دانشکده کشاورزی

گروه زراعت و اصلاح نباتات

تاثیر مواد محرک بر میزان تولید تبائین در گیاه *Papaver bracteatum* Lindl. در شرایط درون شیشه‌ای

اساتید راهنما:

دکتر ناصر زارع

دکتر رسول اصغری زکریا

استاد مشاور:

دکتر منوچهر فرجامی نژاد

توسط:

رضا فرجامی نژاد

دانشگاه محقق اردبیلی

بهمن ۱۳۹۰

دانشکده کشاورزی

گروه زراعت و اصلاح نباتات

تاثیر مواد محرک بر میزان تولید تبائین در گیاه *Papaver bracteatum* Lindl. در شرایط درون شیشه‌ای

پژوهشگر

رضا فرجامی نژاد

پایان‌نامه برای اخذ درجه کارشناسی ارشد

در رشته بیوتکنولوژی

از

دانشگاه محقق اردبیلی

اردبیل- ایران

ارزیابی و تصویب‌شده توسط کمیته پایان‌نامه با درجه: عالی

دکتر ناصر زارع (استاد راهنما و رئیس کمیته داوران): ..... استادیار

دکتر رسول اصغری زکریا (استاد راهنما): ..... دانشیار

دکتر منوچهر فرجامی نژاد (استاد مشاور): ..... دانشیار

دکتر امید سفالیان (داور داخلی): ..... استادیار

بهمن ۱۳۹۰

دانشکده کشاورزی
دانشگاه محقق اردبیلی

تقدیم به پدر و مادر عزیزم

آنان که موی سپید شدند تا ما روی سپید بمانیم

و خمیده قامت شدند تا ما راست قامت شویم

و تقدیم به تمام جویندگان راه دانش و حقیقت

تقدیر و تشکر

شکر و ستایش خداوند را که هر ذره از حیات نشانگر قدرت مطلق اوست و ستایش مخصوص اوست که انسان را اشرف مخلوقات قرار داد و روح او را با علم خود آراست تا هر آینه قدرت لایزالش رنگ و بوی خلقت را بهاری کند.

در این مجال بر خود واجب می‌دانم که از اساتید راهنمای این پایان نامه، معلمان علم و اخلاق جناب آقای **دکتر ناصر زارع** و جناب آقای **دکتر رسول اصغری زکریا** که در تمام مراحل کاری و اجرای پایان نامه تقبل زحمت نموده و با راهنمایی‌های ارزنده خود در حل مشکلات نقش کلیدی داشته‌اند کمال تشکر و قدردانی را داشته باشم. از استاد مشاور و برادر عزیزم جناب آقای **دکتر منوچهر فرجامی‌نژاد** که در طول زندگی و انجام پایان نامه همواره مرا با راهنمایی‌های ارزنده خود یاری نموده نهایت سپاس و تشکر را دارم.

از کلیه اساتید گروه زراعت و اصلاح نباتات، به خصوص آقایان **دکتر علی اصغری، دکتر امید سفالیان، دکتر مجید شکرپور** و **دکتر محمد صدقی** که در تمام دوره تحصیلات زحمت فراوانی را برای اینجانب کشیده‌اند کمال تشکر را دارم.

از **پدر** و **مادر** بزرگوارم، خواهران و برادران عزیزم که در طول دوران تحصیلات مشوق و راهنمای اینجانب بوده‌اند نهایت سپاس و تشکر را دارم.

از دوستان و همکلاسی‌ها به ویژه آقایان **مهندس سهراب عابدی** و **مهندس سید کریم تهامی** تشکر می‌کنم.

در پایان برای تمامی دوستان آرزوی توفیق و سربلندی نموده و امیدوارم خداوند متعال تمام جویندگان راه دانش و حقیقت را مورد لطف و عنایت خود قرار دهد.

نام خانوادگی دانشجو: **فرجامی‌نژاد** نام: **رضا**

عنوان پایان نامه: **تاثیر مواد محرک بر میزان تولید تبائین در گیاه *Papaver bracteatum* Lind. در شرایط درون شیشه‌ای**

اساتید راهنما: **دکتر ناصر زارع و دکتر رسول اصغری زکریا**

استاد مشاور: **دکتر منوچهر فرجامی‌نژاد**

مقطع تحصیلی: **کارشناسی ارشد** رشته: **مهندسی کشاورزی** گرایش: **بیوتکنولوژی در کشاورزی**

دانشگاه: **محقق اردبیلی** دانشکده: **کشاورزی** تاریخ فارغ التحصیلی: **۹۰/۱۱/۲۴** تعداد صفحه: **۱۰۸**

کلید واژه‌ها: **تبائین، مواد محرک، شرایط درون شیشه‌ای، کشت سوسپانسیون، *Papaver bracteatum* Lindl.**

چکیده:

خشخاش ایرانی با نام علمی *Papaver bracteatum* Lindl. از تیره Papaveraceae یکی از گیاهان دارویی بسیار مهم می‌باشد. این تحقیق به منظور بهینه سازی شرایط رشد سلول‌های *P. bracteatum Lindl.* در کشت سوسپانسیون و همچنین تاثیر محرک‌ها و پیش ماده ال-تیروزین بر مقدار تبائین تولید شده در شرایط درون شیشه‌ای (توسط سلول‌های سوسپانسیون) انجام گرفت. به منظور تولید کالوس، ریزنمونه‌های هیپوکوتیل-کوتیلدون در محیط کشت پایه موراشیگ و اسکوک حاوی سطوح مختلف تنظیم کننده‌های رشد گیاهی کشت شده و در اتاقک رشد با دمای ۲۰ درجه سانتیگراد در تاریکی نگهداری شدند. صفات درصد کالوس‌زایی، درصد کالوس قهوه‌ای و وزن تر کالوس اندازه‌گیری شد. به منظور استقرار کشت سوسپانسیون، کالوس‌های تولید شده به محیط کشت MS مایع حاوی یک میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D، ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر کینتین و ۱۵ میلی‌گرم بر لیتر اسید اسکوربیک منتقل و روی شیکر اوربیتال با دور ۱۲۰ دور در دقیقه نگهداری شدند. اثر سطوح مختلف تنظیم کننده‌های رشد گیاهی (2,4-D، NAA و BAP یا کینتین) روی تکثیر سوسپانسیون سلولی مورد بررسی قرار گرفت. پس از اعمال تیمارهای رشد، صفات تعداد سلول‌ها در یک میلی‌لیتر، SCV و PCV با فواصل زمانی یک هفته‌ای، و پس از تکمیل رشد سلول‌ها نیز صفات وزن تر و خشک سلول‌ها، pH و EC محیط کشت اندازه‌گیری شدند. برای بررسی اثر مواد محرک و پیش ماده ال-تیروزین در غلظت‌های مختلف بر مقدار تبائین تولید شده در شرایط درون شیشه‌ای، تیمارهای متیل جاسمونات، کیتوسان، اسید سالیسیلیک، امواج فراصوت و ال-تیروزین بر سلول‌های کشت سوسپانسیون اعمال شده و مقدار تبائین در دو، چهار و شش روز پس از اعمال تیمار با استفاده از تکنیک HPLC مورد اندازه گیری قرار گرفت. نتایج نشان داد که در بین محیط‌های کشت از نظر درصد کالوس‌زایی و وزن تر کالوس اختلاف معنی داری وجود دارد. بیشترین درصد کالوس‌زایی در محیط کشت MS حاوی یک یا دو میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D، ۰/۱ یا ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر کینتین و ۱۵ میلی‌گرم بر لیتر اسید اسکوربیک مشاهده گردید. همچنین بیشترین مقدار وزن تر کالوس در محیط کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D به همراه ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر کینتین و ۱۵ میلی گرم بر لیتر اسید اسکوربیک بدست آمد. علاوه بر این، نتایج نشان داد که استفاده از اسید اسکوربیک (به مقدار ۱۵ میلی‌گرم بر لیتر) باعث جلوگیری از قهوه‌ای شدن کالوس‌ها و در نتیجه بهبود رشد کالوس می‌شود. بین تیمارهای تنظیم کننده رشد گیاهی اعمال شده در کشت سوسپانسیون از نظر شاخص‌های تعداد سلول در یک میلی لیتر، SCV، PCV، وزن تر و خشک سلول، pH، و EC محیط کشت اختلاف معنی‌داری وجود داشت. محیط کشت مناسب برای رشد سلول‌ها، محیط کشت MS پایه حاوی یک میلی‌گرم بر لیتر NAA، یک میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۱۵ میلی گرم بر لیتر اسید اسکوربیک

بود. تعداد سلول در یک میلی لیتر، SCV، PCV، وزن تر و خشک سلول، EC و pH محیط کشت در این تیمار به ترتیب $۱۰^{۶}\times$۱۶/۷، ۲۸/۸۹٪، ۲۷/۶۹٪، ۱۱۸/۵ گرم در لیتر، ۱۰/۴۴ گرم در لیتر، ۲/۵۷ میلی‌زیمنس و ۷/۱۸ بود. منحنی رشد سلول‌ها نشان داد که با گذشت زمان تعداد سلول در میلی‌لیتر، مقدار SCV و PCV افزایش یافته است. تکثیر سلول‌ها تا ۱۲ روز بعد از کشت کند و ناچیز بوده و بعد از آن به شدت افزایش یافت و تراکم سلولی ۴۲ روز پس از کشت به حداکثر مقدار خود رسیدند. پس از این مدت رشد سلول‌ها احتمالا به دلیل تخلیه عناصر غذایی و تنظیم کننده‌های رشد گیاهی موجود در محیط کشت و یا افزایش مقدار مواد فنلی در محیط کشت متوقف شده و تراکم سلولی محیط کشت تقریبا ثابت مانده است. نتایج حاصل از تجزیه واریانس صفات اندازه-گیری شده در تیماری‌های محرک و پیش ماده ال-تیروزین نشان داد که بین تیمارهای محرک از نظر محتوای تبائین سلول‌ها، وزن سلول فریزدرای شده و pH محیط کشت و بین زمان‌های مختلف نمونه برداری از نظر محتوای تبائین سلول‌ها، pH و EC محیط کشت اختلاف معنی‌داری وجود داشت. اثر متقابل تیمار محرک در زمان نمونه برداری نیز برای محتوای تبائین سلول‌ها و pH محیط کشت معنی دار بود. در بین تیمارهای محرک اعمال شده تیمار متیل جاسمونات با غلظت ۱۰۰ میکرومولار به همراه ۲ میلی مولار ال-تیروزین در روز ششم پس از اعمال تیمار بیشترین محتوای تبائین سلول‌ها را با میانگین ۶۴/۰۱ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک داشت که ۴۷/۷۷ برابر بیشتر از محتوای تبائین تولید شده در محیط کشت شاهد (۱/۳۴ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) بود. به دنبال آن تیمارهای محرک اسید سالیسیلیک با غلظت ۷۵ میلی‌گرم بر لیتر در روز چهارم پس از اعمال تیمار، اسیدسالیسیلیک ۷۵ میلی‌گرم بر لیتر در روز ششم پس از اعمال تیمار،پیش ماده ال-تیروزین با غلظت یک میلی‌مولار در روز ششم پس اعمال تیمار و امواج فراصوت به ۲۰ ثانیه شش روز پس از اعمال به ترتیب با میانگین ۴۷/۱۸، ۳۲/۸۹، ۲۸/۸۳ و ۲۸/۱۸ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک قرار داشتند که به ترتیب ۴۵/۸، ۲۴/۵۴، ۲۱/۵۱ و ۲۱/۰۳ برابر بیشتر از محتوای تبائین سلول‌های شاهد در همان زمان‌ها بود.

فهرست مطالب

عنوان
صفحه

فصل اول- مقدمه و مروری بر تحقیقات گذشته

۱-۱- مقدمه ۲

۱-۲- متابولیت‌های طبیعی گیاه ۳

۱-۲-۱- آلکالوئیدها ۴

۱-۳- تیره Papaveraceae ۶

۱-۳-۱- ویژگی‌های زیر تیره *Papaveroideae* ۶

۱-۳-۲- ویژگی‌های جنس *Papaver* ۶

۱-۳-۳- متابولیت‌های ثانویه جنس *Papaver* ۷

۱-۳-۴- ویژگی‌های بخش درون جنسی Macrantha ۸

۱-۳-۵- ویژگی‌های *Papaver bracteatum* Lindl. ۱۰

۱-۴- سیتوژنتیک ۱۳

۱-۴-۱- کاریوتیپ ۱۳

۱-۴-۲- مطالعات سیتوژنتیکی در گونه‌های *Papaver* ۱۴

۱-۵- کشت بافت ۱۶

۱-۵-۱- انواع کشت بافت ۱۶

۱-۵-۲- کشت سوسپانسیون ۱۷

۱-۵-۲-۱- کشت بسته ۱۹

۱-۵-۲-۲- کشت پیوسته ۲۰

۱-۵-۳- روش‌های اندازه گیری رشد در کشت‌های سوسپانسیون سلولی ۲۱
۱-۶- استفاده از کشت سلول گیاهی برای تولید متابولیت‌های ثانویه ۲۳
۱-۶-۱- تجمع متابولیت‌های ثانویه در کشت‌های سلول گیاهی ۲۳
۱-۶-۲- استراتژی‌های افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه از طریق کشت سلول گیاهی..... ۲۴
۱-۶-۲-۱- گزینش لاین‌های سلولی با تولید بالا..... ۲۴
۱-۶-۲-۲- دستکاری عناصر غذایی برای بهبود عملکرد ۲۵
۱-۶-۲-۳- بهینه سازی شرایط کشت ۲۷
۱-۶-۲-۴- محرک‌ها ۲۸
۱-۶-۲-۴-۱- طبقه بندی محرک‌ها ۲۹
۱-۶-۲-۵- جاسمونات‌ها..... ۳۱
۱-۶-۲-۶- کیتوسان ۳۲
۱-۷- مطالعات کشت بافت در گونه‌های *Papaver* ۳۴
اهداف پژوهش..... ۳۷

فصل دوم- مواد روش تحقیق

۲-۱- مواد گیاهی..... ۳۹
۲-۲- بررسی‌های سیتوژنتیکی ۳۹
۲-۲-۱- پیش تیمار ۳۹
۲-۲-۲- تثبیت ۳۹
۲-۲-۳- نگهداری ریشه‌ها ۴۰
۲-۲-۴- هیدرولیز ۴۰
۲-۲-۵- رنگ آمیزی ۴۰

۲-۲-۶- تیمار آنزیمی ۴۰
۲-۲-۷- اندازه گیری صفات کروموزومی ۴۰
۲-۳- کشت بافت ۴۱
۲-۳-۱- تهیه محیط کشت ۴۱
۲-۳-۲- سترون کردن ظروف و سایر وسایل ۴۱
۲-۳-۳- ضد عفونی بذور و کشت آن‌ها ۴۱
۲-۳-۴- تهیه و کشت ریزنمونه و تولید کالوس ۴۲
۲-۳-۵- کشت سوسپانسیون ۴۳
۲-۳-۵-۱- تیمارهای رشد سلول ۴۴
۲-۳-۵-۱-۱- اندازه‌گیری وزن تر ۴۴
۲-۳-۵-۱-۲- اندازه‌گیری وزن خشک ۴۴
۲-۳-۵-۱-۳- اندازه‌گیری حجم سلول ساکن (SCV) و حجم سلول بسته‌بندی شده (PCV) ۴۵
۲-۳-۵-۱-۴- شمارش سلول ۴۵
۲-۳-۵-۲- تیمارهای محرک ۴۵
۲-۳-۶- استخراج تبائین و اندازه گیری آن توسط دستگاه HPLC ۴۶
۲-۳-۷- طرح آزمایشی و تجزیه و تحلیل آماری ۴۶

فصل سوم- نتایج و بحث

۳-۱- بررسی سیتوژنتیکی پنج توده از گونه *P. bracteatum* Lindl. ۴۹
۳-۱-۱- تقارن کاریوتیپ در توده‌های مورد مطالعه گونه *P. bracteatum* Lindl. ۵۶
۳-۲- بررسی کشت بافت گونه *P. bracteatum* Lindl. ۵۸

۳-۲-۱- کالوس‌زایی ۵۸

۳-۲-۲- کشت سوسپانسیون ۶۳

۳-۲-۲-۱- تاثیر تنظیم کننده‌های رشد گیاهی بر رشد سلول‌های *P. bracteatum* Lindl در کشت سوسپانسیون ۶۳

۳-۲-۲-۲- تیمارهای محرک و پیش ماده ۷۸

۳-۳- نتیجه گیری کلی ۹۳

۳-۴- پیشنهادات ۹۴

منابع ۹۵

فهرست جداول

جدول ۱-۱- زیرتیره‌های تیره Papaveraceae ۷

جدول ۱-۲- تقسیم‌بندی جنس *Papaver* ۷

جدول ۱-۳- صفات مورفولوژیک گونه‌های *P. bracteatum* Lindl.، *P. orientale* و *P. pseudo-orientale* ۱۱

جدول ۱-۴- انواع آلکالوئیدها در *P. bracteatum* Lindl.، *P. orientale* و *P. pseudo-orientale* ۱۲

جدول ۱-۵- طبقه بندی محرک‌های مورد استفاده برای تحریک تولید متابولیت‌های ثانویه بر اساس ماهیت آن‌ها ۲۹

جدول ۲-۱- ترکیب محیط کشت MS پایه ۴۲

جدول ۲-۲- ترکیب‌های هورمونی استفاده شده برای تولید کالوس در گیاه *P. bracteatum* Lindl. ۴۳

جدول ۲-۳- تیمارهای محرک استفاده شده برای تولید تبائین در کشت سوسپانسیون سلولی گیاه *P. bracteatum* Lindl. ۴۶

جدول ۳-۱- ویژگی‌های کاریولوژیکی پنج توده از گونه *P. bracteatum* Lindl. ۵۰

جدول ۳-۲- تجزیه واریانس ویژگی‌های کروموزومی در توده‌های مورد مطالعه *P. bracteatum* Lindl. ۵۴

جدول ۳-۳- تقارن کاریوتیپ ۵۷

جدول ۳-۴- تجزیه واریانس صفات درصد کالوس‌زایی و وزن تر کالوس در گیاه *P. bracteatum* Lindl. ۶۰

جدول ۳-۵- میانگین درصد کالوس‌زایی، قهوه‌ای شدگی و وزن تر کالوس ریزنمونه هیپوکوتیل-کوتیلدون *P. bracteatum* Lindl. در محیط‌های کشت مختلف ۶۱

جدول ۳-۶- تجزیه واریانس شاخص‌های اندازه‌گیری شده در کشت سوسپانسیون گونه *P. bracteatum* Lindl. تحت تاثیر سطوح مختلف تنظیم کننده‌های رشد گیاهی ۶۴

جدول ۳-۷- میانگین شاخص‌های اندازه‌گیری شده در کشت سوسپانسیون گونه *P. bracteatum* Lindl. تحت تاثیر سطوح مختلف تنظیم کننده‌های رشد گیاهی ۶۵

جدول ۳-۸- مقایسات گروهی تیمارهای اکسین و سایتوکنین در کشت سوسپانسیون *P. bracteatum* Lindl. ۷۳

جدول ۳-۹- تجزیه رگرسیون تراکم سلول، SCV و PCV کشت سوسپانسیون *P. bracteatum* Lindl. ۷۶

جدول ۳-۱۰- همبستگی بین شاخص‌های رشد با pH و EC محیط کشت در کشت سوسپانسیون *P. bracteatum* Lindl. به روش پیرسون ۷۶

جدول ۳-۱۱- تجزیه واریانس محتوای تبائین سلول‌ها و سایر صفات اندازه‌گیری شده در تیمارهای محرک کشت سوسپانسیون *P. bracteatum* Lindl. ۸۱

جدول ۳-۱۲- میانگین محتوای تبائین سلول‌ها، وزن سلول‌های فریزدرای و pH محیط کشت در تیمارهای محرک مختلف در کشت سوسپانسیون *P. bracteatum* Lindl. ۸۲

جدول ۳-۱۳- میانگین pH محیط کشت و زمان‌های مختلف پس از اعمال تیمار در کشت سوسپانسیون *P. bracteatum* Lindl ۸۴

جدول ۳-۱۴- میانگین محتوای تبائین سلول‌ها در زمان‌های مختلف پس از اعمال تیمار در کشت سوسپانسیون *P. bracteatum* Lindl. ۸۵

فهرست شکل‌ها

شکل ۱-۱- بیوسنتز آلکالوئید بنزیل ایزوکوئینولین ۹

شکل ۱-۲- مراحل کشت سوسپانسیون ۱۸

شکل ۳-۱- گستره متافازی و کاریوگرام کروموزوم‌های پنج توده *P. bracteatum* Lindl. ۵۲

شکل ۳-۲- ایدیوگرام کروموزوم‌های پنج توده *P. bracteatum* Lindl. ۵۳

شکل ۳-۳- میانگین طول کروموزوم‌ها در توده‌های مورد مطالعه *P. bracteatum* Lindl. ۵۵

شکل ۳-۴- مقایسه میانگین توده های مورد مطالعه *P. bracteatum* Lindl از نظر صفات کاریولوژیکی اندازه گیری شده ۵۵

شکل ۳-۵- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای توده‌های *P. bracteatum* Lindl بر اساس ویژگی-های کاریولوژیکی به روش وارد ۵۸

شکل ۳-۶- بذر جوانه زده و کالوس‌های حاصل از ریزنمونه هیپوکوتیل-کوتیلدون *P. bracteatum* Lindl. ۵۹

شکل ۳-۷- مقایسه درصد کالوس زایی ریزنمونه‌ها در محیط‌های حاوی زغال فعال و اسید اسکوربیک ۶۲

شکل ۳-۸- کشت سوسپانسیون *P. bracteatum* Lindl. ۶۹

شکل ۳-۹- سلول‌های حاصل از کشت سوسپانسیون *P. bracteatum* Lindl. ۷۰

شکل ۳-۱۰- منحنی رشد کشت سوسپانسیون *P. bracteatum* Lindl در محیط کشت MS حاوی یک میلی گرم بر لیتر NAA و یک میلی گرم بر لیتر BAP ۷۵

شکل ۳-۱۱- رابطه رگرسیونی بین تعداد سلول و SCV، تعداد سلول و PCV، PCV و SCV در کشت سوسپانسیون *P. bracteatum* Lindl. ۷۷

شکل ۳-۱۲- منحنی حاصل از HPLC در طول موج ۲۸۰nm برای تبائین در کشت سوسپانسیون *P. bracteatum* Lindl. ۷۹

شکل ۳-۱۳- میانگین محتوای تبائین سلول‌ها، pH و EC محیط کشت در زمان‌های مختلف نمونه برداری بعد از اعمال تیمارهای محرک و ال-تیروزین در کشت سوسپانسیون *P. bracteatum* Lindl. ۸۳

شکل ۳-۱۴- میانگین تبائین حاصل از تیمارهای محرک و ال-تیروزین در کشت سوسپانسیون *P. bracteatum* Lindl. ۸۶

شکل ۳-۱۵- میانگین محتوای تبائین سلول‌ها در سطوح مختلف متیل جاسمونات و کاربرد همزمان آن با ال-تیروزین در کشت سوسپانسیون *P. bracteatum* Lindl ۸۸

شکل ۳-۱۶- میانگین محتوای تبائین سلول‌ها در سطوح مختلف کیتوسان و کاربرد همزمان آن با ال-تیروزین در کشت سوسپانسیون *P. bracteatum* Lindl. ۸۹

شکل ۳-۱۷- میانگین محتوای تبائین سلول‌ها در سطوح مختلف اسید سالیسیلیک و کاربرد همزمان آن با ال-تیروزین در کشت سوسپانسیون *P. bracteatum* Lindl. ۹۱

شکل ۳-۱۸- میانگین محتوای تبائین سلول‌ها در زمان‌های مختلف تیمار امواج فراصوت و کاربرد همزمان آن با ال-تیروزین در کشت سوسپانسیون در کشت سوسپانسیون *P. bracteatum* Lindl. ۹۱

شکل ۳-۱۹- میانگین محتوای تبائین سلول‌ها در سطوح مختلف ال-تیروزین در کشت سوسپانسیون *P. bracteatum* Lindl. ۹۲

فصل اول

مقدمه و مروری بر تحقیقات گذشته

۱-۱- مقدمه

گیاهان دارویی از ارزش و اهمیت خاصی در تامین بهداشت و سلامت جوامع به لحاظ درمان و پیشگیری از بیماری‌ها برخوردار بوده و هستند. این بخش از منابع طبیعی قدمتی همپای بشر داشته و یکی از مهمترین منابع تامین غذا و داروی بشر در طول نسل‌ها بوده‌اند. گرایش عمومی جامعه به استفاده از داروها و درمان‌های گیاهی و به طورکلی فراورده‌های طبیعی به ویژه در طی سال‌های اخیر رو به افزایش بوده و مهمترین علت آن اثبات اثرات مضر و جانبی داروهای شیمیایی از یک طرف و ایجاد آلودگی‌های زیست محیطی که کره زمین را تهدید می‌کند از سوی دیگر است. مراتع ایران دارای گونه-های متعددی از گیاهان دارویی با ارزش می‌باشد. استفاده مطلوب، منطقی و بهینه از این منابع که به لحاظ فناوری بسیار کم هزینه‌تر و ساده‌تر از منابع دارویی شیمیایی است می‌تواند بخشی از نیازهای عمده‌ی بهداشتی و درمانی جامعه را تامین کند. سازمان جهانی سلامت تخمین زده که بیش از ۸۰٪ مردم جهان عمدتا از درمان‌های سنتی برای درمان خود استفاده می‌کنند. همچنین بسیاری از گیاهان منبع داروهای جدید هستند (تری‌پاتی و تری‌پاتی، ۲۰۰۳). گیاهان منبع با ارزشی از متابولیت‌های ثانویه هستند که به عنوان دارو، طعم دهنده، عطر، رنگ، آفت کش و مواد افزودنی غذایی استفاده می‌شوند. بیش از ۸۰٪ از ۳۰۰۰۰ فراورده‌ی طبیعی شناخته شده منشاء گیاهی دارند (فیلیپسون، ۱۹۹۰). امروزه گیاهان دارویی از لحاظ اقتصاد جهانی نیز بسیار اهمیت دارند (سیرواستاوا و همکاران، ۱۹۹۵).

با توجه به وابستگی به فصل زراعی و تاثیر شرایط آب و هوایی و محیط بر تولید مواد گیاهی، استفاده از روش‌های کشت بافت می‌تواند راهکار مناسبی برای تولید و تهیه مواد دارویی از گیاهان دارویی باشد. همچنین از این رهیافت برای تکثیر تجاری و ازدیاد گونه‌های مختلف گیاهان دارویی و زینتی نیز استفاده می‌شود. ابزارهای بیوتکنولوژیکی برای تکثیر و بهبود ژنتیکی گیاهان دارویی از طریق روش‌هایی از قبیل باززایی درون شیشه‌ای و تراریختی ژنتیکی از اهمیت زیادی برخوردار است (تری‌پاتی و تری‌پاتی، ۲۰۰۳). پیشرفت در بیوتکنولوژی به ویژه در روش‌های کشت درون شیشه‌ای سلول‌های گیاهی، در آمد جدیدی را از تجارت گیاهان کمیاب و ترکیبات شیمیایی تولیدی توسط آنها فراهم ساخته است. این تکنولوژی‌ها، سودمندی گیاهان به عنوان منابع تجدید پذیر از ترکیبات با ارزش را افزایش داده است. همچنین به

کشت سلول‌های گیاهی به عنوان جایگزین کشاورزی سنتی برای تولید صنعتی متابولیت‌های ثانویه توجه زیادی می‌شود (دی کوسمو و میساوا، ۱۹۹۵؛ مولاباگال و تسای، ۲۰۰۴). این تحقیق به منظور بررسی عوامل موثر بر رشد سلول‌های گیاه دارویی خشخاش ایرانی در کشت سوسپانسیون و تاثیر مواد محرک و پیش ماده ال-تیروزین بر تولید تبائین در شرایط درون شیشه‌ای انجام گرفته است.

۱-۲- متابولیت‌های طبیعی گیاه

متابولیت‌های گیاهی که به صورت طبیعی تولید می‌شوند به دو گروه تقسیم می‌شود:

الف) متابولیت‌های اولیه گیاهی: ترکیباتی هستند که برای رشد گیاهان لازم و ضروری هستند و در تمام سلول‌های زنده یافت می‌شوند. اسیدهای آمینه، اسیدهای نوکلئیک، پروتئین‌ها، کربوهیدرات‌ها، آنزیم‌ها، لیپیدها، اسید اسکوربیک و غیره از متابولیت‌های اولیه مهم گیاهی می‌باشند و در تمام گیاهان تولید می‌شوند (سارین، ۲۰۰۵).

ب) متابولیت‌های ثانویه گیاهی: گیاهان منبعی ارزشمند در تولید طیف گسترده‌ای از ترکیبات شیمیایی نظیر مواد معطر، چاشنی‌ها، شیرین کننده‌های طبیعی، مواد ضد میکروبی و دارویی هستند. در اغلب موارد این ترکیبات به گروه‌های متابولیکی بزرگی تعلق داشته و مجموعا به عنوان متابولیت‌ها یا فراورده‌های ثانویه شناخته می‌شوند (فارسی و ذوالعلی، ۱۳۸۸). به نظر می رسد که متابولیت‌های ثانویه در بیوسنتز متابولیت‌های اولیه درگیر نیستند. این ترکیبات از متابولیسم متابولیت‌های اولیه نظیر کربوهیدرات‌ها، چربی‌ها و اسیدهای آمنیه حاصل می‌شوند. از متابولیت‌های ثانویه می‌توان آلکالوئیدها، کومارین‌ها، فلاوونوئیدها، فنل‌ها، استرول‌ها و استروئیدها را نام برد که در تعداد کمی از گیاهان تولید می‌شوند (سارین، ۲۰۰۵). متابولیت‌های ثانویه در رده‌های خاصی از گیاهان یافت می‌شوند و تولید آنها در شرایط خاصی صورت می‌گیرد. به ظاهر برای ادامه حیات گیاه ضروری نمی‌باشند ولی با این حال نقش و عملکرد مهمی در گیاهان دارند که یکی از مهمترین آنها مزایای اکولوژیکی می‌باشد (اصغری، ۱۳۸۵). متابولیت‌های ثانویه، فعالیت‌های فیزیولوژیکی حیاتی را که متابولیت‌هایی مانند اسیدهای آمینه و اسیدهای نوکلئیک در گیاه انجام می‌دهند را بر عهده ندارند اما این ترکیبات به منظور دفع آفات، جذب حشرات گرده افشان و مبارزه با بیماری‌های میکروبی در گیاه تولید می‌شوند (فارسی و ذوالعلی، ۱۳۸۸).

۱-۲-۱- آلکالوئیدها

آلکالوئیدها ترکیبات آلی نیتروژن‌دار هستند که در اکثر نباتات وجود دارند و تمام آن‌ها را در آزمایشگاه به طور مصنوعی تهیه کرده‌اند. آلکالوئیدها به علت داشتن عامل آمین اغلب دارای خاصیت بازی هستند و ممکن است در ساختمان خود اکسیژن و گوگرد هم داشته باشند (عفت پرور، ۱۳۷۹).

آلکالوئیدها در دنیای داروسازی اهمیت بسیار زیادی دارند و به عنوان مسکن بسیار قوی به کار می‌روند که تاثیر بسیار زیادی روی سیستم عصبی دارند. آلکالوئیدها عمدتا در بافت‌های در حال رشد تولید می‌شوند و بافت‌های مرده به ندرت آلکالوئید تولید می‌کنند. بیش از ۲۵ سال است که در زمینه تولید آلکالوئیدهای مفید از طریق کشت بافت مطالعه انجام می‌گیرد ولی به دلیل تولید کم سلول‌های کشت شده، تولید صنعتی آن امکان‌پذیر نیست. بیش از ۳۰۰۰ نوع آلکالوئید شناسایی شده است که در بین ۴۰۰۰ گونه گیاهی پراکنده شده‌اند (سارین، ۲۰۰۵).

بر اساس اهمیت شیمیایی آلکالوئیدها به ۷ گروه تقسیم می‌شوند (سارین، ۲۰۰۵):

۱. آلکالوئیدهای پیرولیدین: گروه کوچکی از آلکالوئیدها هستند که خود به دو گروه تقسیم می‌شوند. الف)پیرولیدین‌های ساده: مانند هیگرین، هیگرولین و غیره. ب) آلکالوئیدهای تروپان: این گروه در داروسازی بسیار مهم هستند. مانند آتروپین، هیوسیامین، اسکوپولامین، کوکائین و غیره که آتروپین و هیوسیامین باعث گشاد شدن مردمک چشم می‌گردد. این گروه از آلکالوئیدها به عنوان مسکن نیز کاربرد دارند و در تیره‌های Solanaceae، Convolvulaceae و Erythroxylaceae وجود دارند.

۲. آلکالوئیدهای پیرولیزیدین: دارای طیف گسترده‌ای از فعالیت‌های بیولوژیکی در برابر تومور بوده و سست کننده ماهیچه‌ها نیز هستند. این آلکالوئیدها به دلیل داشتن خاصیت ضد تومور، ضد سرطان و ضد جهش از اهمیت خاصی برخوردار هستند. این آلکالوئیدها بر پایه‌ی هسته‌ی پیرولیزیدین خانواده‌ی بزرگی را تشکیل داده‌اند که می‌توان به آلکالوئیدهای سنسیو اشاره کرد. این آلکالوئیدها در تعدادی از گیاهان تیره Asteraceae، Boraginaceae و Fabaceae وجود دارند.

۳. آلکالوئیدهای پیریدین و پیپریدین: این آلکالوئیدها عمدتاً در توتون[1] یافت می‌شوند. از پیریدین‌ها می‌توان به نیکوتین و نورنیکوتین و از پیپریدین‌ها می‌توان به آناباسین اشاره کرد. نیکوتین که مایعی

1 . *Nicotiana tabacum.*

بی‌رنگ است عمدتا در برگ توتون (به مقدار ۸-۰/۵٪) تولید شده و در معرض هوا قهوه‌ای رنگ می‌شود. این آلکالوئید خاصیت درمانی نداشته و باعث افزایش ضربان قلب و بالا رفتن فشار خون می‌شود.

۴. آلکالوئیدهای پلی‌استیل: از این آلکالوئیدها می‌توان به کُنین، لیکوپودیوم، موسکوپریدین و آلکالوئیدهای کارپین اشاره کرد. آلکالوئید کُنین در گیاه شوکران[1] وجود دارد و بسیار سمی است.

۵. آلکالوئیدهای ایزوکوئینولین: این آلکالوئیدها شامل آلکالوئیدهای بسیار مهم بنزیل ایزوکوئینولین می‌باشند. این گروه از آلکالوئیدها، آلکالوئیدهای اصلی جنس پاپاور نظیر مورفین، کدئین، تبائین، پاپاورین و نارکوتین را شامل می‌شود که از نظر داروسازی بسیار اهمیت دارند. مورفین مسکن بسیار قوی می‌باشد که برای دردهای شدید استفاده می‌شود. کدئین بطور گسترده به علت داشتن خاصیت ضد درد مورد استفاده قرار می‌گیرد و اثر سمی کمتری از مورفین دارد. پاپاورین برای درمان آسم و گلو درد و نارکوتین نیز برای تهیه شربت ضد صرفه بکار می‌رود. تولید شش آلکالوئید مهم از این گروه از طریق کشت کالوس *Papaver somniferum*، *Papaver brecteatum* و *Papaver rhoeas* گزارش شده است. همچنین تشکیل تبائین در کشت سوسپانسیون *Papaver bracteatm* نیز گزارش شده است (کامی‌مورآ و همکاران، ۱۹۷۶).

۶. آلکالوئیدهای ایندول: این آلکالوئیدها توسط داروشناس‌ها، فیزیولوژیست‌ها و پزشک‌ها مورد توجه قرار گرفته است. این گروه از آلکالوئیدها در گیاهان تیره Apocynaceae، Loganiaceae، Rubiaceae و Euphorbiaceae یافت شده است. تولید این آلکالوئیدها از طریق کشت کالوس در گیاه *Catharanthus* گزارش شده است.

۷. سودوآلکالوئیدها: گروه دیگری از آلکالوئیدها هستند که در نتیجه اکسید شدن و به دنبال آن آلکیله و استیله شدن اسید آمینه‌های خاص بوجود می‌آیند.

آلکالوئیدها غالبا مزه تلخی دارند و در گیاه سبب حفاظت گیاه از گزند حشرات و حیوانات می‌گردند. اثری مشابه هورمون‌ها داشته و دارای عمل تنظیم کننده در رشد گیاهان بوده و به عنوان منبع ازت یا عناصر مورد نیاز گیاه بکار می‌روند. علت تولید آلکالوئید در گیاهان را می‌توان نتیجه‌ی تکامل متابولیسم گیاهان دانست (عفت‌پرور، ۱۳۷۹).

1 . *Conium maculatum.*