

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



بسمه تعالی

تاییدیه اعضای هیات داوران حاضر در جلسه دفاع از رساله دکتری

خانم مریم مرادی معین دانشجوی مقطع ارشد رشته علوم گیاهی به شماره دانشجویی ۸۹۵۱۰۴۱۰۲۲ تحت عنوان: " اثر بیش بیانی ژنهای pmt و h6h بر تولید تروپان آلکالوئید ها در ریشه های مومنین گیاه شبابیزک ( *Atropa belladonna* ) " در تاریخ ۱۳۹۱/۱۱/۰۸ روز یکشنبه ساعت ۹ در اتاق شماره ۵۰۰۹ دانشکده علوم زیستی ارائه کردند.

اعضای هیات داوران نسخه نهایی این رساله را از نظر فرم و محتوا تایید کرده است و پذیرش آنرا برای تکمیل درجه دکتری پیشنهاد می کنند.

اعضای هیات داوران	نام و نام خانوادگی	رتبه علمی	امضاء
۱- استاد راهنما	آقای دکتر مظفر شریفی	دانشیار	
۲- استاد ناظر داخلی	آقای دکتر حسن زارع مایوان	دانشیار	
۳- استاد ناظر داخلی	آقای دکتر شاهرخ کاظم پور اوصالو	دانشیار	
۴- استاد ناظر خارجی	خانم دکتر فراح کریمی	استادیار	
۵- نماینده تحصیلات تکمیلی	آقای دکتر حسن زارع مایوان	دانشیار	



آیین‌نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهشهای علمی دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه: با عنایت به سیاست‌های پژوهشی و فناوری دانشگاه در راستای تحقق عدالت و کرامت انسانها که لازمه شکوفایی علمی و فنی است و رعایت حقوق مادی و معنوی دانشگاه و پژوهشگران، لازم است اعضای هیأت علمی، دانشجویان، دانش‌آموختگان و دیگر همکاران طرح، در مورد نتایج پژوهشهای علمی که تحت عناوین پایان‌نامه، رساله و طرحهای تحقیقاتی با هماهنگی دانشگاه انجام شده است، موارد زیر را رعایت نمایند:

ماده ۱- حق نشر و تکثیر پایان‌نامه/ رساله و درآمدهای حاصل از آنها متعلق به دانشگاه می باشد ولی حقوق معنوی پدید آورندگان محفوظ خواهد بود.

ماده ۲- انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان‌نامه/ رساله به صورت چاپی در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی باید به نام دانشگاه بوده و با تایید استاد راهنمای اصلی، یکی از اساتید راهنما، مشاور و یا دانشجوی مسئول مکاتبات مقاله باشد. ولی مسئولیت علمی مقاله مستخرج از پایان‌نامه و رساله به عهده اساتید راهنما و دانشجو می باشد.

تبصره: در مقالاتی که پس از دانش‌آموختگی بصورت ترکیبی از اطلاعات جدید و نتایج حاصل از پایان‌نامه/ رساله نیز منتشر می‌شود نیز باید نام دانشگاه درج شود.

ماده ۳- انتشار کتاب، نرم افزار و یا آثار ویژه (اثری هنری مانند فیلم، عکس، نقاشی و نمایشنامه) حاصل از نتایج پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی کلیه واحدهای دانشگاه اعم از دانشکده ها، مراکز تحقیقاتی، پژوهشکده ها، پارک علم و فناوری و دیگر واحدها باید با مجوز کتبی صادره از معاونت پژوهشی دانشگاه و براساس آئین‌نامه های مصوب انجام شود.

ماده ۴- ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه یافته ها در جشنواره‌های ملی، منطقه‌ای و بین‌المللی که حاصل نتایج مستخرج از پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی دانشگاه باید با هماهنگی استاد راهنما یا مجری طرح از طریق معاونت پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

ماده ۵- این آیین‌نامه در ۵ ماده و یک تبصره در تاریخ ۸۷/۴/۱ در شورای پژوهشی و در تاریخ ۸۷/۴/۲۲ در هیأت رئیسه دانشگاه به تایید رسید و در جلسه مورخ ۸۷/۷/۱۵ شورای دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب در شورای دانشگاه لازم‌الاجرا است.

«اینجانب..... در رشته..... دانشجوی رشته..... علوم پایه..... ورودی سال تحصیلی..... ۱۳۸۹ مقطع..... دانشکده..... متعهد می شوم کلیه نکات مندرج در آئین‌نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهشهای علمی دانشگاه تربیت مدرس را در انتشار یافته های علمی مستخرج از پایان‌نامه / رساله تحصیلی خود رعایت نمایم. در صورت تخلف از مفاد آئین‌نامه فوق‌الاشعار به دانشگاه وکالت و نمایندگی می‌دهم که از طرف اینجانب نسبت به لغو امتیاز اختراع بنام بنده و یا هر گونه امتیاز دیگر و تغییر آن به نام دانشگاه اقدام نماید. ضمناً نسبت به جبران فوری ضرر و زیان حاصله بر اساس برآورد دانشگاه اقدام خواهم نمود و بدینوسیله حق هر گونه اعتراض را از خود سلب نمودم»

امضا:.....  
تاریخ:.....  
۹۲/۲/۱۰



### آیین نامه چاپ پایان نامه (رساله) های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان نامه (رساله) های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس، مبین بخشی از فعالیت های علمی - پژوهشی دانشگاه است بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می شوند:

ماده ۱: در صورت اقدام به چاپ پایان نامه (رساله) ی خود، مراتب را قبلاً به طور کتبی به «دفتر نشر آثار علمی» دانشگاه اطلاع دهد.

ماده ۲: در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه) عبارت ذیل را چاپ کند:  
«کتاب حاضر، حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد/ رساله دکتری نگارنده در رشته علم بیامی است که در سال ۱۳۹۱ در دانشکده علم زیج دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی سرکار خانم/جناب آقای دکتر مطهر شریعی، مشاوره سرکار خانم/جناب آقای دکتر \_\_\_\_\_ و مشاوره سرکار خانم/جناب آقای دکتر \_\_\_\_\_ از آن دفاع شده است.»

ماده ۳: به منظور جبران بخشی از هزینه های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت چاپ) را به «دفتر نشر آثار علمی» دانشگاه اهدا کند. دانشگاه می تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر در معرض فروش قرار دهد.

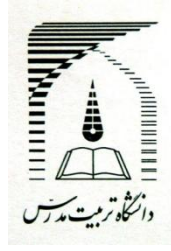
ماده ۴: در صورت عدم رعایت ماده ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرس، تأدیه کند.

ماده ۵: دانشجو تعهد و قبول می کند در صورت خودداری از پرداخت بهای خسارت، دانشگاه می تواند خسارت مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند؛ به علاوه به دانشگاه حق می دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در ماده ۴ را از محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش، تامین نماید.

ماده ۶: اینجانب میرم طوسی سن دانشجوی رشته علم بیامی مقطع کارشناسی ارشد تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می شوم.

نام و نام خانوادگی: میرم طوسی سن  
تاریخ و امضا: ۹۲/۲/۱۰





دانشکده علوم زیستی

پایان نامه دوره کارشناسی ارشد علوم گیاهی

(فیزیولوژی گیاهی)

عنوان:

اثر بیش بیانی ژن های *pmt* و *h6h* بر تولید تروپان آلکالوئیدها در ریشه های  
موئین شابیژک (*Atropa belladonna*)

نگارش:

مریم مرادی معین

استاد راهنما:

دکتر مظفر شریفی

بهمن ۱۳۹۱

## ن والقلم و ما یسطرون

قسم به قلم و آنچه که می نویسند.

"سوره القلم، آیه ۱"

نوشتن مقدس است و قلم آن چنان قداستی دارد که آفرینندهی قلم، خودش به آن سوگند یاد می کند و پیام آورندهی قلم، آن را افضل من دمء الشهداء می خواند. نوشتن سند است، سند رسالت انسان و سند اصالت انسان آزاده.

تقدیم به:

آنان که نه از دانشمندان لایقند و نه از دینداران جاہل<sup>۱</sup>

وباساس از:

پدر و مادر بزرگوارم

---

<sup>۱</sup> برگرفته از کتاب شهید دکتر پاکنژاد

## سپاس گزارى:

سپاس و ستايش خدايى را كه نام او راحت روح است و پيغام او مفتاح فتوح. او كه عشق به يادگيرى علم را در وجودم نهاد و شوق گام نهادن در راه دانش را در قلبم. در پايان اين دوره، بر خود لازم مى دانم، از صميم قلب، از استاد گراميم **جناب آقاى دكتور مظفر شريفى** كه همواره با همراهى و همدلى شان سبب فراغ بال و آسودگى خاطر در طول مدت تحقيق شدند، صميمانه قدردانى كنم. همچنين از دوست عزيزم سركار خانم **دكتور نجمه احمديان چاشمى** كه از راهنمايى هاى سودمند ايشان بسيار بهره بردم، صميمانه سپاس گزارى مى نمايم. از دوست گرامى، **جناب آقاى دكتور محمد ضعيفى زاده** كه در امر تجزيه و تحليل آمارى اين تحقيق كمك شايانى به من نمودند، كمال تشكر را دارم. از اساتيد گرامى، سركار خانم **دكتور فرح كريمى**، **جناب آقاى دكتور حسن زارع مايوان** و **آقاى دكتور شاهرخ كاظم پور اصلو** كه زحمت داورى اين پايان نامه را بر عهده گرفتند بسيار سپاس گزارم. از زحمات ساير اساتيد محترم گروه، سركار خانم دكتور قناتى و دكتور زرین كمر نیز تشكر مى نمايم. از دوستان عزيزم در گروه علوم گياهي از جمله خانم ها خانپور، تحصيلی، درخشانی و بشامگان و نیز كارشناس محترم گروه، سركار خانم خرمی شاد نیز سپاس گزارم.

## چکیده

شابیزک (*Atropa belladonna*)، گیاهی است از تیره سیب زمینی (*Solanacea*) که مهمترین منبع تجاری تروپان آلکالوئیدهایی مانند هیوسیامین و اسکوپولامین محسوب می‌شود. یکی از روش‌های افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه، بیش بیانی آنزیم‌های کلیدی مسیرهای بیوسنتزی آن‌ها می‌باشد. دو آنزیم کلیدی در مسیر بیوسنتزی تروپان آلکالوئیدها، آنزیم پوترسین N-متیل ترانسفراز (PMT) و هیوسیامین  $\beta$ -۶ هیدروکسیلاز (H6H) است. در این مطالعه، ژن‌های *pmt* و *h6h* توسط سه سازه‌ی *Agrobacterium rhizogenese* پس از تلقیح با قطعات برگ‌ی وارد ژنوم شابیزک شدند و ریشه موئین مربوط به هر یک بدست آمد. اولین سازه واجد ژن *pmt*، دومین سازه واجد ژن *h6h* و سومین سازه واجد هر دوی این ژن‌ها (*pmt/h6h*) بودند. پروموتور به کار رفته در این سازه‌ها، مربوط به ویروس موزاییک گل کلم موسوم به CaMV می‌باشد. ریشه‌های موئین حاصل از تلقیح با این سویه‌ها از نظر تراختی و وجود ژن خارجی به کمک PCR بررسی شدند و سپس میزان رشد و تغییرات وزن تر آن‌ها مقایسه گردید. میزان تروپان آلکالوئیدها، کربوهیدرات‌ها و پروتئین‌های محلول آن‌ها سنجیده شد. ریشه‌های بیش بیان کننده‌ی ژن *pmt* نسبت به ریشه‌های شاهد دارای رشد بیشتر و نیز افزایش قابل توجه سطوح هیوسیامین و اسکوپولامین بودند. ریشه‌های بیش بیان کننده‌ی ژن *h6h* از نظر وزن تر تفاوت معناداری با گروه شاهد نداشتند. میزان هیوسیامین نسبت به گروه شاهد افزایش، اما میزان اسکوپولامین در آن‌ها کاهش پیدا کرده بود. ریشه‌های موئین بیش بیان کننده‌ی توأم هر دو ژن (*pmt/h6h*) رشد بیشتری نسبت به گروه شاهد داشتند. اما میزان هیوسیامین در آن‌ها کاهش یافته بود در حالی که میزان اسکوپولامین تغییری نکرده بود. در تمامی ریشه‌های تراختی‌ی مذکور میزان کربوهیدرات‌های محلول نسبت به گروه شاهد افزایش یافته بود. در حالی که میزان پروتئین‌های محلول در هیچ یک از آنها تغییر قابل ملاحظه‌ای نشان نداد. بررسی الکتروفورز پروتئین‌ها با ژل SDS-PAGE نشان داد که انتقال ژن‌های خارجی به ریشه‌های موئین، موجب تغییر در



الگوی بیان پروتئینی آنها نسبت به ریشه‌های موئن شاهد می‌گردد. این تغییر بیشتر به صورت ظهور باندهای جدید و نیز تقویت برخی باندهای دیگر بود.

**کلمات کلیدی:** *Atropa belladonna* ، کشت ریشه موئن، بیش بیانی، تروپان آلکالوئیدها، هیوسیامین، اسکوپولامین، ژن‌های *pmt* و *h6h* .

## فهرست مطالب

فصل ۱ مقدمه.....	۱
۱-۱ تیره سیب زمینی.....	۲
۲-۱ مشخصات گیاه شناسی شاییزک.....	۲
۳-۱ اهمیت دارویی شاییزک.....	۳
۴-۱ آلکالوئیدها.....	۴
۵-۱ اهمیت اقتصادی تروپان آلکالوئیدها.....	۵
۶-۱ مسیر بیوسنتز تروپان آلکالوئیدها.....	۶
۷-۱ آنزیم‌های کلیدی مسیر بیوسنتز تروپان آلکالوئیدها.....	۸
۱-۷-۱ پوترسین N-متیل ترانسفراز (PMT).....	۸
۲-۷-۱ آنزیم تروپینون ردوکتاز I و II (TR I و TR II).....	۹
۳-۷-۱ آنزیم هیوسیامین 6-β هیدروکسیلاز (H6H).....	۱۰
۸-۱ ریشه موئین.....	۱۲
۱-۸-۱ کشت ریشه موئین.....	۱۲
۲-۸-۱ ویژگی‌ها و مزایای کشت ریشه موئین.....	۱۲
۳-۸-۱ تشکیل ریشه موئین.....	۱۳
۴-۸-۱ عوامل تأثیر گذار روی کشت ریشه موئین.....	۱۴
۹-۱ انتقال ژن با استفاده از اگروباکتریوم.....	۱۵
۱-۹-۱ سیستم بیماری زایی باکتری (Vir genes).....	۱۷
۲-۹-۱ چگونگی انتقال T-DNA به ژنوم گیاهان.....	۱۸

- ۱-۹-۳ مزایا و معایب استفاده از اگروباکتریوم برای انتقال ژن..... ۱۹
- ۱-۱۰ انتقال ژن و تولید گیاهان تراریخت به عنوان بیوراکتور..... ۲۰
- ۱-۱۱ مهندسی متابولیک..... ۲۰
- ۱-۱۲ بیش بیانی آنزیم‌های کلیدی در مسیر بیوسنتزی تروپان آلکالوئیدها..... ۲۲
- ۱-۱۳ مروری بر پژوهش‌های انجام شده..... ۲۲
- ۱-۱۴ اهداف مورد نظر در این پژوهش..... ۲۴
- فصل ۲- مواد و روش‌ها..... ۲۶**
- ۲-۱ تهیه نمونه گیاهی..... ۲۷
- ۲-۲ سازه های باکتریایی مورد استفاده..... ۲۷
- ۲-۳ کشت سویه های باکتریایی..... ۲۸
- ۲-۴ تلقیح قطعات گیاهی و بدست آوردن ریشه های موئین..... ۲۹
- ۲-۵ اثبات تراریخت بودن ریشه های حاصل..... ۲۹
- ۲-۶ اثبات انتقال ژن های خارجی pmt و h6h به ریشه های موئین..... ۳۰
- ۲-۷ شیوه ی استخراج DNA..... ۳۰
- ۲-۸ انجام PCR..... ۳۱
- ۲-۸-۱ طراحی روش PCR..... ۳۱
- ۲-۸-۲ برنامه PCR برای اثبات تراریخت بودن ریشه ها..... ۳۱
- ۲-۸-۳ برنامه PCR برای اثبات انتقال ژن های مورد نظر به ریشه های موئین..... ۳۱
- ۲-۹ الکتروفورز و تهیه عکس از ژل آگارز..... ۳۲
- ۲-۱۰ الکتروفورز ژل آگارز..... ۳۲
- ۲-۱۱ طرز تهیه محلول ها و بافرهای مورد نیاز در الکتروفورز..... ۳۳
- ۲-۱۱-۱ تهیه بافر الکتروفورز TBE (5X)..... ۳۳
- ۲-۱۱-۲ تهیه محلول اتیدیوم برماید (۱۰ mg/ml)..... ۳۳

۳۳	۲-۱۱-۳ تهیه بافر سنگین کننده (Stock Solution).....
۳۵	۲-۱۲ تکثیر ریشه های موئین.....
۳۵	۲-۱۳ کشت ریشه های موئین و بررسی میزان وزن تر.....
۳۶	۲-۱۴ استخراج تروپان آلکالوئیدها.....
۳۷	۲-۱۵ سنجش آلکالوئیدها به وسیله ی HPLC.....
۳۷	۲-۱۶ سنجش کربوهیدرات های محلول.....
۳۷	۲-۱۷ استخراج کربوهیدرات های محلول.....
۳۸	۲-۱۸ تعیین مقدار کربوهیدرات های محلول با استفاده از اسپکتروفتومتر.....
۳۸	۲-۱۹ رسم نمودار استاندارد کربوهیدرات ها.....
۳۹	۲-۲۰ سنجش پروتئین کل.....
۳۹	۲-۲۰-۱ استخراج پروتئین کل.....
	۲-۲۰-۲ الکتروفورز ژل پلی اکریل آمید در حضور سدیم دودسیل سولفات پروتئین ها (SDS- PAGE).....
۴۱	۲-۲۱ تجزیه و تحلیل آماری.....
۴۴	۳- نتایج.....
۴۶	۳-۱ نتایج تلفیح قطعات برگی شابیزک با آگر باکتریوم ریزوژنز.....
۴۹	۳-۲ نتایج بررسی های مولکولی.....
۴۹	۳-۲-۱ اثبات موئین بودن ریشه ها و حضور T-DNA در آنها.....
۵۰	۳-۲-۲ اثبات انتقال نسخه های خارجی ژن های pmt و h6h به ریشه های موئین.....
۵۱	۳-۳ تاثیر بیش بیانی ژن h6h، pmt و pmt/h6h بر رشد ریشه های موئین.....
۵۳	۳-۴ نتایج بررسی های بیوشیمیایی در ریشه های موئین تراریخت.....
۵۳	۳-۴-۱ انتخاب لاین های برتر از نظر میزان هیوسیامین و اسکوپولامین.....
۵۵	۳-۴-۲ اثر بیش بیانی ژن pmt بر میزان تولید هیوسیامین و اسکوپولامین در لاین های برتر.....

۳-۴-۳	اثر بیش بیانی ژن h6h بر میزان تولید هیوسیامین و اسکوپولامین.....	۵۶
۳-۴-۴	اثر بیش بیانی توأم ژن های pmt و h6h بر میزان تولید هیوسیامین و اسکوپولامین.....	۵۷
۳-۴-۵	میانگین هیوسیامین و اسکوپولامین در مجموع لاین ها.....	۵۷
۳-۴-۶	تاثیر بیش بیانی ژن های pmt و h6h بر میزان کربوهیدرات های محلول.....	۵۸
۳-۴-۷	تاثیر بیش بیانی ژن های pmt و h6h بر میزان پروتئین های محلول.....	۵۹
۳-۴-۸	الکتروفورز پروتئین ها.....	۶۰
<b>فصل ۴- بحث ، نتیجه گیری و پیشنهادها.....</b>		
۴-۱	تولید ریشه های موئین تراریخت.....	۶۴
۴-۲	تاثیر بیش بیانی ژن h6h ، pmt و h6h/pmt بر وزن تر ریشه های موئین.....	۶۴
۴-۳	تاثیر بیش بیانی ژن های h6h ، pmt و h6h/pmt بر میزان هیوسیامین و اسکوپولامین.....	۶۶
۴-۴	تاثیر بیش بیانی ژن های h6h ، pmt و h6h/pmt بر میزان کربوهیدرات های محلول.....	۶۹
۴-۵	تاثیر بیش بیانی ژن های h6h ، pmt و h6h/pmt بر میزان پروتئین های محلول.....	۷۰
۴-۶	نتایج حاصل از SDS-PAGE پروتئین ها.....	۷۰
۴-۷	بررسی تغییرات کلی حاصل از بیش بیانی ژن pmt بر روی ریشه های موئین حاصل.....	۷۱
۴-۸	بررسی تغییرات کلی حاصل از بیش بیانی ژن h6h بر روی ریشه های موئین حاصل.....	۷۱
۴-۹	بررسی تغییرات کلی حاصل از بیش بیانی ژن های h6h/pmt در ریشه های موئین حاصل.....	۷۲
۴-۱۰	انتخاب بهترین گروه از ریشه های موئین تراریخت.....	۷۲
۴-۱۱	جمع بندی نهایی.....	۷۳
<b>پیشنهادها.....</b>		
<b>منابع.....</b>		
		۷۶

## فهرست نمودارها

- نمودار ۱-۳ میزان وزن تر، در ریشه های موئین گیاه *A. belladonna* واجد نسخه های خارجی ژن های h6h, pmt و pmt/h6h در مقایسه با ریشه های موئین وحشی (vc)..... ۵۳
- نمودار ۲-۳ محتوای هیوسیامین در ریشه های موئین گیاه *A. belladonna* واجد نسخه های خارجی ژن های h6h, pmt و pmt/h6h در مقایسه با ریشه های موئین وحشی (vc)..... ۵۴
- نمودار ۳-۳ محتوای اسکوپولامین، در ریشه های موئین گیاه *A. belladonna* واجد نسخه های خارجی ژن های h6h, pmt و pmt/h6h در مقایسه با ریشه های موئین وحشی (vc)..... ۵۵
- نمودار ۴-۳ محتوای تروپان آلکالوئیدی در لاین های برتر ریشه های موئین گیاه *A. belladonna* واجد نسخه های خارجی ژن های h6h, pmt و pmt/h6h در مقایسه با ریشه های موئین وحشی (vc)..... ۵۶
- نمودار ۵-۳ میانگین هیوسیامین و اسکوپولامین در ریشه های موئین *A. belladonna* واجد ژن های اضافی h6h, pmt و pmt/h6h..... ۵۸
- نمودار ۶-۳ میزان کربوهیدرات های محلول، در لاین های برتر ریشه های موئین گیاه *A. belladonna* واجد نسخه های خارجی ژن های h6h, pmt و pmt/h6h در مقایسه با ریشه های موئین وحشی (vc)..... ۵۹
- نمودار ۷-۳ میزان پروتئین های محلول، در لاین های برتر ریشه های موئین گیاه *A. belladonna* واجد نسخه های خارجی ژن های h6h, pmt و pmt/h6h در مقایسه با ریشه های موئین وحشی (vc)..... ۶۰

## فهرست شکل‌ها

- شکل ۱-۱ گیاه شابیزک *Atropa belladonna* L. ..... ۳
- شکل ۲-۱ مسیر بیوسنتز تروپان آلکالوئیدها..... ۷
- شکل ۳-۱ پلازمید Ri در اگروباکتریوم ریزوژنز..... ۱۷
- شکل ۴-۱ چگونگی انتقال T-DNA به ژنوم گیاهان..... ۱۹
- شکل ۵-۱ روش های افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه با استفاده از مهندسی متابولیت‌ها..... ۲۱
- شکل ۱-۲ دستگاه دانسیتومتر..... ۴۴
- شکل ۱-۳ گیاه شابیزک به کار رفته برای تهیه ریشه های موئین..... ۴۶
- شکل ۲-۳ مقایسه ریخت شناسی ریشه‌های موئین و غیرموئین..... ۴۸
- شکل ۳-۳ مراحل ظهور و رشد ریشه های موئین..... ۴۸
- شکل ۴-۳ نتیجه ی آزمایش PCR برای ژن rolC..... ۵۰
- شکل ۵-۳ نتیجه ی آزمایش PCR برای قطعه ی CaMV 35s..... ۵۱
- شکل ۶-۳ نتیجه ژل SDS-PAGE پروتئین‌ها در ریشه‌های موئین گیاه *A. belladonna* واجد نسخه‌های خارجی ژن‌های pmt/h6h و h6h, pmt در مقایسه با ریشه‌های موئین وحشی (vc)..... ۵۹
- شکل ۷-۳ مقایسه‌ی منحنی دانسیتومتر ژل الکتروفورز پروتئین‌ها در ریشه موئین شاهد (vc: vector control) و ریشه‌های موئین تراریخت واجد نسخه‌های خارجی ژن‌های pmt/h6h و h6h, pmt..... ۶۰

## فهرست جداول

- جدول ۱-۲ سازه های باکتریایی به کار رفته در این پژوهش..... ۲۸
- جدول ۲-۲ توالی آغازگرهای به کار رفته در آزمایش های PCR..... ۳۱
- جدول ۳-۲ تهیه ژل تحتانی و فوقانی..... ۴۳
- جدول ۱-۴ جمع بندی نهایی تغییرات حاصل از بیش بیانی ژن های مربوطه..... ۷۳



# فصل اول

## مقدمه

## ۱-۱ تیره سیب زمینی (Solanaceae)

تیره سیب زمینی یکی از تیره‌های مهم با ۵۸ جنس و نزدیک به ۲۰۰۰ گونه است که ۱۰۰ گونه‌ی آن را فقط سرده سیب زمینی تشکیل می‌دهد (قهرمان ۱۳۷۳). تعدادی از گیاهان این خانواده مانند *Atropa*, *Duboisia*, *Scopolis*, *Hyoscyamus* و ... به دلیل تولید آکالوئیدهای مهم به عنوان داروهای گیاهی استفاده می‌شوند (Zhang et al. 2004). برخی از اعضای این تیره را "میدریاتیک" گویند، زیرا دارای آکالوئیدهایی مانند هیوسیامین و اسکوپولامین هستند که بازکننده مردمک چشم اند (قهرمان ۱۳۷۳).

## ۲-۱ مشخصات گیاه شناسی شابی‌زک

سرده شابی‌زک (*Atropa*) با ارتفاع ۱-۲ متر، با برگ‌هایی متناوب و بیضی شکل، گل‌هایی با کاسبرگ‌های بلند در هنگام میوه‌دهی، ۲-۳/۵ سانتی متر طول، استوانه‌ای-فنجانی شکل، دمگل بلند، میوه سته با رنگ مشکی یا به ندرت زرد است (Schonbeck-Temesy 1972). زمان گل‌دهی این گیاه بهار و زمان میوه‌دهی آن تابستان و اوایل پاییز است. این گیاه متعلق به منطقه‌ی خزری و در حاشیه‌ی جنگل‌ها، زیر درختان و در محل‌های رها شده، در جاهای مرطوب و دارای آب فراوان می‌روید (زمان، ۱۳۷۰ و زرگری، ۱۳۷۵) و در هوای خشک به کندی رشد می‌کند و عملکرد آن کاهش می‌یابد. این گیاه در طی دوره رشد، ریشه زیاد (به

طول ۴۰-۶۰ سانتی‌متر) تولید می‌کند (Leung, 1996). گرما و نور فراوان باعث افزایش آکالوئیدهای آن می‌شود و نور یکی از عوامل مؤثر بر پراکنش این گیاه می‌باشد (کریمی و همکاران، ۱۳۸۳).



شکل ۱-۱ گیاه شایبک *Atropa belladonna* L.

### ۳-۱ اهمیت دارویی شایبک

شایبک خواص درمانی بسیار مهمی دارد به همین دلیل در درمان بیماری‌های مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرد. این خاصیت به آکالوئیدهای موجود در آن برمی‌گردد. قسمت‌های فعال آن دارای یک درصد آکالوئیدهای مشتق از تروپان (هیوسیامین و اسکوپولامین)، تروپیک اسید (Atropique) و بلادونین هستند (زمان، ۱۳۷۰)، به علاوه این گیاه دارای آتروپامین، اسکوپوله‌تین، مواد رزینی، پکتینی و کولین نیز می‌باشد. شایبک در طب سنتی به مصارف داخلی و خارجی می‌رسد و به مقدار مجاز با نظر پزشک تجویز می‌شود، در رفع و تسکین سیاه سرفه و برای رفع انقباض‌های تشنجی بعضی اعضا مانند گردن رحم و مجرای ادرار و همچنین برای بهبودی بسیاری از دمل‌ها استعمال می‌شود (زرگری،

۱۳۷۵). مواد آلی تهیه شده از طریق صنایع داروسازی و همچنین آکالوئیدهای بدست آمده از آن، عضلات صاف را آزاد و شل می‌کند به خصوص وقتی که لازم باشد ترشحات گوارشی و ریوی به حداقل برسند (زمان، ۱۳۷۰). به طور کلی اثرات مهم این گیاه، ضد اسپاسم عضلات صاف، تخدیر کننده، کاهش عرق و مسکن است. در طب سنتی به عنوان آرام بخش اعضای متورم به خصوص معده و روده، در بیماری پارکینسون برای کاهش لرزش و سختی اعضا و افزایش تکلم و حرکت، همچنین به عنوان داروی بیهوشی تجویز می‌شود (زرگری، ۱۳۷۵).

#### ۴-۱ آکالوئیدها

آکالوئیدها به گروهی از متابولیت‌های ثانویه با وزن مولکولی کم گفته می‌شود که از آمینو اسیدها ساخته شده و دارای یک یا چند اتم نیتروژن در ساختار هتروسیکلیک خود هستند و غالباً به عنوان ترکیبات دفاعی در برابر حمله‌ی جانوران و میکروارگانیسم‌ها می‌باشند (Facchini 2001؛ Heldth 2004).

این ترکیبات را بر حسب ساختار شیمیایی و خصوصاً ساختمان مولکولی در چند دسته و گروه تقسیم بندی می‌کنند: آکالوئیدهای بدون حلقه هتروسیکلیک مانند Hordinine، آکالوئیدهای دارای حلقه هتروسیکلیک که بر اساس حلقه هتروسایکلیک خود به چند دسته تقسیم می‌شوند: آکالوئیدهای دارای حلقه پیرول-پیرولیدین مانند: Hygrines، دارای حلقه پیریدین و پیپریدین مانند: نیکوتین، پیپریدین و ... دارای حلقه کینولین مانند: Quinine و ...، دارای حلقه ایزوکینولین مانند: Papaverin، Cephaline و ... دارای حلقه ایندول مانند: Vinicristine و ...، آکالوئیدهای استروئیدی، آکالوئیدهای مشتق از حلقه تروپان مانند اسکوپولامین و آتروپین که در شایبک وجود دارند و... (زمان، ۱۳۷۰).

تروپان آکالوئیدها در تیره‌های مختلفی از گیاهان یافت می‌شوند که از نظر تاکسونومی نزدیک به هم نیستند ولی استرهای تروپیک اسید از مشتقات هیدروکسی تروپان (مثل هیوسیامین و اسکوپولامین) به تیره Solanaceae محدود می‌شود (Hashimoto and Yamada 1986).