بسم الله الرحمن الرحيم

کلیه امتیازهای این پایان‌نامه به دانشگاه بوعلی سینا تعلق دارد. در صورت استفاده از تمام یا بخشی از مطالب این پایان‌نامه در مجلات، کنفرانس‌ها و یا سخنرانی‌ها، باید نام دانشگاه بوعلی سینا یا استاد راهنمای پایان‌نامه و نام دانشجو با ذکر مأخذ و کسب مجوز کتبی از دفتر تحصیلات تکمیلی دانشگاه ثبت شود. در غیر این صورت مورد پیگرد قانونی قرار خواهد گرفت. درج آدرس‌های ذیل در کلیه مقالات خارجی و داخلی مستخرج از تمام یا بخشی از مطالب این پایان‌نامه در مجلات، کنفرانس‌ها و یا سخنرانی‌ها الزامی می‌باشد.

مقالات خارجی

……..……, **Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran.** ……

مقالات داخلی

……، **گروه** ……، **دانشکده** ……، **دانشگاه بوعلی سینا، همدان.**

دانشکدهٔ کشاورزی
گروه آموزشی بیوتکنولوژی

پایان‌نامه برای دریافت درجه کارشناسی ارشد در رشته کشاورزی گرایش بیوتکنولوژی

عنوان:

اثر برخی محرک‌های شیمیایی بر تولید متابولیت ثانویه نورآدرنالین در ریشه موئین تراریخت گیاه خرفه (*Portulaca olerace* L.)

استاد راهنما:
دکتر خسرو پیری

نگارش:
کیانا پیریان

22 آبان 1390

تقدیم به

پدر و مادر مهربان

و

همسر عزیزم

من ام تشکر را در اخلاق ام تشکر ارخالق

اکنون که بر فرازهای سال تحصیل به افتخار ارتقاء، سرشارم از سپاس و ستایش ایزدی گیارم هزار مرتبه تا زگر تیره بی انتهای لطفش گذر از ورطه یکبار از زندگانیم را تجربه نمایم.

صمیمانه این سپاسهای خودرا نثار عزیزترین های زندگی ام مینمایم:

از پدر و مادرگرانمایه بزرگوارم، منشی، فداکاری، مهربانی و گذشت بکمال تشکر را دارم. انچه مرعزیزم که گر من ها و کمک های بی شائبه شان هر واره بدرقه راهم بوده و هست هیچ پنداین از گفتار و نوشتار مشوق من بوده بیمانه سپاسگزارم.

بر خود واجب میدانم تا مراتب احترام و تقدیر خود را از انجام این پژوهانه بیش نبرند تشکر و قدردانی نمایم.

مراتب سپاس و قدردانی خودرا از استاد راهنمای بزرگوارم جناب آقای که تمام کمبودها پیش مرا فرا گرفتند. در عرصه علم و دانش استاد من باشند، درس زندگی به من آموختند و در همه حال مرا از تشویق و حمایت های دریغ و راهنمایی های بی شائبه. خود همواره یاری رساندند بهره مند دارم.

از اساتید گرانقدر جنابان دکتر علی دبیر و دکتر محمد رضا میرزایی اصل و سرکار خانم دکتر سنبل ناظری که افتخار شاگردیشان را در طول تحصیل داشتم، تشکر و قدردانی میکنم.

از سرکار خانم استاد احمدی مسئول آزمایشگاه بیوشیمی و سرکار خانم قیاروند مسئول آزمایشگاه ژنتیک سلولی دانشگاه علوم پزشکی همدان به خاطر کمک ها و همکاری بی دریغشان، تشکر و قدردانی میکنم.

در پایان از همه کلاسی های خوبم و بچه های ورودی ۸۷ و ۸۸ در طول دوران کارشناسی ارشد یاری بنده بودند، بسیار سپاسگزارم.

کیانا پیریان

پاییز ۱۳۹۰

دانشگاه بوعلی سینا

مشخصات رساله/پایان نامه تحصیلی

عنوان:

اثر برخی محرک های شیمیایی بر تولید متابولیت ثانویه نورآدرنالین در ریشه موئین گیاه خرفه (*Portulaca oleracea* L.)

نام نویسنده: کیانا پیریان

استاد راهنما: دکتر خسرو پیری

استاد مشاور: -

دانشکده: کشاورزی | **گروه آموزشی: بیوتکنولوژی**

رشته تحصیلی: مهندسی کشاورزی | **گرایش: بیوتکنولوژی** | **مقطع تحصیلی: کارشناسی ارشد**

تاریخ تصویب : ۱۳۸۹/۸/۱۰ | **تاریخ دفاع: ۱۳۹۰/۸/۲۲** | **تعداد صفحات: ۱۰۰**

چکیده:

بشر با شناخت گیاهان دارویی مختلف به شفا بخشی و اثرات درمانی این گیاهان پی برد و به منظور پیشگیری و درمان بیماری از آنها استفاده کرد. تقریبا یک چهارم داروهای تولید شده حاوی عصاره‌های گیاهی یا ترکیباتی هستند که از مواد گیاهی به دست آمده‌اند. با استفاده از پیشرفت‌های بیوتکنولوژی،تولیدات طبیعی گیاهان می توانند منبع عظیمی از ترکیبات شیمیائی جدید با منشاء گیاهی را برای کاربردهای گوناگون فراهم کنند. کشت بافت گیاهان دارویی به عنوان یک راه حل مناسب جهت تولید متابولیت‌های ثانویه با ارزش معرفی شده‌است. اخیرا کشت ریشه‌های موئین به عنوان یک منبع پایدار برای تولید متابولیت‌ها پیشنهاد شده است. ریشه‌های مویین با استفاده از آگروباکتریوم ریزوژنز تولید می‌شوند. بزرگترین مزیت کشت ریشه‌های مویین این است که اغلب در مقایسه با گیاهان مادری، توان بالایی در تولید متابولیت‌های ثانویه دارند. گیاه خرفه دارای متابولیت‌های ثانویه با ارزشی همچون نورآدرنالین است. این متابولیت در درمان شوک‌های عصبی و عفونی کاربرد دارد. از آنجا که این گیاه در حالت طبیعی متابولیت‌های ثانویه کمی تولید می‌کند، در نتیجه برای افزایش متابولیت‌های ثانویه و توسعه درحد تجاری، استفاده از روش القاء ریشه موئین می‌تواند مثمر ثمر واقع شود. در این تحقیق جهت ایجاد ریشه‌های موئین در گیاه خرفه از باکتری آگروباکتریوم ریزوژنز استرین AR15834 استفاده گردید که در نهایت منجر به تولید ریشه‌های مویین از این گیاه شد. عوامل مختلفی از قبیل نوع ریزنمونه، سن گیاهچه، مدت زمان‌های مختلف آلودگی، مدت هم کشتی، غلظت باکتری، استرین‌های مختلف باکتری برای افزایش تراریختی گیاه خرفه مورد بررسی قرار گرفتند. محیط کشت‌های مختلف از قبیل MS، ۱/۲MS، B5 و W بمنظور رشد بهتر ریشه‌های موئین بررسی شدند و محیط کشت ۱/۲MS بعنوان محیط کشت مناسب برای رشد ریشه‌ها بخاطر تولید زی توده بیشتر انتخاب گردید. جهت تأیید تراریختی ریشه‌های موئین تولید شده، آنالیزPCR با استفاده ازآغازگر اختصاصی ژن rolB انجام پذیرفت. نتیجه آنالیز PCR، وجود باندهای تشخیصی مربوط به تکثیر اختصاصی ژن rolB را با اندازه ۷۸۰ جفت بازی نشان‌داد و بدین ترتیب تراریختی ریشه‌های مؤیین تأیید شد. پس از ایجاد ریشه‌های موئین در گیاه خرفه، میزان تولید متابولیت‌های ثانویه در این ریشه‌ها با استفاده دستگاه HPLC ارزیابی گردید. نتاج حاصل نشان‌داد که میزان نورآدرنالین در ریشه‌های موئین(لاین A) نسبت به ریشه‌های طبیعی (Non-HR) گیاه ۱۲ برابر افزایش داشت. ۴ لاین ریشه موئین جداسازی و میزان نورآدرنالین آنها اندازه گیری گردید. بمنظور افزایش تولید نورآدرنالین در ریشه - های موئین (لاین A) از محرک‌های شیمیایی متیل‌جازمونات و اسیدسالسیلیک و محرک زیستی عصاره مخمر در غلظت‌های مختلف استفاده گردید و مشخص شد که متیل‌جازمونات ۲۰۰ میکرومول در تولید نورآدرنالین ۸ برابر افزایش را نسبت به شاهد (صفر میکرومول) نشان داد و نیز تیمارهای غلظتی ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم عصاره مخمر به ترتیب ۳ و ۵ برابر افزایش نورآدرنالین را نشان دادند.

کلمات کلیدی: آگروباکتریوم ریزوژنز، ریشه‌های موئین، خرفه، نورآدرنالین، متیل جازمونات، اسید سالیسلیک، عصاره مخمر

فهرست مطالب صفحه

چکیده..... 1
مقدمه..... ۲
فصل اول: بررسی منابع
۱-۱- گیاهان دارویی ۴
۱-۱-۱- مقدمه..... ۴
۱-۱-۲- تاریخچه..... ۴
۱-۱-۳- تعریف گیاهان دارویی ۵
1-1-4- اهمیت گیاهان دارویی..... 6
1-1-5- اهمیت اقتصادی گیاهان دارویی ۷
۱-۲- متابولیت های ثانویه گیاهی ۸
۱-۲-۱- نقش متابولیت‌های ثانویه در گیاه..... ۸
۱-۲-۲- اهمیت پزشکی و دارویی متابولیت‌های ثانویه..... ۹
۱-۲-۳- طبقه بندی متابولیت های ثانویه ۱۰
الف- آلکالوئیدها ۱۰
ب- گلیکوزیدها..... ۱۰
پ- ترکیبات فنولیک ۱۰
ت- ترپنوئیدها ۱۱
۱-۲-۴- مسیرهای عمومی سنتز متابولیت‌های ثانویه ۱۱
۱-۳ بیوتکنولوژی و تولید متابولیت های ثانویه گیاهی ۱۲
۱-۳-۱- استفاده از علم بیوتکنولوژی در راستای تولید متابولیت های ثانویه با خواص دارویی ۱۲
۱-۳-۲- کشت بافت..... ۱۲
الف- ریز ازدیادی ۱۳
ب- کشت سلول گیاهی..... ۱۳
پ- کشت اندام ۱۳
۱-۴- ریشه‌های مویین تراریخت در گیاهان ۱۴
۱-۴-۱- تعریف ریشه‌های مویین..... ۱۵
۱-۴-۲- معرفی آگروباکتریوم..... ۱۵
۱-۴-۳- معرفی آگروباکتریوم رایزوژنز و ساختار اولیه پلاسمید Ri..... ۱۶
۱-۴-۴- نژادهای اگروباکتری‌وم رای‌زوژنز..... ۱۷
۱-۴-۵- بررسی مکانیسم مولکولی و عوامل موثر در انتقال DNA از آگروباکتریوم به سلول گیاه..... ۱۸
الف- حرکت آگروباکترویوم به سمت بافت زخمی گیاه ۱۸
ب- القاء اپران های بیماریزایی آگروباکتریوم..... ۱۸
پ- فرآیند ایجاد مولکول T-DNA تک رشته ایی برای انتقال..... ۱۹
ت- ماکرومولکول‌هایی که از آگروباکتریوم به سلول گیاه منتقل می شوند..... ۲۰

ث- وارد شدن ماکرومولکول های بیماریزا به هسته سلول گیاه ۲۱
ج - ادغام شدن مولکول T-strand به داخل ژنوم گیاه ۲۲
۱-۴-۶- عوامل موثر در تشکیل ریشه‌های مویین ۲۲
الف- بیماریزا بودن نژاد اگروباکتریوم رایزوژنز ۲۲
ب- نوع محیط کشت ۲۲
پ- سن و طبیعت ریزنمونه ۲۲
1-4-7-اهمیت کشت ریشه‌های مویین در تولید متابولیت ثانویه گیاهان 22
۱-۴-۸-افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه از کشت ریشه‌های مویین ۲۳
۱-۴-۹-تایید تراریختی در ریشه‌های مویین ۲۴
الف- استفاده از نشانگرهای بیوشمیایی ۲۴
ب- استفاده از نشانگرهای ژنتیکی ۲۴
پ- استفاده از نشانگرهای مرفولوژیکی ۲۵
۱-۴-۱۰- مزیت کشت ریشه‌های مویین ۲۵
۱-۵- استراتژی‌های افزایش متابولیت‌های ثانویه در کشت ریشه‌های مویین ۲۶
۱-۵-۱ دستورزی مواد غذایی محیط کشت ۲۶
۱-۵-۲-آزمایش و انتخاب لاین‌های ریشه مویین با تولید بالا ۲۶
۱-۵-۳-مهندسی متابولیت ۲۷
۱-۵-۴-استفاده از محرک‌ها ۲۷
۱-۶- محرک‌ها ۲۷
۱-۶-۱- محرک‌ها و تحریک ۲۸
۱-۶-۲- طبقه بندی محرک‌ها ۲۸
۱-۶-۳- مکانیسم تحریک در سلول های گیاهی ۲۸
۱-۷- گیاه مورد مطالعه: خرفه ۲۹
الف-گیاه شناسی ۲۹
ب-خواص درمانی گیاه: ۲۹
پ- ترکیبات شیمیایی ۲۹
۱-۸- کاته کولامین ها ۳۰
۱-۸-۱- عملکرد در گیاهان ۳۱
۱-۸-۲- نورآدرنالین ۳۱
فصل دوم: مواد و روش ها
۲-۱- مواد گیاهی و باکتریایی ۳۴
۲-۱-۱- بذر ۳۴
۲-۱-۲- استرین باکتری مورد استفاده ۳۴
۲-۲- محیط کشت های گیاهی و باکتریایی مورد استفاده ۳۴

فهرست مطالب صفحه

۲- ۲-۱- محیط کشت گیاهی و طرز تهیه آنها ۳۴
۲-۲-۲- محیط کشت باکتری و طرز تهیه آن ۳۵
۲-۳- بررسی جوانه‌زنی در گیاه خرفه ۳۶
۲-۳-۱- ضد عفونی سطحی بذور خرفه ۳۶
۲-۳-۲- مشاهدات ماکروسکوپی ۳۶
۲-۴- القاء ریشه‌های موئین به وسیله A. rhizogenes در گیاه خرفه ۳۶
۲-۴-۱- آماده سازی نژاد باکتری برای آلودگی ۳۶
۲-۴-۲- نگهداری باکتری برای مدت طولانی ۳۷
۲-۴-۳- طریقه آلوده کردن ریزنمونه ها ۳۷
۲-۴-۴- حذف باکتری آلوده کننده از ریزنمونه‌های آلوده شده ۳۸
۲-۴-۵- کشت ریشه های موئین در محیط مایع و جامد ۳۸
۲-۴-۶- مشاهدات ماکروسکوپی ۳۹
۲-۴-۷- نحوه اطمینان از حذف کامل باکتری ۳۹
۲-۴-۸- عوامل مورد بررسی در افزایش تراریختی ۳۹
۲-۵- استخراج DNA ۴۰
۲-۵-۱- استخراج DAN از ریشه‌ها مویین و طبیعی گیاه خرفه ۴۰
۲-۵-۲- الکتروفورز DNA استخراج شده از ریشه مویین و طبیعی گیاه خرفه ۴۱
۲-۵-۳- استخراج پلاسمید از باکتری ۴۱
۲-۵-۴- تعیین کمیت و کیفیت DNA ۴۴
۲-۶- آزمون PCR برای تایید تراریختی ریشه‌های موئین گیاه خرفه ۴۴
۲-۶-۱- مواد مورد نیاز برای واکنش زنجیرهایی پلی مراز ۴۵
۲-۶-۲- طریقه انجام و بهینه سازی PCR ۴۵
۲-۶-۳- الکتروفورز محصولات PCR ۴۶
۲-۷- بهینه سازی محیط کشت برای رشد ریشه های موئین گیاه خرفه ۴۷
۲-۷-۱- تعیین بهترین لاین از نظر میزان رشد، زی‌توده و محتوای نورآدرنالین در ریشه‌های موئین ۴۸
۲-۸- استفاده از محرک‌ها در گیاه خرفه ۴۸
۲-۸-۱- مشخصات محرک‌ها و نوع طرح‌ها ۴۸
۲-۸-۲- نحوه استفاده محرک‌ها ۴۸
الف- متیل جازمونات ۴۹
ب- اسید سالسیلیک ۴۹
پ- عصاره مخمر 49
2-9- تعیین میزان مواد موثره با استفاده از دستگاه HPLC در ریشه‌های موئین گیاه خرفه 49
2-9-1- روش خشک کردن نمونه‌ها 49
2-9-2- عصاره گیری از ریشه‌های موئین 50

2-9-3- اندازه گیری نورآدرنالین.....50
2-9-4- اندازه‌گیری کمی.....51
2-9-5- شناسایی ترکیبات.....51
فصل سوم: **نتایج**
۳-۱- بررسی زمان و درصد جوانه زنی در گیاه خرفه.....۵۳
۳-۲- بررسی القاءریشه‌های موئین در گیاه خرفه.....۵۳
۳-۲-۱- نتایج بهینه سازی شرایط القاء ریشه موئین.....۵۵
الف- سن گیاهچه و نوع ریزنمونه.....۵۵
ب- مدت زمان آلودگی.....۵۶
پ- مدت هم‌کشتی.....۵۷
ت- غلظت باکتری و استرین‌های مختلف باکتری.....58
3-2-2- مقایسه محیط کشت‌های مختلف از نظر میزان رشد لاین‌ها.....59
۳-۳- بررسی و تایید ریشه‌های مویئن به روش مولکولی.....۶۰
۳-۴- ارزیابی و مقایسه میزان رشد، زی‌توده نهایی هر لاین و بررسی محتوای نورآدرنالین در لاین‌های مختلف.....۶۱
الف- مقایسه میزان رشد، زی‌توده نهایی لاین‌ها.....۶۱
ب- بررسی و مقایسه میزان تولید نورآدرنالین در ریشه طبیعی و ریشه موئین.....۶۲
۳-۵-بررسی اثر محرک‌ها بر روی مقدار نورآدرنالین درریشه‌ها.....۶۳
الف- متیل جازمونات.....۶۳
ب- اسید سالسیلیک.....۶۴
پ- عصاره مخمر.....۶۴
فصل چهارم: **بحث**
۴-۱- مطالعه و بررسی جوانه‌زنی.....۶۷
۴-۲- مطالعه و ارزیابی ایجاد ریشه موئین.....۶۷
۴-۳- بررسی و ارزیابی عوامل مورد استفاده برای بهینه‌سازی افزایش فراوانی تراریختی.....۶۸
4-4- بررسی و ارزیابی انتخاب محیط کشت مناسب و مطلوب برای رشد لاین‌ها.....70
4-5- ارزیابی تایید مولکولی ریشه های موئین.....70
4-6- بررسی و مطالعه ریشه‌های طبیعی و لاین‌های مختلف ریشه‌های موئین گیاه خرفه از نظر میزان رشد،زی‌توده نهایی و میزان نورآدرنالین.....71
4-6-1- ارزیابی میزان رشد لاین‌ها.....71
4-6-2- مقایسه مقدار نورآدرنالین در لاین‌ها و ریشه طبیعی.....72
4-7- ارزیابی اثر محرک‌های استفاده شده بر روی میزان نورآدرنالین ریشه‌های موئین گیاه خرفه.....72
4-7-1- متیل جازمونات.....72
4-7-2- عصاره مخمر.....73
نتیجه گیری کلی.....۷۴

پیشنهادات ۷۴
پیوست..... 76
فهرست منابع..... 79

فهرست جدول صفحه

جدول ۱-۱- تعدادی از گیاهان دارویی که ریشه‌های مویین در آنها به منظور تولید متابولیت‌های ثانویه با اهمیت شان القاء گردیده است ۱۵
جدول ۱-۲- تعدادی از ریشه‌های مویینی که در مقایسه با ریشه‌های طبیعی متابولیت‌های ثانویه را در سطوح بالاتری تولید کردند ۲۴
جدول ۲-۱- ترکیبات مورد نیاز برای تهیه یک لیتر محیط کشت MS و MS 2/1 ..... ۳۴
جدول ۲-۲- نوع و مقدار مواد تشکیل دهنده محیط کشت LB برای یک لیتر محیط کشت ۳۵
جدول ۲-۳- مواد تشکیل دهنده محلول‌های مورد نیاز در مراحل مختلف استخراج DNA ژنومی ۴۱
جدول ۲-۴- محلول‌های مواد مورد نیاز در استخراج پلاسمید ۴۲
جدول ۲-۵- مواد مورد استفاده در واکنش زنجیره ای پلیمراز ۴۶
جدول ۲-۶- مشخصات لازم برای چرخه های PCR ۴۶
جدول ۲-۷- مشخصات مربوط به محرک‌های استفاده شده ۴۸
جدول ۳-۱- نتایج مربوط به جوانه زنی ۵۳
جدول ۳-۲- نتایج مربوط به درصد جوانه زنی ۵۳
جدول ۳-۳- میزان نورآدرنالین به دست آمده از لاین‌های مختلف بر حسب میلی گرم بر گرم ماده خشک ۶۳
جدول ۳-۴- تجزیه واریانس غلظت‌های مختلف متیل جازمونات در افزایش مقدار نورآدرنالین ۶۴
جدول ۳-۵- تجزیه واریانس غلظت‌های مختلف اسید سالیسلیک در افزایش مقدار نورآدرنالین ۶۴
جدول 3-6- تجزیه واریانس مربوط به مقادیر مختلف عصاره مخمر در افزایش نورآدرنالین 65

شکل ۱-۱- ساختار شیمیایی ترکیبات آلکالوئیدی نیکوتین، کوکائین، مسکالین و مورفین ۱۰
شکل ۱-۲- مثال‌هایی از مهمترین فنول‌های گیاهی احل گره زایی روی ریشه های موئی ۱۱
شکل ۱-۳- ساختار واحد ۵ کربنه (ایزوپرن)..... ۱۱
شکل ۱-۴- ساختار اولیه پلاسمید Ri آگروباکتریوم رایزوژنز..... ۱۸
شکل ۱-۵- پردازش T-DNA ۲۰
شکل ۱-۶- کمپلکس نوکلئوپروتئینی..... ۲۰
شکل ۱-۷- مکانیسم انتقال T-DNA آگروباکتریوم به ژنوم گیاهی ۲۱
شکل 1-8- بیماری ریشه موئین..... ۲۳
شکل ۱-۹- گیاه خرفه a)گیاه کامل b)گل c)برگ d)ساقه..... ۲۹
شکل 2-1- بریدن ریزنمونه‌ها و قرار دادن در محیط بعد از آلودگی، a)بریدن ریزنمونه‌ها با اسکالپل، b)خشک شدن، c)گذاشتن ریزنمونه‌ها روی محیط کشت..... ۳۸
شکل ۳-۱- مراحل تولید گیاهچه تا تولید ریشه موئین در ریزنمونه‌ها ۵۴
شکل 3-2- محیط جامد، a) ریشه موئین با رشد خیلی سریع(یک ماه)، b) ریشه طبیعی با رشد کم(دو ماه)..... ۵۵
شکل 3-3- محیط مایع، a) ریشه موئین(یک ماه)، b) ریشه طبیعی یا شاهد(دوماه)..... ۵۵
شکل 3-4- اثر نوع ریزنمونه بر فراوانی ریشه‌های موئین تولید شده،مقایسه میانگین‌ها به روش LSD..... ۵۶
شکل ۳-۵- اثر سن گیاهچه بر فراوانی ریشه‌های موئین تولید شده، مقایسه میانگین ها به روش LSD ۵۶
شکل ۳-۶- اثر طول مدت آلودگی در تولید ریشه‌های تراریخت و مقایسه میانگین‌ها به روش LSD..... ۵۷
شکل ۳-۷- اثر مدت هم کشتی در تولید ریشه‌های تراریخت و مقایسه میانگین‌ها به روش LSD..... ۵۷
شکل 3-8-اثرغلظت‌های مختلف باکتری در تولید ریشه‌های تراریخت و مقایسه میانگین‌ها به روش LSD..... ۵۸
شکل 3-9- اثر استفاده از استرین‌های مختلف در تولید ریشه‌های تراریخت و مقایسه میانگین‌ها به روش LSD.... ۵۸
شکل ۳-۱۰- زی‌توده نهایی لاین گزینشی در محیط‌های مختلف بر حسب وزن خشک و مقایسه میانگین‌ها به روش LSD..... ۵۹
شکل ۳-۱۱- تاثیرمحیط کشت‌های مختلف بر رشد ریشه‌های موئین ۵۹
شکل 3-12- زی توده لاین گزینشی بر حسب وزن خشک در هر نمونه برداری ۶۰
شکل ۳-۱۳- تصویر ژل آگاروز با الکتروفورز برای تعیین ژن rolB توسط آنالیز PCR در ریشه‌های ترانسفورم شده خرفه..... ۶۱
شکل ۳-۱۴- زی توده نهایی لاین‌ها بر حسب وزن خشک و مقایسه میانگین‌ها به روش LSD ۶۱
شکل ۳-۱۵- گروماتوگرام HPLC با طول موج ۲۸۰ نانومتر مربوط به بیشترین مقدار نورآدرنالین در ریشه‌های موئین بدست آمده از ریزنمونه‌های تراریخت(A) ۶۲
شکل ۳-۱۶- گروماتوگرام HPLC با طول موج ۲۸۰ نانومتر مربوط مقدار نورآدرنالین در ریشه‌های طبیعی یا شاهد بدست آمده از ریزنمونه‌های غیر تراریخت (Non-HR) ۶۲
شکل ۳-۱۷- میزان نورآدرنالین در غلظت‌های مختلف متیل جازمونات، مقایسه میانگین‌ها به روش LSD ۶۳
شکل ۳-۱۸- میزان نورآدرنالین (میلی گرم بر گرم ماده خشک) در غلظت‌های مختلف اسید سالسیلیک (میکرومول)..... ۶۴
شکل 3-19- میزان نورآدرنالین در غلظت‌های مختلف عصاره مخمر(میلی گرم)،مقایسه میانگین‌ها به روش LSD. ۶۵

مقدمه

مقدمه

هزاران سال است که گیاهان از مهمترین منابع درمانی محسوب می شوند به طوری که همزمان با پیدایش انسان‌ها، استفاده از گیاهان داروئی نیز آغاز شد(حسنلو، ۱۳۸۷). در گذشته گیاهان داروئی به عنوان منبع اصلی مواد شفا بخش، به طور وسیعی توسط مردم مورد استفاده قرارگرفت. با مطالعه در تمدن اقوام قدیمی به مصرف گیاهان داروئی به عنوان دارو، سم، مواد پاک‌کننده و رنگ برمی‌خوریم، تا آنکه پس از به بازار آمدن داروهای شیمیایی، استفاده از مواد طبیعی مذکور به طور چشمگیری کاهش یافت (امید بیگی، ۱۳۸٤). در نیم قرن گذشته استفاده از داروهای شیمیایی و سنتزی به شدت رواج یافت ولی به سرعت آثار زیان بار آنها بر زندگی انسان‌ها سبب گرایش مجدد به گیاهان دارویی گردید. گرایش عمومی جامعه به استفاده از داروها و درمانهای گیاهی و به طور کلی فرآورده های طبیعی به ویژه در طی سال‌های اخیر روبه افزایش بوده و مهمترین علل آن، اثبات عوارض جانبی داروهای شیمیایی است (امید بیگی، ۱۳۷۹). به گونه‌ایی که بزرگان علم داورسازی، قرن بیستم را به نام قرن بازگشت به طبیعت و قرن استفاده از داروهای گیاهی نام نهاده‌اند(امید بیگی، ۱۳۷٦).امروزه، سازمان بهداشت جهانی اعلام نموده که بیش از ۸۰ درصد از مردم دنیا هنوز در طب سنتی از گیاهان دارویی برای درمان استفاده می نمایند. گیاهان هم چنین منبع بسیاری از درمان های جدید نیز می باشند. تقریباً یک چهارم داروهای تولید شده حاوی عصاره های گیاهی یا ترکیباتی هستند که از مواد گیاهی به دست آمده اند یا بر اساس ترکیبات گیاهی مدل سازی شده اند(حسنلو، ۱۳۸۷).

بیوتکنولوژی مجموعه‌ای از متون و روش‌ها است که برای تولید، تغییر و اصلاح فراورده‌های به نژادی گیاهان و جانوران و تولید میکرواورگانیسم‌ها برای کاربردهای ویژه، از ارگانیسم‌های زنده استفاده می‌کند. ابزارها و تکنیک‌های بیوتکنولوژی راهگشای تحقیقات جدید برای درک چگونگی عملکرد بدن‌های سالم می‌باشد. به طورکلی بیوتکنولوژی جاذبه‌های پراهمیتی برای تشخیص، درمان و جلوگیری از بیماری دارد. شناخت پایه مولکولی سلامت و بیماری منجر به پیشرفت روش‌های جدید برای درمان و جلوگیری از بیماری‌ها می‌شود. در حفظ سلامت انسان، بیوتکنولوژی و تولیدات آن در روش‌های تشخیص بر پایه بیوتکنولوژی، امکان تشخیص سریع و با حساسیت بالا را فراهم می‌کنند. در علوم پزشکی و دارویی، بیوتکنولوژی و بیوتکنولوژی گیاهان دارویی کاربردهای زیادی از جمله تولید داروها، بیوداروها، تشخیص، ژن درمانی و مهندسی بافت و غیره دارند (گنجعلی، ۱۳۸۷).

متابولیت‌های ثانویه گیاهی، ترکیباتی آلی هستند که مستقیما در رشد، نمو یا تولید مثل گیاه دخیل نمی‌باشند. این ترکیبات دارای ساختار شیمیایی پیچیده تری نسبت به متابولیت های اولیه، که برای بقاء زندگی سلول‌ها ضروری‌اند، می‌باشند. آلکالوئیدها(مورفین، کدئین، آتروپین و....)،

ترپنوئیدها، فلاوونوئیدها، رنگیزه ها و تانن‌ها از جمله مهم‌ترین این ترکیبات هستند. سلول‌های گیاهی مقادیر متنوعی از این فرآورده‌ها را تولید می‌کنند. مواد مؤثره تولید شده توسط گیاهان داروئی نقش مهمی را در صنایع داروسازی، آرایشی، عطرسازی، رنگرزی و صنعت طعم دار کردن بازی می‌کنند. اکثر این ترکیبات از طریق متابولیسم ثانویه تولید می‌شوند و معمولاً درگیاهان به مقادیر کم تولید می‌شوند (کیم[1] و همکاران، ۲۰۰۲).

با توجه به آ نکه در طبیعت سرعت تولید متابولیت های ثانویه آهسته بوده و مدت زمان طولانی برای تولید لازم است، بنابراین میزان تولید اقتصادی نبوده و ضروری به نظر می رسد که برای تولید سریع و انبوه متابولیت های ثانویه و مواد دارویی، از فنون بیوتکنولوژی گیاهی به طور بهینه استفاده شود. در این بخش می‌توان از طریق کشت بافت و تکنیک‌های مختلف انتقال ژن، برخی ژن‌های مهم را به گیاهان هدف انتقال داد، تا این ژن پس از فعال شدن در گیاه مورد نظر، بروز صفت ویژه‌ای را سبب گردد. یکی از اهداف مورد نظر، انتقال ژن مولد ریشه‌های مویین می - باشد. چنین تحقیقاتی در مورد گیاهان دارویی از اهمیت زیادی برخوردار می‌باشد، زیرا با تولید و کشت ریشه‌های مویین می‌توان همه گیاهان دارویی با ارزش را حفظ نمود و باززایی کرد و هم می‌توان سطح تولید برخی متابولیت‌های ثانویه که به طور طبیعی کم تولید می‌شوند را افزایش داد و یا حتی سلول‌های ایجاد شده، متابولیت هایی تولید می کنند که در گیاه اولیه تولید نمی شود. گیاه خرفه یکی از گیاهان دارویی مهم بوده و متابولیت‌های ثانویه ناشی شده از آن ازجمله نورادرنالین از نظر دارویی، بسیار ارزشمند می‌باشند. متابولیت‌های ثانویه بصورت طبیعی در گیاهان مادری به مقدار بسیار کم تولید می‌شوند، این مساله این ضرورت راایجاب می‌کند که با بکار بردن تکنیک‌های بیوتکنولوژی بتوان مقدار مواد موثره موجود در آنها را به مقدار قابل قبولی افزایش داد. که در این راستا برای غلبه بر تولید کم متابولیت‌های ثانویه در گیاه خرفه، تکنیک ریشه موئین و استفاده از محرک‌های شیمیایی در ریشه مویین این گیاه مورد بررسی قرار گرفت.

1- kim

فصل اول:

بررسی منابع

۱- بررسی منابع

۱-۱- گیاهان دارویی

۱-۱-۱- مقدمه

همزمان با پیدایش انسان ها، استفاده از گیاهان دارویی نیز آغاز شد. با توسعه صنایع داروئی در اوایل قرن بیستم داروهای گیاهی تا حد زیادی اعتبار و ارزش خود را نسبت به داروهای جدید صناعی در بین اطبا از دست دادند که احتمالا به علت اطلاعات اندک درباره داروهای گیاهی می باشد. با اینحال در دهه اخیر اقبال دوباره ای برای مصرف داروها و فراورده های گیاهی طبیعی بوجود آمده است (آخوندزاده، ۱۳۷۹).

برخی از ترکیبات شیمیایی موجود در گیاه دارای ساختمان پیچیده ای هستند که سنتز آنها در آزمایشگاه یا غیرممکن یا با صرف زمان و هزینه زیاد امکان پذیر است. در قرن ۱۸ و اوایل قرن ۱۹ محققان پیشرفت قابل توجهی در خالص سازی و شناسایی ترکیبات شیمیایی موجود در گیاهان داشته و موادی را به صورت فرآورده های دارویی برای مصرف عرضه کردند(مورنو[1] و همکاران، ۲۰۰۳).

گرایش به استفاده از گیاهان دارویی برای تولید دارو در اکثر کشورها در حال افزایش است و کشور ایران نیز از این قاعده پیروی می‌کند که با دارا بودن شرایط آب و هوایی و برخورداری از منابع عظیم گیاهان دارویی می‌تواند در این زمینه پیشرو باشد و از پتانسیل‌های موجود در این گیاهان بهره برد. بهره برداری غیر صحیح و بی رویه در گذشته‌های نه چندان دور از منابع ژنتیکی علاوه بر اینکه میزان تولید سنتی را پایین آورده، باعث حرکت به سمت انقراض این منابع هم گردیده است. با این که گیاهان دارویی به روش‌های سنتی تولید می‌شوند اما روش‌های بیوتکنولوژیکی هم برای تکثیر گیاهان دارویی ابداع شده است که یک روش کار آمد و مفید جهت تولید این گونه گیاهان می‌باشد و امروزه شاهد استفاده وسیع و گسترده این روش‌ها در جهت تولید گیاهان دارویی و تولید متابولیت‌های ثانویه در آنها می‌باشیم (روتس[2]، ۲۰۰۱).

۱-۱-۲ تاریخچه

تاریخچه گیاهان دارویی به طور دقیق مشخص نیست و در طول تاریخ استفاده از گیاهان دارویی با خرافات و آداب خاصی همراه بوده است . مصری ها و چینی ها از اولین اقوامی هستند که از حدود ۲۷۰۰ سال پیش از میلاد مسیح از گیاهان به عنوان دارو استفاده می کردند.

1 .Moreno
2 .Rotes

تئوفراست [1]یکی از شاگردان ارسطو بنیانگذار مکتب درمان با گیاه است . دیوسکورید[2]در قرن اول میلادی مجموعه ای را مشتمل بر خواص دارویی ۶۰۰ گیاه جمع آوری نمود که این اثر منشأ بسیاری از مطالعات در قرون بعد گردید. در قرن های هشتم تا دهم میلادی بوعلی سینا و محمد زکریای رازی سبب توسعه دانش درمان با گیاه شدند و در قرن سیزدهم ابن بیطار خصوصیات بیش از ۱۴۰۰ گیاه را در کتابی گرد آوری نموده و در قرن نوزدهم داروهای شیمیایی به سرعت جایگزین بسیاری داروهای گیاهی گردید. سپس در اواخر قرن بیستم عوارض جانبی و مضر داروهای شیمیایی سبب رویکرد دانشمندان به گیاهان دارویی شد به طوریکه این دوره را رنسانس گیاهان دارویی نامیدند. تا قرن نوزدهم گیاهان دارویی به شکل بسیار ابتدایی مورد مصرف قرار می گرفتند تا اینکه استخراج مواد مؤثر گیاهی، از قرن نوزدهم آغاز گردید.

همزمان با انقلاب صنعتی، علم شیمی پیشرفت چشمگیری داشت که باعث به وجودآمدن این تفکر در محیط های علمی شد که می توان از طریق سنتز ترکیبات شیمیایی به خصوص مواد دارویی مشکل دارو و درمان بیماری ها را حل کرد. به همین دلیل تولید داروهای شیمیایی در قرن بیستم سرعت روز افزونی پیدا کرد و داروهای گیاهی به دست فراموشی سپرده شدند. پس از مواجه شدن با مشکلاتی نظیر آلودگی آب و هوا و خاک که توسط کارخانجات تولید مواد شیمیایی ایجاد شده بوده و عوارض جانبی داروهای شیمیایی که بعضا" پس از چند نسل ظاهر می‌شوند، به فکر استفاده از مواد طبیعی فناوری‌های غیر مخرب افتادند به طوریکه در کشورهای صنعتی مصرف داروهای گیاهی از مرز ۷ درصد گذشت(کیانمهر، ۱۳۸۷).

۱ -۱-۳ تعریف گیاهان داروئی

گیاه تازه و زنده که دارای مواد داروئی است به نام گیاه مادر شناخته می‌شود و تا موقعی که یکسری عملیات خاص روی آن‌ها انجام نگیرد، مورد استفاده قرار نمی‌گیرند. معمولاً به محصولی از گیاه که حاوی ماده مؤثره[3]باشد، بطوری که تأثیر فعال زیستی و فیزیولوژیکی بر پیکر موجود زنده بر جای بگذارد "داروهای گیاهی" اطلاق می‌شود. اما امروزه به عصاره یا اسانسی که از گیاهان داروئی استخراج می‌شوند و به عنوان دارو مصرف می‌شوند یا در ساختن داروهای ترکیبی استفاده می‌شوند نیز داروی گیاهی می گویند (زمان، ۱۳۷۶).

به طور کلی گیاهان دارویی دارای خصوصیات تعریف شده زیر می‌باشند:

۱- در پیکره این گیاهان مواد خاصی ساخته و ذخیره می شود به نام مواد مؤثره که این مواد تاثیر فیزیولوژیکی بر پیکر موجود زنده بر جا می گذارند. مواد فعال مذکور در طی یک سلسله فرایندهای

1. Teoferast
2. Divsekoride
3. Effective metabolite

ویژه و پیچیده بیوشیمیایی، به مقدار بسیار کم، معمولا کمتر از وزن خشک گیاه ساخته می‌شوند و به متابولیت‌های ثانویه[1] نیز معروفند.

۲-کاشت، داشت و برداشت گیاهان دارویی، صرفا به خاطر استفاده از مواد موثره آنها صورت می گیرد.

۳- ممکن است اندام خاصی چون ریشه، ساقه، برگ‌ها، گل و غیره حاوی مواد موثره مورد نظر باشد . از این رو، نمی توان تمام اندام‌های گیاه مربوط را منبع ماده دارویی مورد نظر دانست.

۴- گیاهان دارویی حاوی مواد مؤثره، در مقایسه با عموم گیاهان مورد عمل در کشاورزی چون غلات و سبزی‌ها که به طور عام و روزمره مورد استفاده انسانند، در موارد خاصی قابل استفاده اند.

اساسا" از گیاهان حاوی مواد مؤثر استفاده‌های مختلفی به عمل می آید و این گیاهان به سه گروه اصلی شامل: گیاهان دارویی، گیاهان ادویه‌ای[2] و گیاهان عطری[3] طبقه بندی می شوند.

الف) گیاهان دارویی: مواد مؤثره موجود در این گیاهان به صورت مستقیم یا غیر مستقیم اثر درمانی دارد و به عنوان دارو مورد استفاده قرار می گیرند.

ب) گیاهان ادویه‌ای: از مواد مؤثره فعال موجود در این دسته از گیاهان، در صنایع غذایی (کنسرو سازی، نوشابه سازی و غیره) به منظور بهبود در رنگ، طعم و مزه آنها استفاده می شود.

ج) گیاهان عطری: اندام‌های خاصی در این گیاهان حاوی اسانس اند و اسانس از راه تقطیر با بخار آب، از اندام استخراج می شود(امید بیگی، ۱۳۷۶).

۱-۱-٤- اهمیت گیاهان دارویی

یکی از شرایط لازم برای توفیق در معالجه بیماری ها و مراقبت های اولیه بهداشتی[4] وجود و مصرف داروهای مناسب است. گیاهان چه به صورت طب سنتی[5] و چه به شکل فرآورده‌های خالص[6] یکی از منابع عمومی تهیه داروها بوده‌اند. لذا همین مساله موجب شده است که سازمان بهداشت جهانی، فهرست جامعی از گیاهان دارویی موجود و عصاره‌های آن‌ها را ارایه دهد، زیرا این قبیل داروها می توانند حتی جانشین بعضی فرآورده های دارویی بسیار موثر و مهم گردند(رجحان، ۱۳۸۲).

تهیه برخی از مواد مؤثره فعال که در صنایع دارویی اهمیت بسیاری دارند، به طور مصنوعی امکان پذیر نیست و تنها به صورت طبیعی از گیاهان مورد نظر قابل استخراج هستند. این دسته از مواد یا به

1. Secondary metabolite
2. Spice plants.
3. Aromatic plants
4. primery health cure
5.Traditional use
6. Pure active principles