٨٧/١٠٧٧
٨٧/١٠٢٢

١٩٨٧

دانشکده کشاورزی

گروه زراعت و اصلاح نباتات

پایان نامه

برای دریافت درجه کارشناسی ارشد در رشته بیوتکنولوژی کشاورزی

عنوان

کشت سوسپانسیون گیاه دارویی ماریتیغال (*Silybum marianum*)، بررسی میزان سیلیمارین تولیدی و تنوع سوماکلونال با استفاده از نشانگرهای ISSR

استادان راهنما

دکتر ابوالقاسم محمدی

دکتر محمود خسرو شاهلی

استادان مشاور

دکتر علی موافقی

دکتر طاهره حسنلو

پژوهشگر

آسیه فیروزی

۱۳۸۷/۱۰/۲۱

شهریور ماه ۱۳۸۷

شماره پایان‌نامه: ۱۹۹

۱۰۹۵۵۷

تقدیم به:

فرشته‌های زندگیم

پدر و مادر مهربان و

همسر عزیزم...

تقدیم به:

الگوهای علم و اخلاق

دکتر سید ابوالقاسم محمدی

دکتر محمود خسروشاهلی

الهی توفیقم ده که بیش از طلب همدردی، همدردی کنم.

بیش از آنکه مرا بفهمند، دیگران را درک کنم.

پیش از آنکه دوستم بدارند، دوست بدارم،

زیرا در عطا کردن است که می ستانیم و در بخشیدن است، که بخشنده می شویم و در مردن است، که حیات ابدی می یابیم.

از پدر و مادر عزیزم که مظهر گذشت و مهربانی اند بسیار متشکرم و دستهای بخشایشگرشان را می بوسم.

از همسر عزیزم، یار مهربان و همراه همیشگی زندگیم به پاس تحمل تمامی سختیها و کمک های بی شائبه اش بسیار سپاسگذارم.

از خواهران و برادران عزیزم که همواره مشوق من در زندگی بوده اند، سپاسگزارم.

از آقای دکتر سید ابوالقاسم محمدی و دکتر محمود خسروشاهلی که از راهنمایی های ارزنده ی ایشان در این تحقیق بهره مند شدم، تشکر و قدردانی می کنم.

از زحمات استادان عزیزم جناب آقای دکتر موافقی و خانم دکتر حسنلو کمال تشکر و امتنان را دارم.

از آقای دکتر سعید اهری زاد که زحمت باز خوانی و داوری این پایان نامه را تقبل نمودند، سپاسگزارم.

از مدیریت محترم گروه زراعت و اصلاح نباتات جناب آقای دکتر صفر نصرا... زاده و سایر استادان ارجمند و فرزانه ی گروه جناب آقای دکتر مقدم، دکتر ولی زاده، دکتر سخندان، دکتر تورچی و دکتر باغبان که در سال محضرشان کسب علم نمودم، سپاسگزارم.

از جناب آقای دکتر زهتاب نماینده تحصیلات تکمیلی دانشکده کمال تشکر را دارم.

از ریاست محترم مؤسسه بیوتکنولوژی تبریز بابت همکاریشان بسیار ممنونم.

از مسئولین محترم آزمایشگاه مولکولی جناب آقای مهندس امیر کهنموئی و خانم مهندس الناز شکوهی که از کمکهای بی دریغشان بهره مند بودم، سپاسگزارم.

از جناب آقای دکتر علوی کیا که از هیچ کمکی در انجام کارهای مولکولی دریغ نکردند بسیار ممنونم.

از دوستان عزیزم، هم خوابگاهی های مهربانم خانم ها فاطمه شفائی، گلناز حکیم الهی، متین میریگانه، مرضیه عباسی، آرزو هاشمی، نرگس نجفی، پریسا لطف الهی، لیلا قره بیگلو، الناز عبداله زاده، رحیمه همتی، سمیه خرمدل، خدیجه زارع، آتیه محجل شجاع و آقایان احمد حیدری، امیر آفریدون، حمید پایا، علی غیاثی و رسول اکبری و همکلاسیهای خوب و دلسوزم خانم ها سولماز خشمن و شهین نوع پرور و آقای ناصر درویشی بسیار متشکرم.

از آقای عابد مسئول مهربان و دلسوز ساختمان دانشکده علوم بسیار ممنونم.

از تمامی دوستان و بزرگانی که به نوعی از لطف شان در انجام این تحقیق بهره مند بودم ولی اسامی بزرگشان در این چند خط کوچک نگنجید، نیز بسیار ممنونم و برای تمامی عزیزان آرزوی سلامت و سعادت از درگاه احدیت دارم.

آسیه فیروزی

شهریور ۸۷

نام خانوادگی: فیروزی نام: آسیه

عنوان پایان نامه: کشت سوسپانسیون گیاه دارویی ماریتیغال (*Silybum marianum*)، بررسی میزان سیلیمارین تولیدی و تنوع سوماکلونال با استفاده از نشانگرهای ISSR

استادان راهنما: دکتر سید ابوالقاسم محمدی- دکتر محمود خسروشاهلی

استادان مشاور: دکتر علی موافقی -- دکتر طاهره حسنلو

مقطع تحصیلی: کارشناسی ارشد رشته: بیوتکنولوژی کشاورزی گرایش: بیوتکنولوژی

دانشگاه: تبریز دانشکده: کشاورزی تاریخ فارغ التحصیلی: شهریور ۱۳۸۷ تعداد صفحه: ۱۳۰

واژه‌های کلیدی: ماریتیغال، سیلیمارین، کشت سوسپانسیون، محرک، تنوع سوماکلونال، نشانگر ISSR

چکیده:

فلاونوئیدها گروه مهمی از متابولیت‌های ثانویه هستند که در پاسخ به سیگنال‌های محیطی یا رشدی سنتز آنها افزایش می‌یابد و وظایف بسیاری را در گیاهان برعهده دارند. سیلیمارین یک فلاونوئید پلی‌فنلی مشتق شده از ماریتیغال است. ماریتیغال (*Silybum marianum*) گیاه دارویی مهمی است که متابولیت‌های ثانویه آن مجموعاً تحت عنوان سیلیمارین، از دیرباز در درمان خوراکی بیماریهای کبدی مانند هپاتیت و سرطان پروستات استفاده می شوند. با توجه به اهمیت دارویی این گونه گیاهی، روش‌های تولید آزمایشگاهی آن با استفاده از کشت یاخته و بافت مورد توجه قرارگرفته‌اند. به منظور تهیه کالوس جهت کشت سوسپانسیون، ابتدا ریزنمونه‌ها (کوتیلدون و هیپوکتیل) از سه ژنوتیپ ماریتیغال (رقم اصلاح شده مجارستان، اکوتیپ‌های پارس آباد و بهشهر) در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های هورمونی توفوردی (۱ میلی‌گرم درلیتر)، کینتین (۱ میلی‌گرم درلیتر) در مراحل اولیه و در واکشت‌ها در همان محیط با غلظت‌های هورمونی کینتین (۰/۴ میلی‌گرم درلیتر) و پیکلورام (۳ میلی‌گرم درلیتر) کشت شدند. کالوس‌ها بعد از چهار مرحله واکشت برای شروع کشت سوسپانسیون مهیا شدند. وزن‌های برابر از کالوس‌های هر ریزنمونه و ژنوتیپ به ظروف حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت MS مایع شامل غلظت‌های هورمونی کینتین (۰/۴ میلی‌گرم درلیتر) و پیکلورام (۳ میلی‌گرم درلیتر) منتقل و هر دو هفته یکبار واکشت شدند. پس از سه مرحله واکشت، کشت‌ها در سه تکرار در قالب طرح فاکتوریل با طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی تحت تیمارهای محرک فنیل آلانین (۰/۱ میلی مولار)، متیل جاسمونات (۱۰۰ میکرومولار)، عصاره مخمر (۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) و ترکیبی از آنها قرار گرفتند. پس از گذشت ۷۲ ساعت، ماده مؤثره همه کشت‌ها با متانول استخراج شد. اجزای سیلیمارین حاصله با استفاده از دستگاه HPLC اندازه‌گیری و به پنج جزء تاکسی‌فولین، سیلی‌دیانین، سیلی‌کریستین، سیلی‌بین و ایزوسیلی‌بین تفکیک شد. نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر محرک، عامل معنی‌دار بر همه اجزای سیلیمارین بود. تیمارهای متیل جاسمونات و فنیل آلانین اثر بیشتری نسبت به تیمار عصاره مخمر بر میزان سیلیمارین تولیدی در همه کشت‌ها داشتند. میزان ماده مؤثره در ریزنمونه هیپوکتیل در هر سه ژنوتیپ بیشتر از ریزنمونه کوتیلدون بود. در مجموع، ژنوتیپ مجارستان از سیلیمارین تولیدی بیشتری نسبت به دو ژنوتیپ دیگر برخوردار بود و ژنوتیپ بهشهر نظر سیلیمارین کمتری را تولید کرد. به منظور بررسی تنوع سوماکلونال در کشت‌های سوسپانسیونی، از هر کدام از کشت‌ها حداقل در سه واکشت و دو تکرار، استخراج DNA انجام گرفت. کلیه ۱۳ آغازگر ISSR مورد استفاده قادر به تکثیر قطعات DNA بودند. الگوی نواری آغازگرها نشان داد که الگوی نواری نمونه‌های مربوط به ژنوتیپ‌ها و ریزنمونه‌های مختلف در واکشت‌ها و حتی تکرارهای یک واکشت، متفاوت بودند. میانگین تعداد مکان‌های تکثیر شده، ۷/۳ مکان به ازای هر آغازگر و طول قطعات تکثیری ۳۰۰۰-۲۰۰ جفت باز بود.

فهرست مطالب صفحه

مقدمه..... ۱

فصل اول: بررسی منابع

۱-۱- مشخصات گیاه‌شناسی ماریتیغال..... ۳

۱-۲- پراکندگی جغرافیایی ماریتیغال..... ۴

۱-۳- متابولیت های ثانویه و اهمیت آنها..... ۴

۱-۴- فلاونوئیدها..... ۶

۱-۴-۱- مسیر بیوسنتزی فلاونوئیدها..... ۶

۱-۴-۲- اهمیت فلاونوئیدها..... ۷

۱-۴-۳- آنزیم‌های درگیر در بیوسنتز فلاونوئیدها و عمل آنها..... ۸

۱-۴-۳-۱- آنزیم‌های درگیر در بیوسنتز آنتوسیانین‌ها..... ۸

۱-۴-۳-۱-۱- چالکون سنتاز (CHS)..... ۸

۱-۴-۳-۱-۲- چالکون ایزومراز (CHI)..... ۸

۱-۴-۳-۱-۳- آنزیم‌های هیدروکسیلاسیون (F3' 5'H ، F3'H،F3H)..... ۸

۱-۴-۳-۱-۴- دی هیدرو فلاونول-۴-ردوکتاز (DFR)..... ۹

۱-۴-۳-۱-۵- آنتوسیانیدین سنتاز (ANS)..... ۹

۱-۴-۳-۱-۶- فلاونوئید-۳-O- گلیکوزیل ترانسفراز (3GT)..... ۹

۱-۴-۳-۲- بیوسنتز استیلبن ها..... ۱۰

۱-۴-۳-۳- بیوسنتز ارن‌ها..... ۱۰

۱-۴-۳-۴- بیوسنتز گروه‌های حاصل از آنزیم دی‌هیدروفلاونول-۴- ردوکتاز (DFR)..... ۱۰

۱-۴-۳-۴-۱-۵'- دئوکسی ایزوفلاونوئیدها..... ۱۰

۱-۴-۳-۴-۲- فلاون‌ها..... ۱۰

۱-۴-۳-۴-۳- دئوکسی آنتوسیانین و فلوبافن‌ها..... ۱۱

۱-۴-۳-۴-۴- فلاونول‌ها..... ۱۱

۱-۴-۳-۴-۵- کاتشین‌ها و پروآنتوسیانیدین‌ها (PA)..... ۱۱

۱-۵- کشت سوسپانسیون..... ۱۲

فهرست مطالب

صفحه

۱-۵-۱- ویژگیهای کشت سوسپانسیون سلولی..... ۱۲

۱-۵-۲- مزایای کشت سوسپانسیون سلولی..... ۱۳

۱-۵-۳- الگوی رشدی در کشت سوسپانسیون سلولی..... ۱۴

۱-۵-۴- محیط کشت مناسب برای کشت سوسپانسیون سلولی..... ۱۴

۱-۵-۵- واکشت کشت‌های سوسپانسیون سلولی..... ۱۵

۱-۵-۶- انواع کشت‌های سوسپانسیون..... ۱۶

۱-۵-۶-۱- کشت پرستار..... ۱۶

۱-۵-۶-۲- کشت سوسپانسیون دو مرحله‌ای..... ۱۶

۱-۵-۶-۳- کشت مداوم بسته یا کشت بچ..... ۱۷

۱-۵-۶-۴- کشت مداوم باز..... ۱۷

۱-۵-۷- دانه بندی سلولی در کشت‌های سوسپانسیون..... ۱۸

۱-۶- تحریک کردن..... ۱۸

۱-۶-۱- محرک‌ها و فرآیند تحریک کردن..... ۱۹

۱-۶-۲- دسته بندی محرک‌ها..... ۱۹

۱-۶-۲-۱- محرک‌های غیر زیستی..... ۱۹

۱-۶-۲-۲- محرک‌های زیستی..... ۱۹

۱-۶-۲-۳- محرک‌های خارجی..... ۲۰

۱-۶-۲-۴- محرک‌های داخلی..... ۲۰

۱-۶-۳- مکانیسم تحریک کردن..... ۲۰

۱-۶-۴- مسیر ترارسانی علامت محرک‌ها..... ۲۱

۱-۶-۵- متیل جاسمونات..... ۲۱

۱-۶-۶- عصاره مخمر..... ۲۳

۱-۷- استفاده از پیش‌ماده ها..... ۲۴

۱-۷-۱- فنیل آلانین..... ۲۵

فهرست مطالب | صفحه

۱-۷-۲- کلسیم ۲۶

۱-۸- تولید متابولیت های ثانویه از طریق کشت‌های سلولی ۲۶

۱-۹- مواد مؤثره گیاه ماریتیغال ۲۹

۱-۱۰- موارد استفاده دارویی از گیاه ماریتیغال ۳۲

۱-۱۱- نحوه عمل سیلیمارین ۳۲

۱-۱۲- تجزیه و تشخیص ترکیبات سیلیمارین ۳۳

۱-۱۳- کشت بافت گیاه ماریتیغال و تولید سیلیمارین ۳۴

۱-۱۴- نشانگرهای ISSR ۳۷

۱-۱۴-۱- مزایای نشانگرهای ISSR ۳۹

۱-۱۴-۲- عیب نشانگرهای ISSR ۴۰

۱-۱۵- تنوع سوماکلونال ۴۲

فصل دوم: مواد و روشها

۲-۱- مواد گیاهی ۴۹

۲-۲- آماده کردن بذور ۴۹

۲-۳- تهیه ریزنمونه جهت القای کالوس ۵۰

۲-۴- آماده‌سازی و ترکیب محیط کشت کالوس ۵۰

۲-۵- آماده‌سازی و ترکیب محیط کشت سوسپانسیون ۵۱

۲-۶- تهیه محلول‌های محرک ۵۲

۲-۶-۱- محلول ۰/۱ میلی‌مولار فنیل‌آلانین ۵۲

۲-۶-۲- محلول ۱۰۰ میکرومولار متیل‌جاسمونات ۵۲

۲-۶-۳- محلول ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره مخمر ۵۲

۲-۷- ترکیبات محرک مورد آزمایش ۵۲

۲-۸- نحوه اعمال تیمارهای محرک ۵۳

۲-۹- اندازه‌گیری رشد سلول‌ها ۵۳

فهرست مطالب

صفحه

۲-۹-۱- اندازه‌گیری رشد کشت‌های سلولی توسط لام هماسیتومتر..... ۵۳

۲-۹-۲- رسم نمودار رشدی سلول‌ها..... ۵۳

۲-۱۰- سنجش قابلیت زیستی یا زنده‌مانی سلول‌ها..... ۵۴

۲-۱۱- تعیین میزان مواد مؤثره در کشت‌های سوسپانسیون..... ۵۴

۲-۱۱-۱- استخراج عصاره از کشت‌ها..... ۵۴

۲-۱۱-۲- مطالعه فلاونولیگنان‌ها در عصاره متانولی به روش HPLC..... ۵۵

۲-۱۲- تجزیه آماری داده‌ها..... ۵۵

۲-۱۳- بررسی تنوع سوماکلونال با استفاده از نشانگرهای ISSR..... ۵۵

۲-۱۳-۱- استخراج DNA ژنومی از کشت‌های سوسپانسیون..... ۵۵

۲-۱۳-۲- تعیین کمیت و کیفیت DNA..... ۵۶

۲-۱۳-۳- واکنش زنجیره‌ای پلیمراز..... ۵۶

۲-۱۳-۴- تفکیک محصولات تکثیری..... ۵۷

۲-۱۴- تجزیه داده‌ها و امتیازدهی الگوهای نواری نشانگرهای ISSR..... ۵۸

فصل سوم: نتایج و بحث

۳-۱- شکل و نوع کالوس‌هاس تولید شده از ژنوتیپ‌ها و ریزنمونه‌های مختلف ماریتیغال..... ۵۹

۳-۲- اندام‌زایی کالوس‌های ماریتیغال..... ۵۹

۳-۳- رسم نمودار و الگوی رشدی در کشت‌های سوسپانسیونی..... ۶۵

۳-۳-۱- روش شمارش سلولی با استفاده از لام هماسیتومتر..... ۶۵

۳-۳-۲- مقایسه‌ای بین تعداد سلول‌ها در واکشت‌های مختلف کشت‌های سوسپانسیونی..... ۶۵

۳-۳-۳- روش توزین سه روزه سلول‌ها و بررسی میزان سیلیمارین تولیدی آنها..... ۶۶

۳-۳-۴- اثر کلسیم بر تراکم و رشد سلولی کشت‌های سوسپانسیونی..... ۶۷

۳-۴- نتایج حاصل از تصویربرداری با میکروسکوپ فلورسنت..... ۷۴

۳-۴-۱- آزمون زنده بودن سلول‌ها..... ۷۴

۳-۴-۲- آزمون اتوفلورسانس بودن ماده مؤثره سیلیمارین..... ۷۴

۳-۵- بررسی میزان مواد مؤثره در کشت‌های سوسپانسیونی گیاه ماریتیغال..... ۷۷

فهرست مطالب

صفحه

۳-۵-۱- تاکسی فولین..... ۷۷

۳-۵-۲- سیلی کریستین..... ۸۱

۳-۵-۳- سیلی دیانین..... ۸۱

۳-۵-۴- سیلی‌بین..... ۸۱

۳-۵-۵- ایزوسیلی‌بین..... ۸۲

۳-۶- اثر تیمارهای محرک بر سیلیمارین تولیدی در ریزنمونه‌ها و ژنوتیپ‌های مختلف..... ۸۸

۳-۶-۱- ریزنمونه هیپوکوتیل ژنوتیپ مجارستان..... ۸۸

۳-۶-۲- ریزنمونه کوتیلدون ژنوتیپ مجارستان..... ۸۸

۳-۶-۳- ریزنمونه هیپوکوتیل ژنوتیپ پارس آباد..... ۸۹

۳-۶-۴- ریزنمونه کوتیلدون ژنوتیپ پارس آباد..... ۸۹

۳-۶-۵- ریزنمونه هیپوکوتیل ژنوتیپ بهشهر..... ۹۰

۳-۶-۶- ریزنمونه کوتیلدون ژنوتیپ بهشهر..... ۹۰

۳-۷- چندشکلی نشانگرهای ISSR..... ۱۰۵

۳-۸- نتیجه‌گیری کلی..... ۱۱۱

۳-۹- پیشنهادات..... ۱۱۳

منابع..... ۱۱۴

فهرست شکل‌ها

صفحه

شکل۱-۱- ترکیبات اصلی تشکیل دهنده سیلیمارین.....۳۱
شکل۳-۱- نحوه تشکیل، رشد و تکامل کالوس از ریزنمونه کوتیلدن گیاه ماریتیغال.....۶۰
شکل۳-۲- نحوه تشکیل، رشد و تکامل کالوس از ریزنمونه هیپوکوتیل گیاه ماریتیغال.....۶۱
شکل ۳-۳- تشکیل جوانه‌های مولد ساقه و ساقه‌های حاصل از آنها در ریزنمونه‌ها و ژنوتیپ‌های پارس آباد، مجارستان و بهشهر در محیط کشت B5.....۶۲
شکل ۳-۴- تشکیل جوانه‌های مولد ساقه و ساقه‌های حاصل از آنها در ریزنمونه‌ها و ژنوتیپ‌های فریدونکنار و پارس آباد در محیط کشت B5.....۶۳
شکل ۳-۵- تشکیل ریشه در ریزنمونه‌ها و ژنوتیپ‌های مختلف ماریتیغال در محیط کشت B5.....۶۴
شکل ۳-۶- مقایسه بین تعداد سلول‌های شمارش شده با استفاده از لام هماسیتومتر در واکشت‌های اول، دوم و سوم کالوس ریزنمونه برگ لپه‌ای ژنوتیپ مجارستان (M/K).....۶۸
شکل ۳-۷- نمودارهای رشدی حاصل از دو ریزنمونه برگ لپه‌ای (K) و محور زیرلپه (H) در ژنوتیپ های پازس‌آباد (P)، مجارستان (M)، بهشهر (B) و فریدونکنار (F).....۶۸
شکل ۳-۸- مقایسه بین روند رشدی ریزنمونه برگ‌لپه‌ای (K) و محور زیر لپه (H) در ژنوتیپ فریدونکنار (F) به روش لام هماسیتومتر در واکشت اول (S_1).....۶۸
شکل ۳-۹- مقایسه الگوی رشدی در کشت‌های سلولی ریزنمونه‌های ژنوتیپ های مختلف به روش شمارش سلولی با استفاده از لام هماسیتومتر.....۶۹
شکل ۳-۱۰- روند افزایشی وزن سلول‌های سوسپانسیونی و الگوی رشدی در ریزنمونه‌ها و ژنوتیپ های مختلف و مشاهده حالت استثناء برتری ریزنمونه محور زیرلپه به ریزنمونه برگ‌لپه‌ای، تنها در ژنوتیپ فریدونکنار با روش توزین سه روزه سلول‌ها.....۷۰
شکل ۳-۱۱- برتری الگوی رشدی و سرعت رشد کشت‌های سلولی ژنوتیپ پارس‌آباد در هر دو روش (شمارش سلولی با لام و روش توزین سه روزه کشت‌ها) در هر دو ریزنمونه نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها.....۷۱
شکل ۳-۱۲- روند تولید سیلیمارین در کشت‌های سوسپانسیونی چهار ژنوتیپ و دو ریزنمونه ماریتیغال.....۷۲

فهرست شکل‌ها

صفحه

شکل ۳-۱۳- اثر مثبت و معنی‌دار وجود کلسیم در محیط کشت به منظور رشد و تکثیر بهتر و بیشتر سلول‌ها..... ۷۲

شکل۳-۱۴- محیط‌های کشت سوسپانسیونی ماریتیغال..... ۷۳

شکل ۳-۱۵- یک سلول سوسپانسیونی در حال تقسیم و مشاهده دیواره سلولی آن به رنگ سبز تحت رنگ آمیزی با FDA..... ۷۵

شکل ۳-۱۶- توده‌های سلولی در سوسپانسیون سلولی ماریتیغال..... ۷۵

شکل۳-۱۷- مشاهده عدم خاصیت اتو فلورسانس در سیلیمارین تولیدی در ۲ حالت با استفاده از فیلترهای مختلف..... ۷۶

شکل ۳-۱۸- میانگین سیلی‌کریستین (نمودار سمت راست) و سیلی‌دیانین (نمودار سمت چپ) برای تیمارهای الیسیتوری مختلف..... ۸۶

شکل ۳-۱۹- مقایسه میانگین‌های ژنوتیپ‌هاو ریزنمونه‌های مختلف در تیمارهای الیسیتوری مختلف از نظر جزء تاکسی‌فولین..... ۸۶

شکل ۳-۲۰- مقایسه میانگین‌های ژنوتیپ‌ها و ریزنمونه‌های مختلف در تیمارهای الیسیتوری مختلف از نظر جزء سیلی‌بین..... ۸۷

شکل ۳-۲۱- مقایسه میانگین‌های ژنوتیپ‌ها و ریزنمونه‌های مختلف در سطوح الیسیتوری مختلف از نظر صفت ایزوسیلی بین..... ۸۷

شکل ۳-۲۲- نمودار HPLC مربوط به سیلیمارین استاندارد تهیه شده از شرکت سیگما..... ۹۱

شکل ۳-۲۳- نمودارهای HPLC مربوط به کشت‌های سوسپانسیونی ریزنمونه هیپوکتیل ژنوتیپ مجارستان..... ۹۲

شکل ۳-۲۴- نمودارهای HPLC مربوط به کشت‌های سوسپانسیونی ریزنمونه کوتیلدون ژنوتیپ مجارستان..... ۹۳

شکل ۳-۲۵- نمودارهای HPLC مربوط به کشت‌های سوسپانسیونی ریزنمونه هیپوکتیل ژنوتیپ پارس آباد..... ۹۴

شکل ۳-۲۶- نمودارهای HPLC مربوط به کشت‌های سوسپانسیونی ریزنمونه کوتیلدون ژنوتیپ پارس آباد..... ۹۵

شکل ۳-۲۷- نمودارهای HPLC مربوط به کشت‌های سوسپانسیونی ریزنمونه هیپوکتیل ژنوتیپ بهشهر.....۹۶
شکل ۳-۲۸- نمودارهای HPLC مربوط به کشت‌های سوسپانسیونی ریزنمونه کوتیلدون ژنوتیپ بهشهر.....۹۷
شکل ۳-۲۹- اثر عصاره مخمر نسبت به حالت کنترل بر سیلیمارین تولیدی در کشت‌های سوسپانسیونی ماریتیغال.....۱۰۱
شکل ۳-۳۰- اثر مثبت متیل جاسمونات بکار رفته همراه با عصاره مخمر در افزایش سیلیمارین تولیدی در همه ژنوتیپ‌ها و ریزنمونه‌ها.....۱۰۲
شکل ۳-۳۱- اثر الیسیتور عصاره مخمر و ترکیبات آن (متیل جاسمونات + عصاره مخمر و متیل جاسمونات + عصاره مخمر + فنیل آلانین)بر سیلیمارین تولیدی کشت‌های سوسپانسیونی ماریتیغال.....۱۰۲
شکل ۳-۳۲- اثر الیسیتورهای متیل جاسمونات، فنیل آلانین و ترکیب دوتایی آنها بر میزان سیلیمارین تولیدی در کشت‌های سوسپانسیونی ماریتیغال.....۱۰۳
شکل ۳-۳۳- اثر الیسیتور فنیل آلانین و ترکیبات آن (فنیل آلانین+ متیل جاسمونات و فنیل آلانین + متیل جاسمونات + عصاره مخمر) بر میزان سیلیمارین تولیدی کشت‌های سوسپانسیونی ماریتیغال.....۱۰۳
شکل ۳-۳۴- اثر الیسیتور متیل جاسمونات و ترکیبات آن (فنیل آلانین + متیل جاسمونات، متیل جاسمونات + عصاره مخمر و فنیل آلانین + متیل جاسمونات + عصاره مخمر)در مقایسه با حالت کنترل بر میزان سیلیمارین تولیدی در کشت‌های سوسپانسیونی ماریتیغال.....۱۰۴
شکل ۳-۳۵- الگوی نواربندی آغازگرهای ISSR مورد استفاده.....۱۱۰

جدول ۲-۱- مشخصات آغازگرهای ISSR مورد استفاده..... ۵۸
جدول ۳-۱- تجزیه واریانس اثر عوامل مورد مطالعه بر هر یک از پنج جزء سیلیمارین در کشت‌های سوسپانسیونی..... ۷۸
جدول ۳-۲- مقایسه میانگین ژنوتیپ‌ها، ریزنمونه و سطوح الیسیتوری مختلف از نظر صفت تاکسی فولین..... ۷۹
جدول ۳-۳- مقایسه میانگین ریزنمونه و سطوح الیسیتوری مختلف از نظر صفات سیلی‌کریستین و سیلی‌دیانین..... ۸۳
جدول ۳-۴- مقایسه میانگین ژنوتیپ‌ها، ریزنمونه و سطوح الیسیتوری مختلف از نظر صفات سیلی بین و ایزوسیلی‌بین..... ۸۴

بررسی منابع

مقدمه

طی دهه‌های اخیر، مقاومت در برابر مصرف داروهای شیمیایی به علت بروز عوارض جانبی، به طور چشمگیری در حال افزایش است. در نتیجه استحصال هرچه بیشتر مواد دارویی از منابع طبیعی به ویژه گیاهان دارویی افزایش یافته است. از طرفی تقاضای بالا برای داروهایی با منشاء گیاهی و نیز نیاز موسسات داروسازی به گیاهان دارویی یکدست و استاندارد با مواد مؤثره یکنواخت و معین نیاز به روش‌های جدیدی برای تولید مواد مؤثره گیاهی را بیش از پیش ضروری ساخته است. کشت بافت و تکنیک‌های وابسته به آن در گستره بیوتکنولوژی گیاهی، دارای جایگاه قابل توجهی به عنوان راهبردی مؤثر در تکثیر گیاهان ارزشمند و یا گیاهانی در حال انقراض، تولید فرآورده‌های گیاهی دارای ارزش دارویی، صنعتی و کشاورزی در محیط‌های کشت سلولی کنترل شده می‌باشد.

خارمریم یا ماریتیغال (*Silybum marianum*)، گیاهی دارویی است که از دیرباز در درمان بیماریهای کبدی مانند هپاتیت، سیروز کبدی، سرطان کبد وطحال و ... بسیار مؤثر بوده است. مواد مؤثره موجود در ماریتیغال تحت عنوان کلی سیلیمارین[1] معرفی می‌شوند. این مواد، ترکیبات فنلی هستند که با نام فلاونولیگنان‌ها که عضوی از خانواده بزرگ متابولیت‌های ثانویه فلاونوئیدی هستند، شناخته می‌شوند. میزان این فلاونوئیدها در میوه ماریتیغال بسته به شرایط اقلیمی محل رویش و نوع اکوتیپ آن، معمولاً بین ۲ تا ۵ درصد است.

کشت سوسپانسیون سلولی روش مناسبی برای تولید سلول‌های گیاهی جهت استخراج متابولیت‌های ثانویه در مقیاس وسیع است. همچنین در برخی موارد دستکاری محیط کشت، نهایتاً موجب افزایش تولید این ترکیبات ثانویه شده است.

کاربرد محرک‌ها[2] (تحریک کننده‌های سنتز متابولیت‌های ثانویه) و پیش ماده‌ها[3] (اجزای لازم و معمولاً آغازگر و حدواسط در مسیر بیوسنتزی)، می‌تواند منجر به افزایش تولید برخی از متابولیت‌های ثانویه گردد. چنین استراتژی‌هایی در مورد گیاه دارویی ماریتیغال نیز به کار گرفته شده و نتایج مطلوب و مورد انتظاری هم به دست آمده است (سانچز– سمپدرو، ۲۰۰۵).

1- Silymarin
2- Elicitores
3- Percoursore

امروزه کشت‌های سلولی گیاهی به عنوان روشی برای ایجاد تنوع ژنتیکی سودمند در گیاهان مهم مطرح شده‌اند. تنوع سوماکلونال یا تنوع ایجاد شده به واسطه کشت بافت، یک پدیده رایج در کشت های سلولی است. دلیل اصلی تنوع سوماکلونال در کشت‌های درون شیشه‌ای هنوز هم ناشناخته است. بااین وجود، استقرار یک سیستم ریزازدیادی که توانایی تولید گیاهان پایدار و یکسان از نظر ژنتیکی را داشته باشد، ضروری است.

با بررسی تنوع ایجاد شده در این کشت‌ها با استفاده از نشانگرهای مولکولی و مقایسه آنها با گیاهان والدینی، می‌توان به خصوصیات مفیدی در زمینه‌های مورد مطالعه دست یافت و از آنها در برنامه‌های اصلاحی بهره جست. در بین نشانگرهای مولکولی، نشانگرهای ISSR به علت چندشکلی و تکرارپذیری بالا، توزیع ژنومی بالا و تصادفی، مشخص بودن محل کروموزومی، دسترسی و انجام سریع و آسان، به عنوان تکنیک مناسبی در مطالعات ژنتیکی محسوب می‌شوند (سانچز-پرز و همکاران، ۲۰۰۵).

بنابراین، اهداف این مطالعه عبارتند از:

- بهینه کردن شرایط کشت سلولی ماریتیغال به منظور دستیابی به میزان مواد مؤثره بیشتر
- بررسی اثر محرک‌های مختلف و تغذیه با پیش ماده‌ها در مسیر بیوسنتزی مواد مؤثره و شناسایی بهترین محرک یا ترکیب محرکی و تعیین سطح مناسب آن جهت افزایش تولید سیلیمارین
- معرفی بهترین ژنوتیپ و بهترین ریزنمونه با مواد مؤثره بیشتر
- بررسی تنوع سوماکلونال در کشت‌های سلولی با استفاده از نشانگرهای مولکولی