(ولا یحیطون بشیءٍ من علمہٖ الّا بما شاء)

دانشکدهٔ علوم پایه

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد

رشتهٔ زیست شناسی (فیزیولوژی گیاهی)

عنوان:

تغییرات محتوای آتروپین و اسکوپولامین و بیان ژن هیوسیامین ٦- بتا هیدروکسیلاز (*h6h*) تحت تاثیر غلظت‌های مختلف منبع کربن و کروم، در گیاهچه‌های *Atropa belladonna* L.

نگارش:

بهاره وکیلی

استاد راهنما:

دکتر فرح کریمی

اساتید مشاور:

دکتر مهرداد بهمنش

دکتر مظفر شریفی

مهر ۱۳۸۹

دانشگاه شاهد

دانشکده علوم پایه

بسمه تعالی

صورتجلسه دفاع از پایان نامه تحصیلی

با تاییدات الهی و استعانت از حضرت ولیعصر "عج"

جلسه دفاعیه پایان نامه خانم **بهاره وکیلی** به شماره دانشجویی **۸۶۷۵۸۳۵۰۰** در رشته **زیست شناسی-علوم گیاهی گرایش فیزیولوژی** در مقطع **کارشناسی ارشد**

تحت عنوان:

تغییرات محتوی آتروپین و اسکوپولامین و بیان ژن هیوسیامین-۶-بتاهیدروکسیلاز تحت تاثیر غلظت های مختلف منبع کربن و کروم در گیاهچه های *Atropa belladonna*

به ارزش **۸ واحد** راس ساعت **۹/ ۳۰** روز **چهارشنبه** مورخ **۱۳۸۹/۷/۲۸** در دانشکده علوم پایه دانشگاه شاهد تشکیل گردید. هیات داوران پس از استماع دفاعیات و پرسش های لازم، نمره و درجه ایشان را به شرح زیر اعلام میدارند:

نمره پایان نامه به عدد ۱۹/۸۵ نمره پایان نامه به حرف نوزده و هشتاد و پنج صدم درجه عالی

درجه عالی۲۰-۱۸ بسیار خوب ۱۷/۹۹-۱۶ خوب ۱۵/۹۹-۱۴ قابل قبول ۱۳/۹۹-۱۲ و غیر قابل قبول کمتر از ۱۲

عنوان	نام ونام خانوادگی	مرتبه دانشگاهی	امضا
استاد راهنما مسؤل	دکتر فرح کریمی	استادیار	
استاد مشاور اول	دکتر مهرداد بهمنش	استادیار	
استاد مشاور دوم	دکتر مظفر شریفی	استادیار	
داور اول	دکتر امیر موسوی	استادیار	
داور دوم	دکتر طیبه رجبیان	استادیار	
نماینده تحصیلات تکمیلی گروه	دکتر منیژه کرمی	استادیار	
نماینده تحصیلات تکمیلی دانشکده	دکتر حمیدرضا نویدی	استادیار	

دانشگاه شاهد
تاسیس - ۱۳۷۴
آموزش دانشکده علوم پایه

اینجانب بهاره وکیلی متعهد می شوم که مطالب مندرج در این پایان نامه حاصل کار پژوهشی اینجانب تحت نظارت و راهنمایی اساتید دانشگاه شاهد بوده و به دستاوردهای دیگران که در این پژوهش از آنها استفاده شده است، مطابق مقررات و روال متعارف، ارجاع و در فهرست منابع و مآخذ ذکر گردیده است. این پایان نامه قبلاً برای احراز هیچ مدرک هم سطح یا بالاتر ارائه نگردیده است.

در صورت اثبات تخلف در هر زمان، مدرک تحصیلی صادر شده توسط دانشگاه از درجه اعتبار ساقط بوده و دانشگاه حق پیگیری قانونی خواهد داشت. کلیه نتایج و حقوق حاصل از این پایان نامه متعلق به دانشگاه شاهد می باشد.

هرگونه استفاده از نتایج علمی و عملی، واگذاری اطلاعات به دیگران یا چاپ و تکثیر، نسخه برداری، ترجمه و اقتباس از این پایان نامه بدون موافقت کتبی دانشگاه شاهد ممنوع است.

نقل مطالب با ذکر مآخذ بلامانع است.

نام و نام خانوادگی امضاء دانشجو

بهاره وکیلی

در هر حرفه‌ای که هستید نه اجازه دهید که به بدبینی‌های بی‌حاصل آلوده شوید و نه بگذارید که بعضی لحظات تاسف‌بار که برای هر ملتی پیش می‌آید شما را به یاس و ناامیدی بکشاند. در آرامش حاکم بر آزمایشگاه‌ها و کتابخانه‌هایتان زندگی کنید. نخست از خود بپرسید: " من برای یادگیری و خودآموزی چه کرده‌ام؟ " سپس همچنان که پیشتر می‌روید بپرسید: " من برای کشورم چه کرده‌ام؟ " و این پرسش را آنقدر ادامه دهید تا به این احساس شادی‌بخش و هیجان‌انگیز برسید که: " شاید سهم کوچکی در پیشرفت و اعتلای بشریت داشته‌اید. "

اما چه زندگی به تلاش‌های‌مان پاداشی بدهد و یا ندهد، هنگامی که به پایان تلاشهای‌مان نزدیک می‌شویم، هر کداممان باید حق آنرا داشته باشیم که با صدای بلند بگوییم :

"من آنچه در توان داشته‌ام انجام دادم"

لوئی پاستور

۱۸۲۲-۱۸۶۵

تقدیم به؛

پدرم، بزرگوار ستودنی

مادرم، دریای عشق و صبر

خواهرم، یگانه مهربان

پدربزرگ دوست داشتنی

و همسر عزیزم

و به؛

تمام کسانی که در راه اعتلای علم می کوشند

سپاس

(من لم یشکر المخلوق لم یشکر الخالق)

خداوندا! سپاس تو را که فرصت بخشیدی تا بیاموزم.

آموختن و دانستن حق آدمی است و کشاکش دهر، انسان را در دو راهی دریافتن و غفلت، سخت می‌آزماید و هر کس آن درمی‌یابد که ظرف وجودش گنجد.

اکنون که با الطاف و عنایت لایزال الهی، توفیق اتمام این پژوهش را یافته‌ام، بر خویش لازم می‌دانم که از تمام کسانی که به نحوی این جانب را یاری نمودند، تشکر نمایم.

ابتدا از استاد راهنمای محترم و بزرگوارم، **سرکار خانم دکتر فرح کریمی** که در هدایت این پژوهش فراتر از حد وظیفه خویش عمل کرده و راهنمایی‌های ارزنده علمی و عملی برای پیشبرد مشکلات اینجانب ارائه دادند تشکر و قدردانی نمایم.

از اساتید محترم مشاور، جناب آقای **دکتر مظفر شریفی و** جناب آقای **دکتر مهرداد بهمنش** که در مدت انجام این تحقیق افتخار شاگردیشان را داشتم و با راهنمایی‌های بی دریغشان مرا یاری دادند، بسیار سپاسگزارم.

همچنین از اساتید محترم، **سرکار خانم دکتر طیبه رجبیان** و جناب آقای **دکتر امیر موسوی** که زحمت مطالعه و داوری این پایان نامه را برعهده داشتند کمال تشکر و تقدیر را دارم.

از گروه ژنتیک و گیاهی دانشگاه تربیت مدرس، که امکان تحقیق بخش مولکولی این پژوهش را فراهم نمودند، صمیمانه قدردانی می‌نمایم.

از کمک‌های بی دریغ دوستان بسیار خوبم در آزمایشگاه ٤٠١٠ دانشگاه تربیت مدرس به ویژه خانم‌ها **فخاری، تحصیلی، مرادی، احمدیان و رئوف‌فرد** بسیار سپاسگزارم و برای همه آرزوی توفیق دارم.

از **خانوادهٔ صبور و مهربانم** که مشوقان اصلی من و همواره دعایشان بدرقه راهم بوده است، صمیمانه سپاسگزارم.

فهرست

فصل اول: مقدمه

۱-۱ تاریخچه ۲

۱-۲ مشخصات گیاه شناسی شابیزک ۳

۱-۳ کاربردهای دارویی شابیزک ۴

۱-۴ آلکالوئیدها ۵

۱-۴-۱ تروپان آلکالوئیدها ۶

۱-۴-۲ اسکوپولامین و آتروپین ۹

۱-۵ هیوسیامین 6 -ß هیدروکسیلاز (H6H) ۱۰

۱-۵-۱ بررسی‌های مولکولی انجام شده بر روی ژن *h6h* ۱۱

۱-۶ نقش محرک‌های زیستی و غیر زیستی در افزایش متابولیت‌های گیاهی ۱۳

۱-۷ مروری بر پژوهش‌های انجام شده ۱۴

۱-۸ اهداف پژوهشی ۱۷

فصل دوم: مواد و روش‌ها

۲-۱ کشت و آماده سازی نمونه‌های گیاهی ۱۹

۲-۲ انتخاب تیمارها و تاثیر آنها بر قطعات جداکشت ۲۰

۲-۳ برداشت نمونه های گیاهی ۲۱

۲-۴ استخراج آلکالوئید تام ۲۱

۲-۴-۱ سنجش آلکالوئید تام ۲۲

۲-۴-۱-۱ روش تهیه منحنی استاندارد ۲۲

۲-۴-۲ سنجش آلکالوئیدها توسط HPLC ۲۲

۲-۴-۲-۱ روش تهیه منحنی استاندارد ۲۳

۲-۵ سنجش پرولین ۲۳
الف) تهیهٔ معرف نین‌هیدرین ۲۳
ب) اندازه‌گیری پرولین در نمونه‌ها ۲۳
۲-۵-۱ روش تهیه منحنی استاندارد پرولین ۲۴
۲-۶ استخراج و اندازه گیری مقدار کمی پروتئین‌های محلول ۲۴
۲-۶-۱ روش استخراج پروتئین ۲۴
۲-۶-۱-۱ تهیهٔ محلول برادفورد ۲۵
۲-۶-۱-۲ سنجش غلظت پروتئین ۲۵
۲-۶-۱-۳ تهیه منحنی استاندارد پروتئین ۲۶
۲-۶-۲ سنجش فعالیت زیمایه کاتالاز ۲۶
۲-۶-۳ سنجش فعالیت زیمایه آسکوربات پراکسیداز ۲۷
۲-۷ سنجش کلروفیل برگ در گیاهچه‌ها ۲۷
۲-۸ بررسی‌های مولکولی ۲۸
۲-۸-۱ آب دیونیزه تیمار شده با DEPC (Diethylpyrocarbonate) مورد استفاده در استخراج RNAکل ۲۸
۲-۸-۲ محلول‌ها و بافرهای مورد نیاز در الکتروفورز ۲۸
۲-۸-۲-۱ بافر الکتروفورز TBE (۵X) ۲۸
۲-۸-۲-۲ محلول اتیدیوم برماید (۱۰mg/ml) ۲۹
۲-۸-۲-۳ بافر سنگین کننده ۲۹
۲-۸-۳ استخراج RNAکل ۲۹
۲-۸-۴ الکتروفورز ژل آگارز ۳۱
۲-۸-۵ واکنش رونویسی معکوس (RT) ۳۲
۲-۸-۶ طراحی آغازگر ۳۴
۲-۸-۷ آماده سازی آغازگرهای PCR ۳۶

۲-۸-۸ واکنش PCR ۳۶
۲-۸-۸-۱ طراحی واکنش PCR ۳۶
۲-۸-۸-۲ تعیین دمای مناسب اتصال ۳۸
۲-۸-۸-۳ بررسی و تهیهٔ عکس از ژل آگارز ۳۹
۲-۸-۹ بررسی میزان بیان ژن *h6h* به روش RT- PCR نیمه کمّی ۳۹
۲-۸-۱۰ کلونینگ توالی ORF ژن *h6h* ۴۰
۲-۸-۱۰-۱ استخراج توالی ORF از mRNA ژن *h6h* ۴۰
۲-۸-۱۰-۲ بازیابی قطعهٔ DNA خارجی (باند مربوط به *h6h*) از روی ژل آگارز با کیت Bioneer ۴۰
۲-۸-۱۰-۳ واکنش Ligation ۴۱
۲-۸-۱۰-۴ انتقال پلاسمید به باکتری‌های *Ecoli* (DH5α) ۴۳
۲-۸-۱۰-۴-۱ محیط کشت لوریا- برتنی (LB) ۴۳
۲-۸-۱۰-۴-۲ روش آماده سازی سلول‌های مستعد از باکتری های *Ecoli* (DH5α) ۴۴
۲-۸-۱۰-۴-۳ انتقال پلاسمید به سلول‌های مستعد ۴۵
۲-۸-۱۰-۵ Clony PCR ۴۵
۲-۸-۱۰-۶ هضم آنزیمی (Digestion) ۴۶
۲-۸-۱۰-۷ استخراج پلاسمید ۴۷
۲-۹ تجزیه و تحلیل آماری ۴۸

فصل سوم: نتایج

۳-۱ تاثیر تیمارها بر بعضی پارامترهای رشد گیاهچه‌ها ۵۰
۳-۱-۱ تاثیر تیمار کروم بر رشد گیاهچه‌ها ۵۰
۳-۱-۲ تاثیر کربوهیدرات ها بر رشد گیاهچه‌ها ۵۱
۳-۱-۲-۱ تیمار سوکروز ۵۱
۳-۱-۲-۲ تیمار سوربیتول ۵۲
۳-۱-۲-۳ تیمار مانیتول ۵۲

۳-۱-۳ مقایسه تاثیر تیمارها بر رشد گیاهچه‌ها ۵۲
۳-۲ تاثیر تیمارها بر محتوای کلروفیل a و b در گیاهچه‌ها ۵۴
۳-۳ محتوای آلکالوئید تام در اندام هوایی و ریشه گیاهچه‌ها در تیمارهای مختلف ۵۷
۳-۳-۱ تیمار کروم ۵۷
۳-۳-۲ تاثیر کربوهیدرات‌ها ۵۸
۳-۳-۲-۱ تیمار سوکروز ۵۸
۳-۳-۲-۲ تیمار سوربیتول ۵۹
۳-۳-۲-۳ تیمار مانیتول ۵۹
۳-۴ محتوای آتروپین و اسکوپولامین در اندام هوایی و ریشه گیاهچه‌ها در تیمارهای مختلف ۶۱
۳-۴-۱ تیمار کروم ۶۲
۳-۴-۲ تاثیر کربوهیدرات‌ها ۶۳
۳-۴-۲-۱ تیمار سوکروز ۶۳
۳-۴-۲-۲ تیمار سوربیتول ۶۴
۳-۴-۲-۳ تیمار مانیتول ۶۵
۳-۵ مقایسه روند تغییرات آلکالوئید تام، هیوسیامین و اسکوپولامین در تیمارها ۶۸
۳-۶ بررسی غلظت پرولین ۷۰
۳-۶-۱ تیمار کروم ۷۰
۳-۶-۲ تیمار سوکروز ۷۰
۳-۶-۳ تیمار سوربیتول ۷۱
۳-۶-۴ تیمار مانیتول ۷۱
۳-۶-۵ مقایسه محتوای پرولین در تیمارها ۷۱
۳-۷ بررسی محتوای پروتئین تام تحت تاثیر تیمارها ۷۳
۳-۷-۱ تیمار کروم ۷۳
۳-۷-۲ تیمار سوکروز ۷۴

۳-۷-۳ تیمار سوربیتول ۷۴
۳-۷-۴ تیمار مانیتول ۷۴
۳-۷-۵ مقایسه محتوای پروتئین تام در تیمارها ۷۴
۳-۸ فعالیت زیمایهٔ کاتالاز تحت تاثیر تیمارها ۷۶
۳-۸-۱ تیمار کروم ۷۶
۳-۸-۲ تیمار سوکروز ۷۷
۳-۸-۳ تیمار سوربیتول ۷۷
۳-۸-۴ تیمار مانیتول ۷۷
۳-۸-۵ مقایسه فعایت زیمایه کاتالاز در تیمارها ۷۸
۳-۹ فعالیت زیمایهٔ آسکوربات پراکسیداز ۷۹
۳-۹-۱ تیمار کروم ۷۹
۳-۹-۲ تیمار سوکروز ۷۹
۳-۹-۳ تیمار سوربیتول ۸۰
۳-۹-۴ تیمار مانیتول ۸۰
۳-۹-۵ مقایسه فعایت زیمایه آسکوربات پراکسیداز در تیمارها ۸۰
۳-۱۰ بررسی‌های مولکولی ۸۲
۳-۱۰-۱ استخراج RNA کل ۸۲
۳-۱۰-۲ تعیین دمای مناسب اتصال برای ژن *h6h* و سنتز cDND از برگ و ریشه گیاه شابیزک ۸۳
۳-۱۰-۳ بررسی میزان بیان ژن *h6h* به روش RT- PCR نیمه‌کمّی در اندام هوایی و ریشه گیاهچه‌های شابیزک. ۸۵
۳-۱۰-۳-۱ تیمار کروم ۸۵
۳-۱۰-۳-۲ تاثیرکربوهیدرات ها (سوربیتول، مانیتول و سوکروز) ۸۷
۳-۱۰-۴ مقایسهٔ بیان ژن *h6h* در تیمارها ۸۹
۳-۱۰-۵ مقایسهٔ روند تغییرات میزان بیان ژن *h6h* و ارتباط آن با محتوای اسکوپولامین نهایی در تیمارهای مختلف ۸۹
۳-۹-۶ همسانه سازی توالی ORF ژن *h6h* ۹۱

۳-۹ جمع‌بندی نهایی نتایج ۹۵

فصل چهارم: بحث در نتایج

۴-۱ تاثیر تیمارها بر بعضی پارامترهای رشد گیاهچه‌ها ۹۷
۴-۱-۱ تاثیر کروم ۹۷
۴-۱-۲ تاثیر کربوهیدرات ها (سوکروز، سوربیتول و مانیتول) ۹۸
۴-۲ مقایسه آلکالوئیدهای تولید شده تحت تاثیر تیمارهای مختلف ۱۰۰
۴-۲-۱ تیمار کروم ۱۰۰
۴-۲-۲ تاثیر کربوهیدرات‌ها (سوربیتول، مانیتول و سوکروز) ۱۰۱
۴-۳ بررسی محتوای پرولین در تیمارها ۱۰۲
۴-۴ تاثیر تیمارها بر پروتئین های تام محلول ۱۰۳
۴-۵ تاثیر تیمارها بر فعالیت زیمایهٔ کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز ۱۰۴
۴-۶ تاثیر تیمارها بر بیان ژن *h6h* ۱۰۵
پیشنهادها ۱۰۸
منابع ۱۰۹

فهرست اشکال

شکل ۱-۱: ساختار ظاهری بخش‌های مختلف گیاه *A. belladonna* الف) برگ ب) گل ج) میوه د) دانه ۳
شکل ۱-۲: مسیر بیوسنتز تروپان آلکالوئیدها ۸
شکل ۱-۳: مسیر فعالیت هیوسیامین ۶- βهیدروکسیلاز(*h6h*) ۱۰
شکل ۲-۱: نقشهٔ وکتور همسانه سازی pTZ57R/T ۴۲
شکل ۳-۱: مقایسه میانگین طول اندام هوایی و ریشه گیاهچه های شابیزک تحت تاثیر غلظت های مختلف کروم ۵۰
شکل ۳-۲: مقایسه میانگین وزن تر اندام هوایی و ریشه گیاهچه های شابیزک تحت تاثیر غلظت های مختلف کروم ۵۱
شکل ۳-۳: مقایسه میانگین طول اندام هوایی و ریشه گیاهچه های شابیزک تحت تاثیر غلظت های مختلف سوکروز، سوربیتول و مانیتول ۵۳
شکل ۳-۴: مقایسه میانگین وزن تر اندام هوایی و ریشه گیاهچه های شابیزک تحت تاثیرغلظت های مختلف سوکروز، سوربیتول و مانیتول ۵۳
شکل ۳-۵: مقایسه محتوای کلروفیل a و b تحت تاثیر تیمارهای کروم، سوکروز، سوربیتول و مانیتول ۵۵
شکل ۳-۶: مقایسه نسبت کلروفیل a به b تحت تاثیر تیمارهای کروم، سوکروز، سوربیتول و مانیتول ۵۵
شکل ۳-۸: مقایسه محتوای آلکالوئید تام در اندام هوایی و ریشه گیاهچه های شابیزک تحت تاثیر تیمار کروم ۵۸
شکل ۳-۹: مقایسه محتوای آلکالوئید تام در اندام هوایی گیاهچه های شابیزک تحت تاثیر غلظت های مختلف سوکروز، سوربیتول و مانیتول ۶۰
شکل ۳-۱۰: مقایسه محتوای آلکالوئید تام در ریشه گیاهچه های شابیزک تحت تاثیر غلظت های مختلف سوکروز، سوربیتول و مانیتول ۶۰
شکل ۳-۱۱: کروماتوگرام HPLC استانداردهای آتروپین و اسکوپولامین ۶۱
شکل ۳-۱۴: مقایسه اندام های مختلف از نظر محتوای هیوسیامین و اسکوپولامین در گیاهچه های شابیزک تحت تاثیر تیمار کروم ۶۳
شکل ۳-۱۵: مقایسه محتوای هیوسیامین و اسکوپولامین در اندام هوایی گیاهچه های شابیزک تحت تاثیر تیمار سوکروز، سوربیتول و مانیتول ۶۶
شکل ۳-۱۶: مقایسه محتوای هیوسیامین و اسکوپولامین در ریشه گیاهچه های شابیزک تحت تاثیر تیمار سوکروز، سوربیتول و مانیتول ۶۶
شکل ۳ -۱۷ مقایسهٔ روند تغییرات آلکالوئید تام، هیوسیامین و اسکوپولامین در اندام هوایی و ریشه گیاه شابیزک تحت تیمار کروم ۶۳
شکل۳ -۱۸ مقایسهٔ روند تغییرات آلکالوئید تام، هیوسیامین و اسکوپولامین در اندام هوایی گیاهچه شابیزک تحت تیمار کروم، سوکروز، سوربیتول و مانیتول ۶۹
شکل ۳-۱۹ مقایسهٔ روند تغییرات آلکالوئید تام، هیوسیامین و اسکوپولامین در اندام هوایی گیاهچه شابیزک تحت تیمار کروم، سوکروز، سوربیتول و مانیتول ۶۹
شکل ۳-۲۱: مقایسه محتوای پرولین دراندام هوایی گیاهچه های شابیزک تحت تاثیر تیمارهای کروم، سوربیتول، ۷۲
شکل ۳-۲۲: مقایسه محتوای پرولین در ریشه گیاهچه های شابیزک تحت تاثیر تیمارهای کروم، سوربیتول، مانیتول و سوکروز. ۷۳
شکل ۳-۲۴: مقایسه محتوای پروتئین محلول تام در اندام هوایی گیاهچه های شابیزک تحت تاثیر تیمارهای کروم، سوربیتول، مانیتول و سوکروز ۷۵

شکل ۳-۲۵: مقایسه محتوای پروتئین محلول تام در ریشه گیاهچه های شابیزک تحت تاثیر تیمارهای کروم، سوربیتول، مانیتول و سوکروز ۷۶
شکل ۳-۲۶: مقایسه فعالیت زیمایهٔ کاتالاز در اندام هوایی گیاهچه های شابیزک تحت تاثیر تیمارهای کروم، سوربیتول، مانیتول و سوکروز ۷۸
شکل ۳-۲۷: مقایسه فعالیت زیمایهٔ کاتالاز در ریشه گیاهچه های شابیزک تحت تاثیر تیمارهای کروم، سوربیتول، مانیتول و سوکروز ۷۹
شکل ۳-۲۸: مقایسه فعالیت زیمایهٔ آسکوربات پراکسیداز در اندام هوایی گیاهچه های شابیزک تحت تاثیر تیمارهای کروم، سوربیتول، مانیتول و سوکروز ۸۱
شکل ۳-۲۹: مقایسه فعالیت زیمایهٔ آسکوربات پراکسیداز در ریشه گیاهچه های شابیزک تحت تاثیر تیمارهای کروم، سوربیتول، مانیتول و سوکروز ۸۱
شکل۳-۳۰: تست کیفیت RNA با استفاده ازالکتروفورز ۸۲
شکل۳-۳۱: طرح الکتروفورزی تعیین دمای مناسب اتصال پرایمر*h6h*(partial) ۸۳
شکل۳-۳۲: طرح الکتروفورزی تعیین دمای مناسب اتصال ژن توبولین ۸۴
شکل۳-۳۳: هم غلظت سازی cDNA برای کار به روش RT-PCR با استفاده از PCR با پرایمرهای توبولین ۸۴
شکل ۳-۳۴: بررسی بیان ژن در اندام هوایی گیاه شابیزک در تیمارکروم ۷۹
شکل ۳-۳۵: بررسی بیان ژن در ریشه گیاه شابیزک در تیمار کروم ۸۰
شکل ۳-۳۶: بررسی بیان ژن در اندام هوایی گیاه شابیزک در تیمار سوکروز، سوربیتول و مانیتول ۸۸
شکل ۳-۳۷: بررسی بیان ژن درریشه گیاه شابیزک در تیمار سوکروز، سوربیتول و مانیتول ۸۸
شکل ۳-۳۸ مقایسهٔ روند تغییرات میزان بیان ژن *h6h* و ارتباط آن با مقدار اسکوپولامین نهایی ۹۰
شکل۳-۳۹: طرح الکتروفورزی تعیین دمای مناسب اتصال توالی ORF ژن *h6h* ۹۲
شکل ۳-۴۰: مراحل انجام همسانه سازی قطعهٔ حاصل از PCR برای ORF ژن *h6h* ۹۲
شکل ۳-۴۱: نتایج Blast و همردیفی قطعهٔ *h6h* از گیاه شابیزک ۹۴

فهرست جداول و نمودارها

جدول ۲-۱ : محلول مادری برای تهیه محیط کشت ۱۹
جدول ۲-۲ تهیه بافر TBE (X 5) ۲۸
جدول ۲-۳ تهیه بافر سنگین کننده (Stock Solution) ۲۹
جدول ۲-۴ طریقهٔ آماده سازی محلولها برای ساخت cDNA ۳۳
جدول ۲-۵ توالی نوکلئوتیدی آغازگرهای به‌کار رفته در مراحل RT-PCR و همسانه‌سازی ژن ۳۴
جدول ۲-۶طریقهٔ آماده سازی محلولها برای واکنش PCR ۳۷
جدول ۲-۷ شرایط واکنش PCR ۳۸
جدول ۲- ۸ مواد مورد نیاز در واکنش Ligation ۴۲
جدول ۲-۹ محیط کشت LB ۴۳
جدول ۲- ۱۰ مواد مورد نیاز در واکنش هضم ۴۶
جدول۳-۱ تجزیه واریانس میانگین مربعات پارامترهای رشد شابیزک تحت تیمارهای کروم، سوکروز، سوربیتول و مانیتول ۵۶
جدول۳-۲: تجزیه واریانس میانگین مربعات محتوای آلکالوئید تام، هیوسیامین و اسکوپولامین در گیاهچه شابیزک تحت تیمارهای کروم، سوکروز، سوربیتول و مانیتول ۶۷

نمودار استاندارد آلکالوئید تام (آتروپین سولفات) ۵۷
نمودار استاندارد اسکوپولامین ۶۱
نمودار استاندارد آتروپین ۶۲
نمودار استاندارد پرولین ۷۲
نمودار استاندارد برادفورد ۷۵

چکیده

شابیزک یا بلادن (*Atropa belladonna* L.) گیاهی است علفی، چند ساله، از تیرهٔ سیب‌زمینی (Solanaceae)، که در گذشته به عنوان یکی از مهمترین گیاهان دارویی در درمان بیماری‌های مختلف نظیر دردهای حاد گوارشی و ریوی، سیاه سرفه و اخیر در درمان پارکینسون مورد استفاده قرار گرفته است. خاصیت دارویی این گیاه به حضور دو تروپان‌آلکالوئید آتروپین و اسکوپولامین در آن مربوط می‌شود. مسیر بیوسنتز آلکالوئیدهای گروه تروپان از متابولیسم پلی‌آمین‌ها مشتق می‌شود. انتهای این مسیر بیوسنتزی، توسط زیمایهٔ هیوسیامین 6-ß هیدروکسیلاز (H6H) هدایت می‌شود که یک زیمایهٔ کلیدی در تولید اسکوپولامین است و با انجام دو اکسیداسیون پشت سر هم سبب تبدیل آتروپین به اسکوپولامین می‌شود. عموماً آتروپین آلکالوئید اصلی در اغلب گیاهان تیرهٔ سیب‌زمینی مانند شابیزک است، در حالیکه اسکوپولامین فقط در میزان خیلی کم تولید می‌شود. در این تحقیق اثر کروم و کربوهیدرات‌های سوربیتول، مانیتول و سوکروز بر مقدار تروپان‌آلکالوئیدهای آتروپین و اسکوپولامین و بیان ژن *h6h* در گیاهچه شابیزک مورد بررسی قرار گرفت، همچنین تکثیر ORF از mRNA ژن *h6h* انجام شد. از طرفی، با توجه به تنش اسمزی اعمال شده، اثر این تیمارها بر محتوای پرولین و فعالیت زیمایه‌های آنتی‌اکسیدانت (کاتالاز و آسکوربات‌پراکسیداز) نیز سنجیده شد. بیان ژن *h6h* به روش RT-PCR نیمه‌کمّی ، محتوای آتروپین و اسکوپولامین از طریق HPLC و محتوای پرولین و فعالیت زیمایه‌های آنتی‌اکسیدانت به‌وسیله اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. بیشترین محتوای اسکوپولامین و بیشترین میزان بیان ژن *h6h* در ریشه گیاهچه‌های تیمار یافته با ۱۵۰ میلی‌مولار سوکروز مشاهده شد و این تشابه روند افزایشی، ارتباط مستقیم بین این دو فاکتور (بیان ژن *h6h* و مقدار اسکوپولامین) را نشان داد. همچنین تیمارهای اعمال شده در این پژوهش محتوای پرولین را افزایش و فعالیت زیمایه‌های کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز را کاهش دادند که بیشترین محتوای پرولین و کم‌ترین فعالیت زیمایه‌های آنتی‌اکسیدانت در گیاهچه‌های تحت تیمار سوربیتول و مانیتول مشاهده گردید که بیانگر تنش اسمزی اعمال شده توسط این تیمارها در محیط کشت بود.

کلمات کلیدی: آتروپین، اسکوپولامین، شابیزک (*Atropa belladonna* L.)، هیوسیامین -6-ß هیدروکسیلاز (*h6h*)

فصل اول

مقدمه

۱-۱ تاریخچه

شابیزک (*Atropa belladonna* L.) یکی از مهم‌ترین گیاهان دارویی است که به واسطه وجود آلکالوئیدهای ارزشمند، دربرگ‌ها، ریشه و گاهی بذرها، از قدیم‌الایام در طب سنتی و پزشکی مورد استفاده قرار می‌گرفته است. این گیاه سمّی‌ترین گیاه موجود در نیم‌کرهٔ غربی است. مادهٔ سمّی آن (آتروپین) در ریشه‌های ضخیم جمع می‌شود و در میان تمام ملل در مورد ریشهٔ آن افسانه‌هائی شایع است.

" آتروپا" از کلمه یونانی " آتروپوس" مشتق شده و در افسانه‌های یونان باستان "آتروپوس " نام یکی از سه خدای زن است که مسئول گرفتن جان انسان‌ها بوده است. پس قسمت اوّل نام این گیاه، حاکی ازسمّی و کشنده بودن آن است (Hoffman and Schuttes. 1987).

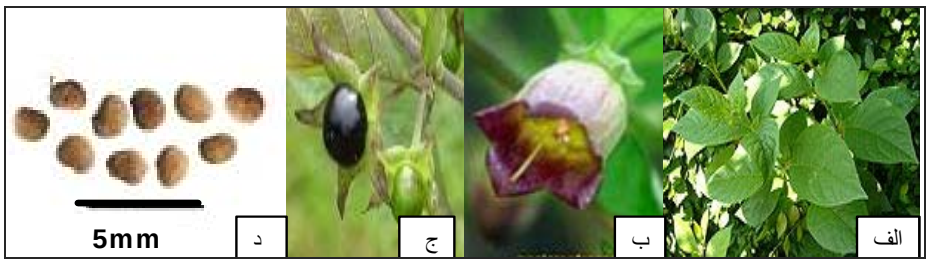
"بلادونا" در زبان ایتالیایی به معنای زن زیباچهره است. در گذشته، زنان ایتالیایی از عصاره میوه این گیاه به عنوان مادّه‌ای آرایشی استفاده می‌کردند (امید بیگی، ۱۳۷۴).

ملکه کلئوپاترا و رومی‌های باستان شیره میوه شابیزک را برای گشاد نمودن مردمک چشم به‌کار می‌بردند و از همان زمان نام بلادونا یعنی بانوی زیبا به این گیاه داده شد (زمان، ۱۳۷۰). خواص دارویی شابیزک به دلیل حضور دو تروپان آلکالوئید مهم به‌نام‌های اسکوپولامین و آتروپین در این گیاه است. تروپان آلکالوئیدهای آتروپین و اسکوپولامین به طور عمده در پزشکی به‌دلیل فعالیت آنتی‌کولینرژیک استفاده می‌شوند (Hashimoto et al. 1993a).

امروزه، پیشرفت‌های اخیر در زیست فناوری گیاهی و فناوری‌های مهندسی ژنتیک، ابزاری جدید برای تولید تجاری این ترکیبات داروئی گیاهی فراهم کرده است. در بخش‌های بعدی، ضمن معرفی گیاه شابیزک و مسیرهای متابولیسمی که منجر به تولید ترکیبات دارویی موثره آن می‌شوند، پیشینه تحقیقات انجام شده و همچنین لزوم بررسی‌های مولکولی در رابطه با مسیرهای بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه شابیزک مطرح می‌گردد.

۱-۲ مشخصات گیاه شناسی شابیزک

شابیزک یا بلادن (*Atropa belladonna* L.) گیاهی از جنس شابیزک‌ها (*Atropa*)، تیرهٔ سیب‌زمینی‌سانان (Solanaceae)، از راستهٔ تاج‌ریزی‌ها (Solanale) است که علفی، چند ساله، با ریشه‌هایی مخروطی و ضخیم، ساقه‌ای مستقیم، پرشاخه و برگ‌های متناوب و بیضی شکل است (امید بیگی، ۱۳۷۴). گل‌ها روی ساقه‌ای کوچک که از زاویه برگ‌ها منشعب شده است، قرار می‌گیرند و به رنگ زرد تیره یا آبی هستند که پس از تلقیح تبدیل به میوه‌های سیاه رنگی می‌شوند. داخل هر میوه تعداد فراوانی بذر وجود دارد (شکل ۱-۱). زمان گل‌دهی این گیاه بهار و زمان میوه‌دهی آن تابستان و اوایل پاییزاست (زرگری، ۱۳۷۵). این گیاه در مناطق جنگلی ، مرطوب و دارای آب فراوان از جمله در شمال و جنوب اروپا، شمال آمریکا، شمال آسیا و شمال آفریقا می‌روید و در هوای خشک به کندی رشد می‌کند و عملکرد آن به شدت کاهش می‌یابد. مقدار کلّی آلکالوئید در پیکر این گیاه، بین ۰/۲ تا ۰/۸ درصد است. گرما و نور فراوان باعث افزایش آلکالوئیدهای آن می‌شود و نور یکی از عوامل موثر بر پراکنش این گیاه است (کریمی و همکاران، ۱۳۸۳).



شکل ۱-۱: ساختار ظاهری بخش‌های مختلف گیاه *A. belladonna* الف) برگ ب) گل ج) میوه د) دانه (Genova et al. 1997)

رویش دانه‌های شابیزک، به علت ماهیت خیلی ضخیم ، چوبی و موجی بودن پوسته آن، که همراه با غشائی داخلی جنین را احاطه می‌کند، ضعیف و نامنظم است (Genova et al. 1997 و امیرجانی، ۱۳۷۲). ایجاد شوک سرمایی