-۱۳): مقایسه میانگین اثر متقابل دوره نوری×ریزنمونه بر درصد کال‌زایی..... ۵۸
جدول(۴-۱۴): تجزیه واریانس آزمایش شماره ۱ مرحله جنین‌زایی سوماتیکی ۶۴
جدول(۴-۱۵): مقایسه میانگین اثر تیمار مرحله کال‌زایی×تیمار مرحله جنین‌زایی بر درصد جنین‌زایی در آزمایش شماره یک ۶۵
جدول(۴-۱۶): تجزیه واریانس آزمایش شماره دو مرحله جنین‌زایی ۶۷
جدول(۴-۱۷): مقایسه میانگین اثر سه‌جانبه تیمار مرحله کال‌زایی×تیمار مرحله جنین‌زایی×نوع ریزنمونه بر درصد جنین‌زایی در آزمایش شماره ۲ ..... ۶۸

فصل اول

مقدمه

۱-۱مقدمه

از قرن‌ها پیش، بشر برای غذا و پناهگاهش به گیاهان به عنوان منابعی از کربوهیدرات‌ها، پروتئین‌ها، و چربی‌ها کاملاً وابسته بوده است. علاوه بر این، گیاهان منابع باارزشی از مواد دارویی هستند و نقش کلیدی در دنیای سلامت دارند(Constable, 1990). تمام تمدن‌ها از زمان باستان تاکنون از گیاهان به عنوان دارو استفاده کرده‌اند. امروزه گیاهان دارویی در اقتصاد جهانی بااهمیت هستند (Srivastava *et al.*, 1995) . سازمان بهداشت جهانی تخمین زده است که بیش از ۸۰ درصد از جمعیت جهان در کشورهای در حال توسعه برای مراقبت‌های پزشکی اساسی وابسته به داروهای گیاهی هستند. همچنین استفاده از داروهای گیاهی در کشورهای توسعه یافته در حال افزایش است و ۲۵ درصد از جمعیت انگلیس بطور منظم از داروهای گیاهی استفاده می‌کنند(Vines, 2004).

در چند دهه گذشته توجه مجددی به مطالعه و استفاده از گیاهان دارویی و شناختن اهمیت این گیاهان در سیستم سلامت شده است(Mendelsohn and Balick, 1994). این آگاهی منجر به بالا رفتن تقاضا برای گیاهان دارویی شده است و بالا رفتن تقاضا برای این گیاهان با کاهش تدریجی ذخیره گیاهان دارویی جهان همراه بوده است(Bodeker, 2002) و اکنون ممکن است بین ٤٠٠٠ تا ١٠٠٠٠ گونه دارویی در معرض خطر انقراض باشند(Edwards, 2004).

امروزه در پزشکی مدرن گیاهان به عنوان منابعی از مواد دارویی به عنوان الگوهایی برای داروهای مصنوعی و به عنوان نشانگرهای طبقه‌بندی شده برای کشف ترکیبات جدید به کار می‌روند(Akerele,1992). سنتز ترکیبات فعال زیستی بطور شیمیایی به دلیل پیچیدگی ساختمانی این ترکیبات و هزینه بالای سنتز آنها دشوار است(Shimomura *et al.*, 1997). به همین دلیل گیاهان دارویی به عنوان مواد خام پایه در جزییات ترکیبات شیمیایی نیمه‌سنتزی پیچیده‌تر به کار می‌روند(Akerele,1992). بنابراین اکثر صنایع دارویی برای تهیه مواد خام مورد نیازشان برای استخراج ترکیبات دارویی بااهمیت بطور عمده وابسته به گیاهان دارویی وحشی هستند و در نتیجه تنوع ژنتیکی گیاهان دارویی در جهان به دلیل برداشت زیاد این گیاهان برای تولید مواد دارویی بدون در نظر گرفتن آینده به میزان هشداردهنده‌ای در معرض خطر قرار گرفته است. از این‌رو دانستن چگونگی نگهداری این گونه‌های دارویی باارزش برای آینده یک نیاز جدی و اساسی است (Akerele,1992).

علاوه بر این به‌طور کلی گیاهان دارویی رشد کرده در شرایط مزرعه در برابر حمله باکتری‌ها، قارچ‌ها و حشرات نیز حساس هستند که حمله این آفات می‌تواند محتوای دارویی فراورده‌های گیاهی را تغییر دهد(Laughlin and Munro, 1982; Murch *et al.*, 2000).

علاوه بر تمام موارد ذکر شده روش‌های تکثیر معمولی ابزار اصلی تکثیر گیاهان دارویی هستند و تکثیر این گیاهان با استفاده از این روش‌های معمولی به دلیل میزان کم بذر حاصل از آن‌ها و نیز جوانه‌زنی ضعیف این گیاهان زمان زیادی به طول می‌انجامد و این گیاهان برای رشدشان احتیاجات اکولوژیکی ویژه‌ای دارند(Vines, 2004).

از سوی دیگر یک سیستم مهندسی ژنتیک کارا که به دنبال بهره‌برداری تجاری از گیاهان تراریخت می‌باشد به وجود یک سیستم باززایی درون شیشه‌ای مناسب نیازمند است(Bhatia *et al.*, 2004).

از این رو تکنیک کشت سلول و بافت به عنوان وسیله‌ای برای تکثیر انبوه، نگهداری ژرم پلاسم گونه‌های در معرض انقراض و مطالعات دست‌ورزی ژنتیکی در گیاهان دارویی در نظر گرفته شده است(Dev, 1997). علاوه بر این از تکنیک کشت درون شیشه‌ای برای تولید ترکیبات فعال زیستی استفاده می‌شود(Sajc *et al.*, 2000) . همچنین گیاهان دارویی که به صورت درون شیشه‌ای تکثیر یافته‌اند منبع آماده‌ای از مواد گیاهی یک‌دست، استریل و ضدعفونی شده برای تعیین ویژگی‌های بیوشیمیایی و شناسایی اجزاء فعال فراهم می‌آورند(Miura *et al.*, 1987) . علاوه بر آن، ممکن است ترکیبات کشت بافت به دلیل شیوه‌های استخراج آسان و عدم حضور مقادیر زیادی از رنگ‌دانه‌ها آسان‌تر تصفیه شوند بنابراین هزینه تولید و فراوری این ترکیبات کاهش یابد(Chang *et al.*, 1994).

گیاه دارویی خشخاش (*Papaver somniferum* L.) یکی از قدیمی‌ترین گیاهان دارویی کشت شده است. این گیاه از آغاز تمدن به عنوان دارو و ماده دارویی استفاده شده است(Brownstein, 1993). این گیاه دارویی هنوز هم تنها منبع تجاری برای داروی مسکن مورفین، ضدسرفه کدیین و تعداد دیگری از بنزیل ایزوکینولین آلکالوییدهای دارویی با اهمیت همچون ماده بازکننده عروق و نرم کننده ماهیچه پاپاورین و ماده ضد سرفه و ضد سرطان نوسکاپین است(Hagel, 2007) . بسیاری از بررسی‌های انجام شده در زمینه کشت درون شیشه‌ای این گیاه با هدف تهیه یک منبع متناوب برای تولید آلکالوییدها بوده است، اما فقط مقدار کمی از این آلکالوییدها شناسایی شده‌اند و یا در مواردی این آلکالوییدها قابل تشخیص نبوده‌اند. این نتایج تأثیر عمده تمایز سلولی را بر بیوسنتز این آلکالوییدها نشان داده است(Ikuta *et al.*, 1974). از زمانی که تجمع این ترکیبات همراه با اندام‌زایی و جنین‌زایی گزارش شده است، تحقیقات زیادی در زمینه اندام‌زایی و جنین‌زایی در این گیاه صورت گرفته است. به هر جهت هنوز هم یک پروتکل جنین‌زایی و باززایی قابل اطمینان در دسترس نمی‌باشد.

الف.اهداف این آزمایش

تعیین بهترین ریزنمونه، بهترین محیط کشت و بهترین ترکیب هورمونی و باززایی گیاهان کامل از ریزنمونه‌های مختلف گیاه *P. somniferum* L. است.

ب.فرضیات این آزمایش

۱- مقادیر بالای هورمون‌های مصنوعی از اندام‌زایی جلوگیری می‌کند.

۲- ریزنمونه‌های مختلف همگی قابلیت کشت بافت دارند.

۳- محیط‌های متفاوت کشت (B5 و MS)در کشت بافت این گیاه یکسان عمل می‌کنند.

فصل دوم

کلیات و بررسی منابع

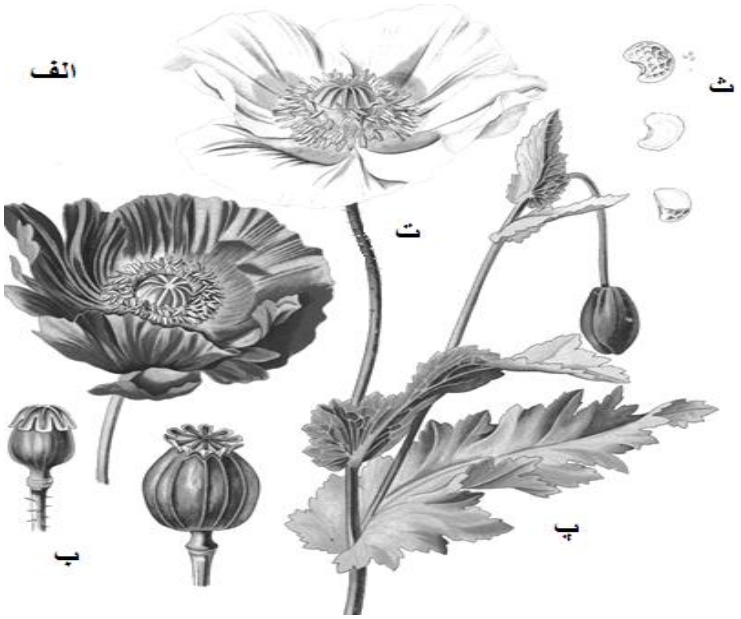
۲-۱کلیات

۲-۱-۱پیشینه و پراکنش گیاه دارویی خشخاش(*P. Somniferum* L.)

این گیاه دارویی یکی از انگشت‌شمار گیاهانی است که قدمت کاشت آن به ماقبل تاریخ می‌رسد. خاستگاه واقعی این گیاه چندان مشخص نیست، با این حال مطالعات گیاه‌شناسی و مولکولی خاستگاه این گیاه را آسیای میانه، ایران، هند و افغانستان می‌داند(Simonds, 1976). بقراط در ٤٦٠ سال قبل از میلاد شیره حاصل از *P. somniferum* را به عنوان بندآورنده خون و مسکن تأیید کرده است ,Booth). (1998 ابن‌سینا پزشک و فیلسوف ایرانی(۱۰۳۷-۹۸۰ میلادی) شیره(تریاک) را به عنوان قوی‌ترین داروی مسکن معرفی کرده است و برای درمان بیماری‌های چشم و اسهال توصیه کرده است(Kapoor, 1995). جنس papaver در سراسر دنیا پراکنش دارد(Kapoor, 1995) و بیش از ۹۹ گونه است(Bernath and Tetenyi, 1981). این جنس در ایران بیش از ۲۸ گونه است(مظفریان، ۱۳۷۵). گیاه دارویی .*p. somniferum* L به صورت وحشی یافت نمی‌شود و در اغلب مناطق دنیا به صورت کشت شده و اهلی است(Shuljgin, 1969).

۲-۱-۲خصوصیات گیاه‌شناسی

.*P. Somniferum* L گیاهی است یک‌ساله و دیپلویید(2n=22) متعلق به خانواده Papaveraceae (Tetenyi,1997)، با ریشه‌های سطحی، دارای ساقه سبز، برافراشته و بی‌کرک که از ماده‌ای مومی پوشیده شده است. برگ‌ها منفرد، متناوب با رنگ سبز غبارآلود و دارای تقسیمات عمیق دندانه‌دار که در برگ‌های فوقانی این بریدگی عمیق‌تر و نامنظم‌تر است (بخش‌های پ و ت شکل ۲-۱)(علوی، ۱۳۵۳). دارای یک گل منفرد است که بسته به واریته رنگ آن سفید، قرمز و یا ارغوانی است.میوه آن کپسول کروی یا گویچه‌ای شکل می‌باشد. این کپسول‌ها بسته به واریته حاوی بذور سفید، خاکستری یا سیاه رنگ هستند (بخش‌های الف ، ب و ث شکل ۲-۱)(Bruneton, 1995). این گیاه دارای سلول‌های خاصی به نام لاتیسیفر(سلول‌های شیرابه‌ای) است که بندبند بوده(Esau, 1965) و در تمام اندام‌های گیاه یافت می‌شود(Nessler and Mahlberg, 1976). این سلول‌ها حاوی شیره شیری رنگی به نام لاتکس می‌باشند(Bernath and Tetenyi, 1982).



شکل ۲-۱: اجزای گیاه *P. somniferum* :الف)گل. ب)میوه (کپسول). پ)برگ. ت)ساقه. ث)بذر

۲-۱-۳مواد مؤثره

مورفین با ۲۰/۸٦ – ۹/۲۰ درصد و نارکوتین یا نوسکاپین با ۱۷/۹۷ – ۸/۷۹ درصد بیشترین آلکالوییدهای شیره یا لاتکس را تشکیل می‌دهند(Shukla *et al.*, 2006). کدیین با ٦/٤٨ – ۱/٦۹ درصد، تبایین با ۷/۹۵ – ۰/۵۲ درصد و پاپاورین با ٦۷۰۷ – ۰ درصد دیگر آلکالوییدهای موجود در *P. somniferum* L. را تشکیل می‌دهند(Shukla *et al.*, 2006).

۲-۱-٤موارد استفاده و خواص

این گیاه یک محصول چند منظوره است و به عنوان دارو و گیاه زینتی استفاده می‌شود و نیز دانه‌های آن به عنوان منبعی از روغن گیاهی شناخته شده است(Dewick, 2002). از روغن بذر این گیاه در تهیه روغن جلا، رنگ‌های خالص و همچنین تهیه عطر و صابون استفاده می‌شود. همچنین کنجاله به دست آمده از بذر خشخاش به دلیل میزان بالای پروتئین، خوراک بسیار مناسبی برای دام است(Verma *et al.*, 1999). امروزه آلکالوییدهای خالص گیاهان جنس خشخاش در داروهای استاندارد شده جهت کاهش دردهای شدید مانند دردهای بیماران سرطانی و نیز داروهای ضدسرفه مصرف می‌شوند. مورفین و کدیین به عنوان کاهنده درد و کدیین و نوسکاپین به عنوان ضدسرفه استفاده می‌شوند. تریاک و مورفین سبب یبوست می‌شوند و به عنوان داروی ضداسهال مورد استفاده قرار می‌گیرند(صفایی‌خرم و همکاران، ۱۳۸۷).

۲-۱-۵کشت بافت و جنین‌زایی سوماتیکی

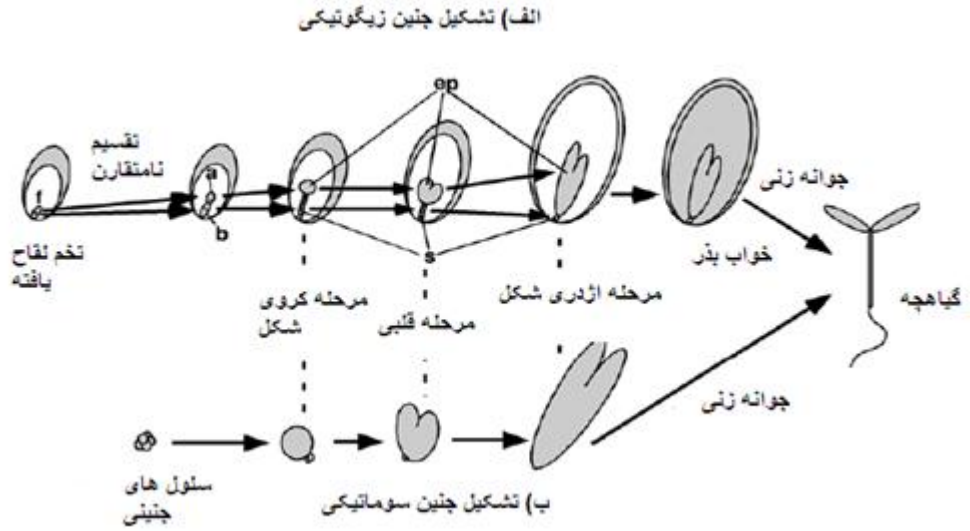
کشت بافت و سلول گیاهی توانایی باززایی و تکثیر گیاهان از سلول‌ها، بافت‌ها و اندام‌ها تحت شرایط محیطی کنترل شده و استریل می‌باشد (Murashige and Skoog, 1974). در سال ۱۸۳۸ شوان[۱] و شلیدن[۲] تئوری توتیپوتنسی[۳] را ارائه نمودند. بر اساس این تئوری، هر سلول مستقل بوده و در اصل قادر به تولید یک گیاه کامل است. اولین تلاش در زمینه کشت بافت گیاهی به وسیله هابرلنت[٤] در سال ۱۹۰۲ انجام شد. اما او در روش کشت بافت ناموفق بود. در سال ۱۹۳۹ نوبکرت[٥]، گوتریت[٦] و وایت[۷] برای اولین بار موفق به تولید گیاه حاصل از کشت بافت شدند(باقری و صفاری، ۱۳۷٦).

کشت بافت اصطلاحی است که برای رشد هر نوع سلول تمایز نیافته بر روی محیط کشت جامد و یا در محیط مایع(کشت سوسپانسیون) به کار برده می‌شود. درتکنیک کشت بافت فاکتورهایی همچون هوا، دما، موانع فیزیکی، فصل و حشرات که بر رشد گیاهان تأثیر می‌گذارند حذف می‌شوند و گیاهان تحت شرایط استاندارد کنترل می‌شوند. همچنین در این تکنیک فضای بسیار کمی مورد نیاز است (George *et al*, 2008). هر گیاه شامل اندام‌های متفاوتی است که هر یک از این اندام‌ها از معدودی بافت تشکیل شده‌اند و بافت‌ها نیز به نوبه خود از سلول‌های اختصاصی به وجود آمده‌اند. از آن‌جایی که گیاه از مواد ساختمانی بسیار متفاوتی تشکیل شده است، انواع مختلفی از کشت درون شیشه‌ای نیز وجود دارد که عبارتند از: کشت گیاه کامل، کشت جنین، کشت اندام گیاهی، کشت کالوس، کشت سلول و کشت پروتوپلاست(باقری و صفاری، ۱۳۷٦).

1-sckwann 2-shelayden 3-Totipotency 4-Haberlandt
5-Nobécourt 6-Gautheret 7-White

در کنار استفاده از تکنیک کشت بافت برای تکثیر رویشی سریع گیاهان، این تکنیک حداقل چهار کاربرد دیگر نیز دارد که از پتانسیل تجاری برخوردارند: رفع بیماری از گیاهان به ویژه بیماری‌های ویروسی، نگهداری ذخایر گیاهی عاری از بیماری، آسان‌سازی تغییر ژنتیکی و مهندسی ژنتیک در گیاهان و تولید محصولات شیمیایی با ارزش (George *et al.*, 2008). شیوه‌های تجربی استفاده شده برای تکثیر گیاهان دارویی از طریق کشت بافت در سه دسته وسیع طبقه بندی شده است. رایج‌ترین شیوه جداسازی اندام‌های مریستمی همچون نوک ساقه‌ها و جوانه‌های انتهایی و تبدیل آن‌ها به گیاهان کامل است. از این سیستم از تکثیر، معمولاً تحت عنوان ریزازدیادی یاد می‌شود. در شیوه دوم نوساقه‌های نابجا از قطعاتی از برگ، ریشه یا ساقه و یا از کالوس تشکیل شده از این اندام‌ها به وجود می‌آیند. سومین سیستم تکثیر گیاهان دارویی مستلزم القاء جنین‌زایی سوماتیکی[1] در کشت کالوس و یا کشت سلولی است (Rout *et al.*, 2000).

استوارد و همکاران نخستین کسانی بودند که باززایی گیاه را از طریق تولید جنین سوماتیکی در سلول‌های کشت شده گیاه هویج مشاهده نمودند (Steward *et al.*, 1958). جنین سوماتیکی از یک سلول ایجاد می‌شود که تقسیم شده و سلول‌های پیش‌جنینی[2] را تشکیل می‌دهند (Haccius, 1978). در جنین‌زایی سوماتیکی، سلول سوماتیکی می‌تواند به یک جنین کامل همانند جنین زیگوتیکی تبدیل شود. ساختار قطبی جنین سوماتیکی حاوی مریستم ریشه و ساقه است (Park *et al.*, 2009).



شکل ۲-۲: جنین‌زایی سوماتیکی و جنین‌زایی زیگوتیکی در دو لپه‌ایها: الف) جنین زیگوتیکی. ب) جنین سوماتیکی

1-Somatic embryogenesis 2-Pro-embryoid

صرف نظر از شیوه تشکیل جنین، خصوصیات فیزیولوژیکی و آناتومیکی جنین‌های سوماتیکی بسیار شبیه جنین‌های زیگوتیکی است(Zimmerman, 1993). در گزارشی با مطالعه گونه‌ای از اوکالیپتوس مشخص شد که جنین‌های سوماتیکی برحسب اندازه کلی، مورفولوژی و تشکیلات درون سلولی شباهتهای زیادی با جنین‌های زیگوتیکی دارند(Bandyopadhyay and Hamill, 2000). علاوه بر این زیمرمن[1] تأکید می‌کند که مراحل رشد زمانی و مورفولوژیکی در جنین سوماتیکی بسیار شبیه جنین زیگوتیکی است و هر دو به واسطه مجموعه‌ای از مراحل متمایز رشد می‌کنند و به یک گیاه کامل تبدیل می‌شوند که این مراحل در دو لپه‌ایها مراحل کروی، قلبی، اژدری و کوتیلدونی (Zimmerman, 1993) و در تک لپه‌ایها مراحل کروی، طویل شدن، فلسی و کلئوپتیلی شدن نامیده می‌شوند (Gupta and Conger, 1999). در جنین زیگوتیکی تخم به شکل نامتقارن و عرضی به یک سلول کوچک رأسی و یک سلول بزرگ پایه تبدیل می‌شود. سلول رأسی به سلول مستعد جنین تبدیل می‌شود. در حالی که سلول پایه به یک نگهدارنده تبدیل می‌شود که به بافت مادری متصل باقی می‌ماند و مواد غذایی و تنظیم کننده‌های رشد را برای رشد و نمو سلول مستعد جنین فراهم می‌آورد(بخش الف شکل ۲-۲). رشد و توسعه سلول مستعد جنین در سه مرحله قابل تشخیص است: تثبیت سازمانی به عنوان جنین، تجمع و ذخیره‌سازی مواد در جنین و کسب تحمل به خشک شدن و خواب بذر(Umehara *et al.*, 2007).

تشکیل جنین سوماتیکی به صورت زیر خلاصه می‌شود: ابتدا در سلول‌های تمایز یافته، تمایز زدایی صورت می‌گیرد که در نتیجه این سلول‌ها شروع به تقسیم می‌نمایند. به این ترتیب توده‌ی تمایز نیافته‌ای از سلول‌هایی با پارانشیم حفره‌دار ایجاد می‌شود(بخش ب شکل ۲-۲). این سلول‌ها سپس تبدیل به سلول‌هایی با سیتوپلاسم کامل می‌شوند که تحت تأثیر اکسین تولید جنین می‌نمایند. سلول‌های جنینی که از آن‌ها جنین‌واره منشأ می‌گیرند خصوصیاتی از خود نشان می‌دهند که مربوط به سلول‌هایی است که در حال تقسیم سریع هستند. این خصوصیات عبارتند از: اندازه‌ی کوچک، محتوای سیتوپلاسمی متراکم، هسته‌های بزرگ با هستک‌های مشخص، واکوئل‌های کوچک و دانه‌های فراوان نشاسته. شیمی سلولی و ترکیب فیزیکوشیمیایی نهایی پروتوپلاسم این سلول‌ها دلالت بر ساخت RNA و فعالیت متابولیکی دارد(Williams and Maheswaran, 1985).

1-Zimmerman