پردیس کشاورزی و منابع طبیعی
دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی
گروه زراعت و اصلاح نباتات

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته اصلاح نباتات

عنوان:

بهینه سازی شرایط کشت بافت و انتقال ژن در گیاه دارویی شیرین بیان (*Glycyrrhiza glabra*)

استادان راهنما:
دکتر علیرضا زبرجدی
دکتر کیانوش چقامیرزا

نگارش:
معصومه صفری

شهریور ماه ۱۳۹۲

کلیه حقوق مادی مترتب بر نتایج مطالعات، ابتکارات و

نوآوری های ناشی از تحقیق موضوع این پایان نامه

متعلق به دانشگاه رازی است.

برای پدر و مادر مهربانم که

لحظات ناب باور بودن، لذت و غرور دانستن، جسارت خواستن، عظمت رسیدن و تمام تجربه های یکتا و زیبای زندگیم، مدیون حضور سبز آنهاست.

و

برای همه ی آنانکه آفتاب را به دیگران ارزانی می دارند. . .

سپاسگزاری...

سپاس بیکران پروردگار یکتا را که هستی‌مان بخشید و به طریق علم و دانش رهنمونمان شد و به همنشینی رهروان علم و دانش مفتخرمان نمود و خوشه چینی از علم و معرفت را روزیمان ساخت.

به مصداق «من لم یشکر المخلوق لم یشکر الخالق» بسی شایسته است از اساتید بزرگوارم جناب آقای دکتر علیرضا زبرجدی و جناب آقای دکتر کیانوش چقامیرزا که همواره از راهنمایی‌های ارزشمند و بی‌دریغشان بهره برده‌ام و در کنارشان صبر و بردباری را آموختم تقدیر و تشکر نمایم و برای ایشان از خداوند متعال بهروزی و سلامت مسئلت دارم. جای آن دارد از جناب آقای دکتر عبداله نجفی و جناب آقای دکتر ناصر کریمی که زحمت مطالعه و تصحیح پایان نامه اینجانب را بر عهده داشتند کمال قدردانی را داشته باشم و از سایر اعضای محترم گروه نیز تقدیر و تشکر می‌نمایم و سپاس بی‌دریغ خدمت دوستان گران‌مایه‌ام خانم‌ها سمانه کاظم، مژگان ملصقی، نوشین محمودی، هدا بشیری و آقایان سروش نوابی‌فر، فرشاد فلاح و حمزه مینایی که همواره از همراهی‌های صمیمانه‌شان بهره‌مند بوده‌ام.

خداوندا به ما توفیق تلاش در شکست، صبر در نومیدی، جهاد بی سلاح، کار بی پاداش، فداکاری در سکوت، دین بی دنیا، عظمت بی نام، خدمت بی نان، ایمان بی ریا، خوبی بی نمود، مناعت بی غرور و دوست داشتن بی آنکه دوستت بدارند، را عنایت فرما.

چکیده

شیرین بیان با نام علمی *Glycyrrhiza glabra* از خانواده لگومینوز می‌باشد که از مشهورترین گیاهان دارویی در جهان است و به شکل گسترده‌ای در پزشکی، داروسازی و صنایع قنادی و بهداشتی مصرف می‌شود. با توجه به اهمیت این گیاه، این پژوهش با هدف بهینه سازی شرایط کشت بافت و انتقال ژن ریشه‌زایی از طریق *Agrobacterium rhizogenes* به منظور تولید انبوه ریشه‌های مویی در شیرین بیان اجرا گردید. به منظور بهینه‌سازی کشت بافت این گیاه آزمایش‌های القای کالوس، باززایی غیرمستقیم و باززایی مستقیم در محیط کشت B5 انجام شد. آزمایش کالوس‌دهی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار اجرا گردید. در آزمایش القا کالوس، سطوح مختلف NAA و BAP و دو نوع ریزنمونه هیپوکوتیل و کوتیلدون مورد مقایسه قرار گرفت. ۲ میلی‌گرم بر لیتر NAA و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP بهترین ترکیب هورمونی جهت القا کالوس ریزنمونه‌های هیپوکوتیل (۹۶/۲۹٪) و کوتیلدون (۱۰۰٪) شناخته شد. در آزمایش باززایی غیر مستقیم از سطوح مختلف BAP و NAA و دو نوع کالوس (حاصل از هیپوکوتیل و کوتیلدون) استفاده شد که بیشترین باززایی از کالوس حدود ۱۳/۶۸٪ به تعداد ۲ شاخساره بود که در محیط کشت B5 حاوی ۳ میلی‌گرم بر لیتر BAP، برای کالوس حاصل از ریزنمونه هیپوکوتیل به دست آمد. در آزمایش باززایی مستقیم سطوح مختلف BAP به همراه NAA و سه نوع ریزنمونه (کوتیلدون، هیپوکوتیل و گره) مورد مقایسه قرار گرفت بیشترین ساقه‌دهی به صورت مستقیم برای ریزنمونه گره (۹۶/۶۷٪) با تعداد ۳ شاخساره حاصل شد که در محیط کشت B5 حاوی ۳ میلی‌گرم بر لیتر BAP می‌باشد. در آزمایشی دیگر که در سطوح مختلف TDZ با دو ریزنمونه (هیپوکوتیل و کوتیلدون) انجام شد، ریزنمونه هیپوکوتیل در محیط B5 بعلاوه ۱ میلی‌گرم در لیتر TDZ، نوساقه تشکیل داد. جهت انتقال ژن ریشه‌زایی از سویه‌های مختلف اگروباکتریوم رایزوژنز استفاده شد. بهینه‌سازی انتقال ژن به این گیاه طی دو آزمایش مجزای *in vitro* و *ex vitro* بررسی شد. در آزمایش *in vitro* از ۳ ریزنمونه (هیپوکوتیل، کوتیلدون و گره) و ۲ سویه باکتری (ATCC 15834 و GM1 9534) استفاده شد، بهترین نتیجه القای ریشه‌مویی در سویه GMI 9534 برای ریزنمونه گره در حدود ۳۶/۸٪ به دست آمد. در آزمایش *ex vitro* درصد القای ریشه در چهار سویه باکتری (ATCC15834، GM19534، A4 و A13) همراه با شاهد بررسی شد. که بر اساس نتایج PCR سه سویه A4، A13 و GMI 9534، ۱۰۰ درصد و سویه ATCC 15834، ۶۶/۶۶ درصد تراریخت بودند.

کلمات کلیدی:

اگروباکتریوم رایزوژنز، شیرین بیان، کشت بافت گیاهی، هورمون‌های رشد

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه

۱-۲- مقدمه..... ۲

فصل دوم: کلیات و بررسی منابع

۲-۱- گیاهان دارویی..... ۶

۲-۱-۱- تعریف گیاهان دارویی..... ۶

۲-۱-۲- تاریخچه گیاهان دارویی..... ۶

۲-۱-۳- ارزش اقتصادی گیاهان دارویی..... ۷

۲-۱-۴- متابولیت‌های ثانویه..... ۸

۲-۲- کشت بافت گیاهی..... ۹

۲-۲-۱- کالوس‌دهی..... ۱۰

۲-۲-۲- انواع کالوس ۱۱

۲-۲-۳- واکشت کالوس..... ۱۱

۲-۲-۴- باززایی..... ۱۱

۲-۲-۵- محیط کشت و انواع آن..... ۱۲

۲-۲-۶- تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی ۱۳

۲-۲-۷- اکسین‌ها..... ۱۳

۲-۲-۸- سیتوکینین‌ها..... ۱۳

۲-۲-۹- کاربردهای کشت بافت و سلول گیاهی..... ۱۳

۲-۳- مهندسی ژنتیک..... ۱۴

۲-۳-۱- تولید گیاهان تراریخت..... ۱۵

۲-۳-۲- روش‌های انتقال ژن..... ۱۵

۲-۳-۳- گونه‌های اگروباکتریوم..... ۱۷

۲-۳-۴- ساختمان پلاسمیدهای اگروباکتریوم..... ۱۷

۲-۳-۵- ترانسفورماسیون گیاهان به کمک اگروباکتریوم..... ۱۸

۲-۳-۶- ناحیه *virulence* پلاسمیدهای Ri و Ti..... ۱۹

۲-۳-۷- تشخیص سلول‌های گیاه میزبان توسط اگروباکتریوم..... ۱۹

۲-۳-۸- اگروباکتریوم رایزوژنز..... ۲۱

۲-۳-۹- ریشه‌های مویین ۲۱

۲-۳-۱۰- گیاهان کامپوزیت ۲۳

۲-۳-۱۱- ارزیابی گیاهان تراریخت..... ۲۴

۲-۴- گیاه دارویی شیرین بیان..... ۲۴

۲-۴-۱- خانواده Leguminosae یا Fabaceae..... ۲۴

۲-۴-۲- جنس *Glycyrrhiza*..... ۲۴

۲-۴-۳- تاریخچه و مناطق کشت گونه *Glycyrrhiza glabra*..... ۲۴

۲-۴-۴- میزان صادرات و سطح زیر کشت شیرین بیان در ایران ۲۵
۲-۴-۵- مشخصات گیاه شناسی شیرین بیان (*Glycyrrhiza glabra*) ۲۵
۲-۴-۶- مصارف و ترکیبات گیاه شیرین بیان ۲۶
۲-۵- مطالعات انجام شده بر روی ترکیبات و خواص دارویی شیرین بیان ۲۸
۲-۶- مطالعات انجام شده بر روی کشت بافت گیاه شیرین بیان ۲۹
۲-۶-۱- کالوس‌دهی و کشت سوسپانسیون ۲۹
۲-۶-۲- باززایی ۳۱
۲-۷- مروری بر تولید ریشه‌های مویین تراریخت با استفاده از اگروباکتریوم در شیرین بیان ۳۲
۲-۸- مطالعات انجام شده بر روی گیاهان کامپوزیت ۳۳

فصل سوم: مواد و روش‌ها

۳-۱- مواد گیاهی ۳۶
۳-۲- کشت بافت گیاهی ۳۶
۳-۲-۱- ضدعفونی لوازم آزمایش و مواد گیاهی ۳۶
۳-۲-۲- تهیه محلول‌های ذخیره محیط کشت بافت گیاهی ۳۶
۳-۲-۳- جوانه‌زنی بذرها و تهیه گیاهچه به منظور تهیه ریزنمونه ۳۸
۳-۲-۴- تهیه ریزنمونه برای القای کالوس ۳۸
۳-۲-۵- محیط القای کالوس ۳۸
۳-۲-۶- باززایی از کالوس (غیر مستقیم) ۳۹
۳-۲-۷- باززایی مستقیم از ریزنمونه ۳۹
۳-۲-۸- شاخه‌زایی (Shoot regeneration) ۳۹
۳-۲-۹- انتقال به گلدان ۴۰
۳-۲-۱۰- تجزیه آماری ۴۰
۳-۳- انتقال ژن به واسطه اگروباکتریوم رایزوژنز ۴۰
۳-۳-۱- باکتری‌های اگروباکتریوم رایزوژنز مورد استفاده ۴۰
۳-۳-۲- تهیه محیط LB (Lauri and Bertani) ۴۱
۳-۳-۳- تهیه استوک ذخیره باکتری ۴۱
۳-۳-۴- آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده ۴۲
۳-۳-۵- کشت باکتری ۴۲
۳-۳-۶- تلقیح ریزنمونه‌ها به وسیله باکتری اگروباکتریوم رایزوژنز ۴۲
۳-۳-۷- حذف باکتری ۴۳
۳-۴- تولید گیاهان کامپوزیت به روش *ex vitro* ۴۳
۳-۴-۱- تهیه باکتری ۴۳
۳-۴-۲- تلقیح گیاه به وسیله باکتری اگروباکتریوم رایزوژنز ۴۳
۳-۵- تأیید تراریختی ۴۴
۳-۵-۱- استخراج DNA ژنومی ۴۴
۳-۵-۲- واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) برای ژن *rolB* ۴۶

فصل چهارم: نتایج و بحث

۴-۱- جوانه‌زنی بذر ۵۰
۴-۲- بررسی آزمایش‌های کشت بافت ۵۰
۴-۲-۱- نتایج آزمایش کالوس‌دهی ۵۰
۴-۲-۲- نتایج آزمایش باززایی از کالوس ۵۴
۴-۲-۳- باززایی مستقیم ۵۶
۴-۳- بررسی آزمایش‌های انتقال ژن به وسیله آگروباکتریوم رایزوژنز ۶۱
۴-۳-۱- نتایج آزمایش بهینه‌سازی شرایط انتقال ژن در شرایط *in vitro* ۶۱
۴-۳-۲- نتایج آزمایش بهینه‌سازی شرایط انتقال ژن در شرایط *ex vitro* ۶۳
۴-۴- نتیجه واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)، به منظور تأیید حضور ژن *rolB* در ریشه‌های تراریخت ۶۵
۴-۵- نتیجه‌گیری کلی ۶۶
۴-۶- پیشنهادات ۶۶
منابع: **۶۷**

فهرست اشکال

عنوان **صفحه**

شکل۲-۱- ساختار دو پلاسمید **Ti** و **Ri** ۱۸
شکل ۲-۲- مکانیسم انتقال **T-DNA** به سلول میزبان ۲۰
شکل ۲-۳- تصویر و طبقه‌بندی گیاه شیرین بیان (***Glycyrrhiza glabra***)..... ۲۶
شکل ۲-۴- فرمول شیمیایی گلیسریزین (ساپونین تری‌ترپنوئیدی پنج حلقه‌ای)..... ۲۷
شکل ۴-۱- جوانه‌زنی شیرین بیان (***Glycyrrhiza glabra***)..... ۵۰
شکل ۴-۲- کالوس حاصل از ریزنمونه هیپوکوتیل و کوتیلدون..... ۵۲
شکل ۴-۳- باززایی حاصل از کالوس هیپوکوتیل..... ۵۶
شکل ۴-۴- باززایی حاصل از ریزنمونه گره ۵۷
شکل ۴-۵- مراحل باززایی در گیاه شیرین بیان..... ۶۰
شکل ۴-۶- مقایسه میانگین اثر متقابل ریزنمونه‌ها و سویه‌های باکتری اگروباکتریوم رایزوژنز در القای ریشه تراریخت..... ۶۳
شکل ۴-۷- گیاهان کامپوزیت (**A**). ریشه‌های تراریخت (**B**)..... ۶۴
شکل ۴-۸- نتایج حاصل از الکتروفورز محصولات **PCR** برای ژن ***rolB*** و ژن ***virC***..... ۶۵

فهرست جدول‌ها

عنوان **صفحه**

جدول ۳-۱- ترکیبات محیط کشت B5 ..... ۳۷
جدول ۳-۲- تنظیم‌کننده‌های رشدی مورد استفاده..... ۳۷
جدول ۳-۳- سویه‌های اگروباکتریوم رایزوژنز مورد استفاده..... ۴۱
جدول ۳-۴- ترکیبات محیط LB برای یک لیتر..... ۴۱
جدول ۳-۵- بافر استخراج CTAB برای ۵۰ ml ۴۵
جدول ۳-۶- بافر شستشو برای ۵۰ ml ۴۶
جدول ۳-۷- اجزای مخلوط واکنش PCR در حجم ۲۵ µl..... ۴۷
جدول ۳-۸- برنامه PCR برای ژن *rolB*..... ۴۷
جدول ۳-۹- برنامه PCR برای ژن *virC*..... ۴۸
جدول ۴-۱- تجزیه واریانس برای صفت کالوس‌دهی ۵۱
جدول ۴-۲- تأثیر ترکیبات مختلف NAA و BAP روی کالوس‌دهی ریزنمونه‌های هیپوکوتیل و کوتیلدون از *G. glabra* ۵۲
جدول ۴-۳- تأثیر ترکیبات مختلف NAA و BAP روی باززایی از کالوس ریزنمونه‌های هیپوکوتیل و کوتیلدون از *G. glabra* ۵۵
جدول ۴-۴- تجزیه واریانس برای صفت باززایی مستقیم از گره ۵۷
جدول ۴-۵- تأثیر ترکیبات مختلف NAA و BAP روی باززایی ریزنمونه گره از *G. glabra* ۵۸
جدول ۴-۶- تجزیه واریانس برای صفت باززایی مستقیم از ریزنمونه‌های هیپوکوتیل و کوتیلدون در محیط کشت پایه B5 حاوی غلظت‌های مختلف TDZ..... ۵۹
جدول ۴-۷- تأثیر غلظت‌های مختلف TDZ روی باززایی ریزنمونه‌های هیپوکوتیل و کوتیلدون از *G. glabra*..... ۵۹
جدول ۴-۸- تجزیه واریانس برای صفت ریشه‌زایی..... ۶۱
جدول ۴-۹- تأثیر ریزنمونه‌های مختلف *G. glabra* بر القای ریشه تراریخت..... ۶۲

فصل اول

مقدمه

۱-۱- مقدمه

گیاهان علاوه بر آنکه از منابع مهم غذایی به شمار می‌روند، تأمین کننده طیف گسترده‌ایی از مواد شیمیایی مانند داروها، رنگ‌ها و چاشنی‌ها هستند. سازمان بهداشت جهانی تخمین زده است که بیش از ۸۰ درصد از مردم به صورت سنتی و یا مدرن از گیاهان دارویی استفاده می‌کنند. گیاهان دارویی به دلیل توأم بودن ماهیت طبیعی و وجود ترکیبات همولوگ دارویی در آنها، با بدن سازگاری بهتری دارند و معمولاً فاقد عوارض ناخواسته داروهای شیمیایی هستند.

وجود یازده اقلیم از سیزده اقلیم شناخته شده جهان، برخورداری از سیصد روز آفتابی در سال و اختلاف دمای ۴۰ تا ۵۰ درجه سانتی‌گرادی میان سردترین و گرمترین نقطه در کشور، شرایط مساعدی برای کشور پهناور ایران به لحاظ بهره‌مندی از یک اکولوژیک منحصر به فرد فراهم کرده است، این شرایط زمینه رشد و نمو گیاهان وحشی و دارویی را در کشور مساعد کرده است، به طوری که بیش از ۹۰ درصد گونه‌های گیاهی جهان در ایران وجود دارد. و این موضوع کشور را در شمار مستعدترین کشورهای جهان برای صادرات گیاهان دارویی قرار داده است. طبق برآوردهای صورت گرفته در سال‌های اخیر، ارزش بازارهای جهانی داروهای گیاهی که شامل گیاهان دارویی و فرآورده‌های آنهاست، همواره با رشد قابل توجهی رو به افزایش بوده است و بخش اعظم این بازار به تولید و عرضه متابولیت‌های ثانویه مشتق از این گیاهان مربوط می‌شود.

هم اکنون گیاهان دارویی به سبب اهمیت در امر صادرات از عرصه های طبیعی جمع آوری می‌شوند، به منظور جلوگیری از این برداشت بی رویه، کشت، اهلی کردن[1] و تولید انبوه این گیاهان باید مورد توجه قرار گیرد (سفید کن، ۱۳۸۷). یکی از این گیاهان ارزشمند شیرین بیان (*Glycyrrhiza glabra*) از خانواده Leguminosae می‌باشد که از مشهورترین گیاهان دارویی در جهان است و به شکل گسترده‌ای در پزشکی، داروسازی و صنایع قنادی و بهداشتی مصرف می‌شود. قسمت‌های مورد استفاده آن ساقه‌های زیرزمینی و

[1] Domestication

ریشه‌های گیاه است که دارای ترکیبات مختلفی است، از جمله مهمترین این مواد، ترکیبی به نام اسید گلیسریزیک[2] است که ۵۰ برابر از شکر شیرین‌تر است (Shibata, 2000) و مقدار آن با توجه به شرایط محیطی و گونه گیاه بین ۵ تا ۲۴ درصد است (Krishnamurthy *et al.*, 1998). به دنبال افزایش تقاضا برای گلیسریزین اخیراً به صورت غیر مسئولانه به جمع آوری شیرین بیان وحشی مبادرت می‌شود که نتیجه این امر، کاهش منابع در رویشگاه‌های طبیعی آن می‌باشد. بدین جهت کوشش‌هایی برای رسیدن به مقدار فراوان گلیسریزین در سلول‌های شیرین بیان به وسیله ابزار بیوتکنولوژی صورت گرفته است (Hayashi *et al.*, 2003). افزایش در عملکردهای کمی و کیفی گیاهان نه تنها به عملیات به‌زراعی بلکه به تغییر ساختار ژنتیکی گیاه آن نیز ارتباط دارد، از جمله اقدامات در این زمینه می‌توان به استفاده از تکنیک‌های کشت بافت و مهندسی ژنتیک اشاره نمود (سفید کن، ۱۳۸۷). در واقع هدف از اصلاح گیاهان دارویی، افزایش کمیت و کیفیت آن دسته از مواد مؤثره در این گیاهان است که در صنایع دارویی از اهمیت خاصی برخوردار هستند و کشت بافت گیاهی راه حلی مناسب برای تولید آسان و انبوه متابولیت‌های ثانویه می‌باشد، همچنین کشت بافت پیش نیاز مهندسی ژنتیک است زیرا از سلول تغییر یافته باید بتوان یک گیاه کامل بوجود آورد. اصلاح ژنتیک با استفاده از *Agrobacterium rhizogenes* به منظور افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه که به طور طبیعی در ریشه‌های گیاه سنتز می‌شود، صورت می‌گیرد. ریشه‌هایی که به وسیله *A. rhizogenes* مویی شده‌اند دارای نرخ رشد سریع هستند و با توجه به بهره‌برداری پایدار و بالا در شرایط کشت عاری از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، برای تولید متابولیت‌های ثانویه مناسب هستند (Giri and Narasu, 2000).

با توجه به اهمیت دارویی گیاه شیرین بیان، ایران در زمره صادرکنندگان مهم این گیاه در دنیا قرار دارد. از آنجا که استان فارس، کرمان و کرمانشاه از مهمترین قطب‌های تولید و صادرات این محصول هستند، سالیانه صدها تن از این گیاه از مناطق رویش آن به صورت وحشی، برداشت می‌شود به طوری که در قسمت‌های جنوبی کشور به خصوص استان‌های فارس و کرمان گیاه در خطر انقراض قرار دارد. بنابراین لازم است از روش‌های دیگری غیر از برداشت مستقیم از مراتع به تولید این محصول اقدام کرد.

[2] glycyrrhizic acid

۱-۲- اهداف

- بهینه سازی شرایط کشت بافت و باززایی گیاه شیرین بیان
- انتقال ژن ریشه‌زایی از طریق *A. rhizogenes* به منظور تولید انبوه ریشه‌های مویی در شیرین بیان

فصل دوم

کلیات و بررسی منابع

۲-۱- گیاهان دارویی

۲-۱-۱- تعریف گیاهان دارویی

گیاه دارویی به گیاهی گفته می‌شود که تمام آن یا اجزائی از آن به صورت تازه، خشک شده یا فرآوری شده جهت تشخیص، درمان، پیشگیری، کمک به اعمال فیزیولوژیک و حفظ بهداشت بدن انسان یا حیوانات و دیگر گیاهان بکار می‌رود (سفیدکن، ۱۳۸۷).

۲-۱-۲- تاریخچه گیاهان دارویی

گیاهان دارویی از ارزش و اهمیت خاصی در تامین بهداشت و سلامت جوامع هم به لحاظ درمان و هم پیشگیری از بیماری‌ها برخوردار بوده و هستند. این بخش از منابع طبیعی قدمتی همپای بشر دارد و یکی از مهمترین منابع تامین غذایی و دارویی بشر در طول نسل‌ها بوده‌اند.

تاریخچه استفاده از گیاهان دارویی در ایران به زمان تمدن آریایی در حدود ۶۵۰۰ تا ۷۰۰۰ سال قبل از میلاد مسیح برمی‌گردد. که در آن زمان زرتشت در نوشته‌های خود به فواید گیاهان دارویی اشاره نمود. دو کشور پهناور چین و هند، هم‌چون ایران، از پیشگامان طب سنتی و داروسازی گیاهی بوده‌اند. اولین آثار کشف شده از چین در زمینه‌ی گیاهان دارویی، نوشته‌ای است به نام شینون مربوط به ۲۸۰۰ سال قبل از میلاد مسیح که در آن حدوداً ۱۰۰۰ گونه دارویی شرح داده شده است. یونان باستان نیز با وجود دانشمندان متعدد در زمینه‌ی علوم طبیعی و داروسازی از کشورهای بسیار مهم در طب سنتی است. در قرن اول میلادی در اروپا فیلسوفی یونانی به نام دیسکوردیس اولین کتاب گیاهان را تحت عنوان «*De Materica Medica*» نوشت. او در این اثر، تعداد ۶۰۰ گیاه را معرفی کرد که در بین آنها نام برخی گیاهان دارویی به چشم می‌خورد. ابوریحان بیرونی دانشمند فاخر ایرانی، اولین فارماکوپه یا فهرست داروهای طبیعی را در جهان تدوین و وضع نمود. کتاب قانون ابوعلی سینا پزشک و فیلسوف ایرانی نیز از ارزشمندترین منابع قدیمی طب سنتی است. او در این اثر ۸۱۱ داروی گیاهی و خواص مهم درمانی آنها را معرفی کرده است. از قرن شانزدهم میلادی به بعد با تولید داروهای شیمیایی و پیشرفت‌هایی در زمینه‌ی شیمی درمانی، از توجه به طب سنتی کاسته شد (قاسمی، ۱۳۸۸).

با شناخت و ظهور بیماری‌های لاعلاج، بروز عوارض جانبی ناشی از مصرف بسیاری از مواد شیمیایی، هزینه‌های سنگین جهت تهیه بعضی از مواد و غیره مجدداً گرایش به استفاده از گیاهان دارویی در دهه‌های اخیر زیاد شده است (آزادبخت، ۱۳۷۸). متأسفانه این حقیقت وجود دارد که تا کنون تحقیقات زیادی درباره‌ی داروهای گیاهی نسبت به سایر منابع دارویی انجام نشده است.

۲-۱-۳- ارزش اقتصادی گیاهان دارویی

گیاهان دارویی یکی از مهمترین منابع دارویی است که از هزاران سال پیش کاربرد داشته‌اند. سازمان بهداشت جهانی تخمین زده است که بیش از ۸۰ درصد از مردم به صورت سنتی و یا مدرن از گیاهان دارویی استفاده می‌کنند. بعلاوه بسیاری از داروهای شیمیایی با الگوبرداری از مواد گیاهی ساخته شده‌اند (Tripathi and Tripathi, 2003).

رویکرد جهانی مردم به سمت استفاده از داروهای با منشأ طبیعی و تأکید سازمان بهداشت جهانی در جایگزینی تدریجی مواد طبیعی به جای مواد شیمیایی موجب شده تا کشورهای جهان نسبت به سرمایه‌گذاری، برنامه‌ریزی کشت و تولید انبوه گیاهان دارویی در سطوح صنعتی و استفاده از آن در صنایع دارویی، بهداشتی و غذایی اقدام کنند. در حال حاضر حدود ۶۶ هزار هکتار از اراضی کشاورزی در استان‌های مختلف کشور، به کشت گیاهان دارویی اختصاص دارد. از مجموع مزارع اختصاص یافته به گیاهان دارویی، حدود ۶۵ هزار تن محصول تولید می‌شود. میزان صادرات کشور در سال ۱۳۸۶ به میزان ۶۳ میلیون دلار ثبت شده است که عمده‌ترین اقلام زیره، گشنیز و عصاره شیرین بیان بوده‌اند. این در حالی است که ارزش کل واردات گیاهان دارویی و مواد اولیه گیاهی در سال ۱۳۸۶ به میزان ۸۵ میلیون دلار می‌باشد. هم اکنون حجم تجارت جهانی گیاهان دارویی بیش از ۴۳ میلیارد دلار است و پیش‌بینی می‌شود در سال ۲۰۵۰ به ۵ تریلیارد دلار برسد. بنابراین سهم ایران در بازار جهانی گیاهان دارویی بسیار ناچیز است (سفیدکن، ۱۳۸۷).

کشور ایران با موقعیت خاص آب و هوایی، بیش از ۷۵۰۰ گونه گیاهی را در خود جای داده است که ۲ تا ۳ برابر پوشش گیاهی تمام قاره اروپاست و پیش‌بینی می‌شود که بیش از ۷۵۰ گونه دارویی در پوشش گیاهی ایران وجود داشته باشد (امیدبیگی، ۱۳۷۴). ولی این به معنای استفاده مستقیم از گیاهان طبیعت نیست. استفاده مستقیم از گیاهان طبیعت باعث نابودی منابع طبیعی مواد مؤثره دارویی خواهد شد.

بسیاری از این گیاهان، زیستگاه‌های طبیعی محدود دارند و بسته به شرایط محیطی و جغرافیایی محل رویش گیاه، جمع‌آوری آنها با مشکلاتی مواجه است. سنتز شیمیایی برخی از ترکیبات طبیعی به دست آمده از گیاهان به سادگی عملی نیست و در صورت برداشت بی رویه تدریجاً در زیستگاه طبیعی خود گیاه از بین

می‌رود، از این‌رو دانشمندان علاقمند به تولید این ترکیبات بوسیله تکنیک‌های بیوتکنولوژی هستند (Rahimi *et al.*, 2008).

به عبارت دیگر غلظت پایین این ترکیبات در گیاه، محدودیت منابع طبیعی، تخریب روزافزون جنگل‌ها، مراتع و فضای سبز، نابودی گونه‌های متنوع گیاهی و جانوری، مشکلات مرتبط با اهلی نمودن وکشت زراعی این گیاهان، توجه محققین را به استفاده از راهکارهای فناوری زیستی جهت افزایش تولید و بهره‌وری گیاهان دارویی معطوف نموده است.

۲-۱-٤- متابولیت‌های ثانویه

در حدود ۲۰۰۰ سال است که نقش مهم ترکیب‌های اولیه (کلروفیل، اسیدهای آمینه، هیدروکربن‌های ساده، لیپیدها، نوکلئوتیدها و غیره) در اعمال حیاتی گیاهان مانند تقسیم و رشد سلول، تثبیت، تمایز، تنفس، انتقال، ذخیره و تولید مثل مشخص شده است (Bourgaud *et al.*, 2001).

برای اولین بار کاسل[1] در سال ۱۸۹۱ میلادی به یک سری ترکیبات متفاوت در گیاهان پی‌برد. پس از پیشرفت فن‌آوری‌های جدید در زمینه تجزیه مواد شیمیایی، مانند روش‌های کروماتوگرافی[2]، محققان این ترکیبات آلی یا مولکول‌های درشت را که در اکثر گیاهان عالی سنتز می‌شوند، «متابولیت‌های ثانویه» نامیدند (قاسمی، ۱۳۸۸).

نقش این ترکیبات در گیاهان ناشناخته بود تا این‌که در اواخر دهه‌ی ۱۹۶۰ با پیشرفت فن‌آوری‌های جدید در زمینه‌ی کشت بافت و کشت سلول، نقش مهم ترکیب‌های ثانویه در فرآیندهای اکوفیزیولوژیکی گیاهان و اثرات متقابل بین عوامل بوم شناختی و گیاهان به اثبات رسید (Harborne, 1993).

بر اساس تخمین‌ها حداقل ۱۰۰۰۰۰ متابولیت ثانویه از ۵۰۰۰۰ گونه گیاهی شناسایی شده است و در هر سال ۴۰۰۰ متابولیت جدید از واریته‌های مختلف گیاهی کشف می‌شود (Kumar and Gupta, 2008). بیش از ۲۵ درصد داروهای موجود در جهان، حاصل از محصولات ثانویه گیاهان است (Bourgaud *et al.*, 2001).

متابولیت‌های ثانویه گستره وسیعی از ترکیبات اقتصادی نظیر استروئیدها، آلکالوئیدها، فلاونوئیدها، ساپونین‌ها، اسانس‌ها ، رزین‌ها و غیره را در بر می‌گیرند. این متابولیت‌ها کاربردهای مختلفی در صنایع گوناگون و به ویژه پزشکی دارند. تولید متابولیت ثانویه گیاهی با خصوصیات دارویی در شرایط آزمایشگاهی، فواید زیادی در مقایسه با استخراج این ترکیبات از گیاهان، تحت شرایط طبیعی دارد. کنترل دقیق پارامترهای مختلف، سبب می‌شود که کیفیت مواد حاصل درطول زمان تغییر نکند. درحالی که در

[1] Kossel
[2] Chromatography

شرایط طبیعی مرتباً تحت تأثیر شرایط آب و هوایی و آفات است. تحقیقات زیادی در زمینه‌ی استفاده از روش‌های مبتنی بر کشت بافت مثل کشت‌های سوسپانسیون و سلول گیاهی برای تولید متابولیت‌های ثانویه صورت گرفته است. از جمله ابزارهایی که برای کشت وسیع سلولهای گیاهی به کار رفته‌اند، بیوراکتور[1]ها هستند. بیوراکتورها، مهمترین ابزار در تولید تجاری متابولیت‌های ثانویه از طریق روش‌های بیوتکنولوژیک، محسوب می‌شوند (صالحی جوزانی، ۱۳۸۷).

از آنجا که عموماً تولید متابولیت‌های ثانویه در بافتهای تمایز یافته بیشتر است، تلاش‌هایی در جهت کشت ساقه و ریشه به منظور تولید ترکیبات مهم دارویی انجام گرفته است. کشت‌های اندام نسبتاً پایدارند و ترکیبات ثانویه در اندام‌های کشت شده در دوره‌های زمانی کوتاهتری نسبت به گیاه تولید می‌شوند (Subroto *et al.*, 1996).

مواردی وجود دارد که میزان متابولیت‌های موجود در سلول‌های کشت بافت شده خیلی بیشتر از میزان آن در گیاه کامل است و یا حتی سلول‌های کشت بافت شده، متابولیت‌هایی تولید می‌کنند که در گیاه اولیه تولید نمی‌شود (حسنلو و همکاران، ۱۳۸۷).

۲-۲- کشت بافت گیاهی

فناوری کشت بافت و سلول در دومین انقلاب سبز، که بر اساس تغییر ژن[2] و دستکاری ژنتیکی[3] برای بهبود کیفیت و کمیت محصولات پایه‌گذاری شد، نقش کلیدی دارد. کشت بافت و سلول گیاهی به روشی گفته می‌شود که اجزای مختلف گیاه در شرایط آزمایشگاهی و به طور کامل سترون روی یک محیط غذایی قرار گیرند و در شرایط محیطی مناسب نگهداری شوند (سید طباطبایی، ۱۳۸۸).

شوان و شلیدن نخستین کسانی بودند که در سال ۱۸۳۹ فرضیه‌ای ارائه دادند که یک سلول منفرد افزون بر توانایی رشد و قابلیت تقسیم شدن بر اساس سیستم خود تنظیمی، خاصیت توتی‌پوتنسی نیز دارد (دادز و رابرتز، ۱۳۷۱). توتی‌پوتنسی به معنای توانایی موجود زنده در ایجاد موجود کامل است. اساس تئوری کشت بافت گیاهی توسط هابرلنت فیزیولژیست آلمانی در سال ۱۹۰۲ پیشنهاد گردید (Haberlandt, 1902).

در حال حاضر تکنیک‌های کشت بافت به عنوان ابزاری قوی جهت مطالعه مشکلات اساسی و کاربردی بیولوژی گیاهی در آمده است. علاوه برآن در سالهای اخیر این تکنیک‌ها کاربردهای تجاری گسترده‌ای در

[1] Bioreactor
[2] Gene modification
[3] Genetic manipulation