دانشگاه ارومیه

دانشکده علوم

گروه زیست شناسی

رساله جهت اخذ درجه دکتری در رشته زیست شناسی گرایش فیزیولوژی گیاهی

موضوع:

القای ریشه‌های موئین در گیاه سنبل الطیب (*Valeriana officinalis* L.) با *Agrobacterium rhizogenes* و بررسی اثر الیسیتورهای زیستی و غیرزیستی به منظور افزایش تولید اسید والرنیک

استادان راهنما:

دکتر ناصر عباسپور　　دکتر مراد جعفری　　دکتر رضا حیدری

تنظیم و نگارش:

محمدرضا دینی ترکمانی

بهمن ۱۳۹۲

حق چاپ و تکثیر مطالب این رساله برای دانشگاه ارومیه محفوظ است.

بسم الله الرحمن الرحيم

تقدیم به:

روح ملکوتی پدرم و مادرم:

که عشق به خدا و تواضع به قلم را در وجودم به یادگار نهاده‌اند.

همسر مهربانم:

که زندگیم را با صفای وجودش رونق بخشیده است.

دختران زیبایم:

که جلا دهنده روحم و آرام بخش ذهن و جسم من بوده‌اند.

خواهرانم:

که دلم را با محبت آگنده کرده‌اند.

و به همه کسانی که دوستشان دارم.

تقدیر و تشکر:

<< إنّی لِما أنزَلتَ إلیَّ مِن خیرٍ فقیر >>

خدایا هیچ فقیری نیازمندتر از من نیست. من به آنچه که عنایت بفرمایی محتاجم!

الهی:

نه من آنم که ز فیض نگهت چشم بپوشم

نه تو آنی که گدا را ننوازی به نگاهی

در اگر باز نگردد نروم باز به جایی

پشت دیوار نشینم چو گدا بر سر راهی

پروردگارا مرا بازدار از اینکه انسان بینوا را فرومایه پندارم، یا گمان کنم که انسان توانگر، فضل و برتری دارد. در مقابل، مرا بازدار از اینکه انسان توانگر را متکبر و بخیل پندارم و یا گمان کنم که بینوایان همواره فضل و برتری دارند. چیزی که از تو می‌خواهم تعادل است.

ادب حکم می‌کند که پیش از همه، از استاد بزرگوارم آقای دکترعباسپور، که همچون دوستی دلسوز در انجام رساله همراهم بودند، تشکر و قدردانی بنمایم. از آقای دکتر جعفری به عنوان استاد راهنمای دوم نهایت تشکر و قدردانی را می‌نمایم که مساعدت ایشان راه گشای گره‌های رساله بود. همچنین از آقای دکتر حیدری استاد راهنمای سوم که افتخار یازده سال شاگردی ایشان کردم سپاسگزارم.

از آقای دکتر صفایی (گروه بیماری شناسی گیاهی، دانشگاه تربیت مدرس تهران) از بابت تهیه عصاره قارچ تشکر و قدردانی می‌گردد.

از آقای دکتر سبزی، ریاست محترم پژوهشکده زیست‌فناوری و آقایان عزیزی و مشکی و مهدی دوست به خاطر همکاری بسیار عالی در ایجاد امکانات مطلوب در پژوهشکده نهایت تشکر را می‌نمایم.

و در آخر از همسر مهربان و سخت کوشم دکتر افسانه صمدی که به حق اگر کمک‌های ایشان نبود سختی انجام رساله برای من دو چندان می‌شد، نهایت تشکر و سپاسگزاری را می‌نمایم.

فهرست مطالب

عنوان صفحه		شماره صفحه
	فصل اول: مقدمه	
۱-۱-	مقدمه	۲
۱-۲-	تکنولوژی جدید در کشت بافت	۳
۱-۲-۱-	پیدایش بیوتکنولوژی	۳
۱-۲-۲-	کشت سلول و بافت گیاهی	۴
۱-۲-۳-	تاریخچه کشت بافت	۵
۱-۲-۴-	روش‌های کاربردی فنون کشت بافت	۵
۱-۳-	اهمیت گیاهان دارویی	۶
۱-۴-	اهمیت و ضرورت انجام تحقیق	۶
۱-۵-	تاریخچه و خصوصیات گیاه شناسی سنبل الطیب	۷
۱-۵-۱-	خصوصیات گیاهی سنبل الطیب	۷
۱-۵-۲-	دلیل نام‌گذاری	۸
۱-۵-۳-	اهمیت دارویی سنبل الطیب	۸
۱-۵-۴-	اسید والرنیک و مشتقات آن	۹
۱-۵-۵-	مکانیسم عمل سنبل الطیب	۱۰
۱-۵-۶-	اثر جانبی مصرف سنبل‌الطیب گونه‌های مختلف سنبل الطیب	۱۰
۱-۵-۷-	گونه‌های مختلف سنبل‌الطیب	۱۰
۱-۶-	باکتری *Agrobacterium rhizogenes*	۱۱

۱-۶-۱- آگروباکتریوم رایزوژنز و القای ریشه‌های موئین ۱۱

۱-۶-۱-۱- تاریخچه و شروع تولید ریشه‌های موئین ۱۲

۱-۶-۱-۲- کاربرد ریشه‌های موئین ۱۳

۱-۶-۱-۳- راهبردهایی برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه از ریشه‌های تراریخته ۱۴

۱-۶-۱-۳-۱- بهینه سازی شرایط تلقیح ۱۴

۱-۶-۱-۳-۲- بهینه سازی ترکیبات محیط کشت ۱۵

۱-۶-۱-۳-۳- استفاده از الیسیتورها ۱۶

۱-۶-۱-۳-۳-۱- انواع الیسیتورها ۱۷

۱-۶-۱-۳-۳-۲- مکانیسم عمل الیسیتورها ۱۹

۱-۶-۱-۳-۳-۳- اهداف اصلی از بکارگیری الیسیتورها ۲۰

۱-۶-۱-۳-۳-۴- غلظت الیسیتور ۲۱

۱-۶-۱-۳-۳-۵- مدت زمان الیسیتور ۲۱

۱-۶-۱-۳-۴- فاز رویشی محیط کشت ۲۱

۱-۶-۱-۳-۵- ترکیب مواد غذایی ۲۱

۱-۶-۱-۳-۶- تراوش فرآورده به بیرون از سلول ۲۱

۱-۶-۱-۴- اندازه‌گیری رشد ریشه های موئین ۲۲

۱-۶-۱-۵- استفاده از بیوراکتورها برای کشت ریشه‌های موئین در مقیاس بزرگ ۲۲

۱-۶-۲- T-DNA ۲۳

۱-۶-۳- تفاوت ریشه موئین و گال تاجی از نظر انتقال T-DNA ۲۳

۱-۶-۴- فرآیند آلودگی ۲۴

۱-۶-۴-۱- پیوستن اگروباکتریوم به سلول میزبان ۲۴

۱-۶-۴-۲-	بیان ژن‌های vir	۲۵
۱-۶-۴-۳-	فرآیند انتقال T-DNA	۲۶
۱-۶-۴-۳-۱-	تولید علامت انتقال T-DNA	۲۶
۱-۶-۴-۳-۲-	کمپلکس انتقالی	۲۶
۱-۶-۴-۳-۳-	انتقال درون سلولی T-DNA و اهداف هسته‌ای	۲۶
۱-۶-۴-۳-۴-	ملحق شدن T-DNA به ژنوم گیاه	۲۷
۱-۶-۵-	انواع ژن‌های T-DNA اگروباکتریوم	۲۸
۱-۷-	بررسی منابع	۳۰
۱-۷-۱-	بررسی مطالعه‌های مربوط به تولید ریشه‌های موئین	۳۰
۱-۷-۲-	بررسی مطالعه‌های مربوط به تأثیر الیسیتورها در کشت‌ها	۳۱
۱-۸-	اهداف تحقیق	۳۲
	فصل دوم: مواد و روش ها	۳۴
۲-۱-	مواد گیاهی	۳۵
۲-۲-	تیمار با اسید سولفوریک و اسید جیبرلیک	۳۵
۲-۳-	محیط کشت MS	۳۶
۲-۳-۱-	تهیه محیط کشت MS	۳۶
۲-۴-	بررسی چند نوع روش تلقیح	۳۷
۲-۴-۱-	تلقیح گیاهان با سویه‌ی A13 باکتری *Agrobacterium rhizogenes*	۳۷
۲-۵-	زمان القای ریشه‌های موئین با توجه به سن ریزنمونه‌ها	۳۹
۲-۶-	ظهور ریشه‌ها و استقرار آنها در محیط مایع	۳۹
۲-۷-	استخراج DNA از نمونه‌های گیاهی	۴۰

۲-۸-	ارزیابی میزان رشد لاین‌های ریشه موئین	۴۱
۲-۹-	بررسی اثر تیمارهای مختلف بر میزان رشد ریشه‌های موئین	۴۱
۲-۱۰-	آماده سازی الیسیتورها	۴۲
۲-۱۰-۱-	آزمایش‌های اعمال الیسیتورها	۴۲
۲-۱۱-	روش استخراج اسید والرنیک	۴۳
۲-۱۲-	شرایط آنالیز دستگاه HPLC برای استخراج اسید والرنیک	۴۳
۲-۱۳-	تجزیه آماری	۴۳
	فصل سوم: نتایج	۴۴
۳-۱-	شکستن خواب بذرها	۴۵
۳-۱-۱-	اثر تیمار اسید جیبرلیک بر جوانه زنی	۴۵
۳-۱-۲-	اثر تیمار اسید سولفوریک بر جوانه زنی	۴۶
۳-۲-	زمان القاء و فراوانی تولید ریشه‌های موئین	۴۷
۳-۲-۱-	مقایسه عملکرد و درصد تراریختی ریزنمونه‌ها	۴۷
۳-۲-۲-	ریشه‌های موئین حاصل از بافت‌های مختلف	۴۸
۳-۲-۳-	زیست توده حاصل از رشد لاین‌های ریشه موئین	۴۹
۳-۲-۴-	اثر محیط‌های کشت مختلف بر رشد ریشه‌های موئین	۵۰
۳-۳-	تأئید تراریختی ریشه‌های موئین	۵۱
۳-۴-	اثر الیسیتورها بر وزن تر ریشه‌های موئین	۵۲
۳-۵-	بررسی اثر الیسیتورها بر میزان اسید والرنیک	۵۴
	فصل چهارم: بحث	۵۹
۴-۱-	شکستن خواب بذرها	۶۰

۴-۱-۱- تیمار اسید جیبرلیک ۶۰

۴-۱-۲- تیمار اسید سولفوریک ۶۱

۴-۲- تولید ریشه‌های موئین ۶۱

۴-۲-۱- تائید مولکولی ریشه‌های مویین سنبل الطیب ۶۱

۴-۲-۲- تاثیر نوع ریزنمونه بر میزان کارایی تراریختی ۶۲

۴-۳- اثرات فاکتورهای مختلف بر رشد ریشه‌های موئین ۶۳

۴-۴- تنوع در سرعت رشدی ریشه‌های مویین ۶۴

۴-۵- ویژگی رشد ریشه‌های موئین در محیط کشت حاوی الیسیتورها ۶۴

۴-۶- اثر الیسیتورها بر میزان متابولیت اسید والرنیک در ریشه‌های موئین ۶۵

۴-۶-۱- اثر عصاره قارچ بر میزان متابولیت اسید والرنیک ۶۶

۴-۶-۲- اثر متیل جاسمونات بر میزان متابولیت اسید والرنیک ۶۷

۴-۶-۳- اثر اسید سالیسیلیک بر میزان متابولیت اسید والرنیک ۶۸

۴-۶-۴- اثر یون‌های کلسیم و منیزیم بر میزان متابولیت اسید والرنیک ۶۸

نتیجه‌گیری ۷۰

پیشنهادها ۷۱

پیوست ها ۷۲

ضمیمه الف-۱- تجزیه واریانس تیمار اسید جیبرلیک در ارتباط با درصد جوانه زنی و روزها تا اولین جوانه زنی ۷۲

ضمیمه الف-۲- تجزیه واریانس تیمار اسیدسولفوریک در ارتباط با درصد جوانه زنی و روزها تا اولین جوانه زنی ۷۲

ضمیمه الف-۳- تجزیه واریانس اندازه گیری میزان اسید والرنیک ریشه‌های مویین تیمار شده با عصاره قارچ ۷۳

ضمیمه الف-۴- تجزیه واریانس اندازه گیری میزان اسید والرنیک ریشه‌های مویین تیمار شده با متیل جاسمونات ۷۳

ضمیمه الف-۵- تجزیه واریانس اندازه گیری میزان اسید والرنیک ریشه‌های مویین تیمار شده با اسید سالیسیلیک ۷۳

ضمیمه الف-۶- تجزیه واریانس اندازه گیری میزان اسید والرنیک ریشه‌های مویین تیمار شده با کلسیم. ۷۴
ضمیمه الف-۷- تجزیه واریانس اندازه گیری میزان اسید والرنیک ریشه‌های مویین تیمار شده با منیزیم ۷۴
ضمیمه ب-۱- کروماتوگرام ماده استاندارد اسید والرنیک ۷۴
ضمیمه ب-۲- نمودار کالیبراسیون ماده استاندارد اسید والرنیک ۷۵
ضمیمه ب-۳- کروماتوگرام HPLC ریشه موئین شاهد ۷۵
ضمیمه ب-۴- کروماتوگرام HPLC ریشه موئین تیمار شده با عصاره قارچ ۰/۵ درصد (v/v) به مدت ۷ روز ۷۶
ضمیمه ب-۵- کروماتوگرام HPLC ریشه موئین تیمار شده با عصاره قارچ ۰/۵ درصد (v/v) به مدت ۳ روز ۷۶
ضمیمه ب-۶- کروماتوگرام HPLC ریشه موئین تیمار شده با عصاره قارچ ۱ درصد (v/v) به مدت ۷ روز ۷۷
ضمیمه ب-۷- کروماتوگرام HPLC ریشه موئین تیمار شده با عصاره قارچ ۱ درصد (v/v) به مدت ۳ روز ۷۷
ضمیمه ب-۸- کروماتوگرام HPLC ریشه موئین تیمار شده با عصاره قارچ ۱/۵ درصد (v/v) به مدت ۷ روز ۷۸
ضمیمه ب-۹- کروماتوگرام HPLC ریشه موئین تیمار شده با عصاره قارچ ۱/۵ درصد (v/v) به مدت ۳ روز ۷۸
ضمیمه ب-۱۰- کروماتوگرام HPLC ریشه موئین تیمار شده با متیل جاسمونات ۵۰ میکرومول به مدت ۷ روز ۷۹
ضمیمه ب-۱۱- کروماتوگرام HPLC ریشه موئین تیمار شده با متیل جاسمونات ۵۰ میکرومول به مدت ۳ روز ۷۹
ضمیمه ب-۱۲- کروماتوگرام HPLC ریشه موئین تیمار شده با متیل جاسمونات ۱۰۰ میکرومول به مدت ۷ روز ۸۰
ضمیمه ب-۱۳- کروماتوگرام HPLC ریشه موئین تیمار شده با متیل جاسمونات ۱۰۰ میکرومول به مدت ۳ روز ۸۰
ضمیمه ب-۱۴- کروماتوگرام HPLC ریشه موئین تیمار شده با متیل جاسمونات ۲۰۰ میکرومول به مدت ۷ روز ۸۱
ضمیمه ب-۱۵- کروماتوگرام HPLC ریشه موئین تیمار شده با متیل جاسمونات ۲۰۰ میکرومول به مدت ۳ روز ۸۱
ضمیمه ب-۱۶- کروماتوگرام HPLC ریشه موئین تیمار شده با اسید سالیسیلیک ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر به مدت ۷ روز ۸۲
ضمیمه ب-۱۷- کروماتوگرام HPLC ریشه موئین تیمار شده با اسید سالیسیلیک ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر به مدت ۳ روز ۸۲
ضمیمه ب-۱۸- کروماتوگرام HPLC ریشه موئین تیمار شده با اسید سالیسیلیک ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر به مدت ۷ روز ۸۳
ضمیمه ب-۱۹- کروماتوگرام HPLC ریشه موئین تیمار شده با اسید سالیسیلیک ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر به مدت ۳ روز ۸۳

ضمیمه ب-۲۰- کروماتوگرام HPLC ریشه موئین تیمار شده با اسید سالیسیلیک ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر به مدت ۷ روز ۸۴
ضمیمه ب-۲۱- کروماتوگرام HPLC ریشه موئین تیمار شده با اسید سالیسیلیک ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر به مدت ۳ روز ۸۴
ضمیمه ب-۲۲- کروماتوگرام HPLC ریشه موئین تیمار شده با منیزیم۷۴۰ میلی‌گرم برلیتر به مدت ۷ روز ۸۵
ضمیمه ب-۲۳- کروماتوگرام HPLC ریشه موئین تیمار شده با منیزیم۷۴۰ میلی‌گرم برلیتر به مدت ۳ روز ۸۵
ضمیمه ب-۲۴- کروماتوگرام HPLC ریشه موئین تیمار شده با منیزیم۱۴۸۰ میلی‌گرم برلیتر به مدت ۷ روز ۸۶
ضمیمه ب-۲۵- کروماتوگرام HPLC ریشه موئین تیمار شده با منیزیم۱۴۸۰ میلی‌گرم برلیتر به مدت ۳ روز ۸۶
ضمیمه ب-۲۶- کروماتوگرام HPLC ریشه موئین تیمار شده با منیزیم۲۲۲۰ میلی‌گرم برلیتر به مدت ۷ روز ۸۷
ضمیمه ب-۲۷- کروماتوگرام HPLC ریشه موئین تیمار شده با منیزیم۲۲۲۰ میلی‌گرم برلیتر به مدت ۳ روز ۸۷
ضمیمه ب-۲۸- کروماتوگرام HPLC ریشه موئین تیمار شده با کلسیم ۸۸۰ میلی‌گرم برلیتر به مدت ۷ روز ۸۸
ضمیمه ب-۲۹- کروماتوگرام HPLC ریشه موئین تیمار شده با کلسیم ۸۸۰ میلی‌گرم برلیتر به مدت ۳ روز ۸۸
ضمیمه ب-۳۰- کروماتوگرام HPLC ریشه موئین تیمار شده با کلسیم ۱۷۶۰ میلی گرم برلیتر به مدت ۷ روز ۸۹
ضمیمه ب-۳۱- کروماتوگرام HPLC ریشه موئین تیمار شده با کلسیم ۱۷۶۰ میلی گرم برلیتر به مدت ۳ روز ۸۹
ضمیمه ب-۳۲- کروماتوگرام HPLC ریشه موئین تیمار شده با کلسیم ۲۶۴۰ میلی‌گرم برلیتر به مدت ۷ روز ۹۰
ضمیمه ب-۳۳- کروماتوگرامHPLC ریشه موئین تیمار شده با کلسیم ۲۶۴۰ میلی‌گرم برلیتر به مدت ۳ روز ۹۰
ضمیمه پ-۱- مواد مورد نیاز برای تهیه ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول بافر استخراج ۹۱
ضمیمه پ-۲- اجزاء بافر TE ۹۱
ضمیمه پ-۳- روش تهیه استات سدیم ۳ مولار ۹۱
ضمیمه پ-۴- تهیه محلول اتیلن دی آمین ترا استیک اسید(EDTA) (۰/۵ M و pH =۸) ۹۱
ضمیمه پ-۵- تهیه محلول تریس اسید کلریدریک (pH=۸ و ۱ M) ۹۲
ضمیمه پ-۶- روش تهیه ژل آگارز ۹۲
ضمیمه پ-۷- روش تهیه بافر TAE ۱ X ۹۲

ضمیمه پ-۸- **اجزاء بافر** TAE ۵۰X ۹۲

منابع ۹۳

فهرست شکل ها

عنوان		صفحه
شکل ۱- ۱-	نمائی از A : گل و B : ریزوم	۷
شکل ۱- ۲-	نمائی از A : برگ و B : ریشه خشک	۸
شکل ۱-۳-	ساختار شیمیایی اسید والرنیک و مشتقات آن	۹
شکل ۱-۴-	مراحل ساخت صنعتی اسید والرنیک	۹
شکل ۱-۵-	القاء ریشه موئین و بعضی از کاربردهای آن	۱۱
شکل ۱-۶-	راهبردهایی برای افزایش تولید مواد از ریشه‌های موئین	۱۷
شکل ۱-۷-	نمونه‌ای از مکانیسم عمل الیسیتورها	۲۰
شکل ۱-۸-	نمایی از یک پلاسمید	۲۳
شکل ۱-۹-	یک مدل از مراحل ورود ژن‌های اگروباکتریوم به ژنوم گیاه. ۱) شناسایی و پیوستن اگروباکتریوم به سلول گیاهی	۲۵
شکل ۱-۱۰-	a: فرمول ساختاری استوسرینگان و b: مکانیسم عمل ژن‌های *vir*	۲۶
شکل ۱- ۱۱-	مدلی از کمپلکس $virB/D_4$	۲۷
شکل ۱-۱۲-	ارتباط سنتز اوپین‌ها با عملکرد ژنهای *vir*	۲۹
شکل ۱-۱۳-	ساختارهای مولکولی چند نوع اوپین	۲۹
شکل ۲- ۱-	بذرهای کشت شده سنبل الطیب در اتاق رشد	۳۶
شکل ۲-۲-	گیاهان ۴۲ روزه سنبل‌الطیب و آماده برای تلقیح	۳۸
شکل ۲ -۳-	باکتری‌های سانتریفوژ شده، قسمت سفید نوک فالکون باکتری ته نشین شده را نشان می دهد	۳۸
شکل ۲-۴-	ارلن‌های حاوی ریشه های موئین در روی دستگاه شیکر انکوباتور	۴۰
شکل ۳-۱-	میانگین درصد القای ریشه‌های موئین حاصل از B : ریزنمونه های برگ، هیپوکوتیل و ریشه، A : روش	

تلقیح. ۴۸

شکل ۳-۲- تفاوت در تعداد و محل تشکیل ریشه‌های موئین در ریزنمونه های: A- هیپوکوتیل، B- ریشه و C- برگ ده روز بعد از ایجاد آلودگی با *A.rhizogenes* سویه A13. ۴۹

شکل ۳-۳- میزان رشد ریشه‌های موئین: A- چهارده روز بعد از تلقیح، B- بیست و سومین روز محیط کشت (زمان اعمال الیسیتورها)، C- دو ماه بعد از کشت (زمان برداشت ریشه‌ها). ۴۹

شکل ۳-۴- مقایسه افزایش زیست توده ریشه‌های موئین و شاهد در محیط MS مایع پس از ۲ هفته ۴۹

شکل ۳- ۵- میزان رشد لاین‌های ریشه موئین (L_1 - L_9) سنبل الطیب بر اساس وزن تر ۵۰

شکل ۳-۶- اثرات محیط‌های کشت مختلف بر رشد ریشه‌های موئین. ۵۰

شکل ۳- ۷- تجزیه PCR ریشه‌های موئین *V.officinalis* تلقیح شده با *A. rhizogenes* سویه A13 با استفاده از آغازگر *rol*-B ۵۱

شکل ۳-۸- تجزیه PCR ریشه‌های موئین *V.officinalis* تلقیح شده با *A. rhizogenes* سویه A13 با استفاده از آغازگر *rol*A-B. ۵۲

شکل ۳- ۹- تجزیه PCR ریشه‌های موئین *V.officinalis* تلقیح شده با *A. rhizogenes* سویه A13 با استفاده از آغازگر *vir*D. ۵۲

شکل ۳-۱۰- مقایسه میانگین اثر تیمارهای مختلف اسید سالیسیلیک بر رشد ریشه‌های موئین بر اساس وزن تر. ۵۳

شکل ۳-۱۱- مقایسه میانگین اثر تیمارهای مختلف متیل جاسمونات بر رشد ریشه‌های موئین بر اساس وزن تر. ۵۳

شکل ۳-۱۲- مقایسه میانگین اثر تیمارهای مختلف عصاره قارچ بر رشد ریشه‌های موئین بر اساس وزن تر. ۵۴

شکل ۳-۱۳- تغییرات مقدار اسید والرنیک بر اساس آزمون FLSD در سطح احتمال ۵ درصد برای تیمارهای مختلف ریشه‌های موئین گیاه سنبل الطیب با عصاره قارچ. ۵۵

شکل ۳-۱۴- تغییرات مقدار اسید والرنیک بر اساس آزمون FLSD در سطح احتمال ۵ درصد برای تیمارهای مختلف ریشه‌های موئین گیاه سنبل الطیب با متیل جاسمونات. ۵۶

شکل ۳-۱۵- تغییرات مقدار اسید والرنیک بر اساس FLSD در سطح احتمال ۵ درصد برای تیمارهای مختلف ریشه‌های موئین گیاه سنبل الطیب با اسید سالیسیلیک. ۵۷

شکل ۳-۱۶- تغییرات مقدار اسید والرنیک بر اساس آزمون FLSD در سطح احتمال ۵ درصد برای تیمارهای مختلف ریشه‌های موئین گیاه سنبل الطیب با کلسیم. ۵۸

شکل ۳-۱۷- تغییرات مقدار اسید والرنیک بر اساس FLSD در سطح احتمال ۵ درصد برای تیمارهای مختلف ریشه‌های موئین گیاه سنبل الطیب با یون‌های منیزیم. ۵۸

فهرست جدول ها

عنوان		صفحه
جدول ۱- ۱-	طبقه بندی الیسیتورها براساس ماهیت آنها	۱۸
جدول ۱- ۲-	طبقه بندی الیسیتورها براساس منشاء آنها	۱۸
جدول ۲-۱-	عناصر تشکیل دهنده محیط کشت گیاهی MS	۳۷
جدول ۲-۲-	اجزاء واکنش PCR	۴۰
جدول ۲-۳-	مشخصات آغازگرهای استفاده شده	۴۱
جدول ۲-۴-	الگوی دمایی مورد استفاده جهت انجام PCR	۴۱
جدول ۳-۱-	مقایسات میانگین اثر غلظت‌های مختلف اسید جیبرلیک در مدت زمان‌های مختلف بر درصد جوانه زنی، روزها تا اولین جوانه زنی و ۵۰ درصد تا جوانه زنی در محیط آب + آگار.	۴۵
جدول۳-۲-	مقایسات میانگین اثر غلظت‌های مختلف اسید جیبرلیک در مدت زمان‌های مختلف بر درصد جوانه زنی، روزها تا اولین جوانه زنی و ۵۰ درصد تا جوانه زنی در محیط MS.	۴۶
جدول ۳-۳-	مقایسات میانگین اثر غلظت‌های مختلف اسید سولفوریک در مدت زمان‌های مختلف بر درصد جوانه زنی، روزها تا اولین جوانه زنی و ۵۰ درصد تا جوانه زنی در محیط آب - آگار.	۴۶
جدول ۳-۴-	مقایسات میانگین اثر غلظت‌های مختلف اسید سولفوریک در مدت زمان‌های مختلف بر درصد جوانه زنی، روزها تا اولین جوانه زنی و ۵۰ درصد تا جوانه زنی در محیط MS.	۴۷
جدول ۳-۵-	نتایج تأثیر سن ریزنمونه بر درصد موفقیت تلقیح با سویه A13 در ریزنمونه‌های مختلف.	۴۷

.

چکیده:

گیاه چند ساله سنبل‌الطیب با نام علمی *Valeriana officinalis* L. از خانواده *Valerianaceae* از زمان‌های گذشته به عنوان مسکن، ضد نفخ و کاهنده اسپاسم در اروپا و افریقای شمالی بطور گسترده مورد توجه و استفاده انسان بوده است. ترکیبات شیمیایی عمده این گیاه در ریشه و ریزوم بوده و مرتبط با والپوتریات‌ها (ایریدوئیدها)، سزکوئی‌ترپن‌ها (اسید والرنیک و مشتقات آن) و منوترپن‌ها است. در پژوهش حاضر، ابتدا جوانه زنی بذرها مورد بررسی قرار گرفت، سپس به منظور القای ریشه‌های موئین ریزنمونه های هیپوکوتیل، برگ و ریشه حاصل از گیاهچه‌های ۴۲ روزه رشد یافته در شیشه در قطعات کوچک (۵ تا ۱۰ میلی‌متر) بریده و در سوسپانسیون باکتری آگروباکتریوم رایزوژنز سویه A13 به مدت ۳۰ دقیقه غوطه‌ور گردید. بعد از دو هفته تعدادی از ریشه‌های موئین در محل زخم ریزنمونه‌ها تشکیل شدند. تراریختی ریشه‌های موئین توسط PCR با استفاده از آغازگرهای ویژه انجام شد. ریشه‌های موئین با بیش از ۴ شاخه بریده شده و به محیط کشت MS مایع بدون هورمون منتقل گردید و پس از ۲۳ روز الیسیتورها اعمال شد. مطالعه اثرات ۵ الیسیتور مختلف با عصاره قارچ (۰/۵، ۱ و ۱/۵ درصد حجمی (v/v))، متیل‌جاسمونات (۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومول)، اسید سالیسیلیک (۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر)، و یون‌های منیزیم و کلسیم با ۳ میزان مختلف از این ترکیبات موجود در محیط کشت MS پایه ($MgSO_4$= 370 mg/l و $CaCl_2$= 440 mg/l) به ترتیب با ۲ برابر ($MgSO_4$= 740 mg/l و $CaCl_2$= 880 mg/l)، ۴ برابر ($MgSO_4$= 1480 mg/l و $CaCl_2$= 1760 mg/l) و ۶ برابر ($MgSO_4$= 2220 mg/l و $CaCl_2$= 2640 mg/l) انجام شد. ریشه‌ها بعد از ۳ و ۷ روز مواجهه با الیسیتورها برداشت شدند. میزان اسید والرنیک در ریشه‌های موئین تیمار شده توسط سیستم کروماتوگرافی HPLC مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به‌دست آمده از آزمایش‌های خواب بذرها نشان داد که از بین غلظت‌های مختلف اسید جیبرلیک بیشترین درصد جوانه زنی (۸۱/۸۴ درصد) با استفاده از ۸۰۰ پی‌پی‌ام در مدت زمان ۷۲ ساعت در محیط آب آگار بود. همچنین بهترین درصد جوانه زنی (۷۳/۱۸ درصد) در تیمار با اسید سولفوریک با غلظت ۱۰ درصد به مدت ۱۵ دقیقه به دست آمد. نتایج حاصل از PCR، وجود باندهای درخشانی از ژن‌های *rol*A-B و *rol*B را در DNA ریشه‌های موئین نشان داد. نتایج منفی آغازگر *vir*D، دلیل بر عدم وجود هر گونه آلودگی باکتریایی در ریشه‌های موئین و موید صحت نتایج مثبت آغازگرهای دیگر و در نتیجه تأیید ورود ژن‌های باکتریایی به ژنوم گیاه سنبل‌الطیب بود. نتایج حاصل از اندازه‌گیری وزن‌تر ریشه‌ها نشان داد که بین لاین های مختلف ریشه‌های مویین اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد وجود داشت. نتایج کروماتوگرافی نشان داد که اضافه کردن الیسیتورها به محیط کشت ریشه‌های موئین در بیشتر غلظت‌های بکار رفته در دو زمان تیمار (۳ و ۷ روز) منجر به افزایش معنی‌دار ($P< 0.05$) اسید والرنیک در مقایسه با ریشه‌های موئین شاهد (تیمار نشده) گردید. عصاره قارچ بطور معنی‌دار ($P< 0.05$) تولید اسید والرنیک را در تمامی غلظت‌ها در هر دو زمان مواجهه با الیسیتورها را افزایش داد. طوری که بیشترین انباشتگی اسید والرنیک وقتی مشاهده شد که ریشه‌های موئین با ۱ درصد از عصاره قارچی در مدت زمان ۷ روزه تیمار شدند (۳/۰۲ میلی‌گرم بر گرم ماده خشک که ۱۳/۱۳ برابر بیشتر از شاهد یعنی۰/۲۳ میلی‌گرم بر گرم ماده خشک بود). همچنین میزان اسید والرنیک بعد از اضافه کردن ۱۰۰ میکرومول متیل‌جاسمونات در مدت زمان ۷ روزه تا ۱/۹۴ میلی‌گرم بر گرم ماده خشک افزایش یافت که این میزان در حدود ۶ برابر میزان اسید والرنیک به‌دست آمده از ریشه‌های موئین شاهد بود. از بین غلظت‌های آزمایش شده، اسید سالیسیلیک به طور اندک میزان اسید والرنیک را در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر به میزان ۰/۵۵ میلی‌گرم بر گرم ماده خشک بعد از ۷ روز و با

غلظت ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر به میزان ۰/۴۳ میلی‌گرم بر گرم ماده خشک افزایش داد. اما میزان اسید والرنیک در تیمار با غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر اسید سالیسیلیک به میزان ۰/۱۸ و ۰/۲۰ میلی‌گرم بر گرم ماده خشک به ترتیب در زمان های ۳ و ۷ روزه در مقایسه با ریشه‌های شاهد (۰/۲۳ میلی‌گرم بر گرم ماده خشک) کاهش یافت. به علاوه کلسیم و منیزیم بطور معنی‌دار ($P< 0.05$) میزان تولید اسید والرنیک را افزایش دادند. بیشترین میزان اسید والرنیک (۱/۸۳ میلی‌گرم بر گرم ماده خشک به عبارتی ۷/۹ برابر بیشتر از ریشه-های شاهد) با بیشترین غلظت کلسیم (۶ برابر میزان غلظت آن در محیط کشت پایه) در مواجهه با ۷ روز به‌دست آمد. همچنین منیزیم مشابه با کلسیم بطور قابل‌توجه میزان تولید اسید والرنیک را افزایش داد (۱/۱۱ میلی‌گرم بر گرم ماده خشک یعنی ۴/۲ برابر بیشتر از ریشه‌های موئین شاهد). از بین غلظت‌های آزمایش شده این یون‌ها تنها کلسیم در غلظت ۸۸۰ میلی‌گرم بر لیتر میزان اسید والرنیک را به میزان ۰/۲۱ بعد از ۳ روز کاهش داد. بطور کلی نتایج نشان داد که غلظت و مدت زمان مواجهه با الیسیتورها دو عامل مهمی بودند که میزان تولید و انباشتگی اسید والرنیک را تحت تاثیر قرار دادند.

کلمات کلیدی: سنبل الطیب، ریشه‌های موئین، الیسیتور، آگروباکتریوم رایزوژنز، اسید والرنیک.

فصل اول: مقدمه

۱-۱- مقدمه

هزاران سال است که گیاهان از مهمترین منابع درمانی محسوب می‌شوند. تقریباً یک چهارم داروهای تولید شده حاوی عصاره گیاهی یا ترکیباتی هستند که از مواد گیاهی بدست آمده‌اند یا براساس ترکیباتی گیاهی مدل‌سازی شده‌اند (Yaniv, 2005). اعلام ممنوعیت سازمان بهداشت جهانی مبنی بر عدم استفاده از رنگ‌ها و اسانس‌های سنتتیک و عوارض جانبی داروهای مصنوعی درسال های اخیر باعث رونق کشت و صنعت گیاهان دارویی شده است (سلامی و همکاران، ۱۳۸۵). از آنجا که ساخت شیمیایی ترکیباتی گیاهی به راحتی میسر نمی‌باشد، محققان سعی برآن دارند که چنین ترکیباتی را از طریق تکنیک‌های فن‌آوری زیستی بدست آورند. کشت سلول گیاهی یک منبع مناسب و مهم برای تولید متابولیت‌های ثانوی با ارزش می‌باشد. یکی از مزیت‌های روش کشت سلول مستقل بودن از تغییرات جغرافیایی و عوامل محیطی و در عین حال سرعت بالای رشد می‌باشد. در این روش ممکن است ترکیباتی جدیدی تولید شود که در شرایط طبیعی در گیاه مادری وجود نداشته باشند. محققین با استفاده از این روش سعی می‌کنند تا شواهد بیشتری در رابطه با چگونگی بیوسنتز آن‌ها و نیز مکانیسم تنظیمی آن به دست آورند و با این روش‌ها توانسته‌اند تولید متابولیت‌های ثانوی با ارزش در گیاهان را افزایش دهند (Kartal *et al*., 2004). با توجه به اهمیت اقتصادی متابولیت‌های ثانویه و نیز محدود بودن گونه‌های گیاهی در رویشگاه طبیعی آن‌ها، روش کشت سلول راه مناسبی برای تولید ترکیبات شیمیایی ارزشمند می‌باشد (Farkya *et al*., 2004). کشت سلول‌های گیاهی در بعضی موارد موفقیت‌آمیز بوده است اما بزرگترین چالش در این زمینه ناپایداری ژنتیکی، رشد کم و بازده پایین کشت سلول‌های گیاهی است (Ming *et al*., 2003). بنابراین برای غلبه بر این محدودیت‌ها استفاده از آگروباکتریوم رایزوژنز (*Agrobacterium rhizogenes*) و کشت ریشه‌های موئین به‌علت رشد سریع، زمان دو برابر شدن کوتاه، سهولت نگهداری و توانایی سنتز گسترده‌ای از ترکیبات شیمیایی مزیت‌های بیشتری را به عنوان یک منبع پیوسته برای تولید متابولیت های ثانویه‌ی ارزشمند ایجاد می‌نماید (Giri *et al*., 2000). ریشه‌های موئین از طریق تراریخت نمودن سلول‌های گیاهی توسط باکتری اگروباکتریوم رایزوژنز تشکیل می‌شوند و همانند سلول‌های معمولی دارای پایداری ژنتیکی در طول دوره کشت می‌باشد (Tepfer, 1984). اگرچه تولید متابولیت‌های گیاهی با ارزش، در ابتدا از طریق کشت سلول، بافت و اندام گیاهی و همچنین کشت ریشه‌های موئین، از نظر تجاری موفقیت آمیز نبود اما امروزه محققین با بکار بردن روش‌هایی که به نوعی موجب تحریک مسیر بیوسنتزی این ترکیب‌ها می‌شوند به موفقیت‌های قابل‌توجهی دست یافته‌اند. یکی از این روش‌ها که به منظور افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در کشت درون شیشه (*in vitro*) به‌کار می‌رود، استفاده از الیسیتورها می‌باشد (Raoa and Ravishankar, 2002).

انتقال ژن یا جذب DNA، فرآیندی است که طی آن قطعه مشخصی از DNA به درون سلول‌ها وارد می‌شود. در اصلاح نباتات، تکنیک‌های مرتبط با انتقال ژن از طریق تکثیر جنسی و رویشی به خوبی رایج می‌باشند. هدف این تکنیک‌ها ایجاد تنوع ژنتیکی در جوامع گیاهی، انتخاب افراد برتر از نظر ژن‌های کنترل کننده صفات مطلوب و همچنین حفظ تنوع واریته‌های گیاهی می‌باشد. با استفاده از تکنیک‌های اصلاحی مرسوم، پیشرفت‌های چشمگیری در زمینه بهبود عملکرد گیاهان زراعی حاصل شده است. با توجه به رشد سریع تکنیک‌های مهندسی ژنتیک بر مبنای دانش ساختار و عملکرد ژن، دامنه اصلاح نباتات بسیار گسترده‌تر شده است (Zhoua and Wu, 2006).