بسم الله الرحمن الرحیم

دانشگاه تربیت مدرس
دانشکدهٔ علوم زیستی

رسالهٔ دورهٔ دکتری
رشتهٔ زیست شناسی (فیزیولوژی گیاهی)

بررسی اثر متیل جاسمونات، سالیسیلیک اسید، میدان مغناطیسی و امواج فراصوت بر رشد سلول و تولید تاکسول در کشت سلولی گیاه فندق (*Corylus avellana* L.)

نگارش:
آیت اله رضایی نودهی

استاد راهنما:
دکتر فائزه قناتی

استاد مشاور:
دکتر مهرداد بهمنش

تیر ۱۳۹۰

حضرت علی (ع):

العلم سلطان من وجده صال به و من لم یجده صیل علیه.

دانش توانایی است، هرکس آن را بیابد به وسیله آن برتری پیدا میکند و هرکس آنرا نیابد بر او چیره میشوند.

تقدیم به

مادرم که مهرش در دلم گرامی و مقدس است

او که سرآغاز کنجکاوی سالهای کودکی ام بود و با گفتن آن همه قصه های قدیمی

لذت خیال و شگفتی را به من هدیه داد

به پدرم که مهرش بنایی شد برای تلاش پرشورم در کسب دانش

او که در زمانه ناسازگار با شکست ناپذیری، رشد مرا سرشار از حکمت کرد

و به همه آنهایی که به همدردی با انسان فرایم خواندند.

تشکر و قدردانی

حال که به لطف لایزال الهی، مراحل انجام این پژوهش به پایان رسیده است بر خود لازم می دانم که از زحمات استاد گرامی، سرکار خانم **دکتر فائزه قناتی** که هدایت این پایان نامه را بر عهده داشتند و راهنمایی های ارزنده ای برای حل مشکلات علمی و عملی اینجانب ارائه دادند تشکر و قدردانی نمایم.

همچنین از جناب آقای **دکتر مهرداد بهمنش** که مشاوره این پایان نامه را به عهده داشتند و در مدت انجام این تحقیق با راهنمایی های بی دریغ شان مرا یاری دادند کمال تشکر و تقدیر را دارم.

از اعضای هیات داوران، جناب آقای **دکتر منصور شریعتی،** سرکار خانم **دکتر منیژه مختاری،** جناب آقای **دکتر مظفر شریفی و** جناب آقای **دکتر پرویز عبدالمالکی** که زحمت مطالعه و داوری این پایان نامه را برعهده داشتند صمیمانه تشکر می کنم.

همچنین از اساتید گروه علوم گیاهی سرکار خانم **دکتر زرین کمر،** جناب آقای **دکتر کاظم پور اصالو،** جناب آقای **دکتر شریفی** و جناب آقای **دکتر زارع مایوان** به خاطر راهنمایی هایشان سپاسگزاری می کنم.

از سرکار خانم **خرمی شاد** و سرکار خانم **فدائی،** مسئولین محترم آزمایشگاه علوم گیاهی و سرکار خانم **زرندی** مسئول آزمایشگاه بیوشیمی کمال تشکر را دارم.

از مساعدت های دوستان خوبم آقایان **یوسف زادی، آقایی، غلامی و مرادی پینوندی** و خانم ها **اسماعیل زاده، احمدیان، دهجی پور، قنادنیا، تحصیلی، رجب بیگی، رحمتی، رامک، فخاری، رئوف فرد، یوسف زاده، خاتمی، احمدیانی، ناهیدیان، پایز، صفری، خانپور و جمشیدی** بسیار سپاسگزارم و برای همه آرزوی توفیق و سربلندی دارم.

از خانوادهٔ صبور و خوبم به ویژه **همسر عزیزم** که در تمامی مراحل مرا فداکارانه یاری داده و در حل مشکلاتم کوشیدند صمیمانه تشکر و سپاسگزاری می کنم.

چکیده

گیاه فندق اخیراً گزارش شده است که دارای پتانسیل تولید داروی ضد سرطان تاکسول در میان گیاهان گلدار میباشد. دست ورزی محیطهای کشت سلولی با الیسیتورها یکی از استراتژیهای مهم جهت القای متابولیسم ثانویه و تولید متابولیتهای ارزشمند میباشد. بدین منظور با بهینه سازی شرایط، کشت سلولی فندق راه اندازی شد و اثر الیسیتورهای متیل جاسمونات و اسید سالیسیلیک و همچنین محرکهای امواج فراصوت و میدان مغناطیسی ایستا به صورت انفرادی و توأم در محیط کشت ساده و دو فازی روی رشد، برخی از پارامترهای فیزیولوژیک و تولید تاکسول و همچنین اثر برخی از آنها روی بیان ژنهای *DXR*، *HMGR* و *PAL* بررسی گردید. بر اساس منحنی رشد روز هشتم پس از واکشت زمان مناسب برای تیمارها انتخاب گردید. نتایج نشان داد که الیسیتورهای متیل جاسمونات و اسیدسالیسیلیک با افزایش غلظت و با گذشت زمان، ضمن کاهش رشد و درصد زنده بودن، پاسخهای دفاعی سلولها را القا نموده و منجر به تولید بیشتر ترکیبات فنلی و تاکسول گردیدند. امواج فراصوت (۳ دقیقه، ۲ بار)، میدان مغناطیسی (۳۰ میلی تسلا) و دی بوتیل فتالات (۱۰٪ (v/v)) نیز اثراتی شبیه الیسیتورها داشته و ضمن القای استرس اکسیداتیو و افزایش فعالیت سیستم آنتی اکسیدانی، تولید تاکسول را تحریک کردند. متیل جاسمونات و اسید سالیسیلیک به ترتیب با غلظتهای ۱۰۰ µM و ۵۰ میلی گرم در لیتر، بیشترین تاثیر را در تولید تاکسول داشتند، بنابراین در تیمارهای ترکیبی از آنها همراه با دیگر عوامل استفاده گردید. در مقایسه بین تیمارهای انفرادی، بیشترین عملکرد تاکسول تحت تاثیر دی بوتیل فتالات با مقدار ۲/۵ میلیگرم در لیتر یا ۲۲۰/۱ میکروگرم در گرم وزن خشک بدست آمد. در حالت تیمار ترکیبی دو تایی الیسیتورها با عوامل دیگر، برهم کنش متیل جاسمونات با میدان مغناطیسی و فراصوت بر تولید تاکسول قویتر بود. در محیط دو فازی، فراصوت و اسید سالیسیلیک اثر دی بوتیل فتالات را در خصوص تولید تاکسول افزایش دادند و در مقایسه با کشتهای شاهد به ترتیب ۴۶، ۴۱/۸ برابر تولید تاکسول را افزایش دادند. بیشترین تولید تاکسول، درصد آزادسازی و عملکرد ویژه تحت اثر کاربرد توام دی بوتیل فتالات و مافوق صوت به ترتیب به مقدار ۳/۳ میلیگرم در لیتر، ۹۸/۴ درصد و ۲۶۴/۳۱ میکروگرم بر گرم وزن خشک مشاهده گردید. تیمارهای ترکیبی ۳ تایی هم تفاوت قابل توجهی در

خصوص تولید تاکسول نشان دادند و تیمار DBP+SA+US بیشترین تاثیر را با مقدار ۳۱۹/۵ میکروگرم در گرم وزن خشک داشت. کاربرد توام DBP با الیسیتورها و US، اثر آنها را بسته به ماهیت آنها به صورت متفاوتی افزایش داد. DBP در حالت ترکیبی، ضمن تحت تاثیر قرار دادن اثر دیگر عوامل، تاثیر بسزایی مخصوصاً در افزایش آزاد سازی تاکسول داشت.

بیان ژن *DXR* در آزمایشات وابسته به زمان به صورت معنی داری تحت اثر متیل جاسمونات و اسید سالیسیلیک افزایش یافت. بیان *DXR* تحت تاثیر اسید سالیسیلیک نسبت به متیل جاسمونات قویتر القا گردید و الگوی تغییرات آن نیز متفاوت بود. میدان مغناطیسی و تیمار ترکیبی آن با الیسیتورها هم با عث افزایش معنی دار بیان *DXR* نسبت به شاهد گردید. بیان ژن *HMGR* در سلولهای تیمار شده با الیسیتورها و میدان مغناطیسی تحت تاثیر قرار نگرفت و کلاً القاء نگردید. بیان *PAL* به شدت تحت اثر متیل جاسمونات و اسید سالیسیلیک القا گردید. اما الگوی بیان این ژن تحت تاثیر اسید سالیسیلیک کاملاً در مقایسه با متیل جاسمونات متفاوت بود. میدان مغناطیسی نیز به همراه متیل جاسمونات و اسید سالیسیلیک در تیمار ترکیبی بیشترین بیان *PAL* را سبب شد اما میدان به تنهایی اثر معنی داری روی آن در مقایسه با شاهد نداشت. بین زمان بیشینه بیان *DXR* و تجمع تاکسول با توجه به روند تغییرات صورت گرفته هماهنگی مشاهده گردید. افزایش تولید تاکسول توسط الیسیتورها و بکارگیری تلفیقی آنها احتمالاً در اثر القای پارامترهای مختلف پاسخهای دفاعی نظیر انفجار اکسیداتیو (تولید H_2O_2)، پراکسیداسیون لیپیدها و افزایش فعالیت و بیان PAL و همچنین تغییر الگوی بیان ژنهای کلیدی *DXR* و *HMGR* مربوط به بیوسنتز مسیرهای ترپنوییدی و فنیل پروپانوییدی میباشد. با توجه به مقایسه بیان ژنهای کلیدی *DXR* و *HMGR* که به ترتیب در مسیرهای پلاستی (MEP) و سیتوسلی (موالونات) بیوسنتز پیش سازهای ترپنوییدها ایفای نقش میکنند و برای اولین بار در این تحقیق گزارش میگردد، بنظر میرسد در سلولهای فندق، مسیر MEP نقش اصلی را در بیوسنتز تاکسول بعهده دارد.

کلمات کلیدی: فندق (*Corylus avellana* L.) ، کشت سلولی، تاکسول، الیسیتور، فراصوت، میدان مغناطیسی، استخراج درجا، بیان ژن

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول (مقدمه و تاریخچه تحقیق) ۱
مقدمه ۲
۱-۱ تاریخچه تحقیق ۶
۱-۱-۱ فیزیولوژی تولید متابولیت های ثانویه در گیاهان ۶
۱-۱-۱-۱ متابولیتهای ثانویه ۶
۱-۱-۱-۲ بیوسنتز و تجمع متابولیتهای ثانویه ۸
۱-۱-۱-۳ پاسخهای دفاعی گیاه ۹
۱-۱-۲ استراتژیهای افزایش تولید متابولیتهای ثانویه ۱۱
۱-۱-۲-۱ عوامل برونزاد برای القای تولید متابولیت ثانویه ۱۲
۱-۱-۲-۲ دست ورزی آزاد سازی فراورده ۱۴
۱-۱-۲-۳ کشت دو فازی ۱۵
۱-۱-۲-۴ انتقال ماده و نفوذپذیرسازی (Permeabilization) ۱۷
۱-۱-۳ الیسیتورها ۱۷
۱-۱-۳-۱ متیل جاسمونات ۱۸
۱-۱-۳-۲ اسید سالیسیلیک ۲۰
۱-۱-۴ فراصوت و اثرات زیستی آن ۲۲
۱-۱-۵ میدان مغناطیسی و اثرات زیستی آن ۲۴
۱-۱-۶ برهم کنش الیسیتورها ۳۰
۱-۱-۷ تاکسول ۳۱
۱-۱-۷-۱ تاکسول و فعالیت ضد سرطانی ۳۲
۱-۱-۷-۲ بیوسنتز تاکسول ۳۳
۱-۱-۸ روشهای افزایش تولید تاکسول ۳۷
۱-۱-۸-۱ گزینش لاینهای سلولی با تولید بالا ۳۷
۱-۱-۸-۲ بهینه سازی شرایط کشت ۳۸
۱-۱-۸-۲-۱ محیطهای غذایی و بکارگیری سیستم کشت دو مرحله ای (two-stage culture) ۳۸
۱-۱-۸-۲-۲ منبع کربوهیدرات ۳۸
۱-۱-۸-۲-۳ هورمونهای گیاهی ۳۹
۱-۱-۸-۳ استفاده از الیسیتورها ۳۹
۱-۱-۸-۴ افزودن پیش سازها، ترکیبات جاذب یا مواد افزودنی ۴۰
۱-۱-۸-۵ اثر هم افزایی (synergistic) الیسیتورها، مواد افزودنی یا عوامل القا کننده ۴۰
۱-۱-۸-۶ تثبیت (Immobilization) ۴۱

۱-۱-۹ فندق منبع جدید تاکسول ۴۲
۱-۱-۱۰ اهداف ۴۳
فصل دوم (مواد و روشها) ۴۴
۱-۲- تولید کالوس و راه اندازی کشت سلولی ۴۵
۲-۲ تیمار سلولها با متیل جاسمونات، اسید سالیسیلیک و دی بوتیل فتالات ۴۵
۲-۳ تیمار سلولها امواج فراصوت ۴۷
۲-۳-۱ دستگاه تابش امواج فراصوت ۴۷
۲-۳-۲ کالیبراسیون سیستم مولد امواج فراصوت ۴۹
۲-۳-۳ تعیین مشخصات سیستم مولد امواج فراصوت ۴۹
۲-۴ تیمار سلولها با میدان مغناطیسی ایستا ۴۹
۲-۵ اندازه گیری رشد سلولی و تعیین درصد زنده بودن سلول ها ۴۹
۲-۶ آنالیزهای بیوشیمیایی ۵۰
۲-۶-۱ اندازه‌گیری پروتئین ۵۰
۲-۶-۲ تعیین سطح پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی ۵۰
۲-۶-۳ تعیین مقدار پراکسید هیدروژن ۵۱
۲-۶-۴ اندازه گیری ترکیبات فنلی ۵۱
۲-۶-۷ اندازه گیری فلاونوئید کل ۵۱
۲-۶-۸ استخراج و اندازه گیری فعالیت پلی فنل اکسیداز (PPO) ۵۲
۲-۶-۹ استخراج و اندازه گیری فعالیت پراکسیداز (PO) ۵۲
۲-۶-۲۲-۱۰ استخراج و اندازه گیری فعالیت فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL) ۵۳
۲-۶-۱۱ استخراج، تایید و اندازه گیری تاکسول ۵۴
۲-۷ بررسی های مولکولی ۵۵
۲-۷-۱ محلول ها و بافرها ۵۵
۲-۷-۱-۱ تهیه محلول EDTA ۵۵
۲-۷-۱-۲ تهیه بافر Tris-Hcl ۵۵
۲-۷-۱-۳ آب دیونیزه تیمار شده با DEPC ۵۶
۲-۷-۱-۴ طرز تهیه محلول ها و بافرهای مورد نیاز در الکتروفورز ۵۶
۲-۷-۱-۴-۱ تهیه بافر الکتروفورز TBE (۵X) ۵۶
۲-۷-۱-۷-۲ تهیه محلول اتیدیوم برماید (۱۰mg/ml) ۵۶
۲-۷-۱-۷-۳ تهیه بافر سنگین کننده ۵۷
۲-۷-۲ استخراج RNA کل از سلولهای فندق ۵۷
۲-۷-۳ الکتروفورز ژل آگارز ۵۸
۲-۷-۴ واکنش رونویسی معکوس ۵۹
۲-۷-۵ طراحی آغازگر ۶۱
۲-۷-۶ آماده سازی آغازگرهای PCR ۶۱

۲-۷-۷ واکنش PCR ۶۲
۲-۷-۷-۱ طراحی واکنشPCR ۶۲
۲-۸ Digestion (روشی برای تأیید توالی)... ..... ۶۳
۲-۹ تجزیه و تحلیل آماری ۶۳
فصل سوم (نتایج) ۶۴
۳-۱ بهینه سازی محیط کشت جهت القای تولید کالوس و راه اندازی کشت سلولی ۶۵
۳-۲ بررسی اثر متیل جاسمونات بر کشت سلولی فندق (*Corylus avellana* L.) ۶۷
۳-۲-۱ بررسی رشد و زنده بودن سلولی ۶۷
۳-۲-۲ اثر متیل جاسمونات بر تولید H_2O_2 ..... ۶۹
۳-۲-۳ اثر متیل جاسمونات بر تولید MDA ۷۰
۳-۲-۴ اثر متیل جاسمونات بر محتوای پروتئین سلولی ۷۰
۳-۲-۵ اثر متیل جاسمونات بر فعالیت فنیل آلانین آمونیا لیاز (PAL) ۷۲
۳-۲-۶ اثر متیل جاسمونات بر فعالیت پلی فنل اکسیداز (PPO) ۷۳
۳-۲-۷ اثر متیل جاسمونات بر تولید ترکیبات فنلی ۷۴
۳-۲-۸ اثر متیل جاسمونات بر تولید تاکسول ۷۵
۳-۳ بررسی اثر اسید سالیسیلیک بر کشت سلولی فندق (*Corylus avellana* L.) ۷۶
۳-۳-۱ اثر اسید سالیسیلیک بر رشد و زنده بودن سلولی ۷۶
۳-۳-۲ اثر اسید سالیسیلیک بر تولید H_2O_2 ..... ۷۸
۳-۳-۳ اثر اسید سالیسیلیک بر تولید MDA ۷۹
۳-۳-۴ اثر اسید سالیسیلیک بر محتوی پروتئین کل سلولی ۸۰
۳-۳-۵ اثر اسید سالیسیلیک بر فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز (PAL) ۸۱
۳-۳-۶ اثر اسید سالیسیلیک بر فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز (PPO) ..... ۸۲.
۳-۳-۷ اثر اسید سالیسیلیک بر تولید ترکیبات فنلی ..... ۸۳.
۳-۳-۸ اثر اسید سالیسیلیک بر تولید تاکسول ..... ۸۴....
۳-۴ اثر میدان مغناطیسی ایستا، الیسیتور و تیمار توام آنها بر کشت سلولی فندق ۸۶
۳-۴-۱ رشد و زنده بودن سلولی ۸۶
۳-۴-۲ تولید H_2O_2 و MDA ۸۷
۳-۴-۳ محتوی پروتئین کل ۸۹
۳-۴-۴ فعالیت آنزیم PAL ۹۰
۳-۴-۵ فعالیت آنزیم PPO ۹۱
۳-۴-۶ تولید ترکیبات فنلی ۹۲
۳-۴-۷ تولید ترکیبات فلاونوییدی ۹۳
۳-۴-۸ فعالیت آنزیم پراکسیداز (PO) ۹۴
۳-۴-۹ تولید تاکسول ۹۵
۳-۴-۱۰ آزاد سازی تاکسول از سلولها و عملکرد ویژه آنها ۹۷

۳-۵ اثر امواج فراصوت بر کشت سلولی فندق..... ۹۹
۳-۵-۱ اثر امواج فراصوت بر رشد، زنده بودن سلولی و تولید تاکسول..... ۹۹
۳-۵-۲ اثر امواج فراصوت و کاربرد توام آن با الیسیتورها بر کشت سلولی فندق..... ۱۰۱
۳-۵-۲-۱ رشد و زنده بودن سلولی..... ۱۰۱
۳-۵-۲-۲ تولید H_2O_2 و پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی..... ۱۰۳
۳-۵-۲-۳ محتوی پروتئین سلولی..... ۱۰۵
۳-۵-۲-۴ pH محیط کشت..... ۱۰۶
۳-۵-۲-۵ فعالیت PAL..... ۱۰۹
۳-۵-۲-۵ فعالیت PPO..... ۱۱۰
۳-۵-۲-۶ ترکیبات فنلی..... ۱۱۱
۳-۵-۲-۷ ترکیبات فلاونوییدی..... ۱۱۲
۳-۵-۲-۸ فعالیت آنزیم پراکسیداز (PO)..... ۱۱۴
۳-۵-۲-۹ تولید تاکسول..... ۱۱۵
۳-۵-۲-۱۰ آزاد سازی تاکسول و عملکرد ویژه سلولی..... ۱۱۷
۳-۶ اثر دی بوتیل فتالات بر کشت سلولی فندق..... ۱۱۹
۳-۶-۱ رشد سلولی..... ۱۱۹
۳-۶-۲ اثر دی بوتیل فتالات و کاربرد توام آن با فراصوت و الیسیتورها بر کشت سلولی فندق..... ۱۲۰
۳-۶-۲-۱ رشد و زنده بودن سلولی..... ۱۲۰
۳-۶-۲-۲ تولید H_2O_2 و پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی..... ۱۲۱
۳-۶-۲-۳ محتوی پروتئین..... ۱۲۳
۳-۶-۲-۴ فعالیت PAL..... ۱۲۴
۳-۶-۲-۵ فعالیت PPO..... ۱۲۶
۳-۶-۲-۶ مقدار pH..... ۱۲۷
۳-۶-۲-۷ فعالیت آنزیم PO..... ۱۲۸
۳-۶-۲-۸ تولید تاکسول..... ۱۲۹
۳-۶-۲-۹ آزادسازی تاکسول و عملکرد ویژه سلولی..... ۱۳۳
۳-۷ بررسی های مولکولی..... ۱۳۵
۳-۷-۱ استخراجRNA و سنتز cDND..... ۱۳۵
۳-۷-۲ تعیین دمای مناسب Annealing برای ژنهای اکتین، *DXR*، *HMGR* و *PAL*..... ۱۳۶
۳-۷-۳ بررسی میزان بیان ژنها به روش Semi quantitative-RT PCR در کشت سلولی فندق..... ۱۳۷
۳-۷-۳-۱ بررسی بیان ژنها تحت اثر متیل جاسمونات در کشت سلولی فندق..... ۱۳۷
۳-۷-۳-۱-۱ بیان ژن *DXR*..... ۱۳۷
۳-۷-۳-۱-۲ بیان ژن *HMGR*..... ۱۳۸
۳-۷-۳-۱-۳ بیان ژن *PAL*..... ۱۳۹
۳-۷-۳-۲ بررسی بیان ژنها تحت اثر اسید سالیسیلیک در کشت سلولی فندق..... ۱۴۱

۳-۷-۳-۲-۱ بیان ژن *DXR* ۱۴۱
۳-۷-۳-۲-۲ بیان ژن *HMGR* ۱۴۲
۳-۷-۳-۲-۳ بیان ژن *PAL* ۱۴۳
۳-۷-۳-۳ بررسی بیان ژنها تحت اثر میدان مغناطیسی ایستا، الیسیتور و تیمار توام آنها ۱۴۵
۳-۷-۳-۳ -۱ میدان مغناطیسی و متیل جاسمونات ۱۴۵
۳-۷-۳-۳ -۲ میدان مغناطیسی و اسید سالیسیلیک ۱۴۶
فصل چهارم (بحث، نتیجه گیری و پیشنهادات) ۱۴۹
۴-۱ بهینه سازی محیط کشت ۱۵۰
۴-۲ بررسی اثر متیل جاسمونات بر کشت سلولی فندق (*Corylus avellana* L.) ۱۵۱
۴-۳ بررسی اثر اسید سالیسیلیک بر کشت سلولی فندق (*Corylus avellana* L.) ۱۵۸
۴-۴ اثر میدان مغناطیسی ایستا، الیسیتور و تیمار توام آنها بر کشت سلولی فندق ۱۶۳
۴-۵ اثر امواج فراصوت و کاربرد توام آن با الیسیتورها بر کشت سلولی فندق ۱۶۹
۴-۶ اثر DBP و کاربرد توام آن با فراصوت و الیسیتورها بر کشت سلولی فندق ۱۷۸
۴-۷ بررسی های مولکولی ۱۸۳
۴-۷-۱ بررسی بیان ژنها تحت اثر الیسیتورها و میدان مغناطیسی در کشت سلولی فندق ۱۸۵
۴-۷-۱-۱ *DXR* ۱۸۵
۴-۷-۱-۲ *HMGR* ۱۸۷
۴-۷-۱-۳ *PAL* ۱۸۷
نتیجه گیری ۱۸۹
پیشنهادات ۱۹۱
منابع ۱۹۲
ضمایم ۲۱۵

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول ۱-۱ مقایسه نقشها و ویژگیهای متابولیسم اولیه و ثانویه در گیاهان عالی ۸
جدول۲-۱ مشخصات برنامه جریان و گرادیان فاز متحرک مورد ا ستفاده در HPLC تاکسول ۵۵
جدول ۲-۲ طرز ساخت (۵ X) TBE ۵۶
جدول ۲-۳ روش تهیه بافر سنگین کننده ۵۷
جدول۲-۴ مواد مورد نیاز برای ساخت cDNA ۶۰
جدول ۲-۵ توالی پرایمرهای اکتین، *DXR*، *HMGR* و *PAL* ۶۱
جدول ۲-۶ آماده سازی نمونه ها برای واکنش PCR ۶۲
جدول ۲-۷ برنامه PCR برای ژنهای مورد بررسی ۶۲
جدول۲-۸ ساخت مواد Digestion ۶۳
جدول ۳-۱ اثر دفعات تابش امواج فراصوت روی رشد و تولید تاکسول در کشت سلولی فندق ۱۰۱

فهرست اشکال

عنوان **صفحه**

شکل ۱-۱ مسیرهای اصلی بیوسنتز متابولیت ثانویه و ارتباط آنها با متابولیسم اولیه..... ۷
شکل ۱-۲ واکنشهای دفاعی در سلول گیاهی..... ۱۱
شکل ۱-۳ تصویر شماتیک ترتیب واکنشهای دفاعی در گیاهان القا شده با الیسیتور..... ۱۳
شکل۱-۴ تصویر شماتیک مسیر بیوسنتز جاسمونات و ترکیبات وابسته و میانجیگری آنها در انتقال پیام الیسیتور که منجر به تجمع متابولیتهای ثانویه میشود..... ۲۰
شکل۱-۵ مسیرهای بیوسنتزی اسید سالیسیلیک در گیاهان. A) مسیر سینامات، B) مسیر بیوسنتز باکتریایی که در آرابیدوپسیس مشاهده میشود، C) تبدیل SA و SA بتا گلوکوزید (SAG) به همدیگر..... ۲۱
شکل۱-۶ طیف امواج صوتی..... ۲۲
شکل ۱-۷ ساختار مولکول تاکسول..... ۳۱
شکل۱-۸ مکانیسم عمل تاکسول روی سیستم میکروتوبولی سلول..... ۳۳
شکل ۱-۹ مسیر بیوسنتز تاکسول..... ۳۶
شکل ۲-۱ منحنی رشد سلولهای فندق در محیط کشت تعلیقی..... ۴۷
شکل۳-۱ مراحل مختلف القاء و تولیدکالوس از بذر فندق..... ۶۵
شکل ۳-۲ اثر غلظت و ترکیب هورمونها روی القای کالوس از قطعات جداکشت بذر فندق..... ۶۶
شکل ۳-۳ مرفولوژی سلولها در مراحل اولیه (شکل سمت راست) و بعدی (شکل سمت چپ) کشت تعلیقی..... ۶۷
شکل ۳-۴ تغییرات میزان رشد و زنده بودن سلولی تحت تأثیر متیل جاسمونات در کشت سلولی فندق.... ۶۸
شکل ۳-۵ تغییرات میزان رشد تحت تأثیر متیل جاسمونات (۱۰۰ میکرومولار) در زمانهای مختلف در کشت سلولی فندق..... ۶۸
شکل ۳-۶ تغییرات میزان تولید H_2O_2 تحت تأثیر متیل جاسمونات (۱۰۰ میکرومولار) در زمانهای مختلف در کشت سلولی فندق..... ۶۹
شکل ۳-۷ تغییرات میزان تولید MDA تحت تأثیر متیل جاسمونات (۱۰۰ میکرومولار) در زمانهای مختلف در کشت سلولی فندق..... ۷۰
شکل ۳-۸ تغییرات میزان پروتئین سلولی تحت تأثیر متیل جاسمونات (۱۰۰ میکرومولار) در زمانهای مختلف در کشت سلولی فندق..... ۷۱
شکل ۳-۹ تغییرات فعالیت PAL تحت تأثیر متیل جاسمونات (۱۰۰ میکرومولار) در زمانهای مختلف در کشت سلولی فندق..... ۷۲
شکل ۳-۱۰ تغییرات فعالیت PPO تحت تأثیر متیل جاسمونات (۱۰۰ میکرومولار) در زمانهای مختلف در کشت سلولی فندق..... ۷۳
شکل ۳-۱۱ تغییرات در محتوای ترکیبات فنلی تحت تأثیر متیل جاسمونات (۱۰۰ میکرومولار) در

زمانهای مختلف در کشت سلولی فندق ۷۴
شکل ۳-۱۲ تغییر در مقدار تولید تاکسول برون سلولی (بالا) و درون سلولی (پایین) تحت تأثیر متیل جاسمونات (MJ50: ۵۰ میکرومولار و MJ100: ۱۰۰ میکرومولار) در زمانهای مختلف در کشت سلولی فندق ۷۵
شکل ۳-۱۳ تغییرات میزان رشد و زنده بودن سلولی تحت اثر اسید سالیسیلیک در کشت سلولی فندق ۷۷
شکل ۳-۱۴ تغییرات میزان رشد (وزن تر) تحت تأثیر اسید سالیسیلیک (۵۰ میلیگرم در لیتر) در زمانهای مختلف در کشت سلولی فندق ۷۸
شکل ۳-۱۵ تغییرات میزان تولید پراکسید هیدروژن تحت تأثیر اسید سالیسیلیک (۵۰ میلیگرم در لیتر) در زمانهای مختلف در کشت سلولی فندق ۷۹
شکل ۳-۱۶ تغییرات میزان تولید MDA تحت تأثیر اسید سالیسیلیک (۵۰ میلیگرم در لیتر) در زمانهای مختلف در کشت سلولی فندق ۸۰
شکل ۳-۱۷ تغییرات میزان پروتئین کل سلولی تحت تأثیر اسید سالیسیلیک (۵۰ میلیگرم در لیتر) در زمانهای مختلف در کشت سلولی فندق ۸۱
شکل ۳-۱۸ تغییرات میزان فعالیت آنزیم PAL تحت تأثیر اسید سالیسیلیک (۵۰ میلیگرم در لیتر) در زمانهای مختلف در کشت سلولی فندق ۸۲
شکل ۳-۱۹ تغییرات میزان فعالیت آنزیم PPO تحت تأثیر اسید سالیسیلیک (۵۰ میلیگرم در لیتر) در زمانهای مختلف در کشت سلولی فندق ۸۳
شکل ۳-۲۰ تغییرات میزان تولید ترکیبات فنلی تحت تأثیر اسید سالیسیلیک (۵۰ میلیگرم در لیتر) در زمانهای مختلف در کشت سلولی فندق ۸۴
شکل ۳-۲۱ تغییر در مقدار تولید تاکسول برون سلولی (بالا) و درون سلولی (پایین) تحت تأثیر اسید سالیسیلیک (SA25: ۲۵ میلیگرم در لیتر و SA50: ۵۰ میلیگرم در لیتر) در زمانهای مختلف در کشت سلولی فندق ۸۵
شکل ۳-۲۲ تغییرات میزان رشد و زنده بودن سلولی تحت اثر میدان مغناطیسی ایستا (SMF)، الیسیتورهای متیل جاسمونات (MJ، ۱۰۰ میکرومولار)، اسید سالیسیلیک (SA، ۵۰ میلیگرم در لیتر) و تیمار ترکیبی آنها در کشت سلولی فندق ۸۷
شکل ۳-۲۳ تغییرات تولید H_2O_2 و MDA تحت اثر میدان مغناطیسی ایستا (SMF)، الیسیتورهای متیل جاسمونات (MJ، ۱۰۰ میکرومولار)، اسید سالیسیلیک (SA، ۵۰ میلیگرم در لیتر) و تیمار ترکیبی آنها در کشت سلولی فندق ۸۸
شکل ۳-۲۴ تغییرات محتوی پروتئین کل تحت اثر میدان مغناطیسی ایستا (SMF)، الیسیتورهای متیل جاسمونات (MJ، ۱۰۰ میکرومولار)، اسید سالیسیلیک (SA، ۵۰ میلیگرم در لیتر) و تیمار ترکیبی آنها در کشت سلولی فندق ۸۹
شکل ۳-۲۵ تغییر فعالیت PAL تحت اثر میدان مغناطیسی ایستا (SMF)، الیسیتورهای متیل جاسمونات (MJ، ۱۰۰ میکرومولار)، اسید سالیسیلیک (SA، ۵۰ میلیگرم در لیتر) و تیمار ترکیبی آنها در کشت سلولی فندق ۹۰
شکل ۳-۲۶ تغییر در فعالیت آنزیم PPO تحت اثر میدان مغناطیسی ایستا (SMF)، الیسیتورهای متیل

جاسمونات (MJ، ۱۰۰ میکرومولار)، اسید سالیسیلیک (SA، ۵۰ میلیگرم در لیتر) و تیمار ترکیبی آنها در کشت سلولی فندق..... ۹۱
شکل ۳-۲۷ تغییر در تولید ترکیبات فنلی تحت اثر میدان مغناطیسی ایستا (SMF)، الیسیتورهای متیل جاسمونات (MJ، ۱۰۰ میکرومولار)، اسید سالیسیلیک (SA، ۵۰ میلیگرم در لیتر) و تیمار ترکیبی آنها در کشت سلولی فندق..... ۹۲
شکل ۳-۲۸ تغییر در تولید ترکیبات فلاونوییدی تحت اثر میدان مغناطیسی ایستا (SMF)، الیسیتورهای متیل جاسمونات (MJ، ۱۰۰ میکرومولار)، اسید سالیسیلیک (SA، ۵۰ میلیگرم در لیتر) و تیمار ترکیبی آنها در کشت سلولی فندق..... ۹۳
شکل ۳-۲۹ تغییر فعالیت آنزیم پراکسیداز محلول (SPO) تحت اثر میدان مغناطیسی ایستا (SMF)، الیسیتورهای متیل جاسمونات (MJ، ۱۰۰ میکرومولار)، اسید سالیسیلیک (SA، ۵۰ میلیگرم در لیتر) و تیمار ترکیبی آنها در کشت سلولی فندق..... ۹۴
شکل ۳-۳۰ تغییر در میزان تولید تاکسول برون سلولی(Extracellular)، درون سلولی(Cell-associated) و کل(Total) تحت اثر میدان مغناطیسی ایستا (SMF)، الیسیتورهای متیل جاسمونات (MJ، ۱۰۰ میکرومولارار)، اسید سالیسیلیک (SA، ۵۰ میلیگرم در لیتر) و تیمار ترکیبی آنها در کشت سلولی فندق..... ۹۶
شکل ۳-۳۱ تغییر در آزاد سازی تاکسول (بالا) و عملکرد ویژه (پائین) سلولها تحت اثر میدان مغناطیسی ایستا (SMF)، الیسیتورهای متیل جاسمونات (MJ، ۱۰۰ میکرومولار)، اسید سالیسیلیک (SA، ۵۰ میلیگرم در لیتر) و تیمار ترکیبی آنها در کشت سلولی فندق..... ۹۸
شکل ۳-۳۲ تغییر در میزان رشد و زنده بودن سلولها تحت اثر امواج فراصوت در کشت سلولی فندق..... ۱۰۰
شکل ۳-۳۳ تغییر در زنده بودن سلولی در طول زمان (بالا) و رشد و زنده بودن سلولی در پایان دوره کشت (پایین) تحت اثر امواج فراصوت (US)، الیسیتورهای متیل جاسمونات (MJ، ۱۰۰ میکرومولار)، اسید سالیسیلیک (SA، ۵۰ میلیگرم در لیتر) و تیمار ترکیبی آنها در کشت سلولی فندق..... ۱۰۲
شکل ۳-۳۴ تغییر در مقدار تولید H_2O_2 در طول زمان (شکل بالا) و تولید H_2O_2 و MDA در پایان دوره کشت (شکل پایین) تحت اثر امواج فراصوت (US)، الیسیتورهای متیل جاسمونات (MJ، ۱۰۰ میکرومولار)، اسید سالیسیلیک (SA، ۵۰ میلیگرم در لیتر) و تیمار ترکیبی آنها در کشت سلولی فندق..... ۱۰۴
شکل ۳-۳۵ تغییر در محتوی پروتئین سلولی تحت اثر امواج فراصوت (US)، الیسیتورهای متیل جاسمونات (MJ، ۱۰۰ میکرومولار)، اسید سالیسیلیک (SA، ۵۰ میلیگرم در لیتر) و تیمار ترکیبی آنها در کشت سلولی فندق..... ۱۰۶
شکل ۳-۳۶ تغییرات در مقدار pH محیط کشت سلولی در طول زمان(شکل بالا) و در انتهای دوره کشت (شکل پائین) تحت اثر امواج فراصوت (US)، الیسیتورهای متیل جاسمونات (MJ، ۱۰۰ میکرومولار)، اسید سالیسیلیک (SA، ۵۰ میلیگرم در لیتر) و تیمار ترکیبی آنها در کشت سلولی فندق..... ۱۰۷
شکل ۳-۳۷ تغییرات در فعالیت آنزیم PAL تحت اثر امواج فراصوت (US)، الیسیتورهای متیل جاسمونات (MJ، ۱۰۰ میکرومولار)، اسید سالیسیلیک (SA، ۵۰ میلیگرم در لیتر) و تیمار ترکیبی آنها در کشت

سلولی فندق..... ۱۰۹
شکل ۳-۳۸ تغییرات در فعالیت آنزیم PPO تحت اثر امواج فراصوت (US)، الیسیتورهای متیل جاسمونات (MJ، ۱۰۰ میکرومولار)، اسید سالیسیلیک (SA، ۵۰ میلیگرم در لیتر) و تیمار ترکیبی آنها در کشت سلولی فندق..... ۱۱۰
شکل ۳-۳۹ تغییر در مقدار ترکیبات فنلی تحت اثر امواج فراصوت (US)، الیسیتورهای متیل جاسمونات (MJ، ۱۰۰ میکرومولار)، اسید سالیسیلیک (SA، ۵۰ میلیگرم در لیتر) و تیمار ترکیبی آنها در کشت سلولی فندق..... ۱۱۲
شکل ۳-۴۰ تغییر در مقدار ترکیبات فلاونوییدی تحت اثر امواج فراصوت (US)، الیسیتورهای متیل جاسمونات (MJ، ۱۰۰ میکرومولار)، اسید سالیسیلیک (SA، ۵۰ میلیگرم در لیتر) و تیمار ترکیبی آنها در کشت سلولی فندق..... ۱۱۳
شکل ۳-۴۱ تغییر در فعالیت آنزیم پراکسیداز (PO) تحت اثر امواج فراصوت (US)، الیسیتورهای متیل جاسمونات (MJ، ۱۰۰ میکرومولار)، اسید سالیسیلیک (SA، ۵۰ میلیگرم در لیتر) و تیمار ترکیبی آنها در کشت سلولی فندق..... ۱۱۴
شکل ۳-۴۲ تغییر در مقدار تولید تاکسول (برون سلولی، درون سلولی و کل) تحت اثر امواج فراصوت (US)، الیسیتورهای متیل جاسمونات (MJ، ۱۰۰ میکرومولار)، اسید سالیسیلیک (SA، ۵۰ میلیگرم در لیتر) و تیمار ترکیبی آنها در کشت سلولی فندق..... ۱۱۶
شکل ۳-۴۳ تغییر در آزاد سازی تاکسول و عملکرد ویژه سلولی تحت اثر امواج فراصوت (US)، الیسیتورهای متیل جاسمونات (MJ، ۱۰۰ میکرومولار)، اسید سالیسیلیک (SA، ۵۰ میلیگرم در لیتر) و تیمار ترکیبی آنها در کشت سلولی فندق..... ۱۱۸
شکل ۳-۴۴ تغییر در تولید ذیتوده تحت اثر دی بوتیل فتالات در کشت سلولی فندق..... ۱۱۹
شکل ۳-۴۵ تغییر در رشد و زنده بودن سلولی تحت اثر دی بوتیل فتالات (DBP، ۱۰٪)، الیسیتورهای متیل جاسمونات (MJ، ۱۰۰ میکرومولار)، اسید سالیسیلیک (SA، ۵۰ میلیگرم در لیتر)، امواج فراصوت (US) و تیمار ترکیبی آنها در کشت سلولی فندق..... ۱۲۱
شکل ۳-۴۶ تغییر در تولید H_2O_2 و پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی تحت اثر دی بوتیل فتالات (DBP، ۱۰٪)، الیسیتورهای متیل جاسمونات (MJ، ۱۰۰ میکرومولار)، اسید سالیسیلیک (SA، ۵۰ میلیگرم در لیتر)، امواج فراصوت (US) و تیمار ترکیبی آنها در کشت سلولی فندق..... ۱۲۲
شکل ۳-۴۷ تغییر در محتوی پروتئین تحت اثر دی بوتیل فتالات (DBP، ۱۰٪)، الیسیتورهای متیل جاسمونات (MJ، ۱۰۰ میکرومولار)، اسید سالیسیلیک (SA، ۵۰ میلیگرم در لیتر)، امواج فراصوت (US) و تیمار ترکیبی آنها در کشت سلولی فندق..... ۱۲۴
شکل ۳-۴۸ تغییر در فعالیت آنزیم PAL تحت اثر دی بوتیل فتالات (DBP، ۱۰٪)، الیسیتورهای متیل جاسمونات (MJ، ۱۰۰ میکرومولار)، اسید سالیسیلیک (SA، ۵۰ میلیگرم در لیتر)، امواج فراصوت (US) و تیمار ترکیبی آنها در کشت سلولی فندق..... ۱۲۵
شکل ۳-۴۹ تغییر در فعالیت آنزیم PPO تحت اثر دی بوتیل فتالات (DBP، ۱۰٪)، الیسیتورهای متیل جاسمونات (MJ، ۱۰۰ میکرومولار)، اسید سالیسیلیک (SA، ۵۰ میلیگرم در لیتر)، امواج فراصوت (US) و تیمار ترکیبی آنها در کشت سلولی فندق..... ۱۲۶

شکل ۳-۵۰ تغییر در مقدار pH تحت اثر دی بوتیل فتالات (DBP، ۱۰٪)، الیسیتورهای متیل جاسمونات (MJ، ۱۰۰ میکرومولار)، اسید سالیسیلیک (SA، ۵۰ میلیگرم در لیتر)، امواج فراصوت (US) و تیمار ترکیبی آنها در کشت سلولی فندق ۱۲۷
شکل ۳-۵۱ تغییر در فعالیت آنزیم پرکسیداز (PO) تحت اثر دی بوتیل فتالات (DBP، ۱۰٪)، الیسیتورهای متیل جاسمونات (MJ، ۱۰۰ میکرومولار)، اسید سالیسیلیک (SA، ۵۰ میلیگرم در لیتر)، امواج فراصوت (US) و تیمار ترکیبی آنها در کشت سلولی فندق ۱۲۹
شکل ۳-۵۲ تغییر در مقدار تولید تاکسول برون سلولی (بالا) و درون سلولی (پائین) تحت اثر دی بوتیل فتالات (DBP، ۱۰٪)، الیسیتورهای متیل جاسمونات (MJ، ۱۰۰ میکرومولار)، اسید سالیسیلیک (SA، ۵۰ میلیگرم در لیتر)، امواج فراصوت (US) و تیمار ترکیبی آنها در کشت سلولی فندق ۱۳۰
شکل ۳-۵۳ تغییر در مقدار تولید تاکسول کل تحت اثر دی بوتیل فتالات (DBP، ۱۰٪)، الیسیتورهای متیل جاسمونات (MJ، ۱۰۰ میکرومولار)، اسید سالیسیلیک (SA، ۵۰ میلیگرم در لیتر)، امواج فراصوت (US) و تیمار ترکیبی آنها در کشت سلولی فندق ۱۳۳
شکل ۳-۵۴ تغییر در مقدار آزاد سازی تاکسول و عملکرد ویژه سلولی تحت اثر دی بوتیل فتالات (DBP، ۱۰٪)، الیسیتورهای متیل جاسمونات (MJ، ۱۰۰ میکرومولار)، اسید سالیسیلیک (SA، ۵۰ میلیگرم در لیتر)، امواج فراصوت (US) و تیمار ترکیبی آنها در کشت سلولی فندق ۱۳۴
شکل۳-۵۵ طرح الکتروفورز برای تست کیفیت RNA (A) و هم غلظت سازی cDND مربوط به سلولهای تیمار شده با میدان مغناطیسی و الیسیتور (B) و آزمایش وابسته به زمان (C) ۱۳۶
شکل ۳-۵۶ نیم رخ بیان ژن *DXR* در سلولهای شاهد و تیمار شده با متیل جاسمونات (۱۰۰µM) در کشت سلولی فندق ۱۳۸
شکل ۳-۵۷ نیم رخ بیان ژن *HMGR* در سلولهای شاهد و تیمار شده با متیل جاسمونات (۱۰۰µM) در کشت سلولی فندق ۱۳۹
شکل ۳-۵۸ نیم رخ بیان ژن *PAL* در سلولهای شاهد و تیمار شده با متیل جاسمونات (۱۰۰µM) در کشت سلولی فندق ۱۴۰
شکل ۳-۵۹ نیم رخ بیان ژن *DXR* در سلولهای شاهد و تیمار شده با اسید سالیسیلیک (۵۰mg/L) در کشت سلولی فندق ۱۴۱
شکل ۳-۶۰ نیم رخ بیان ژن *HMGR* در سلولهای شاهد و تیمار شده با اسید سالیسیلیک (۵۰mg/L) در کشت سلولی فندق ۱۴۲
شکل ۳-۶۱ نیم رخ بیان ژن *PAL* در سلولهای شاهد و تیمار شده با اسید سالیسیلیک (۵۰mg/L) در کشت سلولی فندق ۱۴۴
شکل ۳-۶۲ تغییرات بیان ژنهای *DXR* و *PAL* در سلولهای شاهد و تیمار شده با متیل جاسمونات (۱۰۰µM)، میدان مغناطیسی ایستا (SMF, ۳۰ mT) و تیمار توام آنها (SMF+MJ) در کشت سلولی فندق ۱۴۶
شکل ۳-۶۳ تغییرات بیان ژنهای *DXR* و *PAL* در سلولهای شاهد و تیمار شده با اسید سالیسیلیک (۵۰ mg/L)، میدان مغناطیسی ایستا (SMF, ۳۰ mT) و تیمار توام آنها (SMF+SA) در کشت سلولی فندق ۱۴۷

شکل۱ (ضمیمه)-کروماتوگرام های مربوط به HPLC عصاره سلولی فندق و استاندارد تاکسول. بالا) عصاره سلولی (زمان بازداری ۱۵/۸۳ دقیقه)، وسط) عصاره سلولی+ استاندارد تاکسول (زمان بازداری ۱۵/۷۸ دقیقه) و پایین) استاندارد تاکسول (زمان بازداری ۱۵/۸۸ دقیقه)..... ۲۱۵
شکل۲ (ضمیمه)-آنالیز عصاره کشت سلولی فندق و همچنین استاندارد تاکسول توسط LC-MS. A و C: طیفهای جریان یونی به ترتیب عصاره سلولی و محلول استاندارد و B و D: طیفهای جرمی بدست آمده به روش ESI product ion+ مربوط به تاکسول موجود در نمونه و استاندارد. علامت ستاره پیک تاکسول را نشان میدهد..... ۲۱۶

فصل اول

مقدمه و تاریخچه تحقیق