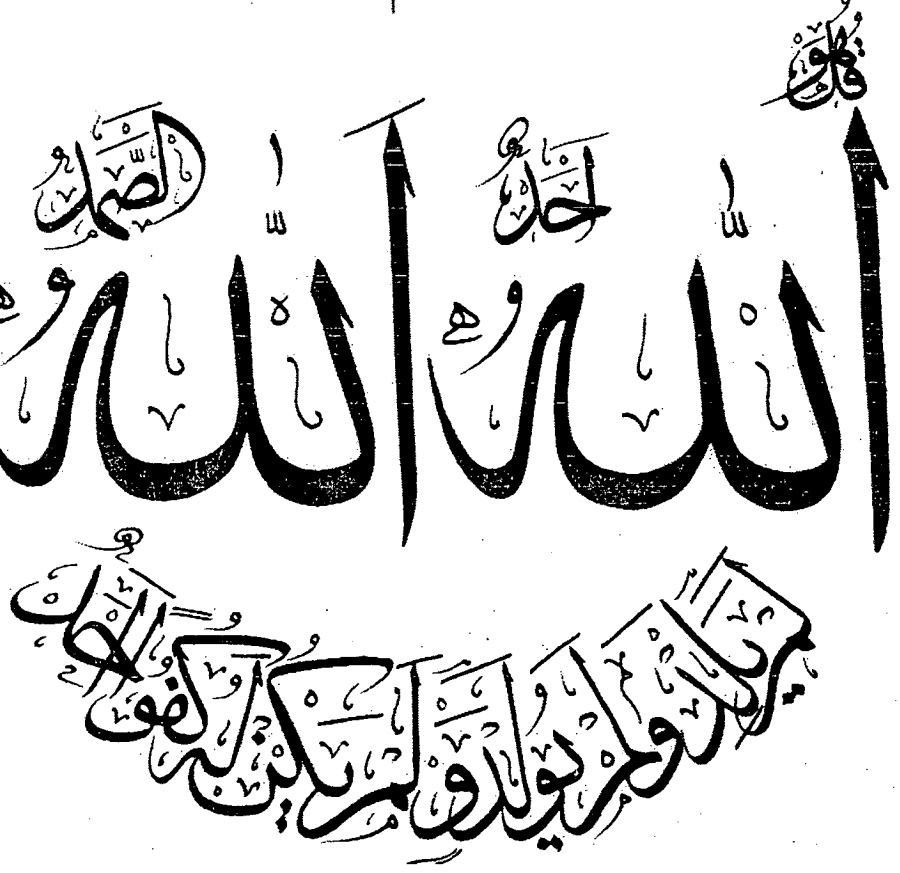

٢٠٢٢٧٧٩-١٥٨٣٣١

دانشگاه اصفهان

دانشکده علوم

گروه زیست شناسی

پایان‌نامه‌ی کارشناسی ارشد رشته‌ی زیست شناسی- علوم گیاهی

گرایش فیزیولوژی گیاهی

ادغام T-DNA در گیاه *Datura metel* L. و بررسی تولید آلکالوئیدها در شرایط کشت *in vitro*

استاد راهنما:

دکتر علی اکبر احسانپور

استاد مشاور:

دکتر غلامرضا اصغری

پژوهشگر:

طیبه همایی بروجنی

تیر ماه ۱۳۸۹

وزارت علوم، تحقیقات و فناوری
پژوهشگاه علوم و فناوری اطلاعات ایران
مرکز اطلاعات و مدارک علمی ایران
IRANDOC

۱۵۸۳۳۱

۱۳۹۰/۳/۱۶

کلیه حقوق مادی مرتب بر نتـایج مطالعـات، ابتکـارات و نوآوری های ناشی از تحقیق موضـوع ایـن پایـان نامـه متعلق به دانشگاه اصفهان است.

شیوه نگارش پایان نامه
رعایت شده است.
تحصیلات تکمیلی دانشگاه اصفهان

دانشگاه اصفهان

دانشکده علوم

گروه زیست شناسی

پایان‌نامه‌ی کارشناسی ارشد رشته‌ی زیست شناسی- علوم گیاهی

گرایش فیزیولوژی گیاهی خانم طیبه همایی بروجنی تحت عنوان

ادغام T-DNA در گیاه *Datura metel* L. و بررسی تولید آلکالوئیدها در شرایط کشت *in vitro*

در تاریخ ۸۹/۴/۱۶ توسط هیأت داوران زیر بررسی و با درجه به تصویب نهایی رسید.

۱- استاد راهنمای پایان نامه دکتر علی‌اکبر احسانپور با مرتبه‌ی علمی استاد امضا

۲- استاد مشاور پایان نامه دکتر غلامرضا اصغری با مرتبه‌ی علمی استاد امضا

۳- استاد داور داخل گروه دکتر منصور شریعتی با مرتبه‌ی علمی دانشیار امضا

۴- استاد داور خارج گروه دکتر فریبا امینی با مرتبه‌ی علمی استادیار امضا

امضای مدیر گروه

Department Of Biology 1965

این نگاشته اگر در خور باشد،

پیشکشی است به پیشگاه مقدس جانان، مولا

صاحب الزمان(عج)

او که جهان در انتظار مقدمش است.

من لم یشکرالمخلوق لم یشکر الخالق

سپاس خدایی را که اوّل و آخر وجود است، بی آنکه اوّلی بر او پیشی بگیرد یا آخری پس از او باشد، خدایی که دست هر چشمی از دامن دیدارش کوتاه است و فهم هر کبوتر توصیفگری از پرواز در آسمان وصفش عاجز. حمد و سپاس خداوندی را می‌سزد که به من توان اندیشیدن بخشید تا بتوانم با استعانت و یاری از او فراز و نشیب‌های راه را پشت سرگذارم و توفیقاتی هر چند ناچیز را در عرصه علم و تحقیق بدست آورم. پس از آن لازم می‌دانم صمیمانه‌ترین مراتب تشکر و قدردانی خود را تقدیم نمایم به محضر استاد راهنمای دلسوزم، جناب آقای دکتر احسانپور که با راهنمایی‌های سودمند و صبر و حوصله فراوان، جهت دهنده اصلی این مطالعه بودند. از اخلاق حسنه و تفکر مثبتشان درس‌های زیادی گرفتم و اندوخته ای ندارم در خور قدرشان مگر دست دعا. همچنین مراتب قدردانی و تشکر خود را تقدیم استاد مشاور محترم امین پروژه جناب آقای دکتر غلامرضا اصغری می نمایم که همکاری‌های صمیمانه و بزرگوارانه ایشان در یاد و خاطر من چون ودیعتی بزرگ بر جای خواهد ماند.

از اساتید داور جناب آقای دکتر شریعتی و سرکار خانم فریبا امینی به خاطر قبول داوری این رساله و بیان نکات ارزنده درجهت بهبود کیفیت آن صمیمانه تشکر می‌نمایم. لازم می‌دانم از تمامی اساتید محترم گروه زیست شناسی دانشگاه

اصفهان که افتخار شاگردی در محضر آن‌ها را داشتم صمیمانه قدردانی نمایم.

تشکر ویژه دارم از خانم لیلا عرب به خاطر راهنمایی‌های ارزشمندشان در به انجام رسیدن این تحقیق. از پدر و مادر عزیزم آنان که وجودم بر ایشان همه رنج بود و وجودشان برایم همه مهر، توانشان رفت تا به توانایی برسم و مویشان سپید گشت تا رویم سپید بماند. آنان که راستی قامتم در شکستی قامتشان تجلی یافت صمیمانه تشکر می‌نمایم. از برادران عزیزم و و از تمامی دوستانم که در مراحل مختلف درس و تحقیق از راهنمایی‌ها و کمک‌هایشان بهره‌مند شدم از صمیم قلب تشکر می‌نمایم و برای همه این عزیزان طول عمر با عزت و موفقیت و توفیق روز افزون را از پیشگاه خداوند منان خواستارم.

تقدیم به

پدر و مادر عزیزم
که حضورشان آرامش زندگیم، وجودشان امید زیستنم،
نگاهشان گرمای هستیم و بودنشان اطمینان خاطرم است.
تمام موفقیت‌های مادی و معنوی خود را مدیون حمایت‌ها
ودعای خیر ایشان می‌دانم.

و

برادران مهربانم
به پاس همراهی صمیمانه‌شان در فراز و نشیب زندگی‌ام.

چکیده

گیاه *Datura metel* L. سرشار از آلکالوئیدهای مهم دارویی وتجاری است، که عبارتند از: هیوسیامین، اسکوپولامین و آتروپین. بنابراین به کارگیری روش های کشت سلولی و طراحی سیستم هایی که افزایش پتانسیل تکثیر و به دنبال آن ازدیاد متابولیت‌های ثانویه را در بردارند، در مورد این گیاه ضروری به نظر می‌رسید. روش‌های مختلفی برای تغییر در میزان ترکیبات ثانویه گیاهی وجود دارد. که از آن جمله می‌توان به اعمال موتاسیون، ایجاد تغییرات سوماکلونال و انتقال T-DNA به گیاه اشاره کرد. در مطالعه حاضر ابتدا شرایط باززائی گیاه از قطعات برگ بهینه گردید و بهترین محیط کشت با بالاترین درصد باززائی (۷۹ در صد) در محیط کشت MS حاوی ۱ میلی گرم در لیتر BAP به دست آمد. در سیستم های باززائی گیاه گاهی احتمال وقوع تغییرات ژنتیکی و یا اپی ژنتیکی مطلوب وجود دارد. به منظور بررسی این موضوع، گیاهان باززائی شده با استفاده از پرایمر های RAPD مورد بررسی قرار گرفتند. در بین پرایمرهای استفاده شده پرایمر FPK2-19 بیشترین تنوع ژنتیکی را نشان داد. پس از بهینه سازی محیط باززایی اقدام به انتقال T-DNA به گیاه، با استفاده از *Agrobacterium tumefaciens* حاوی پلاسمید pZM1047، در برگیرنده ژن‌های GUS و Kan نمودیم. نرخ ترانسفورماسیون در این پژوهش حدود ۱۳ درصد به‌دست آمد. که نسبت به درصد گزارش شده توسط محققان قبلی ۲ درصد افزایش داشت. بعد از باززایی از گیاهان تراریخت چندین لاین حاصل شد و آنالیز مقدار کمی آلکالوئید با استفاده از روش TLC در اندام‌های هوایی و همچنین ریشه گیاهان شاهد، باززایی شده و لاین‌های ۱، ۲ و ۳ تراریخت صورت گرفت. در مجموع آتروپین کل در مورد لاین ۲ تراریخت (T2) ۸۳/۰۴ درصد، افزایش معنی دار نسبت به شاهد نشان داد. همچنین لاین‌های ۲ باززایی شده (R2) و لاین ۱ تراریخت (T1) نیز به‌ترتیب افزایش ۷۷/۷۹ و ۶۱/۰۱ درصدی معنی دار نسبت به شاهد نشان دادند. از طرف دیگر لاین ۳ باززایی شده (T3) ۹/۴۰ درصد کاهش آتروپین کل نسبت به شاهد نشان داد. همچین نتایج بررسی آلکالوئیدها در اندام‌های هوایی نشان داد که گیاهان لاین ۲ تراریخت با مقدار ۱۶۴/۹۷ درصد افزایش معنی دار آلکالوئید نسبت به شاهد بیشترین مقدار آلکالوئید را در بین گیاهان مورد بررسی نشان دادند. این در حالی بود که ریشه‌های این لاین با ۹۴/۲۵ درصد کاهش معنی‌دار آلکالوئید نسبت به شاهد دارای کمترین مقدار آلکالوئید در بین گیاهان مورد برررسی هستند. در مجموع آنالیز آلکالوئیدهای ریشه روندی را عکس روند ساقه نشان داد. این می‌تواند تأییدی بر سنتز آلکالوئیدها در ریشه و انتقال آن‌ها به اندام‌های هوایی باشد. در رابطه با علت اختلاف بین سطوح آلکاوئید گیاهان باززایی شده و شاهد می‌توان به این مسئله اشاره کرد که وقوع تغییرات ژنتیکی سوماکلونال و وجود باند ۱۱۰۰ bp در لاین ۲ (R2) باعث افزایش ۷۷/۷۹ درصدی معنی دار آتروپین کل نسبت به شاهد شده است. همچنین انتقال T-DNA به گیاه نیز، احتمالاً با تأثیر بر ژن‌های سنتز کننده آلکالوئید و تغییر بیان آن‌ها تغییر میزان آلکالوئیدها را به‌دنبال داشته است.

کلمات کلیدی: داتورا متل، آلکالوئید، تراریخت، آتروپین، RAPD PCR

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه

پیشگفتار ۱

۱-۱ مقدمه ۲

۱-۱-۱ مشخصات عمومی تیره سولاناسه ۲

۱-۱-۲ جنس داتورا ۳

۱-۱-۳ گونه *Datura metel* L. ۴

۱-۱-۴ ترکیبات شیمیایی گیاه *Datura metel* L. ۶

۱-۱-۵ خواص درمانی *Datura metel* L. ۶

۱-۱-۶ آلکالوئیدها ۷

۱-۱-۷ آلکالوئیدهای *Datura metel* L. ۷

۱-۲ آگروباکتریوم (*Agrobacterium*) ۱۰

۱-۲-۱ طبقه‌بندی جنس *Agrobacterium* ۱۱

۱-۲-۲ ژنوم *Agrobacterium* ۱۲

۱-۲-۳ شناسایی آگروباکتریوم توسط گیاه ۱۲

۱-۲-۴ ساختمان پلاسمیدهای Ri و Ti ۱۳

۱-۲-۵ T-DNA ۱۵

۱-۲-۶ مکانیسم انتقال T-DNA به سلول‌های گیاهی و تومورزایی ۱۶

۱-۳ باززایی گیاه ۱۸

۱-۴ عوامل مؤثر در باززایی ۲۰

۱-۵ باززایی *Datura metel* L. ۲۲

۱-۶ تنوع سوماکلونال (Somaclonal variation) ۲۳

۱-۶-۱ دلایل تنوع سوماکلونال ۲۴

۱-۶-۲ کاربرد تنوع سوماکلونال ۲۵

۱-۷ ایجاد گیاه تراریخت *Datura metel* L. ۲۶

۱-۸ اهداف تحقیق ۲۸

عنوان | صفحه

فصل دوم: مواد و روش‌ها

۲-۱ تهیه و تکثیر گیاهان داتورا ۲۹
۲-۱-۱ تهیه محیط کشت MS ۲۹
۲-۱-۲ کشت بذرهای داتورا ۲۹
۲-۲ باززایی گیاهان *Datura metel* L. ۳۰
۲-۳ کشت باکتری ۳۱
۲-۳-۱ تهیه سوسپانسیون باکتریای جهت انجام کشت توام ۳۳
۲-۳-۲ کشت توام ۳۳
۲-۴ تست تراریختی گیاهان باززایی شده با PCR ۳۴
۲-۴-۱ استخراج پلاسمید از باکتری ۳۴
۲-۴-۲ استخراج DNA ژنومی از گیاه به روش CTAB ۳۴
۲-۴-۲-۱ آماده‌سازی محلول‌های استخراج ۳۴
۲-۴-۲-۲ روش استخراج DNA ۳۵
۲-۴-۳ واکنش PCR ۳۶
۲-۴-۴ الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۳۸
۲-۵ بررسی تنوع سوماکلونال ۳۸
۲-۶ تعیین مقدار آلکالوئیدها ۳۹
۲-۶-۱ استخراج آلکالوئید از گیاه ۳۹
۲-۶-۳ آماده‌سازی تانک کروماتوگرافی ۴۰
۲-۶-۴ شناسایی لکه‌ها برروی TLC ۴۰
۲-۶-۵ تهیه محلول‌ها ۴۱
۲-۶-۵-۱ تهیه محلول استاندارد آتروپین و اسکوپولامین ۴۱
۲-۶-۵-۲ تهیه معرف داژندروف ۴۱
۲-۶-۵-۳ تهیه معرف نیتریت سدیم ۴۱
۲-۷ ترسیم منحنی استاندارد غلظت/دانسیته و محاسبه مقادیر آلکالوئید ۴۱

عنوان | صفحه

فصل سوم: نتایج

۳-۱ کشت بذر و تکثیر گیاه *Datura metel* L. ۴۲

۳-۲ بهینه سازی شرایط باززایی گیاه ۴۳

۳-۳ کشت همراه ۴۵

۳-۳-۱ تأیید حضور پلاسمید PZM1047 در باکتری مورد استفاده ۴۵

۳-۳-۲ ترانسفورماسیون ۴۶

۳-۴ تأیید تراریخت شدن گیاهان ۴۹

۳-۴-۱ PCR با پرایمر NPTII ۴۹

۳-۴-۲ PCR با پرایمر GUS ۴۹

۳-۵ بررسی تنوع سوماکلونال (Somaclonal variation) در گیاهان باززایی شده غیر تراریخت ۵۰

۳-۶ بررسی آلکالوئیدها ۵۱

۳-۶-۱ محاسبه تراکم نسبی (Relative Density) نمونه‌های استاندارد و نمونه‌های ریشه و اندام‌های هوایی ۵۱

۳-۶-۲ رسم منحنی استاندارد غلظت و دانسیته نسبی ۵۲

۳-۶-۳ مقایسه غلظت آتروپین در اندام‌های هوایی گیاهان شاهد، باززایی شده و تراریخت ۵۲

۳-۶-۴ مقایسه غلظت آتروپین در ریشه گیاهان شاهد، باززایی شده و تراریخت ۵۳

۳-۶-۵ مقایسه میزان آلکالوئید در ریشه و اندام هوایی ۵۴

۳-۶-۶ مقایسه غلظت آتروپین کل در گیاهان شاهد، باززایی شده و تراریخت ۵۶

فصل چهارم: بحث

۴-۱ اثر ترکیبات هورمونی محیط کشت بر میزان باززایی قطعات جداکشت برگ *Datura metel* L. ۵۸

۴-۲ انتقال ژن و تأیید گیاهان تراریخت داتورا ۵۹

۴-۳ بررسی تغییرات سوماکلونال (Somaclonal variation) ۶۳

۴-۴ آنالیزهای کمی آلکالوئید ۶۴

۴-۴-۱ آنالیزهای کمی آلکالوئید در اندام هوایی ۶۴

۴-۴-۲ آنالیزهای کمی آلکالوئید در ریشه ۶۵

۴-۴-۳: تغییرات آلکالوئید کل ۶۶

۴-۵: جمع‌بندی نهایی ۶۷

۴-۶: پیشنهادات ۶۸

عنوان	صفحه

پیوست‌ها ۶۹
منابع و مآخذ ۷۴

فهرست جدول‌ها

عنوان **صفحه**

جدول ۱-۱ جایگاه گیاه *Datura metel* L. در طبقه‌بندی گیاهی ۴
جدول ۲-۱ ترکیب محیط کشت‌های به‌کار رفته برای باززایی گیاه داتورا ۳۰
جدول ۲-۲ ترکیب بافر استخراج DNA از گیاه ۳۵
جدول ۲-۳ حجم و غلظت مواد مورد استفاده در PCR ۳۷
جدول ۲-۴ توالی پرایمرهای RAPD ۳۹
جدول ۳-۱ مقایسه غلظت آتروپین در ریشه و ساقه گیاهان شاهد، باززایی شده و تراریخت ۵۵

فهرست شکل‌ها

عنوان صفحه

شکل ۱-۱ گیاه *Datura metel* L. ۵

شکل ۱-۲ مسیر سنتز آلکالوئیدهای تروپان. ۹

شکل ۲-۱ نقشه پلاسمید. ۳۲

شکل ۳-۱ گیاه داتورا متل در شرایط کشت در شیشه ۴۳

شکل ۳-۲ اثر ترکیبات هورمونی مختلف در باززایی گیاه داتورا ۴۴

شکل ۳-۳ درصد باززایی قطعات جداکشت برگ داتورا در محیط کشت‌های هورمونی مختلف. ۴۵

شکل ۳-۴ تأیید حضور پلاسمید PZM1047 در باکتری A. tumefasciens با تکثیر ژن NPTII ۴۶

شکل ۳-۵ مقایسه قطعات برگ شاهد و تراریخت در محیط باززایی حاوی آنتی‌بیوتیک کانومایسین. ۴۷

شکل ۳-۶ گزینش نوساقه‌های گیاهان تراریخت در محیط کشت باززایی. ۴۸

شکل ۳-۷ تأیید دریافت پلاسمید PZM1047 در گیاهان تراریخت از طریق آزمایشات PCR با پرایمرهای NPTII. (A) و GUS (B) ۴۹

شکل۳-۸ الگوی باندینگ حاصل از تکثیر قطعات DNA با استفاده از پرایمر FPK2-19 ۵۰

شکل۳-۹ کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) غلظت‌های مختلف استاندارد ۵۱

شکل ۳-۱۰ کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) اندام‌های هوایی (A) و ریشه (B) ۵۲

شکل ۳-۱۱ مقایسه غلظت آتروپین در اندام‌های هوایی گیاهان شاهد، باززایی شده و تراریخت ۵۳

شکل ۳-۱۲ مقایسه غلظت آتروپین در ریشه گیاهان شاهد، باززایی شده و تراریخت ۵۴

شکل۳-۱۳ مقایسه نسبت آتروپین اندام‌های هوایی به ریشه در گیاهان شاهد، باززایی شده و تراریخت ۵۶

شکل ۳-۱۴ مقایسه غلظت آتروپین کل در گیاهان شاهد، باززایی شده و تراریخت ۵۷

چکیده

گیاه *Datura metel* L. سرشار از آلکالوئیدهای مهم دارویی وتجاری است، که عبارتند از: هیوسیامین، اسکوپولامین و آتروپین. بنابراین به کارگیری روش های کشت سلولی و طراحی سیستم هایی که افزایش پتانسیل تکثیر و به دنبال آن ازدیاد متابولیت‌های ثانویه را در بردارند، در مورد این گیاه ضروری به نظر می‌رسید. روش‌های مختلفی برای تغییر در میزان ترکیبات ثانویه گیاهی وجود دارد. که از آن جمله می‌توان به اعمال موتاسیون، ایجاد تغییرات سوماکلونال و انتقال T-DNA به گیاه اشاره کرد. در مطالعه حاضر ابتدا شرایط باززائی گیاه از قطعات برگ بهینه گردید و بهترین محیط کشت با بالاترین در صد باززائی (۷۹ در صد) در محیط کشت MS حاوی ۱ میلی گرم در لیتر BAP به دست آمد. در سیستم های باززائی گیاه گاهی احتمال وقوع تغییرات ژنتیکی و یا اپی ژنتیکی مطلوب وجود دارد. به منظور بررسی این موضوع، گیاهان باززائی شده با استفاده از پرایمر های RAPD مورد بررسی قرار گرفتند. در بین پرایمرهای استفاده شده پرایمر FPK2-19 بیشترین تنوع ژنتیکی را نشان داد. پس از بهینه سازی محیط باززایی اقدام به انتقال T-DNA به گیاه، با استفاده از *Agrobacterium tumefaciens* حاوی پلاسمید pZM1047، در برگیرنده ژن‌های GUS و Kan نمودیم. نرخ ترانسفورماسیون در این پژوهش حدود ۱۳ درصد به‌دست آمد. که نسبت به درصد گزارش شده توسط محققان قبلی ۲ درصد افزایش داشت. بعد از باززایی از گیاهان تراریخت چندین لاین حاصل شد و آنالیز مقدار کمی آلکالوئید با استفاده از روش TLC در اندام‌های هوایی و همچنین ریشه گیاهان شاهد، باززایی شده و لاین‌های ۱، ۲ و ۳ تراریخت صورت گرفت. در مجموع آتروپین کل در مورد لاین ۲ تراریخت (T2) ۸۳/۰۴ درصد، افزایش معنی دار نسبت به شاهد نشان داد. همچنین لاین‌های ۲ باززایی شده (R2) و لاین ۱ تراریخت (T1) نیز به‌ترتیب افزایش ۷۷/۷۹ و ۶۱/۰۱ درصدی معنی دار نسبت به شاهد نشان دادند. از طرف دیگر لاین ۳ باززایی شده (T3) ۹/۴۰ درصد کاهش آتروپین کل نسبت به شاهد نشان داد. همچین نتایج بررسی آلکالوئیدها در اندام‌های هوایی نشان داد که گیاهان لاین ۲ تراریخت با مقدار ۱۶۴/۹۷ درصد افزایش معنی دار آلکالوئید نسبت به شاهد بیشترین مقدار آلکالوئید را در بین گیاهان مورد بررسی نشان دادند. این در حالی بود که ریشه‌های این لاین با ۹۴/۲۵ درصد کاهش معنی‌دار آلکالوئید نسبت به شاهد دارای کمترین مقدار آلکالوئید در بین گیاهان مورد بررررسی هستند. در مجموع آنالیز آلکالوئیدهای ریشه روندی را عکس روند ساقه نشان داد. این می‌تواند تأییدی بر سنتز آلکالوئیدها در ریشه و انتقال آن‌ها به اندام‌های هوایی باشد. در رابطه با علت اختلاف بین سطوح آلکاوئید گیاهان باززایی شده و شاهد می‌توان به این مسئله اشاره کرد که وقوع تغییرات ژنتیکی سوماکلونال و وجود باند ۱۱۰۰ bp در لاین ۲ (R2) باعث افزایش ۷۷/۷۹ درصدی معنی دار آتروپین کل نسبت به شاهد شده است. همچنین انتقال T-DNA به گیاه نیز، احتمالاً با تأثیر بر ژن‌های سنتز کننده آلکالوئید و تغییر بیان آن‌ها تغییر میزان آلکالوئیدها را به‌دنبال داشته است.

کلمات کلیدی: داتورا متل، آلکالوئید، تراریخت، آتروپین، RAPD PCR

فصل اول

مقدمه

پیشگفتار:

گیاهان ازسال‌ها پیش به‌عنوان یکی از منابع طبیعی تولید کننده ترکیبات دارویی مورد توجه و استفاده پزشکان بوده‌اند. در کشورهای پیشرفته گیاهان منبع اصلی مواد دارویی هستند. حتی امروزه، سازمان بهداشت جهانی اعلام نموده که بیش از ۸۰ درصد مردم دنیا هنوز در طب سنتی از گیاهان دارویی برای درمان استفاده می‌نمایند. گیاهان همچنین منبع بسیاری از درمان‌های جدید نیز می‌باشند. تقریباً یک چهارم داروهای تولید شده ای گیاهحاوی عصاره‌هی یا ترکیباتی هستند که از مواد گیاهی به‌دست آمده‌اند یا براساس ترکیبات گیاهی مدل‌سازی شده‌اند (Palazon et al., 2008). از سویی نیاز انسان به سایر اشکال حیات برای تداوم زندگی و از سوی دیگر آرامش روحی به‌دست آمده از زندگی در جوار طبیعت بر این باور صحه می‌گذارد که باید درمان آلام روحی و جسمی بشر را در دامان پر مهر طبیعت جست و جو کرد. با این‌حال عوامل متعدد مانند نور، دما، ارتفاع و تفاوت خاک با تأثیر بر میزان و ماهیت ترکیبات شیمیایی گیاه، مشکلاتی را در تولید و به‌کارگیری داروهای گیاهی ایجاد کرده است. از سوی دیگر، تهیه این فرآورده‌ها در مقیاس وسیع نیاز به کشت گیاه در مقیاس گسترده دارد که از نظر اقتصادی چندان به‌صرفه نمی‌باشد (Trease and Evans, 2002). بنابراین درسال‌های اخیر به کارگیری روش‌های کشت سلولی در تهیه مواد دارویی باارزش به‌ویژه متابولیت‌های ثانویه[1] گیاهی، مورد توجه خاص قرار گرفته است. اما متأسفانه علی‌رغم تلاش‌های گسترده انجام شده در این

---

[1] Secondary metabolite

زمینه، گزارش‌های اندکی ازموفقیت روش‌های کشت سلول‌های گیاهی در تولید مواد دارویی مهم از نظر تجاری، وجود دارد. برای نیل به این هدف باید کشت سلول‌های گیاهی جهت تولید مواد مطلوب در مقیاس زیاد، بهینه‌سازی شود (Rawia and Michael, 2004). به همین دلیل تاکنون راه‌کارهای زیادی برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در کشت بافت گیاهی صورت گرفته است. از جنبه روش‌های بیوتکنولوژیک برای تولید ترکیبات مطلوب، تحریک مسیرهای متابولیکی در سلول‌های گیاهی کشت شده، از جمله روش‌هایی است که منجر به افزایش قابل توجه در تولید متابولیت‌های ثانویه می‌شود. به‌عنوان مثال می‌توان به ادغام T-DNA[1] در گیاه توسط آگروباکتریوم[2] نیز اشاره کرد. امروزه ایجاد گیاهان تراریخت[3] اهداف زیادی را دنبال می‌کند. از جمله گیاهان تراریخت به منظور بررسی نقش و عمل ژن‌ها، افزایش محصول، افزایش مقاومت نسبت به تنش‌های زیستی و غیرزیستی تولید و به کار می‌رود (Wang and Yuan, 2004).

۱-۱: مقدمه

۱-۱-۱: مشخصات عمومی تیره سولاناسه[4]

گیاهان این خانواده علفی، درختچه‌ای یا درختی و گاهی اوقات بالارونده هستند. تعدادی از این گیاهان دارای بخش‌های خوراکی هستند (گوجه‌فرنگی و بادمجان). تعدادی به‌علت دارا بودن مواد سمی اثر کشنده دارند. در بین این گونه تعداد فراوانی با ارزش درمانی زیاد یافت می‌شود که تعداد زیادی از آن‌ها در ایران به‌حالت وحشی می‌رویند. برگ‌ها به‌صورت متناوب ساده و بدون گوشوارک می‌باشند. گل‌آذین گرزن و گل دو جنسی معمولاً منظم و در مواردی نیز نامنظم دارند.

دستگاه زایای ماده: مادگی مرکب از دو برچه با تخمک‌های متعدد، تخمدان فوقانی، خامه انتهایی، میوه سته یا کپسول می‌باشد. بذر آن با رویانی خمیده یا راست و واجد اندوسپرم است (Jones and Louch, 1976).

---

[1] Transferred DNA

[2] Agrobacterium

[3] Transgenic

[4] Solanaceae

از اختصاصات تشریحی این تیره می‌توان به وجود بافت آبکشی ابتدایی، سلول‌های ترشح کننده و سلول‌های محتوی بلورهای اگزالات کلسیم اشاره کرد (قهرمان، ۱۳۷۳).

جنس‌های مهم این تیره عبارتند از: ۱-Nicotinia با ۶۶ گونه ۲- Withania با ۱۰ گونه ۳- Dubusia با ۲ گونه، ۴- Capsicum با ۵۰ گونه، ۵- Hyosyamus با ۲۰ گونه ۶- Physalis با ۱۰۰ گونه ۷- Atropa با ۴ گونه ۸- Solanum با ۱۴۰۰ گونه و۹- Datura با حدود ۱۰ گونه (آزاد بخت، ۱۳۷۸).

۱-۱-۲: جنس داتورا

عقیده بر این است که داتورا از کلمه tat به‌معنای گزنده مشتق شده است. در قرون وسطی به‌صورت یک گیاه زینتی زیبا مورد توجه بوده است. مدتی پس از آن تبهکاران برای مسموم کردن قربانیان خود از این گیاه استفاده می‌کرده‌اند. امروزه این گیاه جزء گیاهان سمی و مخدر به‌حساب می‌آید (شماع و محمودی، ۱۳۶۷). جنس داتورا یکی از مهم‌ترین جنس‌های تیره سولاناسه می‌باشد که در نواحی گرم و معتدل کره زمین پراکنده است. بوته‌ای یکساله است و ارتفاع آن از ۳۰ سانتی‌متر تا ۲ متر می‌رسد. میزان آلکالوئیدها در قسمت‌های مختلف گیاه و نیز در گونه‌های مختلف این جنس اختلاف زیادی دارد. ولی نوع آلکالوئیدها در گونه‌های مختلف تقریباً مشابه بوده و بیشترین مقدار آلکالوئیدهای تمام گونه‌ها را آتروپین (هیوسیامین) و اسکوپولامین (هیوسین) تشکیل می‌دهد (Evan and Willian, 2002).

داتورا دارای گونه‌های زیادی می‌باشد، که از مهم‌ترین آن‌ها می‌توان به گونه‌های زیر اشاره کرد (دلاور، ۱۳۶۷).

D. metel	*D. stramonium*	*D. suarealens*
D. fastuosa	*D. tatula*	*D. leavis*
D. arborea	*D. innoxia*	*D. albanes*

۱-۱-۳: گونه *Datura metel* L.

Datura metel L. در طبقه‌بندی گیاهی کرانکوئیست مطابق جدول ۱-۱ می‌باشد.

جدول۱-۱ جایگاه گیاه *Datura metel* L. در طبقه بندی گیاهی (قهرمان، ۱۳۷۳)

Magnoliophyta	شاخه
Magnoliopsida	رده
solanales	راسته
Solanaceae	خانواده
Datura	جنس
Metel	گونه

گیاهی به‌صورت علفی ویک ساله است. این گیاه درختچه ایست، دارای گل‌های بزرگ، برگ‌های تخم‌مرغی صاف و بدون دندانه است (شکل ۱-۱). دانه‌ها، قهوه‌ای روشن و گوشه‌ای شکل هستند و نسبت به *Datura stramonium* L. بزرگتر، صاف و مسطح‌تر هستند. برگ‌های آن نسبت به استرامونیوم تیره‌تر و صاف‌تر است و کناره برگ‌ها نیز غیر دندانه‌ای و کامل است.

میوه‌ها به‌صورت کپسول سبز رنگ و پوشیده از خار است. البته این خارها مثل استرامونیوم خشن و سبزرنگ نیستند. ساقه‌های گیاه حالت خزنده دارند و نسبت به ساقه‌های استرامونیوم ارتفاع کمتری دارند. این گیاه در ایران، در بندرعباس و بلوچستان می‌روید و به احتمال زیاد از خارج وارد کشور شده و بومی ایران نیست (میر حیدر، ۱۳۷۳).