دانشکده کشاورزی

گروه بیوتکنولوژی و به نژادی گیاهی

پایان نامه کارشناسی ارشد

بررسی اثر اتیلن بر میزان بیان ژن‌های *T16H* ،*G10H*، *DAT* و *AVLBS* در گیاه پروانش (*Catharanthus roseus*)

میثم شعبانی

شهریور ۱۳۹۱

دانشکده کشاورزی

پایان نامه کارشناسی ارشد

بررسی اثر اتیلن بر میزان بیان ژن‌های *G10H*، *T16H*، *DAT* و *AVLBS* در گیاه پروانش (*Catharanthus roseus*)

میثم شعبانی

استاد راهنما:

دکتر محمد فارسی

استاد مشاور:

دکتر امین میرشمسی کاخکی

شهریور ۱۳۹۱

دانشکده کشاورزی، گروه بیوتکنولوژی و به نژادی گیاهی

از این پایان نامه کارشناسی ارشد توسط میثم شعبانی دانشجوی مقطع رشته بیوتکنولوژی در کشاورزی در تاریخ در حضور هیات داوران دفاع گردید. پس از بررسی های لازم، هیات داوران این پایان نامه را با نمره عدد حروف و با درجه مورد تایید قرار داد.

عنوان پایان نامه: بررسی اثر اتیلن بر میزان بیان ژن های G10H، T16H، DAT، AVLBS در گیاه پروانش ***Catharanthus roseus***

سمت در هیات داوران	نام و نام خانوادگی	مرتبه علمی	گروه	موسسه / دانشگاه	امضاء
داور	سعید ملکزاده شفارودی	استادیار	بیوتکنولوژی	فردوسی مشهد	
داور	نسرین مشتاقی	استادیار	بیوتکنولوژی	فردوسی مشهد	
استاد راهنما	محمد فارسی	استاد	بیوتکنولوژی	فردوسی مشهد	
استاد مشاور	امین میرشمسی کاخکی	استادیار	بیوتکنولوژی	فردوسی مشهد	
نماینده تحصیلات تکمیلی	سعید ملکزاده شفارودی	استادیار	بیوتکنولوژی	فردوسی مشهد	

تعهد نامه

عنوان پایان نامه: بررسی اثر اتیلن بر میزان بیان ژن‌های *G10H*، *T16H*، *DAT* و *AVLBS* در گیاه پروانش (*Catharanthus roseus*)

اینجانب میثم شعبانی دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی در کشاورزی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد تحت راهنمایی دکتر محمد فارسی 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 می‌گیرم.
- 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 تأثیر گذار بوده‌اند در مقالات مستخرج از رساله رعایت خواهد شد.
- در خصوص استفاده از موجودات زنده یا بافت‌های آنها برای انجام پایان نامه، کلیه ضوابط و اصول اخلاقی مربوطه رعایت شده است.

تاریخ

میثم شعبانی

مالکیت نتایج و حق نشر

- **کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج، برنامه های رایانه ای، نرم افزارها و تجهیزات ساخته شده) به دانشگاه فردوسی مشهد تعلق دارد و بدون اخذ اجازه کتبی از دانشگاه قابل واگذاری به شخص ثالث نیست.**
- **استفاده از اطلاعات و نتایج این پایان نامه بدون ذکر مرجع مجاز نیست.**

چکیده

پروانش (*Catharanthus roseus*) یک گیاه مدل دارویی است. ریشه این گیاه محل تجمع دو آلکالوئید اجمالسین و سرپنتین است، که در درمان بیماری‌های قلبی–عروقی، از جمله فشار خون بالا استفاده می‌شود. این گیاه به خصوص به علت وجود آلکالوئیدهای وین‌بلاستین و وین‌کریستین، که در درمان سرطان به کار برده می‌شود، اهمیت زیادی پیدا کرده است. در حال حاضر، وین‌بلاستین و وین‌کریستین به طور عمده توسط استخراج از گیاه *C. roseus* به دست می‌آیند. دلیل این امر آن است که روش‌های تمام سنتزی و نیمه سنتزی و روش‌های دیگر برای تولید این مواد در مقیاس وسیع مناسب نیستند. همچنین تلاش زیادی برای تولید این ترکیبات در مقیاس وسیع به وسیله کشت سوسپانسیون سلولی و ریشه های موئین انجام شده است. به دو دلیل کشت‌های سلولی برای تولید این مواد موفق نبوده‌اند: ۱– کشت سلولی فاقد مسیر تولید وین‌دولین (پیش ماده وین‌بلاستین و وین کریستین) می‌باشد ۲–میزان تولید این مواد در کشت‌های سلولی بسیار کم بوده است. وجود مقادیر بسیار کم وین‌بلاستین و وین‌کریستین که در بخش هوایی گیاه تولید می‌شود (حدود ۰/۰۰۰۵ وزن خشک) و همچنین استخراج آنها از میان ترکیبات زیادی، که از لحاظ خصوصیات فیزیکی و شیمیایی بسیار به هم شبیه هستند، باعث افزایش قیمت بسیار زیاد این دو ماده شده است. تحقیقات زیادی درباره نقش تنظیم کننده‌های رشد گیاهی در بیوسنتز متابولیت‌های این گیاه انجام شده است. برای استفاده تجاری از پروانش سه ماه پس از جوانه زدن، که گیاه شروع به گلدهی می‌کند جمع آوری می‌شود. از طرفی تیمار با اتیلن در طول دوره گلدهی باعث افزایش معنی داری در کاتارانتین، وین‌دولین و وین‌بلاستین، می‌شود. همچنین مکانیسم مولکولی اثر برخی تنظیم کننده های رشدی نظیر اتیلن در این گیاه ناشناخته مانده است. بیان ژن‌های *T16H*، *G10H*، *DAT* و *AVLBS* در تیمار با اتیلن، و در بازه‌های زمانی ۶، ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با استفاده از تکنیک Real time RT-PCR، بررسی شد. بیان ژن‌های *T16H*، *DAT* و *AVLBS* در ۶ ساعت پس از تیمار با اتیلن نسبت به شاهد افزایش بیان و در ۱۲ ساعت کاهش یافت و پس از آن روند ثابتی پیدا کرد. با این وجود ژن *G10H* با تابعیت از این الگو پس از ۷۲ ساعت نیز افزایش بیان داشت و از الگوی سه ژن دیگر تبعیت نکرد. با توجه به روند بیان مشابه ژن‌های *T16H*، *DAT* و *AVLBS* به نظر می‌رسد که احتمالاً توسط یک عامل رونویسی تنظیم می‌شوند. نتایج سایر تحقیقات نشان دهنده این واقعیت است که *G10H* از طریق مسیر متفاوتی نسبت به سایر ژن‌ها تنظیم می‌شود. با توجه به نتایج تحقیقات قبلی و این آزمایش به نظر می‌رسد که ژن *G10H*، ژن مهمی در پاسخ به اتیلن باشد. همچنین نتایج این تحقیق نشان داد که بیان ژن‌های *T16H*، *DAT* و *AVLBS* تحت تأثیر اتیلن قرار می‌گیرند.

کلید واژه‌ها: اتیلن، بیان ژن، پروانش

سپاسگزاری

ای خدای بزرگ، هیچ کس شکر و سپاست را به حد کمال به جا نیاورد، چرا که هر شکری که کند آن شکر هم نعمت و احسان تو است و شکری دیگر بر او لازم آید. ما اندک شکری که به جا آوریم باز جزا و پاداش می‌دهی و اندک طاعتی که انجام دهیم ثواب عطا می‌کنی. دعای ۳۷–صحیفه سجادیه– امام سجاد (ع)

خدا را شکر که به اینجانب توفیق علم آموزی را در جوار ملکوتی بارگاه ثامن الحجج حضرت علی ابن موسی الرضا علیه السلام را داد.

از پدر و مادرم عزیزم که همیشه و در همه حال با کمک‌های همه جانبه خود امکان تحصیل را برایم فراهم کردند نهایت تشکر و سپاسگزاری را دارم. از خواهر و برادرهایم که مرا یاری کردند تشکر می‌کنم.

از همه ی معلمان و اساتیدم از ابتدا تا کنون که مرا با آموختن کلمه‌ای بنده خویش نهادند کمال تشکر را دارم.

از استاد گرانقدر آقای دکتر محمد فارسی که در تمام مراحل این پایان نامه از راهنمایی ایشان استفاده کردم کمال تشکر و قدردانی را دارم.

از استاد محترم آقای دکتر امین میرشمسی که در تمام مراحل این پایان نامه از مشاوره‌های ایشان بهرمندم شدم نهایت تشکر و سپاسگزاری را دارم.

از اساتید ارجمند آقای دکتر سعید ملک زاده و خانم دکتر مشتاقی که زحمت تصحیح و داوری این پایان نامه را برعهده داشتند تشکر و قدردانی می‌کنم.

از تمامی اساتید گروه بیوتکنولوژی که در این مدت از محضرشان بهره بردم نهایت تشکر و قدردانی را دارم.

از خانم مهندس عباسیان و مشیری که حق استادی بر اینجانب دارند تشکر و قدردانی می‌کنم. از خانم بوستانی تکنیسین محترم آزمایشگاه بیوتکنولوژی، نگهبانان محترم ساختمان شهدا، آقای دکتر گلدانی، آقای گرجی مسئول گلخانه و علی یزدانی که در انجام این پایان نامه مرا کمک کردند، تشکر و قدردانی می‌نمایم.

از همه دانشجویان گروه بیوتکنولوژی و همکلاسی‌ها و دوستان بخصوص آقایان محمد زارع، مهدی شاهسوند، محمد مجیدی، محسن محمودنیا، اسماعیل دهقان، پرویز عبادی، مهدی صالحی، رحیم افضل، بهمن پناهی، مسعود فخرفشانی، محمد دوستی، مرتضی محمدی، محسن اشرفی، امیر موسائی، مسعود گارگر، جواد شهرکی، نوید چلوار فروش، محمود امیری، قاسم ترابی، سید حمید موسوی و همه کسانی که مرا در انجام این پایان نامه یاری نمودند متشکرم.

بر خود لازم می‌بینم که از دوستان گرامی آقایان سید رضا هاشمی، محمد خلیلی، محمد حسن جعفری و محسن علی پور که بدون لطف آنها انجام این پایان نامه مشکل بود، تشکر ویژه کنم.

فهرست مطالب

عنوان ..... صفحه

فصل اول: مقدمه ۱

فصل دوم: بررسی منابع ۵

۲-۱- گیاهان دارویی: ۵

۲-۱-۱- تاریخچه: ۵

۲-۱-۲- مشکلات داروهای شیمیایی: ۶

۲-۱-۳- اهمیت گیاهان دارویی: ۶

۲-۱-۴- اهمیت اقتصادی گیاهان دارویی: ۷

۲-۲- متابولیت‌های ثانویه: ۸

۲-۲-۱- وظایف متابولیت‌های ثانویه: ۹

۲-۲-۲- انواع ترکیبات ثانویه: ۹

۲-۲-۲-۱- ترپن‌ها: ۹

۲-۲-۲-۲- فنل‌ها: ۱۱

۲-۲-۲-۳- ترکیبات نیتروژن دار: ۱۲

۲-۳- پروانش: ۱۴

۲-۳-۱- تاریخچه: ۱۴

۲-۳-۲- رده‌بندی پروانش: ۱۵

۲-۳-۳- خصوصیات ژنتیکی و گیاه‌شناسی پروانش: ۱۶

۲-۳-۴- شرایط محیطی مورد نیاز رشد پروانش: ۱۶

۲-۳-۵- متابولیت‌های ثانویه پروانش: ۱۷

۲-۳-۵-۱- ترکیبات دارویی پروانش که به بازار دارویی عرضه شده‌اند: ۲۰

۲-۳-۶- مسیرهای بیوسنتزی TIA در گیاه پروانش: ۲۰
۲-۳-۶-۱- توضیح کلی مسیرهای بیوسنتزی TIA در گیاه پروانش: ۲۱
۲-۳-۶-۲- ژن‌های مورد بررسی در این تحقیق: ۲۹
۲-۴- تنظیم کننده‌های رشد گیاهی (PGR): ۳۶
۲-۴-۱- اتیلن: ۳۶
۲-۴-۲- اثر محرک‌ها و تنظیم کننده‌های رشد گیاهی در تولید متابولیت‌ها و بیان ژن‌های مسیر بیوسنتزی ترپن‌ها ایندول آلکالوئیدها در گیاه پروانش: ۳۷
۲-۵- روش‌های مختلف بررسی بیان ژن: ۴۰
۲-۵-۱- RT-PCR نقطه نهایی: ۴۱
۲-۵-۲- Real-Time PCR: ۴۲
۲-۵-۲-۱- برخی از مفاهیم پایه در Real-Time PCR: ۴۲
۲-۵-۲-۲- روش‌های مختلف تعیین کمیت توسط Real-Time PCR: ۴۴
۲-۶- اهداف کلی تحقیق: ۴۸
فصل سوم: مواد و روش‌ها ۵۱
۳-۱- کاشت گیاه: ۵۱
۳-۲- تیمار با اتفن: ۵۱
۳-۳- استخراج RNA: ۵۲
۳-۴- تیمار با DNase جهت حذف DNA: ۵۲
۳-۵- شرایط نگهداری RNA: ۵۳
۳-۶- سنتز cDNA: ۵۳
۳-۷- طراحی آغازگرها: ۵۳
۳-۸- بهینه سازی شرایط واکنش PCR: ۵۳
۳-۹- انجام واکنش PCR بر روی نمونه‌های RNA تیمار شده با DNase: ۵۴

۳-۱۰- واکنش PCR بر روی نمونه‌های cDNA: ۵۵

۳-۱۱- تجزیه و تحلیل الگوی بیان ژن‌های T16H، G10H، DAT، AVLBS در تیمار با اتفن با استفاده از تکنیک Real Time PCR: ۵۵

۳-۱۱-۱- بهینه سازی شرایط واکنش Real time PCR: ۵۵

۳-۱۱-۲- واکنش اصلی Real Time PCR: ۵۶

۳-۱۱-۳- تجزیه و تحلیل داده‌ها: ۵۷

فصل چهارم: نتایج و بحث ۵۹

۴-۱- نتایج: ۵۹

۴-۱-۱- استخراج RNA: ۵۹

۴-۱-۲- تیمار با DNase: ۶۱

۴-۱-۳- بهینه سازی شرایط واکنش PCR: ۶۳

۴-۱-۴- واکنش PCR بر روی نمونه‌های RNA تیمار شده با DNase: ۶۴

۴-۱-۵- واکنش PCR بر روی نمونه‌های cDNA: ۶۵

۴-۱-۶- تجزیه و تحلیل الگوی بیان ژن‌های T16H، G10H، DAT، AVLBS در تیمار با اتفن با استفاده از تکنیک Real Time PCR: ۶۶

۴-۱-۶-۱- بررسی منحنی‌های حاصل از واکنش Real Time PCR: ۶۶

۴-۱-۶-۲- نتایج بررسی بیان ژن‌ها: ۶۸

۴-۲- بحث: ۷۲

فصل پنجم : نتیجه گیری و پیشنهادات ۷۷

۵-۱- نتیجه گیری کلی ۷۷

۵-۲- پیشنهادات ۷۷

منابع ۷۹

پیوست‌ها ۸۹

فهرست شکل‌ها

عنوان شکل | صفحه

شکل ۲-۱. بیوسنتز ترپن‌های بزرگ‌تر توسط IPP و ایزومر آن DMAPP ۱۱

شکل ۲-۲. تعداد مقالات و مالکیت‌های انحصاری در رابطه با گیاه پروانش از سال ۱۹۵۰ تا سال ۲۰۰۱ .....۱۵

شکل ۲-۳. بیوسنتز تریپتوفان از طریق کوریسمات ۲۲

شکل ۲-۴. ساخت IPP و DMAPP از طریق مسیر موالونات و MEP ۲۳

شکل ۲-۵. تولید گرانیل، از طریق ترکیب شدن DMAPP با IPP ۲۴

شکل ۲-۶ . بیوسنتز اسکولگانین از گرانیل از طریق مسیر ایریدوید ۲۴

شکل ۲-۷. بیوسنتز تریپتامین و استریکتوسیدین ۲۵

شکل ۲-۸. بیوسنتز ایندول آلکالوئیدهای، اجمالسین، سرپنتین، تتراهیدروآلستونین در پروانش ۲۵

شکل ۲-۹. مسیر بیوسنتزی وین‌دولین در گیاه *C, roseus* ۲۶

شکل ۲-۱۰. بیوسنتز وین‌بلاستین و وین‌کریستین ۲۷

شکل ۲-۱۱. نمای کلی مسیر بیوسنتزی TIA در گیاه پروانش همراه با آنزیم‌ها و جایگاه آنها در سلول.....۲۹

شکل ۲-۱۲. توالی نوکلئوتیدی cDNA، CYP76B6 کد کننده ژن *G10H* در گیاه پروانش ۳۱

شکل ۲-۱۳. پراکنش فعالیت آنزیم *T16H* در قسمت‌های مختلف گیاه و کشت سوسپانسیون سلولی پروانش ۳۲

شکل ۲-۱۴. ساختار شماتیک و توالی ژن *CrPrx1*، جداسازی شده از گیاه پروانش ۳۴

شکل ۲-۱۵. ساختار سه بعدی ژن *CrPrx1* ۳۵

شکل ۲-۱۶. ساختار شماتیک و توالی ژن *CrPrx* ۳۶

شکل ۲-۱۷. مسیر انتقال پیام اتیلن ۳۷

شکل ۲-۱۸. قدرت تفکیک ضعیف ژل آگارز برای نمونه‌های با اختلاف پنج برابر ۴۱

شکل ۲-۱۹. مقایسه روش‌های RT- PCR نقطه نهایی و Real-Time PCR ۴۲

شکل ۲-۲۰. منحنی واکنش Real-Time PCR و اجزای آن ۴۴

شکل ۲-۲۱. نمای کلی روش‌های تعیین کمیت در Real-Time PCR ۴۵

شکل ۲-۲۲. منحنی استاندارد در روش تعیین کمیت مطلق ۴۶

شکل ۲-۲۳. بازدهی واکنش PCR برای ژن‌های مرجع و ژن هدف با توجه به سریال رقت آنها ۴۸

شکل ۳-۱ . گیاهان کاشته شده در لیوان یک‌بار مصرف در گلخانه ۵۱

شکل ۳-۲ . گیاهان پروانش مورد آزمایش در مرحله گلدهی ۵۲

شکل ۴-۱ . نمودارهای حاصل از آنالیز نمونه های RNA با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر قبل از تیمار با DNase..... ۶۰
شکل ۴-۲ . نمونه‌های RNA استخراج شده قبل از تیمار با DNase..... ۶۱
شکل ۴-۳ . نمودارهای حاصل از آنالیز نمونه های RNA با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر پس از تیمار با DNase ۶۲
شکل ۴-۴ . نمونه‌های RNA پس از تیمار با DNase ۶۳
شکل ۴-۵. نتایج PCR بر روی دو نمونه cDNA با آغازگرهای مختلف جهت بهینه سازی واکنش PCR ۶۴
شکل ۴-۶. واکنش PCR بر روی نمونه‌های RNA پس از تیمار DNase و DNA به عنوان شاهد، با آغازگر ژن *MRP1* .۶۵
شکل ۴-۷. واکنش PCR بر روی نمونه‌های RNA پس از تیمار DNase و DNA به عنوان شاهد، با آغازگر ژنMRP1 ..۶۵
شکل ۴-۸ . واکنش PCR بر روی نمونه‌های cDNA ۶۶
شکل ۴-۹ . منحنی‌های ذوب محصولات Real-Time PCR ۶۷
شکل ۴-۱۰ . منحنی‌های تکثیر Real-Time PCR..... ۶۸
شکل ۴-۱۱. بیان نسبی ژن *G10H* تحت تیمار با اتفن در زمان‌های مختلف ۶۹
شکل ۴-۱۲. بیان نسبی ژن *T16H* تحت تیمار با اتفن در زمان‌های مختلف ۷۰
شکل ۴-۱۳. بیان نسبی ژن *DAT* تحت تیمار با اتفن در زمان‌های مختلف ۷۱
شکل ۴-۱۴. بیان نسبی ژن *AVLBS* تحت تیمار با اتفن در زمان‌های مختلف ۷۲

فهرست جدول‌ها

عنوان جدول | صفحه

جدول ۲-۱. آلکالوئیدهای استخراج شده از *Catharanthus roseus*، به ترتیب وزن مولکولی آنها ۱۸

جدول ۲-۲. آنزیم‌های مسیر بیوسنتزی TIA در گیاه پروانش همراه با کوفاکتورها و جایگاه آنها ۲۸

جدول ۳-۱. لیست آغازگرهای استفاده شده جهت بررسی بیان ژن..... ۵۳

جدول ۳-۲. غلظت و حجم بهینه اجزای واکنش PCR بر روی نمونه cDNA ۵۴

جدول ۳-۳. برنامه دمایی PCR، بر روی نمونه cDNA ۵۴

جدول ۳-۴. توالی و طول قطعه آغازگر ژن *MRP1* ۵۴

جدول ۳-۵. غلظت و حجم اجزای واکنش PCR بر روی نمونه‌های RNA تیمار شده با DNase ۵۵

جدول ۳-۶. برنامه دمایی PCR، بر روی نمونه‌های RNA تیمار شده با DNase ۵۵

جدول ۳-۷ . غلظت و حجم بهینه شده اجزای واکنش Real Time PCR بر روی نمونه‌های cDNA ۵۶

جدول ۳-۸ . چرخه دمایی بهینه شده واکنش Real time PCR ۵۶

جدول ۳-۹ . برنامه منحنی ذوب Real Time PCR ۵۶

جدول ۴-۱ . غلظت و نسبت‌های ۲۶۰/۲۸۰ و ۲۶۰/۲۳۰ در نمونه‌های RNA استخراج شده قبل از تیمار با DNase ۶۰

جدول ۴-۲ . غلظت و نسبت‌های ۲۶۰/۲۸۰ و ۲۶۰/۲۳۰ در نمونه‌های RNA پس از تیمار با DNase ۶۲

فهرست علائم و اختصارات

علامت	معادل انگلیسی	معادل فارسی
TIA	Terpenoid Indole Alkaloids	ترپنوئید ایندول آلکالوئید
PGR	Plant Growth Regulator	تنظیم کننده‌های رشد گیاهی
W.H.O	World Health Organization	سازمان بهداشت جهانی
IPP	Isopentenyl Diphosphate	ایزوپنتیل دی فسفات
MEP	2-C-Methyl-D-Erythritol 4-Phosphate	۲-C -متیل D- اریتریتول ۴-فسفات
DMAPP	Dimethylallyl Diphosphate	دی‌متیل‌آللیل دی‌فسفات
GPP	Geranyl Diphosphate	گرانیل دی‌فسفات
FPP	Farnesyl Diphosphate	فارنسیل دی‌فسفات
GGPP	Geranyl Geranyl diphosphate	گرانیل‌گرانیل دی‌فسفات
G10H	Geraniol 10-Hydroxylase	گرانیل-۱۰-هیدروکسیلاز
CPR	Cytochrome P450 Reductase	سیتوکروم P450 ریدوکتاز
ORF	Open Reading Frame	چارچوب قرائت بازی
T16H	Tabersonine 16-Hydroxylase	تابرسونین-۱۶-هیدروکسیلاز
DAT	Acetyl CoA : Deacetylvindoline 17-O-Acetyltransferease	استیل کوا A : داستیل‌وین‌دولین-۱۷-O-استیل ترانسفراز
AVLBS	Anhydrovinblastine Synthase	آنهیدروویین‌بلاستین سینتاز
2,4-D	2,4-Dichlorophenoxy acetic acid	۴،۲- دی‌کلروفنوکسی استیک اسید
MJ	Methyl Jasmonate	متیل جاسمونات
ABA	Abscissic Acid	اسید آبسزیک
SA	Salicylic Acid	اسید سالیسیلیک
GA3	Gibberellic Acid	اسید جیبرلیک
STR	Strictosidine synthase	استریکتوسیدین سینتاز

فصل اول

مقدمه

گیاهان دارویی منبع با ارزشی برای تأمین دارو می‌باشند. یکی از مزیت‌های داروهای گیاهی نسبت به داروهای شیمیایی، عوارض کمتر است. گیاه پروانش با اسم علمی *Catharanthus roseus* (L.) G. Don یک گیاه چند ساله، متعلق به خانواده خرزهره (Apocynaceae) است (واندر هیجدن و همکاران، ۲۰۰۴). پروانش یک گیاه مدل دارویی است که تحقیقات زیادی بر روی آن انجام شده است. این گیاه حاوی ۱۳۰ نوع TIA است (واندر هیجدن و همکاران، ۲۰۰۴؛ ال-سعید و ورپورت، ۲۰۰۷ a,b؛ زائو و ورپورت، ۲۰۰۷).

ریشه این گیاه محل تجمع دو آلکالوئید اجمالسین و سرپنتین است. این آلکالوئیدها ترکیبات مهم دارویی برای درمان انواع بیماری‌های قلبی-عروقی از جمله فشار خون بالا می‌باشند (اسوبودا و بلاک، ۱۹۷۵). این گیاه به علت وجود آلکالوئیدهای دایمر وین‌بلاستین و وین‌کریستین، که در برگ و اندام‌های هوایی آن تولید می‌شوند، و در شیمی درمانی انواع مختلفی از سرطآنهای خون، غده‌های لنفاوی، پستان، ریه و تخمدان به کار برده می‌شود، اهمیت زیادی پیدا کرده است (موخرجی و همکاران، ۲۰۰۱؛ واندر هیجدن و همکاران، ۲۰۰۴). این دو ماده دارای ارزش اقتصادی بسیار بالایی هستند. قیمت هر کیلوگرم وین‌بلاستین یک میلیون دلار و تولید سالانه آن ۱۲ کیلوگرم و قیمت هر کیلو گرم وین‌کریستین ۳/۵ میلیون دلار و تولید سالانه آن یک کیلوگرم است (لویولا-وارگاس و همکاران، ۲۰۰۷).

در حال حاضر، مواد وین‌بلاستین و وین‌کریستین به طور عمده توسط استخراج از گیاه *C. roseus* به دست

می‌آیند. دلیل این امر آن است که روش‌های تمام سنتزی و نیمه سنتزی و روش‌های دیگر برای تولید این مواد در مقیاس وسیع مناسب نیستند (آتا، ۱۹۷۶؛کاتنی، ۱۹۷۷). همچنین تلاش زیادی برای تولید این ترکیبات در مقیاس وسیع به وسیله کشت سوسپانسیون سلولی و ریشه های موئین انجام شده است. به دلیل اینکه کشت سلولی فاقد مسیر تولید وین‌دولین، پیش ماده وین‌بلاستین و وین‌کریستین می‌باشد، در تولید این مواد موفق نبوده‌اند (زائو و ورپورت، ۲۰۰۷). وجود مقادیر بسیار کم وین‌بلاستین و وین کریستین که در بخش هوایی گیاه تولید می‌شود (حدود ۰/۰۰۰۵ وزن خشک) و همچنین استخراج آنها از میان ترکیبات زیادی، که از لحاظ خصوصیات فیزیکی و شیمیایی بسیار به هم شبیه هستند، باعث افزایش قیمت بسیار زیاد این دو ماده شده است (اسکوت، ۱۹۷۹؛ دی‌لوکا و لافلام، ۲۰۰۱).

به دلیل آن که متابولیت‌های ثانویه نقش دفاعی در گیاهان بر عهده دارند، مقدار آنها در اثر اعمال محرک‌ها افزایش می‌یابد. اکثر کارهای انجام شده در چند سال گذشته، در گیاه *C. roseus* بر روی تنظیم تولید آلکالوئیدها، از طریق استفاده از پیش ماده‌ها، محرک‌ها و مهندسی متابولیک متمرکز شده است (ال–سعید و ورپورت، a ۲۰۰۷).

در رابطه با اثر PGR در تولید TIA در گیاه *C. roseus* تحقیقات زیادی انجام شده است. این ترکیبات تولید متابولیت‌های ثانویه را در این گیاه تحت تأثیر قرار می‌دهند (دسندیت و همکاران، ۱۹۹۲؛ پاسکوالی و همکاران، ۱۹۹۲؛ ال–سعید و ورپورت، a,b ۲۰۰۷؛ زائو و ورپورت، ۲۰۰۷؛ رویتراکول و ورپورت، ۲۰۰۷؛).

اتیلن به عنوان یکی از تنظیم کننده‌های رشد گیاهی، بسیاری از فرایندهای مراحل انتهایی گیاه مثل پیری، ریزش برگ، پژمردگی گلها و رسیدگی میوه را بر عهده دارد. این ماده همچنین در طی تنش‌های محیطی افزایش می‌یابد (کافی و همکاران، ۱۳۸۴). نتایج مطالعات انجام شده در خصوص کاربرد تنظیم کننده های رشدی نظیر اتیلن در لاین‌های سلولی گیاه پروانش باعث افزایش اجمالیسین گردید (یحیی و همکاران، ۱۹۹۸). اتیلن همچنین باعث افزایش تولید اجمالسین، سرپنتین، تابرسونین، کاتارانتین، وین‌دولین شد (ال–سعید و ورپورت، ۲۰۰۴). تجمع اجمالسین در کشت سوسپانسیون سلولی به وسیله تیمار با متیل جاسمونات و اتیلن افزایش یافت. در کشت ریشه‌های موئین پروانش اتیلن فقط باعث القای تجمع کاتارانتین شد. در کشت بخش هوایی اتیلن و متیل جاسمونات باعث افزایش وین‌دولین شد. تیمار متیل جاسمونات و اتیلن، باعث افزایش فعالیت آنزیم *TDC*، در کشت سوسپانسیون سلولی گردید (واسکئوز–فلوتا و همکاران، ۲۰۰۹).

پروانش سه ماه پس از جوانه زدن شروع به گلدهی می‌کند، که جهت استفاده تجاری جمع آوری می‌شود. از

طرفی تیمار با اتیلن در طول دوره گلدهی باعث افـزایش معنـی داری در کاتـارانتین، ویـن‌دولـین و ویـن‌بلاسـتین، می‌گردد (پان و همکاران، ۲۰۱۰). مکانیسم مولکولی تنظیم پیش ماده‌های ترپنی مسیر TIA، توسط اتیلن در طـول مراحل مختلف رشدی گیاه هنوز ناشناخته مانده است (هدهیلی و همکاران، ۲۰۰۷). با توجه به نتایج فـوق، گزارشـی در رابطه با اثر اتیلن بر روی میزان بیان ژن‌ها در مرحله گلدهی وجود ندارد، لذا این تحقیق به منظور بررسـی اثـرات اتیلن بر میزان بیان چهار ژن *T16H*، *G10H*، *DAT* و *AVLBS* مسیر بیوسنتزی TIA در گیاه پروانش در مرحلـه گلدهی، با استفاده از تکنیک Real time RT-PCR انجام شد.

فصل دوم

بررسی منابع

۲-۱ گیاهان دارویی:

۲-۱-۱ تاریخچه:

قدمت شناخت خواص دارویی گیاهان به دوران قبل از تاریخ بر می‌گردد و دقیقاً مشخص نیست که گیاهان از چه زمانی به عنوان دارو مورد استفاده بشر قرار گرفته‌اند. اطلاعات بدست آمده از متون تاریخی و سنگ نوشته‌ها حاکی از آن است که مصریان و چینیان در زمره اولین جمعیت‌های بشری بوده‌اند که بیش از ۲۷ قرن قبل از میلاد مسیح، از گیاهان به عنوان دارو استفاده می‌کردند. 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 بنام تئوفراستوس، بنیان‌گذار مکتب گیاه درمانی بوده است. در ایران استفاده از گیاهان دارویی از دوران هخامنشیان رایج بوده است. با ورود اسلام به ایران، جامع‌ترین و کامل‌ترین دستورات پزشکی و بهداشتی و در کنار آن دستورات طب النبی، طب الصادق و طب باقر در اختیار مردم قرار گرفت. در قرون هشتم تا دهم میلادی، دانشمندان ایرانی نظیر ابوعلی سینا و محمد زکریای رازی، به دانش گیاه درمانی رونق زیادی بخشیدند. آنها گیاهان فراوانی را در این زمینه معرفی کردند و کتاب‌های معروفی چون قانون و الحاوی را تألیف نمودند. در قرن سیزدهم، ابن بیطار مطالعات فراوانی را در مورد خواص دارویی گیاهان انجام داد و

خصوصیات بیش از ۱۴۰۰ گیاه دارویی را در کتاب های خود بیان داشت. در قرون هفده و هیجده میلادی، اروپائیان به پیشرفت‌های بزرگی در زمینه گیاه درمانی و استفاده از گیاهان دارویی دست یافتند و از قرن نوزدهم، کوشش‌های همه جانبه‌ای جهت استخراج مواد مؤثره از گیاهان دارویی و تعیین معیارهای معینی برای تجویز و مصرف آنها شروع شد که این تحقیقات تا به امروز ادامه یافته و همچنان با سرعت هر چه بیشتر ادامه دارد (دهقان، ۱۳۸۸).

۲-۱-۲ مشکلات داروهای شیمیایی :

یکی از مشکلات بزرگی که طب جدید، با وجود مزیت ظاهری آن نسبت به طب سنتی، با خود به ارمغان آورده است، مصرف روز افزون داروهای شیمیایی است که متأسفانه روز به روز شکل حادتری به خود می‌گیرد. در مورد پیامدهای این مسئله می‌توان به ۲ نکته مهم اشاره کرد :

۱-نخست اینکه میکروب‌ها و ویروس‌ها بر اثر مصرف مداوم و بی رویه و گاهی بدون توجه به طریقه مصرف برخی داروها، به تدریج مقاوم می شوند، به این ترتیب تأثیر داروها ضعیف و حتی خنثی می‌شود و در نتیجه بیماران به افزایش مصرف و انواع قوی‌تر از داروها روی می‌آورند.

۲-دوم اینکه، گرچه استفاده از داروهای شیمیایی در درمان بیماری‌های خاص مورد نظر، مفید واقع می‌شود، ولی مصرف طولانی و در برخی موارد حتی مقطعی آنها، عوارض خاصی از خود بر جای می‌گذارد، که «عوارض جانبی» نامیده می‌شود و بعضاً ممکن است از خود بیماری نیز خطرناک‌تر باشد.

البته این نکته را نیز نباید نادیده گرفت که داروهای شیمیایی عمدتاً با تقلید از فرمول داروهای گیاهی اما به صورت مصنوعی در آزمایشگاه های دارو سازی تهیه می‌شوند ولی اخیراً مشخص شده است در صورتی که برخی از انواع ترکیبات موجود در گیاهان در آزمایشگاه به صورت خالص تهیه شوند، و همراه با سایر ترکیبات موجود در گیاه به مصرف برسند، عوارض جانبی آنها از بین می‌رود و تنها اثرات مفید آن در شخص آشکار می‌شود. به هر حال همان گونه که بسیاری از متخصصان این رشته معترفند، بایستی اساساً بیماران را به سوی مصرف داروهای گیاهی که مزیت‌های متعددی نسبت به داروهای شیمیایی دارند، سوق داد (زمان، ۱۳۸۴).

۲-۱-۳ اهمیت گیاهان دارویی:

بشر برای هزاران سال فراورده‌های طبیعی را به عنوان منبع تمام داروها مورد استفاده قرار داده است و در این میان گیاهان عالی بیشترین سهم را در تولید اغلب این مواد دارویی داشته‌اند (ژن، ۱۹۹۸ به نقل از دهقان،