بسم الله الرحمن الرحيم

کلیه امتیازهای این پایان‌نامه به دانشگاه بوعلی سینا تعلق دارد. در صورت استفاده از تمام یا بخشی از مطالب این پایان‌نامه در مجلات، کنفرانس‌ها و یا سخنرانی‌ها، باید نام دانشگاه بوعلی سینا یا استاد راهنمای پایان‌نامه و نام دانشجو با ذکر مأخذ و کسب مجوز کتبی از دفتر تحصیلات تکمیلی دانشگاه ثبت شود. در غیر این صورت مورد پیگرد قانونی قرار خواهد گرفت. درج آدرس‌های ذیل در کلیه مقالات خارجی و داخلی مستخرج از تمام یا بخشی از مطالب این پایان‌نامه در مجلات، کنفرانس‌ها و یا سخنرانی‌ها الزامی می‌باشد.

مقالات خارجی

……..……, **Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran.**

مقالات داخلی

…. ……. ……., **گروه** ……., **دانشکده** ……., **دانشگاه بوعلی سینا، همدان**

دانشکده کشاورزی
گروه بیوتکنولوژی

پایان نامه:
برای دریافت درجه کارشناسی ارشد در رشته بیوتکنولوژی کشاورزی

عنوان:

القاء ریشه‌های موئین و تولید متابولیت ثانویه دوپامین در گیاه خرفه (*Portulaca oleracea* L.) با استفاده از تکنیک آگروباکتریوم رایزوژنز

استاد راهنما

دکتر خسرو پیری

استاد مشاور

دکتر بهمن بهرام نژاد

پژوهشگر:

یاسر احمدی مقدم

۱۸ اسفند ۱۳۸۹

تقدیم به همه کسانی که دوستشان دارم

به نام خدا

ای هستی بخش، وجود مرا بر نعمات بی کرانت توان شکر نیست. ذره ذره وجودم برای تو و نزدیک شدن به تو می تپد.

اکنون که به لطف حضرت حق، توفیق انجام این رساله نصیبم شده، بر خود لازم میدانم از همهٔ عزیزانی که به نوعی در انجام این رساله بر من منت نهاده و از کمک، مضایقه نکردند، تشکر و سپاسگزاری نمایم.

از استاد راهنمای محترم خود جناب آقای دکتر پیری که در تمام مراحل و بخش های مختلف رساله، با پیگیری و درایت بی نظیرشان، هدایت و پیشبرد امر را بر عهده داشته اند و با صبر بی شائبه خود الگوی اخلاقی بنده در تمام مراحل زندگی ام خواهند بود؛ نهایت سپاس را دارم. و برایشان از خداوند منان آرزوی توفیق روز افزون را خواستارم.

از استاد ارجمند جناب آقای دکتر بهمن بهرام نژاد که زحمت مشاوره پایان نامه را بر عهده داشتند و با همکاری صادقانه و نظرات سازنده خویش، باعث غنی تر شدن هرچه بیشتر پژوهش حاضر گردیدند، تشکر و قدردانی می کنم.

از جناب آقای دکتر علی دیجو و سرکار خانم دکتر سنبل ناظری که افتخار شاگردیشان را در طول دوران تحصیل داشتم، تشکر و قدردانی می کنم.

از همه معلمان و اساتید دوران تحصیلم، که افتخار حضور در محضرشان را داشتم بویژه جناب آقای مصطفی اکرمی بسیار ممنون و قدردانم.

از سرکار خانم استاد احمدی مسئول آزمایشگاه بیوتکنولوژی و سرکار خانم قیاسوند مسئول آزمایشگاه ژنتیک سلولی دانشگاه علوم پزشکی همدان به خاطر کمک ها و همکاری های بدریغ شان، تشکر و قدردانی می کنم.

در پایان از همکلاسی های خوبم و بچه های ورودی ۸۸ که در طول دوران کارشناسی ارشد یاری گر بنده بودند، بسیار سپاسگذارم.

در نهایت سعادت و موفقیت روز افزون این عزیزان را از خداوند متعال خواهانم.

فهرست مطالب **صفحه**

مقدمه ۱

۱- بررسی منابع ٤

۱-۱- گیاهان دارویی ٤

۱-۱-۱- مقدمه ٤

۱-۱-۲- تاریخچه : ٤

۱ -۱-۳- تعریف گیاهان داروئی ٦

۱-۱-٤- اهمیت گیاهان دارویی ٦

۱-۱-۵- اهمیت اقتصادی گیاهان دارویی ۷

۱-۲- متابولیت های ثانویه گیاهی (مواد موثره گیاهی) ۸

۱-۲-۱-نقش متابولیت‌های ثانویه در گیاه ۹

۱-۲-۲-اهمیت پزشکی و دارویی متابولیت‌های ثانویه ۹

۱-۲-۳-تاثیر عوامل اکولوژیک بر میزان و نوع مواد موءثره گیاهی ۱۰

۱-۲-٤- طبقه بندی متابولیت های ثانویه ۱۲

الف- آلکالوئیدها ۱۲

ب- ترکیبات فنولیک ۱۳

پ- ترپنوئیدها ۱۳

ت- گلیکوزیدها ۱۳

۱-۲-۵-مسیرهای عمومی سنتز متابولیت‌های ثانویه: ۱٤

۱-۳- بیوتکنولوژی و تولید متابولیت های ثانویه گیاهی ۱۴

۱-۳-۱- استفاده از علم بیوتکنولوژی در راستای تولید متابولیت های ثانویه با خواص دارویی ۱۵

۱-۳-۲- کشت بافت ۱۵

الف- ریز ازدیادی ۱۵

ب- کشت سلول گیاهی ۱٦

پ- کشت اندام ۱۶

۱-۴-ریشه‌های مویین در گیاهان: ۱۸

۱-٤-۱- تراریختی سلول گیاهی به وسیله آگروباکتریوم ۱۸

۱-٤-۱- تراریختی سلول گیاهی به وسیله آگروباکتریوم ۱۸

الف-طبقه بندی آگروباکتریوم ها ۱۹

۱-٤-۲- معرفی آگروباکتریوم رایزوژنز و ساختار اولیه پلاسمید Ri ۱۹
۱-٤-۳- نژادهای آگروباکتریوم رایزوژنز ۲۱
۱-۴-۴- بررسی مکانیسم مولکولی و عوامل موثر در انتقال DNA از آگروباکتریوم به سلول گیاه ۲۱
الف- حرکت آگروباکترویوم به سمت بافت زخمی گیاه ۲۲
ب - القاء اپران های بیماریزایی آگروباکتریوم ۲۲
پ - فرآیند ایجاد مولکول T-DNA تک رشته ایی برای انتقال ۲۳
ت- ماکرومولکول‌هایی که از آگروباکتریوم به سلول گیاه منتقل می شوند ۲۳
ث- وارد شدن ماکرومولکول های بیماریزا به هسته سلول گیاه ۲۵
ج - ادغام شدن مولکول T-strand به داخل ژنوم گیاه ۲۵
۱-۴-۵- ویژگی‌ها و کاربردهای ریشه‌های مویین: ۲٦
۱-۴-۶- تولید متابولیت‌های ثانویه با استفاده از ریشه‌های مویین: ۲۷
۱- ٤-۷-افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه از کشت ریشه‌های مویین: ۲۷
۱-٤-۸-امکان تولید متابولیت‌های جدید در کشت ریشه‌های مویین: ۲۸
۱-۵-استراتژی‌های افزایش متابولیت‌های ثانویه در ریشه‌های مویین ۲۹
۱-۵-۱- دستورزی مواد غذایی محیط کشت ۲۹
۱-۵-۲-آزمایش و انتخاب لاین‌های ریشه مویین با تولید بالا ۳۱
۱-۵-۳-مهندسی متابولیت ۳۱
۱-۵-٤-استفاده از محرک‌ها ۳۱
۱-۶- گیاه مورد مطالعه: خرفه ۳۱
الف-گیاه شناسی ۳۲
ب-خواص درمانی گیاه: ۳۳
ج- ترکیبات شیمیایی: ۳۳
۱-۷- کاته‌کولامین‌ها ۳٤
۱-۷-۱- عملکرد در گیاهان ۳۵
۲- مواد و روش‌ها ۳۷
۲-۱- مواد گیاهی ۳۷
۲-۱-۱- بذر ۳۷
۲-۱-۲- استرین باکتری مورد استفاده : ۳۷

۲-۲- محیط کشت های مورد استفاده ۳۷
۲-۲-۱- محیط کشت گیاهی و طرز تهیه آنها ۳۷
۲-۲-۲- محیط کشت باکتری و طرز تهیه آن ۳۸
۲-۳ – بررسی جوانه‌زنی در گیاه خرفه ۳۹
۲-۳-۱– ضد عفونی سطحی بذور خرفه ۳۹
۲-۳-۲- مشاهدات ماکروسکوپی ۳۹
۲-۴- القاء ریشه‌های موئین به وسیله *A. rhizogenes* در گیاه خرفه ۳۹
۲-٤-۱- آماده سازی نژاد باکتری برای آلودگی ۳۹
۲-٤-۲- نگهداری باکتری برای مدت طولانی ٤۰
۲-٤-۳- طریقه آلوده کردن ریزنمونه ها ٤۰
۲-٤-٤-انتقال ریز نمونه‌ها به محیط کشت دارای آنتی‌بیوتیک ٤۲
۲-٤-٥- کشت ریشه های موئین در محیط مایع و جامد ٤۲
۲-٤-٦- مشاهدات ماکروسکوپی ٤۲
۲-٤-۷- نحوه اطمینان از حذف کامل باکتری ٤۲
۲-٤-۸- عوامل مورد بررسی در افزایش تراریختی ٤۳
۲-٥- بررسی وجود ژن rol B موجود بر T_L- DNA پلاسمید Ri، در ریشه‌های موئین خرفه ۴۲
۲-٥-۱- استخراج DAN از ریشه‌ها و انجام PCR ٤۳
۲-٥-۲- الکتروفورز DNA استخراج شده از گیاه خرفه ٤٤
۲-٥-۳- استخراج پلاسمید از باکتری ٤٤
۲-٥-٤- تعیین کمیت و کیفیت DNA ۴۶
۲-۶- آزمون PCR برای تایید تراریختی ریشه‌های موئین گیاه خرفه ۴۶
۲-٦-۱- مواد مورد نیاز برای واکنش زنجیرهایی پلی مراز ٤۷
۲-٦-۲- طریقه انجام و بهینه سازی PCR ٤۷
۲-٦-۲- الکتروفورز محصولات PCR ٤۸
۲-۷- بهینه سازی محیط کشت برای رشد ریشه های موئین گیاه خرفه ۴۹
۲-۷-۱ تعیین بهترین لاین از نظر میزان رشد، زی‌توده و محتوای دوپامین در ریشه‌های موئین ٤۹
۲-۸- استفاده از محرک‌ها در گیاه خرفه ۵۱
۲-۸-۱- مشخصات محرک‌ها و نوع طرح‌ها ۵۰

۲-۸-۲- نحوه استفاده محرک‌ها ۵۰
الف- متیل جازمونات ۵۰
ب- اسید سالسیلیک ۵۰
۲-۹- تعیین میزان مواد موثره با استفاده از دستگاه HPLC در ریشه‌های موئین گیاه خرفه ۵۱
۲-۹-۱- روش خشک کردن نمونه‌ها ۵۱
۲-۸-۲- عصاره گیری از ریشه‌های موئین ۵۱
۲-۸-۳- اندازه گیری دوپامین ۵۲
۲-۸-٤- تزریق نمونه‌ها به ستون HPLC ۵۲
۳ - نتایج ۵۴
۳-۱-بررسی زمان و درصد جوانه زنی در گیاه خرفه ۵۴
۳-۲-بررسی القاءریشه‌های موئین در گیاه خرفه ۵۴
۳-۲-۱- نتایج بهینه سازی شرایط القاء ریشه موئین ۵۵
الف- سن گیاهچه و نوع ریزنمونه ۵۵
پ- مدت زمان آلودگی ۵۷
ت- مدت هم‌کشتی ۵۷
۳-۲-۲- مقایسه محیط کشت‌های مختلف از نظر میزان رشد لاین‌ها ۵۸
۳-۳- بررسی و تایید ریشه‌های مویئن به روش مولکولی ۵۹
۳-۴- ارزیابی و مقایسه میزان رشد، زی‌توده نهایی هر لاین و بررسی محتوای دوپامین در لاین‌های مختلف ۶۰
الف – مقایسه میزان رشد، زی‌توده نهایی لاین‌ها ۶۰
ب- بررسی و مقایسه میزان تولید دوپامین در ریشه طبیعی و ریشه موئین ۶۱
۳-۵-بررسی اثر محرک‌ها بر روی مقدار دوپامین درریشه‌ها ٦٤
الف- متیل جازمونات ۶۳
ب- اسید سالسیلیک ۶۴
۴- بحث ۶۶
۴-۱- مطالعه و بررسی جوانه‌زنی ۶۶
۴-۲- مطالعه و ارزیابی ایجاد ریشه موئین ۶۶
۴-۳- بررسی و ارزیابی عوامل مورد استفاده برای بهینه‌سازی افزایش فراوانی تراریختی ۶۷
۴-۴- ارزیابی تایید مولکولی ریشه های موئین ۶۹

۴-۵- بررسی و مطالعه ریشه‌های طبیعی و لاین های مختلف ریشه‌های موئین گیاه خرفه از نظر میزان رشد، زی‌توده نهایی و میزان دوپامین ۷۰
٤-٥-١- ارزیابی میزان رشد لاین‌ها..... ۷۰
٤-٥-٢- مقایسه مقدار دوپامین در لاین‌ها و ریشه طبیعی ۷۱
۴-۶- ارزیابی اثر محرک‌های استفاده شده بر روی میزان دوپامین ریشه های موئین گیاه خرفه ۷۱
۴-۶-۱- متیل جازمونات ۷۱
نتیجه گیری کلی ۷۳
پیشنهادات ۷۴
پیوست ۷٦
فهرست منابع ۷۹

جدول ۱-۱- تعدادی از گیاهان دارویی که ریشه‌های مویین در آنها به منظور تولید متابولیت‌های ثانویه بااهمیت‌شان القاء گردیده است. ۱۸

جدول ۱ - ۲- تعدادی از ریشه‌های مویینی که در مقایسه با ریشه‌های طبیعی متابولیت‌های ثانویه را در سطوح بالاتری تولید کردند ۲۹

جدول ۱-۳-تعدادی از ریشه‌های مویینی که در آنها متابولیت‌های ثانویه‌ای تولید شده است که در بافت‌های کنترل وجود ندارد ۳۰

جدول ۲-۱ ترکیبات مورد نیاز برای تهیه یک لیتر محیط کشت MS و۱/۲ MS ۳۹

جدول۲-۲- نوع و مقدار مواد تشکیل دهنده محیط کشت LB برای یک لیتر محیط کشت 40

جدول ۲-۳ - مواد تشکیل دهنده محلول‌های مورد نیاز در مراحل مختلف استخراج DNA ژنومی ۴۴

جدول۲-۴- محلولهای مواد مورد نیاز در استخراج پلاسمید ۴۶

جدول ۲-۵ - مواد مورد استفاده در واکنش زنجیره ای پلیمراز 49

جدول ۲-۶- مشخصات لازم برای چرخه های PCR 49

جدول ۲ - ۷- مشخصات مربوط به محرک‌های استفاده شده ۵۲

جدول ۳-۱- نتایج مربوط به جوانه زنی ۵۶

جدول ۳-۲- نتایج مربوط به درصد جوانه زنی ۵۶

جدول ۳-۳ - میزان دوپامین به دست آمده از لاین‌های مختلف بر حسب میلی گرم بر گرم ماده خشک ۶۵

جدول ۳-۴- تجزیه واریانس غلظت‌های مختلف متیل جازمونات در افزایش مقدار دوپامین ۶۶

جدول ۳-۵- تجزیه واریانس غلظت‌های مختلف اسید سالیسلیک در افزایش مقدار دوپامین ۶۶

شکل۱- ۱- ساختار شیمیایی ترکیبات آلکالوئیدی نیکوتین، کوکائین، مسکالین و مورفین ۱۲
شکل۱-۲ –مثال‌هایی از مهمترین فنول‌های گیاهی ۱۳
شکل ۱-۳- ساختار واحد ۵ کربنه (ایزوپرن)، ۱۳
شکل ۱ -۴- ساختار اولیه پلاسمید Ri آگروباکتریوم رایزوژنز ۲۰
شکل ۱-۵ - پردازش T-DNA..... ۲۳
شکل ۱-۶- کمپلکس نوکلئوپروتئینی ۲٤
شکل ۱-۷- مکانیسم انتقال T-DNA آگروباکتریوم به ژنوم گیاهی ۲۵
شکل ۱-۸- گیاه خرفه a)گیاه کامل b)بذر c)برگ وگل d)ساقه ۳۳
شکل ۱-۹–مسیر بیوسنتزی کاته‌کولامین‌ها ۳۵
شکل ۳-۱ - مراحل تولید گیاهچه تا تولید ریشه موئین در ریزنمونه‌ها ۵۷
شکل ۳- ۲- اثر نوع ریزنمونه بر فراوانی ریشه‌های موئین تولید شده، مقایسه میانگین ها به روش LSD ۵۸
شکل ۳- ۳- اثر سن گیاهچه بر فراوانی ریشه‌های موئین تولید شده، مقایسه میانگین ها به روش LSD..... ۵۸
شکل ۳-۴ - اثر طول مدت آلودگی در تولید ریشه‌های تراریخت و مقایسه میانگین‌ها به روش LSD ۵۹
شکل ۳-۵- اثر مدت هم کشتی در تولید ریشه‌های تراریخت و مقایسه میانگین‌ها به روش LSD..... ۵۹
شکل ۳-۶- زی‌توده نهایی لاین گزینشی در محیط‌های مختلف بر حسب وزن خشک و مقایسه میانگین‌ها به روش LSD ۶۰
شکل ۳-۷ - زیتوده لاین گزینشی برحسب وزن خشک در هر نمونه برداری ۶۱
شکل ۳-۸- تاثیرمحیط کشت‌های مختلف بر رشد ریشه‌های موئین ۶۱
شکل۳- ۹ - تصویر ژل آگاروز با الکتروفورز برای تعیین ژن rolB توسط آنالیز PCR در ریشه‌های ترانسفورم شده خرفه ٦۲
شکل ۳-۱۰ - زیتوده نهایی لاین‌ها بر حسب وزن خشک و مقایسه میانگین‌ها به روش LSD..... ٦۳
شکل ۳- ۱۱ - گروماتوگرام HPLC با طول موج ۲۸۰ نانومتر مربوط به بیشترین مقدار دوپامین در ریشه‌های موئین بدست آمده از ریزنمونه‌های تراریخت(F)..... ٦٤
شکل ۳-۱۲ - گروماتوگرام HPLC با طول موج ۲۸۰ نانومتر مربوط مقدار دوپامین در ریشه‌های طبیعی یا شاهد بدست آمده از ریزنمونه‌های غیر تراریخت(con) ٦٤
شکل ۳- ۱۳- میزان دوپامین در غلظت‌های مختلف متیل جازمونات، مقایسه میانگین‌ها به روش LSD..... ٦٤
شکل ۳-۱۴- میزان دوپامین (میلی گرم بر گرم ماده خشک) در غلظت‌های مختلف اسید سالسیلیک (میکرومول) ٦٦

دانشگاه بوعلی سینا

مشخصات رساله/پایان نامه تحصیلی

عنوان:

القاء ریشه‌های مویین و تولید متابولیت ثانویه دوپامین در گیاه خرفه (*Portulaca oleracea* Linn.) با استفاده از آگروباکتریوم رایزوژنز

نام نویسنده: یاسر احمدی مقدم

نام استاد/اساتید راهنما: دکتر خسرو پیری

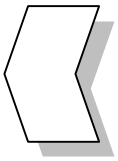
نام استاد/اساتید مشاور: دکتر بهمن بهرام نژاد

دانشکده : کشاورزی	**گروه آموزشی: بیوتکنولوژی**	
رشته تحصیلی: مهندسی کشاورزی	**گرایش تحصیلی: بیوتکنولوژی گیاهی**	**مقطع تحصیلی: کارشناسی ارشد**
تاریخ تصویب:۱۳۸۹/۸/۱	**تاریخ دفاع: ۱۳۸۹/۱۲/۱۸**	**تعداد صفحات: ۸۹**

چکیده:

هزاران سال است که گیاهان از مهمترین منابع درمانی محسوب می‌شوند.گیاهان همچنین منبع بسیاری از درمانهای جدید می‌باشند.تقریبا یک چهارم داروهای تولید شده حاوی عصاره‌های گیاهی یاترکیباتی هستند که از مواد گیاهی به دست آمده‌اند یا براساس ترکیبات گیاهی مدل سازی شده‌اند. با استفاده از پیشرفت های بیوتکنولوژی، تولیدات طبیعی گیاهان می‌توانند منبع عظیمی از ترکیبات شیمیائی جدید با منشاء گیاهی را برای کاربردهای گوناگون فراهم کنند. کشت بافت گیاهان دارویی به عنوان یک راه حل مناسب جهت تولید متابولیت های ثانویه با ارزش معرفی شده است. اخیرا کشت ریشه های موئین به عنوان یک منبع پایدار برای تولید متابولیت ها پیشنهاد شده است. ریشه های مویین با استفاده از آگروباکتریوم رایزوژنز تولید می‌شوند. بزرگترین مزیت کشت ریشه های مویین این است که اغلب در مقایسه با گیاهان مادری، توان بالایی در تولید متابولیت های ثانویه دارند. خرفه یکی از گیاهان دارویی است که در آسیا و اروپا یافت می‌شود. این گیاه دارای ترکیبات ثانویه با ارزشی همچون دوپامین است. امروزه از دوپامین در درمان بیماری پارکینسون استفاده می‌شود. این گیاه در حالت طبیعی متابولیت های ثانویه کمی تولید می‌کنند و در نتیجه برای افزایش متابولیت های ثانویه و توسعه درحد تجاری، استفاده از روش القاء ریشه موئین می-تواند مثمر ثمر واقع شود. در این تحقیق جهت ایجاد ریشه های موئین در گیاه خرفه از باکتری آگروباکتریوم رایزوژنز استرین AR15834 استفاده گردید که در نهایت منجر به تولید ریشه‌های مویین از این گیاه شد. جهت تأیید تراریختی ریشه های موئین تولید شده، آنالیزPCR با استفاده ازآغازگر اختصاصی ژن rolB انجام پذیرفت. نتیجه آنالیز PCR، وجود باندهای تشخیصی مربوط به تکثیر اختصاصی ژن rolB را با اندازه ۷۸۰ جفت بازی نشان داد و بدین ترتیب تراریختی ریشه‌های مؤیین تأیید شد. پس از ایجاد ریشه های موئین در گیاه خرفه، میزان تولید متابولیت های ثانویه در این ریشه ها با استفاده دستگاه HPLC ارزیابی گردید. نتاج حاصل نشان داد که میزان دوپامین در ریشه های موئین(لاینF) نسبت به ریشه های طبیعی(کنترل) گیاه ۱۸ برابر افزایش داشت. ۶ لاین ریشه موئین جداسازی و میزان دوپامین آنها هم اندازه گیری گردید. عوامل مختلفی از قبیل نوع ریزنمونه، سن گیاهچه، ، مدت زمان های مختلف آلودگی، مدت هم کشتی برای افزایش تراریختی گیاه خرفه مورد بررسی قرار گرفت. محیط کشت های مختلف از قبیل MS، ۱/۲MS، B5 و W بمنظور رشد بهتر ریشه های موئین بررسی شد و محیط کشت ۱/۲MS بعنوان محیط کشت مناسب برای رشد ریشه ها بخاطر تولید زی توده بیشتر انتخاب گردید. بمنظور افزایش تولید دوپامین در ریشه های موئین(لاین B) از محرکهای متیل جازمونات و اسید سالسیلیک در غلظت های مختلف استفاده گردید و مشخص شد که تمام غلظت‌های مورد استفاده متیل جازمونات به ویژه متیل جازمونانت ۱۰۰ میکرومول تاثیر بالای در تولید دوپامین دارند.

واژه‌های کلیدی: آگروباکتریوم رایزوژنز، ریشه‌های موئین،خرفه، دوپامین، متیل جازمونات، اسید سالیسلیک



مقدمه

مقدمه

قدمت شناخت خواص داروئی گیاهان، شاید بیرون از حافظه تاریخ باشد. یکی از دلایل مهم این قدمت حضور باورهای ریشه‌دار مردم سرزمین‌های مختلف در خصوص استفاده از گیاهان داروئی است. همزمان با پیدایش انسان‌ها، استفاده از گیاهان داروئی نیز آغاز شد. در گذشته گیاهان داروئی به عنوان منبع اصلی مواد شفا بخش، به طور وسیعی توسط مردم مورد استفاده قرار-گرفت. با مطالعه در تمدن اقوام قدیمی به مصرف گیاهان داروئی به عنوان دارو، سم، مواد پاک-کننده و رنگ برمی‌خوریم، تا آنکه پس از به بازار آمدن داروهای شیمیایی، استفاده از مواد طبیعی مذکور به طور چشمگیری کاهش یافت (امید بیگی، ۱۳۸۴).

به تدریج با افزایش داروهای شیمیایی، نوبت به انفجارعلم درقرن بیستم رسید تا بالاخره باروشن شدن ضرر و زیانی که از تجویز داروهای شیمیایی حاصل می‌شود و بیماری‌های که از مصرف این داروها ایجاد می‌شود، امروزه می‌بینیم نه تنها ناراحتی و شکایت بیماران را در پی داشته بلکه هر روزبه تعداد انواع بیماری‌ها و امراض گوناگون افزوده‌ترمی‌گردد. به طوری که درقرن اخیر باب جدیدی تحت عنوان بیماری‌های که توسط پزشکان به وجود می‌آیند گشوده شده است. بر این اساس امروزه اکثر مردم با اثرات نامطلوب و زیان آور داروهای شیمیایی و سینتتیک آشنا شده وبه سوی داروهای گیاهی و طبیعی که مسلما هزاران سال تنها وسیله درمان ومعالجه بیمارها بوده و از حداقل ضرر وزیان برخوردار می‌باشند، روی آورده‌اند (عماد، ۱۳۷۷).

باآداب و سنن قومی درآمیخته و سرانجام دراختیار نسل‌های معاصر قرار گرفته است. طبق برخی سنگ نبشته‌ها وشواهد دیگر به نظر می‌رسد مصریان وچینیان در زمره نخستین اقوام بشری بوده باشند که بیش از ۲۷ قرن قبل از میلاد مسیح از گیاهان به عنوان دارو استفاده کرده وحتی برخی از گیاهان را برای مصرف بشر در درمان دردها کشت داده‌اند. گیاهان دارویی به گستره وسیعی از گیاهان اطلاق می‌شود که در درمان بیماری‌ها و یا پیشگیری از بروز آن مورد استفاده قرار می‌گیرند. در چندین سال اخیر کشفیات مهمی روی ترکیبات ناشناخته گیاهان مذکور حاصل شده و بر این اساس داروهای فراوان تهیه وبه بازار عرضه گردیده است (زرگری، ۱۳۷۱).

بیوتکنولوژی مجموعه‌ای از متون و روش‌ها است که برای تولید، تغییر و اصلاح فراورده-های به نژادی گیاهان و جانوران و تولید میکرواورگانیسم‌ها برای کاربردهای ویژه، از ارگانیسم-های زنده استفاده می‌کند. ابزارهای بیوتکنولوژی و تکنیک‌های آن راهگشای تحقیقات جدید برای درک چگونگی عملکرد بدن‌های سالم می‌باشد. همچنین فارماکوژنومیکس کاربرد گسترده

بیوتکنولوژی و ژنومیکس برای کشف دارو و یا مشخص نمودن داروهاست. بنابراین بیوتکنولوژی جاذبه‌های پراهمیتی برای تشخیص، درمان و جلوگیری از بیماری دارد. شناخت پایه مولکولی سلامت وبیماری منجر به پیشرفت روش‌های جدید برای درمان و جلوگیری از بیماری‌ها می‌شود. در حفظ سلامت انسان، بیوتکنولوژی و تولیدات آن در روش‌های تشخیص بر پایه بیوتکنولوژی، امکان تشخیص سریع و با حساسیت بالا را فراهم می‌کنند. در علوم پزشکی و دارویی، بیوتکنولوژی و بیوتکنولوژی گیاهان دارویی کاربردهای زیادی از جمله تولید داروها، بیوداروها، تشخیص، ژن درمانی و مهندسی بافت و غیره دارند(گنجعلی، ۱۳۸۷).

متابولیت‌های ثانویه گیاهی، ترکیباتی آلی هستند که مستقیما در رشد، نمو یا تولید مثل گیاه دخیل نمی‌باشند. این ترکیبات دارای ساختار شیمیایی پیچیده تری نسبت به متابولیت‌های اولیه، که برای بقاء زندگی سلول‌ها ضروری‌اند، می‌باشند. آلکالوئیدها، ترپنوئیدها، فلاوونوئیدها، رنگیزه ها و تانن ها از جمله مهم‌ترین این ترکیبات هستند. سلولهای گیاهی مقادیر متنوعی از این فرآورده‌ها را تولید می‌کنند. مواد مؤثره تولید شده توسط گیاهان داروئی نقش مهمی را در صنایع داروسازی، آرایشی، عطرسازی، رنگرزی و صنعت طعم دار کردن بازی می‌کنند. اکثر این ترکیبات از طریق متابولیسم ثانویه تولید می‌شوند و معمولاً درگیاهان به مقادیر کم تولید می‌شوند (کیم[1] و همکاران، ۲۰۰۲) .

یکی از کاربردهای مهم بیوتکنولوژی تراریخت نمودن گیاهان برای اهداف خاص نظیر تولید بیشتر، مقاومت، القای صفتی خاص و غیره می‌باشد. در این بخش می‌توان از طریق کشت بافت و تکنیک‌های مختلف انتقال ژن، برخی ژن‌های مهم را به گیاهان هدف انتقال داد، تا این ژن پس از فعال شدن در گیاه مورد نظر، بروز صفت ویژه‌ای را سبب گردد. یکی از اهداف مورد نظر، انتقال ژن مولد ریشه‌های مویین می‌باشد. در این تحقیق به القاء تولید ریشه‌های مویین در گیاه خرفه و تولید متابولیت ثانویه دوپامین با استفاده از آگروباکتریوم رایزوژنز پرداخته شد. چنین تحقیقاتی در مورد گیاهان دارویی از اهمیت زیادی برخوردار می‌باشد، زیرا با تولید و کشت ریشه‌های مویین می‌توان همه گیاهان دارویی با ارزش را حفظ نمود و باززایی کرد و هم می‌توان سطح تولید برخی متابولیت‌های ثانویه که به طور طبیعی کم تولید می‌شوند را افزایش داد.گیاه خرفه یکی از گیاهان دارویی مهم بوده و متابولیت های ثانویه ناشی شده از آن ازجمله دوپامین از نظر دارویی، بسیار ارزشمند می‌باشند. این در حالی است که این متابولیت‌های ثانویه بصورت طبیعی در گیاهان

[1] - kim

مادری به مقدار بسیار کم تولید می‌شوند. این مساله این ضرورت را ایجاب می‌کند که با بکار بردن تکنیک‌های بیوتکنولوژی بتوان بر این مشکل غلبه کرد و مقدار مواد موثره موجود در آنها را به مقدار قابل قبولی افزایش داد. که در این راستا برای غلبه بر تولید کم متابولیت های ثانویه در گیاه خرفه، تکنیک ریشه موئین در مورد این گیاه مورد بررسی قرار گرفت.

فصل اول

بررسی منابع

۱- بررسی منابع

۱-۱- گیاهان دارویی

۱-۱-۱- مقدمه

گیاهان از همان آغاز تمدن بشری به عنوان دارو بکار برده می شدند. با توسعه صنایع داروئی در اوایل قرن بیستم داروهای گیاهی تا حد زیادی اعتبار و ارزش خود را نسبت به داروهای جدید صناعی در بین اطبا از دست دادند که احتمالا به علت اطلاعات اندک درباره داروهای گیاهی می باشد. با اینحال در دهه اخیر اقبال دوباره ای برای مصرف داروها و فراورده های گیاهی طبیعی بوجود آمده است (آخوندزاده، ۱۳۷۹).

در سال‌های اخیر تمایل به استفاده از گیاهان دارویی و ترکیبات حاصل از آنها در حال افزایش است. در حال حاضر بیش از ۴۰% داروهای مصرف شده در کشورهای پیشرفته، دارای منشاء گیاهی می‌باشند (مورنو[1] و همکاران، ۲۰۰۳).

گرایش به استفاده از گیاهان دارویی برای تولید دارو در اکثر کشورها در حال افزایش است و کشور ایران نیز از این قاعده پیروی می‌کند که با دارا بودن شرایط آب و هوایی و برخورداری از منابع عظیم گیاهان دارویی می‌تواند در این زمینه پیشرو باشد و از پتانسیل‌های موجود در این گیاهان بهره برد. بهره برداری غیر صحیح و بی رویه در گذشته‌های نه چندان دور از منابع ژنتیکی علاوه بر اینکه میزان تولید سنتی را پایین آورده، باعث حرکت به سمت انقراض این منابع هم گردیده است. با این که گیاهان دارویی به روش‌های سنتی تولید می‌شوند اما روشهای بیوتکنولوژیکی هم برای تکثیر گیاهان دارویی ابداع شده است که یک روش کار آمد و مفید جهت تولید این گونه گیاهان می‌باشد و امروزه شاهد استفاده وسیع و گسترده این روشها در جهت تولید گیاهان دارویی و تولید متابولیت‌های ثانویه در آنها می‌باشیم (روتس[2]، ۲۰۰۱).

۱-۱-۲- تاریخچه :

بشر از آغاز خلقت با بیماری و درد و رنج سروکار داشته وبرای برطرف نمودن آلام خویش از گیاهان استفاده می نموده است. در اثر اصل مهم تجربه و خطا که بهترین معلم و راهنمای انسان برا ی استفاده از گیاهان و شناخت اثرات درمانی آنها بود، انسان موفق گردید به خواص دارویی گیاهان پی برد وگیاهان مفید وداورویی را از انواع سمی و مضران تمیز دهد. با گسترش روزافزون این اطلاعات وانتقال آن بصورت سینه به سینه و نسل به نسل، امروزه ما دارای

[1]. Moreno
[2]. Rotes

دانش گسترده ای در زمینه خواص گیاهان دارویی و موارد کاربد آنها در درمان بیماری های مختلف می باشیم. در حقیقت علم شناخت اثرات درمان گیاهان یکی از قدیمی ترین علوم شناخته شده بشری بوده و تمدن های کهن چون ، مصر، بابل، آشور، ایران، یونان، چین وهند پس از اختراع فن کتابت آنرا تکمیل تر نموده وبه صورت دائرۀ المعارف مدون پزشکی و دارویی در اختیار نسل های بعدی قرار داده اند. دارو سازان اسلامی و ایرانی نیز در این زمینه خدمات ارزنده ای به جامعه بشری نموده و سهم بسیار با ارزشی در جمع آوری، گسترش، حفظ و تکمیل اطلاعات مربوط به شناخت اثرات درمانی و کاربرد گیاهان دارویی و داروهای طبیعی بعهده داشتند (معطر، ۱۳۷۶).

تکمیل، تصحیح و انتقال این دانش از دنیای قدیم به اروپای قرون وسطی از با ارزش ترین وبا ثمرترین خدمات محققین اسلامی و ایرانی محسوب گشته ودر حقیقت ترجمه آثار با ارزش دارویی و پزشکی دانشمندانی چون محمد بن زکریای، شیخ الرئیس ابوعلی سینا، ابوریحان بیرونی و غیره به زبان لاتین و تدریس آنها در دانشگاها ی بزرگ مغرب زمین، موجب گسترش علم داروپزشکی و ایجاد رنسانس در کشور های اروپایی گردیده است. با استفاده از این معارف، روح تجربه و تحقیق در کشور های مغرب زمین رونق پیدا نموده و با گسترش علم شیمی تجزیه در قرون ۱۸ و ۱۹ مواد متشکله گیاهان دارویی شناسایی و جدا سازی گردید و در مرحله بعد ایده سنتز مواد گیاهی و استفاده از مواد شیمیایی بجای مواد طبیعی موجب گسترش علم شیمی دارویی و سنتز و ساخت داروهای شیمیایی گردید. بدین ترتیب استفاده از گیاهان دارویی و داروهای گیاهی کم کم رو به فراموشی رفت و با توجه به سرمایه گذاری های عظیم در زمینه تولید داروهای شیمیایی، کار تلیسم و انحصار طلبی، امر تولید این داروها را در بر گرفت و مسئله ساخت و عرضه دارو از یک کار و هدف والای انسانی به صورت یک حرفه تجارتی و سود آور مورد توجه قرار گرفته کم کم و در طول زمان با روشن شدن عوارض جانبی شدید اینگونه داروها و آثار زیان بخشی آن که از خود ظاهر می ساختند، محققین بفکر چاره جویی بر آمده و مسئله بازگشت به استفاده از داروهای گیاهی و طبیعی مورد نظر قرار داده شد و این بار به جای استفاده از یک ماده خالص جدا شده از گیاه استفاده عصاره های تام گیاه در نظر گرفته شد و فراورده های گیاهی بصورت فرمهای دارویی جدید مورد قبول انسان قرن ۲۰و ۲۱ مانند قرص، کپسول قطره، دراژه و غیره تولید ودر اختیار جامعه پزشکی قرار گرفت (معطر،۱۳۷۶).