فهرست مطالب

فصل اول: مقدمه

۱- مقدمه ۱

فصل دوم: بررسی مابع

۲- بررسی منابع ۵

۲-۱ اهمیت گیاهان دارویی ۵

۲-۲ تاریخچه استفاده از گیاهان دارویی ۷

۲-۳ متابولیت های ثانویه ۹

۲-۳-۱ بیورآکتورها و کاربرد آنها ۱۰

۲-۳-۲ کاربرد فنآوری های نوین در افزایش تولید متابولیت های ثانویه ۱۱

۲-۳-۳ مهندسی متابولیک مسیرهای بیوشیمیایی ۱۴

۲-۴ اصلاح گیاهان دارویی ۱۶

۲-۴-۱ روش های اصلاحی نوین ۱۸

۲-۴-۱-۱ نشانگرهای مولکولی ۲۰

۲-۴-۲ ریز ازدیادی ۲۴

۲-۴-۳ باززایی ۲۶

۲-۴-۴ غربالگری و گزینش لاین های سلولی ۲۷

۲-۴-۵ راه کارهای افزایش تولید متابولیت های ثانویه در کشت های سلولی گیاهی ۲۹

۲-۴-۶ ریشه های موئین ۳۰

۲-۴-۷ محرک ها (Elicitors) ۳۴

۲-۵ تاریخچه گیاه شقایق ۳۵

۲-۵-۱ مناطق زیر کشت شقایق ۳۶

۲-۵-۲ مواد دارویی مورد استفاده ۳۷

۲-۶-۳ مشخصات گیاه شناسی ۳۹

۲-۶-۴ مراحل رشد گیاه شقایق ۴۱

۲-۵-۵ وزن هزار دانه گیاه شقایق: ۴۲

۲-۵-۶ نیازهای اکولوژیکی گیاه شقایق ۴۳

۲-۵-۷ آلکالوئیدهای گیاه شقایق ۴۴

۲-۶ مسیر متابولیکی سنتز مرفین و کدئین ۴۴

۲-۷ استفاده از روش های مهندسی ژنتیک در بهبود عملکرد تولید آلکالوئیدها ۴۶

۲-۷-۱ جداسازی ژن های مؤثر در بیوسنتز مرفین ۴۹

۲-۸ ساختارناقلین ژن ۵۲

۲-۸-۱ ناقلین باکتریایی ۵۳

۲-۸-۲ ناقلین گیاهی ۵۳

۲-۹ طبقه بندی آگروباکتریوم ها: ۵۳

۲-۹-۱ اساس ایجاد تومور و پلاسمید Ti: ۵۳

۲-۱۰ تولید گیاه تراریخت ۵۴

۲-۱۰-۱ روش های انتقال ژن ۵۵

۲-۱۰- ۲ راه کارهای بیان ژن در گیاه ۵۶
۲-۱۰-۳ بیان موقت ژن درگیاه ۵۶
۲-۱۰-۴ آگروباکتریوم یا بیان با یک ناقل باکتریایی ۵۹
۲-۱۰-۵ انتقال ژن بصورت پایدار به گیاه ۶۰
۲-۱۱ کشت بافت گیاهی ۶۰
۲-۱۱-۱ هورمون های گیاهی و ترکیبات آلی و محیط کشت ۶۱
۲-۱۱-۲ جنین زایی ۶۳
۲-۱۱-۳ کشت بافت شقایق الی فرا ۷۱
۲-۱۲ اهداف تحقیق ۷۳

فصل سوم: مواد و روشها

۳- مواد و روشها ۷۳
۳-۱ مواد گیاهی ۷۳
۳-۲ باکتری ها ۷۴
۳-۳ مواد شیمیایی وآنزیم ها ۷۴
۳-۴ مراحل انجام آزمایش ۷۴
۳-۴-۱ الف: بخش کشت بافت ۷۵
۳-۴-۱-۱ بهینه سازی محیط کشت بذر، انتخاب ریزنمونه مناسب و تعیین شرایط بهینه القای کالوس..... ۷۵
۳-۴-۱-۲ بررسی فاکتورهای مؤثر در جنین زایی سوماتیکی ۷۸
۳-۴-۱-۳ باززایی گیاهان از جنین های سوماتیکی ۸۰
۳-۴-۱-۴ القای ریشه در گیاهان باززایی شده در محیط درون شیشه ۸۰
۳-۴-۲ ب: آزمایشهای مولکولی ۸۰
۳-۴-۲-۱ شناسایی ژن های کاندید در گیاهان شقایق ۸۰
۳-۴-۲-۲ جداسازی ژن های مؤثر در بیوسنتز مرفین و کدئین ۸۱
۳-۴-۲-۳ پلاسمید pTZ57R/T..... ۸۶
۳-۴-۲-۴ ناقل pBI121..... ۸۸
۳-۴-۲-۵ تهیه سلول های مستعد باکتری*E. coli* سویه DH5α ۹۱
۳-۴-۲-۶ تراریختی *Agrobacterium tumefaciense* ۹۲
۳-۴-۳ ج: تراریختی گیاهان ۹۳
۳-۴-۳-۱ انتقال ژن به برگ گیاه با واسطه آگروباکتریوم در خلاء (آگرو اینفیلتریشن) ۹۴
۳-۴-۳-۲ تراریختی *P. somniferum* و باززایی گیاهان تراریخت ۹۴
۳-۴-۳-۳ تأیید تراریختی گیاهان با استفاده از روش های مولکولی و بیوشیمیایی ۹۵
۳-۴-۳-۴ استخراج DNA ۹۶
۳-۴-۳-۶ واکنش زنجیره ای پلیمراز ۹۷
۳-۴-۳-۷ استخراج ترکیبات آلکالوئیدی از برگ های گیاهان شقایق الی فرا..... ۹۷

فصل چهارم نتایج

۴- نتایج ۹۹
۴-۱ بخش اول کشت بافت..... ۹۹
۴-۱-۱ نتایج کشت بذر *Papaver somniferum*..... ۹۹
۴-۱-۲ محیط کشت جوانه زنی بذر:..... ۹۹

۴-۱-۳ تعیین عوامل مؤثر در تولید جنین های سوماتیکی ۱۰۰
۴-۱-۴ باززایی جنین های سوماتیکی ۱۱۰
۴-۱-۵ باززایی گیاه از جنین های سوماتیکی ۱۱۲
۴-۱-۶ روش های کنترل pH محیط کشت بافت ۱۱۳
۴-۲ نتایج بخش مولکولی ۱۱۷
۴-۲-۱ شناسایی ژن های کاندید در گیاهان ۱۱۷
۴-۲-۲ جداسازی ژن های مؤثر در بیوسنتز مرفین و کدئین ۱۱۸
۴-۲-۳ همسانه سازی در *E. coli* ۱۲۰
۴-۲-۴ تراریختی آگروباکتریوم تومفسینس ۱۲۹
۴-۳ تراریختی گیاهان شقایق الی فرا ۱۳۰
۴-۳-۱ بیان موقت ژن های *cor* و *sat* در گیاهان شقایق الی فرا ۱۳۰
۴-۳-۲ نتایج سنجش هیستوشیمیایی ۱۳۳
۴-۳-۳ بیان دائم ژن های *cor* و *sat* در ریزنمونه های هیپوکوتیلی گیاه شقایق الی فرا ۱۳۴
۴-۳-۴ ریشه زایی گیاهان تراریخت ۱۳۷
۴-۳-۵ انتقال به گلدان ۱۳۷
۴-۴ بررسی و آنالیز انتقال دائم ۱۳۸
۴-۴-۱ استخراج DNA از برگهای گیاهان ۱۳۹
۴-۴-۲ شناسایی ژن های *cor* و *sat* در نمونه های تراریخت شقایق الی فرا ۱۴۰
۴-۴-۳ آنالیز بیان ژن ۱۴۱

فصل پنجم: بحث

۵- بحث ۱۴۵
۵-۱ کشت بافت ۱۴۷
۵-۱-۱ القای کالوس ۱۴۷
۵-۱-۲ جنینزایی سوماتیکی ۱۴۸
۵-۱-۳ باززایی گیاه ۱۴۹
۵-۲ جداسازی و کلونینگ ژنهای درگیر در مسیر بیوسنتز آلکالوئیدها ۱۵۰
۵-۳ انتقال ژن ۱۵۰
۵-۳-۱ بیان موقت و دائم ژنهای *sat* و *cor* ۱۵۰
پیشنهادات ۱۵۳
فهرست منابع ۱۵۴
پیوست ها ۱۷۳

فهرست اشکال

شکل۲-۱: چشم انداز بیوتکنولوژی تحقیقات ریشه‌های موئین. ۳۴
شکل۲-۲: نمای شماتیک از اجزای شقایق الی فرا ۴۰
شکل۲-۳: بذر شقایق الی فرا ۴۲
شکل۲-۴: مسیر سنتز مرفین از الف: سالو تاردینول و ب: تبائین ۴۷
شکل۲-۵: نمای شماتیک از مسیر بیوسنتز مرفین، ۴۸
شکل۲-۶: استراتژی های بیان موقت با استفاده از ناقل های ویروسی ۵۸
شکل۳-۱: ناقل pTZ57R/T ۸۶
شکل ۳-۲: نقشه شماتیک ناقل pBI121 (Clontech) ۸۹

شکل۴-۱: رشد بذر گیاه شقایق الی فرا در محیط درون شیشه در مراحل مختلف رشد..... ۱۰۰
شکل۴-۲: کشت ریزنمونه کوتیلدونی و هیپوکوتیل گیاه شقایق الی فرا در محیط کشت حاوی هورمون 2,4-D.... ۱۰۲
شکل۴-۳: اثرات تیمارهای مختلف هورمونی بر روی کالوس زایی ریزنمونه های هیپوکوتیلی گیاه شقایق الی فرا... ۱۰۴
شکل۴-۴: القای کالوس در ریزنمونه هیپوکوتیلی گیاه شقایق الی فرا در محیط B5 تکمیل شده با هورمون 2,4-D و BAP..... ۱۰۴
شکل۴-۵: اثرات تیمارهای مختلف هورمونی بر روی کالوس زایی ریزنمونه های هیپوکوتیلی گیاه شقایق الی فرا... ۱۰۵
شکل۴-۶: القای کالوس در ریزنمونه هیپوکوتیلی گیاه شقایق الی فرا در محیط B5 تکمیل شده با هورمون NAA و BAP..... ۱۰۵
شکل۴-۷: اثرات تیمارهای مختلف هورمونی بر روی کالوس زایی ریزنمونه های هیپوکوتیلی گیاه شقایق الی فرا... ۱۰۶
شکل۴-۸: القای کالوس در ریزنمونه هیپوکوتیلی گیاه شقایق الی فرا در محیط B5 تکمیل شده با هورمون NAA و BAP ۱۰۷
شکل۴-۹: اثرات تیمارهای مختلف سولفید مس بر روی کالوس زایی ریزنمونه های هیپوکوتیلی گیاه شقایق الی فرا ۱۰۷
شکل۴-۱۰: القای کالوس در ریزنمونه های هیپوکوتیلی گیاه شقایق الی فرا در محیط B5 تکمیل شده با سولفید مس ۱۰۸
شکل۴-۱۱: تولید کالوس در شرایط تاریکی در ریزنمونه هیپوکوتیلی گیاه شقایق الی فرا..... ۱۰۹
شکل۴-۱۲: تشکیل جنین های سوماتیکی در محیط کشت فاقد هورمون تکمیل شده با گلوتامین در دمای ۱۸ درجه در گیاه شقایق الی فرا ۱۱۱
شکل۴-۱۳: ظهور برگ های کوتیلدونی و باززایی گیاهچه از جنین های سوماتیکی ریزنمونه هیپوکوتیلی گیاه شقایق الی فرا در محیط کشت عاری از هورمون B5:..... ۱۱۳
شکل۴-۱۳: قهوه ای شدن ریزنمونه های هیپوکوتیلی و کوتیلدونی گیاه شقایق الی فرا در محیط B5 بدلیل کاهش شدید pH محیط ۱۱۴
شکل۴-۱۴: شناسایی سلول های جنین زا از سلول های غیر جنین زا در کشت گیاه شقایق الی فرا با استفاده از میکروسکوپ..... ۱۱۶
شکل۴-۱۵: الکتروفورز محصولات PCR جهت شناسایی ژن های درگیر در مسیر بیوسنتز مرفین و کدئین از گیاهان شقایق الی فرا ۱۱۷
شکل۴-۱۶: استخراج RNAی کل از برگ گیاه شقایق الی فرا به منظور سنتز cDNA و تولید DNAی دورشته ای ۱۱۸
شکل۴-۱۷: الکتروفورز محصول PCR برای همسانه سازی ژن های *sat* و *cor* از گیاه شقایق الی فرا با استفاده از آغازگرهای اختصاصی که cDNA به عنوان الگو بوده است ۱۲۰
شکل۴-۱۸: کشت باکتری *E. coli* بر روی محیطLB دارای آمپی سیلین..... ۱۲۱
شکل۴-۱۹: الکتروفورز محصول PCR برای همسانه سازی ژن های *sat* و *cor* از گیاه شقایق الی فرا با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ۱۲۱
شکل۴-۲۰: الکتروفور قطعات حاصل از هضم آنزیمی پلاسمید pTZ57R/T نوترکیب حامل ژن های *cor* و *sat* توسط آنزیمهای برشی *Bam*HI و *Sac*I..... ۱۲۲
شکل۴-۲۱: الکتروفورز محصول PCR برای تأیید الحاق ژن های هدف در پلاسمید pTZ57R/T با استفاده از Colony PCR ۱۲۳
شکل۴-۲۲: الکتروفورز هضم آنزیمی پلاسمید pBI121 پس از هضم آنزیمی توسط دو آنزیم *Bam*HI و *Sac*I... ۱۲۴

شکل۴-۲۳: بازیافت قطعه مربوط به ناقل پلاسمیدی pBI121 بدون ژن *gus* از روی ژل، قطعه مربوط به ژن *gus* در انتها نمایان است ۱۲۵
شکل۴-۲۴: الکتروفورز استخراج پلاسمید pBI121 نوترکیب حامل ژنهای *sat* و *cor* از *E. coli* با استفاده از روش Mini prep ۱۲۶
شکل۴-۲۵: الکتروفورز محصول هضم آنزیمی پلاسمید pBI121 نوترکیب توسط دو آنزیم *Bam*HI و *Sac*I ۱۲۷
شکل۴-۲۶: الکتروفورز محصول PCR ژن های *cor* و *sat* به منظور تأیید تراریختی باکتری *E. coli* ۱۲۸
شکل۴-۲۷: نمای شماتیک پلاسمید نوترکیب pBI121 حامل ژن های مورد نظر *sat* و *cor*. که در جایگاه های آنزیم BamHI و SacI همسانه سازی شده اند ۱۲۸
شکل۴-۲۸: رشد کلونی های آگروباکتریوم حامل پلاسمید نوترکیب pBI121 بر روی محیط انتخابی حاوی ۵۰mg/l کانامایسین و ۵۰mg/l ریفامپسین ۱۲۹
شکل ۴-۲۹: تأیید تراریختی باکتری آگروباکتریوم حاوی پلاسمید نوترکیب pBI121 از طریق الکتروفورز محصولات PCR ۱۳۰
شکل ۴-۳۰: آنالیز بیان موقت محصول ژن های *sat* و *cor* در برگ های گیاهان شقایق با استفاده از TLC ۱۳۲
شکل ۴-۳۱: آنالیز بیان موقت گیاهان کنترل شقایق الی فرا و نمونه های استاندارد با استفاده از روش TLC ۱۳۳
شکل ۴-۳۲: نتایج رنگ آمیزی هیستوشیمیایی ریزنمونه کوتیلدونی حاوی ژن *gus* ۱۳۴
شکل ۴-۳۳: انتقال گیاهان تراریخت شقایق الی فرای باززایی شده از جنین های سوماتیکی در محیط کشت انتخابی عاری از هورمون B5 . ..... ۱۳۵
شکل ۴-۳۴: باززایی گیاهان تراریخت شقایق الی فرا در محیط کشت پایه B5 ..... ۱۳۶
شکل ۴-۳۵: نمای شماتیک از مراحل باززایی گیاهان تراریخت شقایق الی فرا در محیط B5 از ریزنمونه هیپوکوتیلی ۷ روزه ۱۳۶
شکل ۴-۳۶: ریشه زایی گیاهان تراریخت شقایق الی فرا در محیط B5 فاقد هورمون حاوی پرولین و ۰/۱ میلی گرم در لیتر هورمون IBA ۱۳۷
شکل ۴-۳۷: الکتروفورز محصول استخراجDNAی ژنومی از برگ های گیاهان تراریخت شقایق الی فرا ۱۳۹
شکل ۴-۳۸: تأیید تراریختی گیاهان شقایق الی فرا از طریق آزمون PCR بر روی ژنوم گیاهان باززایی شده با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن های *cor* و *sat* ۱۴۰
شکل ۴-۳۹: درصد ترکیبات مختلف آلکالوئیدی در نمونه های برگ های گیاهان تراریخته و شاهد شقایق الی فرا. ۱۴۴

فهرست جداول

جدول ۲-۱: لیست، کاربرد، قیمت و منشأ گیاهی برخی از متابولیت های ثانویه ۹
جدول ۲-۲: اهداف مهندسی متابولیت در گیاهان دارویی ۱۵
جدول ۲-۳ : تولید متابولیت های ثانویه در کشت های سلولی ۲۸
جدول ۲-۴ :کشت های ریشه مویین تولیدکننده محصولات دارویی مطلوب. ۳۱
جدول۲-۵: منطقه و مساحت زیر کشت شقایق در ایران ۱۳۴۸ ..... ۳۷
جدول ۲-۶: مراحل مختلف رشدی، حساسیت های دمائی و آبی ۴۲
جدول۲-۷: آلکالوئیدهای مهم شقایق الی فرا و میزان موجود در شیرابه آن ۴۴
جدول ۳-۱: مواد مورد نیاز از هر یک از مواد تهیه شده برای یک واکنش ۲۵ میکرولیتری PCR. ۸۴
جدول ۳-۲: چرخهء واکنش زنجیرهای پلیمراز برای تکثیر DNAی گیاهان *Papaver somniferum* ۸۴
جدول ۳-۳: تیمارهای هورمونی کشت بافت ریزنمونه های شقایق الی فرا ۷۶
جدول ۴- ۳: نتایج آنالیز HPLC در برگ های گیاهان تراریخت و کنترل ۱۴۳

فهرست پیوست‌ها

پیوست ۱- استخراج RNA ۱۷۳
پیوست ۲- پیوست طرز تهیه آب عاری از RNAase دپسی ۱۷۵
پیوست ۳- طرز تهیه مواد الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد ۱۷۶
پیوست ۴- استخراج پلاسمید به روش Mini prep ۱۷۸
پیوست ۵- نحوه استفاده از کیت Roche برای خالص سازی ۱۸۱
پیوست ۶- تهیه سلول های مستعد باکتری ۱۸۲
پیوست ۷- تهیه سلول های آماده تراریختی آگروباکتریوم ۱۸۳
پیوست ۸- استخراج پلاسمید از آگروباکتریوم تومفسینس ۱۸۴
پیوست ۹- محیط کشت های باکتریایی و آنتی بیوتیکها ۱۸۶
پیوست ۱۰- استخراج DNA ۱۸۷
پیوست ۱۱- رنگ آمیزی هیستوشیمیایی جهت تشخیص ژن *gus* ۱۸۹

چکیده:

شقایق الی‌فرا *Papaver somniferum* منبع اقتصادی مسکن‌های نارکوتیک، کدئین و مرفین می‌باشد. در کنار این دو مرفینان، گیاه شقایق الی‌فرا تقریبا" ۸۰ آلکالوئید متعلق به خانواده‌های متنوع تتراهیدروبنزیل ایزوکوئینون را تولید می‌کنند. آلکالوئیدهای بنزوایزوکوئینی گروه متنوعی از ترکیبات ازت‌دار هستند که در ۲۰ درصد گونه‌های گیاهی یافت می‌شوند. جداسازی ژن‌های مؤثر دخیل در بیوسنتز مرفین در گیاهان شقایق الی‌فرا جهت تولید آلکالوئیدهای ویژه دارای اهمیت بسیار می‌باشد. مهندسی متابولیک مسیرهای آلکالوئید گیاهی عموما" بدلیل محدودیت دسترسی به ژنهای بیوسنتزی کلون شده و عدم توانایی تراریختی گونه‌های تولیدکننده آلکالوئید محدود می‌باشد. اکنون مسیر سنتز آنزیمی مرفین در شقایق الی‌فرا بصورت کامل تشریح شده است. در مسیر بیوسنتزی، دو آنزیم کلیدی سالوتاردینول۷- أ- استیل ترانسفراز یا SAT که در تبدیل سالوتاردینول به سالوتاردینول ۷-أ- استات که پیش ماده اولیه تبائین است و کدئینون ردوکتاز یا (COR) که آنزیم ماقبل آخر و آنزیم نهایی در دو مسیر متناوب بین تبائین و مرفین می‌باشد دخیل می‌باشند. آنزیم کدئینون ردوکتاز، واکنش احیاء وابسته به NADPH کدئینون به کدئین را نیز کاتالیز می‌کند. در این پروژه، ژن‌های کدکننده این آنزیم‌ها با استفاده از آغازگرهای طراحی شده بر اساس توالی ژن‌ها در بانکهای اطلاعاتی برای شقایق الی‌فرا جداسازی گردید. RNAی کل جهت سنتز cDNA استخراج و cDNA کدکننده آنزیمهای SAT و COR با استفاده از رونویسی معکوس mRNA استخراج‌شده از گیاهان ۶ هفته‌ای تولید گردید. این ژن‌ها ابتدا در ناقل همسانه‌سازی pTZ57RIT مستقر گردیدند. پلاسمیدهای نوترکیب جهت تراریختی سویه DH5α باکتری *E. coli* به کار گرفته شد. پس از انتخاب همسانه‌های مثبت در محیط انتخابی، استخراج پلاسمیدها انجام گردید. پلاسمیدهای نوترکیب با استفاده از روش هضم آنزیمی و PCR تأیید گردیدند. DNAی بازیابی شده از ژل آگارز ۱٪ جهت همسانه‌سازی بعدی در پلاسمید بیانی pBI121 بین جایگاه‌های برشی *Bam*HI و*Sac*I به منظور بیان ژن‌ها تحت کنترل پیش‌برنده CaMV 35S مورد استفاده قرار گرفت. پلاسمید نوترکیب در سویه DH5α باکتری *E. coli* منتقل شد. نتایج این همسانه‌سازی با استفاده از روشهای مختلف ملکولی نظیر هضم آنزیمی و PCR تأیید گردید. سازه‌های ساخته شده جهت تراریخت سویه C58 باکتری آگروباکتریوم تومفسینس مورد استفاده قرار گرفت. از روش آگروواینفیلتراسیون جهت بیان موقت ژن-های *sat* و *cor* در برگهای گیاهان شقایق الی‌فرا استفاده گردید. این سازه‌ها به منظور بیان دایم در ریزنمونه-های هیپوکوتیلی گیاهان شقایق الی‌فرا استفاده شد. بیان ژن‌ها با استفاده از آنالیزهای بیوشیمیایی کروماتوگرافی لایه نازک TLC و کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC) عصاره برگ و مولکولی PCR تأیید گردید. نتایج ارزیابی نشان داد که مرفین، کدئین، پاپاورین و نوسکاپین تنها در برگ‌های گیاهان تراریخت تولید می‌گردد.

کلمات کلیدی: بیان موقت، شقایق الی‌فرا، همسانه‌سازی

فصل اول

۱- مقدمه

گیاه شقایق الی‌فرا (*Papaver somniferum*) به واسطه تولید آلکالوئیدهای با ارزش و پرمصرف در صنایع دارویی از جمله گیاهان مهم اقتصادی دنیا محسوب می‌شود، بطوریکه سطح زیر کشت آن در دنیا طی سال‌های ۲۰۰۰-۱۹۹۰ میلادی بالغ بر ۲۵۰۰۰۰ هکتار بوده است. وضعیت سطح زیر کشت و فرآوری این محصول در دنیا تحت نظارت دفتر کنترل مواد مخدر و پیشگیری از جرایم سازمان ملل متحد می‌باشد. در طی چند دهه اخیر، کشورهای مختلف و بخصوص اروپایی‌ها، سرمایه‌گذاری عظیمی بر روی جنبه‌های مختلف زراعت، فرآوری و کنترل قاچاق مشتقات شقایق انجام داده‌اند، بطوریکه در ترکیه طی دهه ۱۹۷۰ تولید تریاک ریشه‌کن شد و به جای آن از کپسول خشک شقایق به منظور تهیه آلکالوئیدهای مورد نیاز صنایع دارویی استفاده گردید چراکه انحراف آن به مسیرهای غیرقانونی و قاچاق مواد مخدر بسیار مشکل‌تر از تریاک است. استرالیا نیز با تحقیق بر روی مسائل آگرونومی و مهندسی ژنتیک موفق به کشف ارقام مطلوبی از شقایق شده است که از نظر دارویی بسیار با ارزش‌تر از ارقام سنتی می‌باشند. با ممنوعیت کشت شقایق در ایران پس از پیروزی انقلاب اسلامی، به‌دلیل نیاز به مشتقات دارویی این گیاه، در حال حاضر رویکردی جدید برای استفاده از فنآوری‌های نوین برای استفاده از این گیاه دارویی مهم و مشتقات آن در کشور بوجود آمده است. در این‌صورت، امید است فاصله بین فنآوری‌های کشت و فرآوری این محصول با سایر کشورهای اروپایی و حتی آسیایی رفع شود.

استفاده ازروش‌های کشت بافت و مهندسی ژنتیک امکان تولید گیاهانی با افزایش میزان تولید متابولیت‌های ثانویه را فراهم می‌کند. فنآوری کشت بافت و سلول گیاهی در اواخر سال ۱۹۶۰ بعنوان یک ابزار در مطالعه و تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهی مورد استفاده قرار گرفت و راه‌حل‌های مختلفی با استفاده از سیستمهای این ویترو برای بهبود تولید ترکیبات ثانویه گیاهی به کار گرفته شد. متأسفانه با وجود تحقیقات فراوان در این زمینه، تاکنون فقط تولید تعداد معدودی از متابولیت‌های ثانویه گیاهی به روش این ویترو، از نظر اقتصادی و تجاری مقرون به صرفه بوده است. نیاز به تجهیزات پیچیده همچون بیوراکتورها و هزینه زیاد محیط کشت‌ها و محرک‌های مختلف برای افزایش تولید محصول، تولید این مواد را در شرایط آزمایشگاهی با محدودیت مواجه ساخته است.

با توجه به نکات ذکر شده در بالا اهداف این آزمایش‌ها عبارتند از:

۱- راه اندازی و کشت بافت گونه‌های خشخاش *Papaver somniferum*.

الف: امکان تکثیر و نگهداری گونه گیاهی مورد نظرمطلوب از نظر صفات ژنتیکی و بیوشیمایی فراهم آید.

ب: ریزنمونه مناسب جهت انتقال ژن و باززایی گیاهان تراریخت تعیین گردد.

۲-بهینه‌سازی انتقال ژن در گونه‌های *P. somniferum* با استفاده از روش‌های انتقال ژن.

۳- جداسازی ژن‌های مسؤل در ساخت آنزیم‌های کلیدی در راه متابولیکی تولید مرفین و تبائین شامل SAT و COR و انتقال این ژن‌ها با هدف افزایش تولید این فراورده‌ها در *P. somniferum* .

۴- تهیه بذر از لاین‌های با میزان تولید مطلوب آلکالوئید جهت کشت در مزرعه.

بر این اساس از بانک‌های اطلاعاتی ژنتیکی، که معمولاً تمام اطلاعات ژنتیکی در آن ذخیره شده است، چون NCBI[1] و EMBL[2] استفاده گردید. اینگونه پایگاه‌های اطلاعاتی[3] قابلیت‌های بیشتری چون جستجوی توالی،توالی پروتئین، مقایسه با دیگر توالی‌ها و... را نیز دارا می‌باشند.

[1] . National Center for Biotechnology Information
[2] . European Molecular Biology Laboratory
[3] . Data bases

در این رابطه توالی‌های نسبتاً مشابه برای ژن‌های *sat* و *cor* یافت گردید و با نرم افزارهای بیوانفورماتیک، برای دو سر ابتدائی و انتهایی ژن طراحی آغازگر صورت گرفت. این آغازگرها به گونه‌ای طراحی شدند که در آنها سایت‌های برشی جهت خارج نمودن قطعه در صورت لزوم در ادامه کارهای مولکولی در آن تعبیه شد. آنزیم‌ها به گونه‌ای انتخاب شده بودند که در درون توالی محلی برای برش نداشتند.

با توجه به این نکته، که معمولاً ژن‌های یوکاریوتی دارای اینترون و اگزون بوده و نیازمند، فرایند پردازش می‌باشند، به همین منظور با انتخاب توالی مبتنی بر mRNA، حذف اینترون امکان-پذیر می‌باشد. بنابراین استخراج RNAی کل و ساخت cDNA و در ادامه انجام PCR از آن به عنوان الگو در این پروژه جهت جداسازی و تکثیر ژن انجام گرفت.

پس از اطمینان از صحت کار، ابتدا به منظور پشتیبان در ناقل‌های کلونینگ همسانه‌سازی شدند، سپس برای انتقال دوباره به گیاه *P. somniferum* با بیان بیشتر، از ناقلین با پیش‌برنده قوی استفاده گردید.

در ادامه برای اثبات اثر ژن‌های فوق انتقال موقت بر روی برگ‌های گیاه انجام گرفت، نتایج حاصل با TLC تائید گردید، که حاکی از افزایش میزان مواد مؤثره آلکالوئیدی در گیاهان تراریخت در مقایسه با گیاهان شاهد (غیر تراریخت) می‌باشد.

در خاتمه انتقال دائم این ژن‌ها به گیاه انجام شد، پس از تراریختی ریزنمونه‌های هیپوکوتیلی و باززایی گیاهان تراریخت، الحاق ژن‌ها در ژنوم گیاهان با استفاده از آزمون PCR و آغازگرهای اختصاصی ژن‌ها و نیز آغازگر برگشتی ژن *nos*II تأیید گردید. گیاهان تراریخته در مرحله گلدانی بوده و پس از تولید گرز، تأیید افزایش تولید مواد مؤثره آلکالوئیدی با استفاده از آزمون کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) و HPLC انجام گرفت.

فصل دوم

۲- بررسی منابع

۲-۱ اهمیت گیاهان دارویی

گیاهان دارویی بعنوان منبعی غنی از مواد دارویی شناخته شده‌اند و استفاده از آنها در درمان انسان و دام، قدمتی به بلندای تاریخ بشر دارد. علاقه به تولید گیاهان دارویی و معطر و تقاضا برای محصولات طبیعی بطور مداوم در جهان رو به افزایش می‌باشد به طوری که قرن بیستم را قرن بازگشت به طبیعت و قرن گیاهان دارویی نام نهاده‌اند. مطابق برآورد سازمان بهداشت جهانی (WTO)، ۸۰ درصد مردم دنیا برای مراقبت‌های بهداشتی اولیه بطور سنتی به گیاهان دارویی و تولیدات طبیعی تمایل دارند (محمدی، ۱۳۸۰؛ نوروزیان، ۱۳۸۰؛ چاترجی، ۲۰۰۲)[۱]. گیاهان نیز منبع بسیاری از داروهای جدید می‌باشند. تخمین زده شده است که ۲۵ درصد داروهای مورد استفاده حاوی عناصر گیاهی یا ترکیبات فعال بدست آمده از عناصر گیاهی می‌باشند. مسکن‌های بسیار رایج نظیر آسپرین، کدئین و مرفین از گیاهان خانواده شقایق (Papaveracea) منشأ گرفته‌اند و یا داروهای ضد سرطان رایج نظیر تاکسول[۲] و وین‌بلاستین[۳] تنها در منابع گیاهی یافت می‌شوند (کاتزانگ، [۴]۱۹۹۵؛ پزوتو[۵]، ۱۹۹۶؛ رابرتز[۶]، ۱۹۸۸). مواد مؤثره گیاهان دارویی جزئی از متابولیت‌های ثانویه گیاهی به شمار می‌آیند که تولید آنها برای گونه‌های مولد ضروری نیست و در حقیقت حاصل فعالیت چرخه های بیوسنتزی فرعی هستند که از چرخه‌های بیوسنتزی حیاتی (متابولیسم اولیه) مشتق می‌شوند و نقش اصلی آنها در سازگاری گیاه به محیط اطراف خود می‌باشد.

تاکنون از حدود ۶۰۰۰۰۰ گونه گیاهی جهان بیش از ۳۰۰۰۰ گونه بنا به ضرورت تجزیه گردیده و فقط قریب به ۳۰۰ گونه از آنها به عنوان گیاه دارویی رسمی شناخته شده است. ۶۰ گونه از این ۳۰۰ گونه در عملیات به‌نژادی و به‌زراعی وارد شده و تنها معدودی از این ۶۰ گونه به سطح تولید

---

[1] Chatterjee
2. Taxol
3. Vinblastine
[4] Katzung
[5].Pezzuto
[6] Roberts

اقتصادی قابل توجه رسیده و به رقابت با داروهای صنعتی پرداخته‌اند (لانگی[1]، ۱۹۹۸). امروزه سهم تجارت جهانی گیاهان دارویی ۴۳ تا ۶۰ میلیارد دلار است که نرخ رشد سالیانه آن حدود ۷ درصد می‌باشد (لانگی، ۱۹۹۸). در کشور چین بازار سالیانه گیاهان دارویی از ۱/۸ میلیارد دلار در سال ۱۹۹۵ به حدود ۸ میلیارد دلار در سال ۱۹۹۹ رسید. در حدود ۱۰ میلیون نفر در این کشور در بخش گیاهان دارویی اشتغال دارند و سالانه ۱۲۰ میلیون تن گیاه دارویی خرید و فروش می‌شود (اسکیپ-من[2]، ۲۰۰۲). در ایران حدود ۶۰۰ میلیارد ریال از بودجه عمومی کشور صرف پرداخت یارانه برای تأمین داروهای مورد نیاز می‌شود. هزینه واردات دارو در سال ۱۳۷۹ حدود ۴۰۰ میلیون دلار بوده است (نوروزیان، ۱۳۸۰). طبق گزارش‌های موجود فلور ایران شامل ۱۱۰۰۰-۸۰۰۰ گونه گیاهی است که معادل دو برابر فلور کل اروپاست (نوروزیان، ۱۳۸۰). ایران به‌دلیل دارا بودن تنوع آب و هوایی گسترده و ذخایر ژنتیکی گیاهی فراوان یکی از غنی‌ترین کشورها از نظر امکانات و استعدادهای طبیعی به شمار می‌رود.

گیاهان به عنوان منابع سرشار مواد دارویی، مواد طعم‌دهنده، مواد معطر و مواد رنگی مورد استفاده قرار گرفته‌اند که این کاربردها، فرآورده‌های گیاهان دارویی (متابولیتهای ثانویه) را در بین ارزشمندترین فراورده‌های گیاهی قرار داده است. استفاده از فراورده‌های طبیعی در پزشکی شاخه جدیدی از داروسازی را بوجود آورده است که به فارماکوگنسی[3] معروف است و بسیاری از کمپانی‌های دارویی به تحقیق در زمینه اثر عصاره‌های گیاهی در درمان بیماری‌ها می‌پردازند. ترکیباتی نظیر کدئین و مرفین جزء آلکالوئیدهای ایزوکوئینولینی به عنوان مسکن، هیوسیامین و اسکوپولامین‌ها در درمان بیماریهای قلبی و حرکتی (سوون[4] و همکاران، ۲۰۰۱) کورارین[5] و توکسیفرین[6] به عنوان

[1] Lange
[2] Schippmann
1- Pharmacognocy
[4]-. Sevon
3- Qurarine
4- Toxiferrine

سست کننده قوی در جراحی‌ها، وین‌کریستین[1] و وین‌بلاستین در درمان سرطان خون و تاکسول دارای اثرات ضد سرطان کاربرد گسترده‌ای در پزشکی دارند (لی[2] و همکاران، ۱۹۹۹).

۲-۲ تاریخچه استفاده از گیاهان دارویی

استفاده از گیاهان دارویی به منظور درمان با تاریخ زندگی انسان هم زمان بوده است. انسان در تمام دوران تاریخی چاره‌ای جز توسل به گیاهان نداشت. اگر چه در نیم قرن گذشته استفاده از داروهای شیمیایی و سنتزی به شدت رواج یافت ولی به سرعت آثار زیان‌بار داروهای شیمیایی بر زندگی انسان‌ها سبب گرایش مجدد به گیاهان دارویی گردید، و این نکته که توسل به گیاهان دارویی همواره در طول تاریخ یکی از روش‌های موثر درمان بوده است، به خوبی روشن است. تاریخ طب در کشور ما مربوط به دوره آریایی می‌باشد و اوستا (۶۵۰۰ ق.م) اولین کتابی است که از گیاهان دارویی سخن گفته است. به نقل از اوستا، اولین پزشک ایرانی تریته پدر گرشاسب پهلوان بوده است که از کاربرد گیاهان دارویی و عصاره آنها اطلاع داشته و مقام او در طب نظیر مقام ایمهوتپ (۳۵۰۰ ق.م) در مصر باستان، انقلبیوس در یونان و آسکولانیوس در روم(سه رب النوع درمان) بوده است. قدیمی-ترین گیاه دارویی در طول تاریخ " هوم "گیاه مقدس آیین زرتشت بوده است. در کتاب‌های پهلوی هوم را سرور همه گیاهان و استفاده از آن را باعث عمر جاویدان می‌داند. تاریخ استفاده دارویی از پیاز و ادویه به ۴۵۰۰ ق.م و به نقل از هردوت استفاده از گیاهان دارویی میرح(*Commiphora*)، کاسیا (*Cinnamomu*)، سیناموم (*Cinnamimum Zylanica*)، آنیز (*Pinpimella anisum*) و مارجورام (*Oroganum margorana*) در مومیایی کردن اجساد به ۵۲۰۰ ق.م می‌رسد. در قدیمی‌ترین کتاب چینی منسوب به شینون (۲۸۰۰ ق.م)، ۱۰۰۰ گونه دارویی شرح داده شده است و ماردوکاپالیدین (۷۱۰ ق.م) ۶۴ گونه دارویی را کشت می‌نموده است، در الواح سومری چگونگی کشت گیاهان به صورت مختصرشرح داده شده است. بقراط (۳۷۷ ق.م) کاربرد دارویی ۴۰۰ گونه دارویی را ذکر کرده

5- Vincristine
[2] - Lee

است. ظهور دانشمندانی نظیر سقراط، دیوسکورید، رازی، هروی، ابن سینا، ابوریحان بیرونی، جرجانی، خاندان بختیشوع سبب گسترش این علم در جهان گردیدند. گیاهان دارویی رستنی‌هایی با تاریخچه جالب توجه و ممتاز هستند. علاوه بر قدمت، گستره نفوذ این گیاهان در تاریخ ادیان و ملت‌ها بسیار شایان توجه است بطوریکه در جای جای حوادث مهم تاریخی، سیاسی، اجتماعی و دینی، این گیاهان قرین توجه بوده و یا منجر به بروز حوادث مهمی شده اند. در بوندهشن (دایرهٔالمعارف زرتشتیها) به اسامی فرشتگان اداره‌کننده روزهای یک ماه اشاره شده که با نام گیاهان دارویی انطباق دارد، زعفران و نسترن از آن جمله‌اند. در سوره دهر، آیات پنجم و ششم میخوانیم نیکوکاران عالم در بهشت شرابی نوشند که طبعش در لطف رنگ وبوی کافور است. در تاریخ اسلام، نام یهود بنی‌قریظه با حوادث مهم صدر اسلام قرین است. در زبان عربی یکی از نام‌های درخت اقاقیا، قریظه است. بنی قریظه نام طایفه-ای از یهود بوده که در ابتدا به شغل دباغی اشتغال داشته‌اند و از این گیاه در فرآوری پوست استفاده می‌کرده‌اند. امروزه می‌دانیم که تانن‌ها گروهی از مواد مؤثره هستند که در رسوب پروتئین نقش دارند و این اثر باعث خاصیت میکروب‌کشی، ضد خونریزی و انقباض بافت‌های مختلف می‌شود. بنابراین برای رسوب‌دادن پروتئین پوست، در دباغی مورد استفاده قرار می‌گرفته است. از دیگر گیاهان دارویی سس است که در زبان عطاران و منابع طب سنتی به افتیمون معروف است که نام اخیراز صفت گونه‌ای در نام علمی آن گرفته شده است. از خواص درمانی این گیاه در درمان بیماری‌های دماغی استفاده می-شود .علاوه بر منابع طبی در متون ادبی هم از این گیاه نام برده شده است. با جستجو و دقت درمنابع دینی، تاریخی و ادبی، اسامی گیاهان دارویی، وجوه تسمیه و حوادث مرتبط با این گیاهان به وفور به چشم می‌خورد. بنابراین در کنار توجه فزاینده ای که به خواص درمانی این گیاهان می‌شود لازم است جهت آشنایی با این وجوه تسمیه بررسی‌های جامع‌تری انجام گیرد و حلقه‌های مجزای دانش بشری مربوط به گیاهان دارویی انسجام و اتصال بیشتری پیدا نماید.

۲-۳ متابولیت های ثانویه

مسیرهای متابولیکی فراوانی در گیاهان وجود دارد که حاصل فعالیت آنها تأمین ترکیبات حیاتی برای گیاه است. این مسیرهای متابولیکی حیاتی را متابولیسم اولیه و فرآورده‌های حیاتی حاصل از آنها را که بطور مستقیم در رشد و متابولیسم دخالت دارند، متابولیت‌های اولیه گویند. مسیرهای سنتز کربوهیدرات‌ها، لیپیدها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک در گیاهان از جمله مسیرهای متابولیکی اولیه می‌باشند. جنبه دیگری از متابولیسم که می‌توان آن را وجه تمایز گیاهان و جانوران دانست اینست که گیاهان و قارچها مسیرهای متابولیکی متنوعی دارند که از مسیرهای متابولیکی اولیه مشتق می‌شوند. و برای بقاء موجود نیز حیاتی نیستند این مسیرهای پیرامونی را مجموعا" متابولیسم ثانویه و فراورده‌های آنها را متابولیت‌های ثانویه می‌نامند (لی و همکاران[1]، ۱۹۹۹). بسیاری از ترکیبات ارزشمند بیوشیمیایی محصول متابولیسم ثانویه گیاهی می‌باشد و بسیاری از این مواد منحصر به سلسله گیاهان هستند و در میکروب‌ها و حیوانات تولید نمی‌گردند. به هر حال با پیشرفت‌هایی که در عرصه موجودات تراریخت صورت گرفته، تولید مولکول‌ها و ترکیباتی که در گیاهان وجود ندارد نیز ممکن خواهد گردید. جدول ۲-۱ یک لیست برخی از مهمترین متابولیت‌های ثانویه را نشان می‌دهد.

جدول ۲-۱: لیست، کاربرد، قیمت و منشأ گیاهی برخی از متابولیتهای ثانویه

محصول	کاربرد	گیاه	قیمت (دلار / کیلوگرم)
آجمالیسین		*Cath. roseus*	۳۷۰۰۰
آرتمیسینین	ضد مالاریا	*Artemisia annua*	۴۰۰
آجمالین		*Ra. serpentina*	۷۵۰۰۰
آکینیتین		*Acotinum spp.*	
بربرین		*C. japonica*	۳۲۵۰
کامپتوتسین	آنتی تومور	*Camptotheca acuminata*	۴۳۲۰۰۰
کاپسائیسین		*Ca. frutescens*	۷۵۰
کاستانوسپرمین	ممانعت کننده گلیکوزید	*Castanospermum australe*	
کدئین	مسکن	*P. somniferum*	۱۷۰۰۰
کلشی سین	آنتی تومور	*Colchium autumnale*	۳۵۰۰۰

[1]- Lee

دیگوکسین	محرک قلب	*Di. lanata*	۳۰۰۰
دیوژنین	پیش ساز استروئیدی	*Dioscorea deltoidea*	۱۰۰۰
الیپتیسین	آنتی تومور	*Orchrosia elliptica*	۲۴۰۰۰۰
ژینسنوزید	داروی مقوی	*Panax ginseng*	
مورفین	مسکن	*P. somniferum*	۳۴۰۰۰۰
پودوفیلوتوکسین	آنتی تومور	*Podophyllum petalum*	
کوئینین	ضد مالاریا	*Cinchon. ledgeriana*	۵۰۰
سانگوینارین	آنتی پلاک	*Sanguinaria canadensis*	۴۸۰۰
		P. somniferum	
شیکونین	ضد باکتری	*L. erythrorhizon*	۴۵۰۰
تاکسول	ضد سرطان	*Taxus brevifolia*	۶۰۰۰۰۰
وین کریستین	ضد سرطان	*Cath. roseus*	۲۰۰۰۰۰۰
وین بلاستین	ضد سرطان	*Cath. roseus*	۱۰۰۰۰۰۰

تولید متابولیت‌های ثانویه یا بصورت تک‌مرحله‌ای انجام می‌شود یا بصورت دومرحله‌ای. در نوع دومرحله‌ای ابتدا سلول‌ها در یک سیستم مخصوص فقط رشد داده می‌شوند و در مرحله دیگر به محیط دیگری به منظور بیوسنتز فراورده ثانویه منتقل می‌گردند. تغییر در محیط کشت اثر قابل توجهی بر تمایز بافت و سنتز متابولیت‌های ثانویه دارد. تولید درون شیشه متابولیت‌های ثانویه در بسیاری از کشت‌های سلولی امکان‌پذیر می‌باشد (بارز و الیس[1]، ۱۹۸۱).

۲-۳-۱ بیورآکتورها و کاربرد آنها

بیورآکتورها مرحله کلیدی در تولید اقتصادی و تجاری متابولیت‌های ثانویه توسط زیست-فنآوری گیاهی می‌باشد. مزیت استفاده از این روش نسبت به روش کشت توده‌ای سلول‌های گیاهی عبارتست از :

۱- با کنترل بهتر شرایط، میزان تولید کشت‌های سوسپانسیون سلولی با کنترل پارامترهای لازم افزایش یافته و در نتیجه تولید ترکیبات فعال زیستی بهینه می‌گردد.

۲- تنظیم منظم شرایط در مراحل مختلف عمل بیورآکتور امکان پذیر است.

۳- مدیریت کشت نظیر تلقیح و برداشت آسان و از لحاظ زمانی به صرفه است.

[1] -Barz and Ellis

۴- جذب مواد غذایی در شرایط کشت غرقابی، افزایش یافته و باعث تحریک تکثیر و افزایش عملکرد در ترکیبات فعال زیستی خواهد شد

از سیستم بیورآکتور تاکنون در کشتهای اندامزایی و جنین‌زایی چندین گونه استفاده شده است (لوین و همکاران[۱]، ۱۹۸۸). مقادیر بالای سانگواینارین[۲] در کشتهای سوسپانسیون سلولی *P. somniferum* با استفاده از بیورآکتور تولید گردید (پارک و یون[۳]، ۱۹۹۲). در کشتهای بافت ریشه Ginseng در یک بیورآکتور ۲۰ تنی در حدود ۵۰۰mg/l/day تولید ساپونین گزارش شده است (چارلوود و چارلوود[۴]، ۱۹۹۱). پیشرفت‌های چشمگیری در ارتباط با بهینه‌سازی سیستم‌های کشت بیورآکتورها جهت تولید و استخراج ترکیبات با ارزش گیاهان دارویی نظیر، ژین‌سینوزیدها و شیکونین بدست آمده است. ریشه‌های کشت شده در گیاهان خانواده سرخدار[۵] در بیوراکتورها موجب آزادشدن ترکیبات فعال دارویی ضد سرطان به داخل محیط مایع بیوراکتورها می‌شود که به صورت پیوسته آن را می‌توان جهت تهیه دارو استخراج نمود (مارچ[۶] و همکاران،۲۰۰۰). لازم به ذکر است که جهت بدست‌آوردن ۱ کیلوگرم ترکیب فعال تاکسول لازم است که پوسته درختان با ۱۰۰ سال عمر را برداشت نمود (ماهل-باخ[۷]، ۱۹۹۸). تحقیقات انجام شده در طی دو دههء اخیر روشهای مؤثری را جهت جداسازی کشت-های سلولی و سیستم‌های بیوراکتور با عملکرد بالا فراهم نموده است که از این سیستم‌های مؤفق جهت تولید مواد دارویی بازدارنده تومورها استفاده می‌شود (ماهل‌باخ، ۱۹۹۸).

۲-۳-۲ کاربرد فنآوری های نوین در افزایش تولید متابولیت های ثانویه

تصور بر این است که استفاده از روش کشت سلول گیاهی برای ترکیبات مهم دارویی زمانی به صورت صنعتی قابل استفاده خواهد شد که: ۱- میزان تولید متابولیت‌ها افزایش یابد، ۲- ترکیبات

---

[1] -Lewin,l
2- Sangoinarine
[3] -Park and Yoon
4- Charlwood
[5] - Taxus
[6] - Murch
[7]-Mahelbach