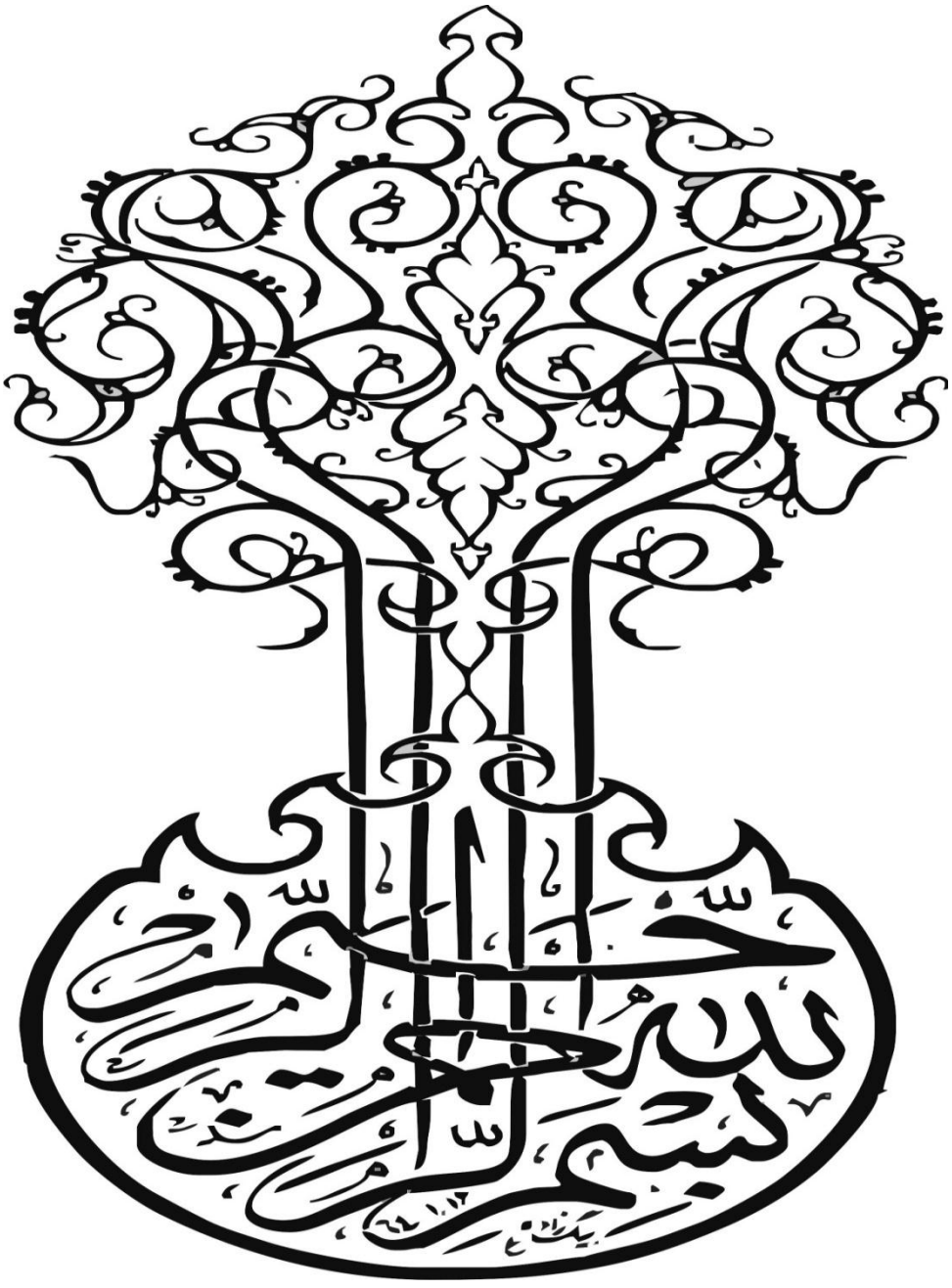
بسم الله الرحمن الرحيم

دانشکده‌ی کشاورزی

گروه علوم باغبانی

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته علوم باغبانی- گیاهان دارویی

عنوان:

بررسی اثر نوع سویه و ریزنمونه بر القاء ریشه مویین در بذرالبنج مشبک

(Hyoscyamus reticulatus)

اساتید راهنما:

دکتر بهمن حسینی

دکتر اسماعیل رضایی

تحقیق و نگارش:

زهرا زینلی

شهریور ماه ۱۳۹۳

حق چاپ برای دانشگاه ارومیه محفوظ است

چکیده

بذرالبنج مشبک یکی از مهم‌ترین گیاهان دارویی خانواده بادمجانیان است که بواسطه داشتن آلکالوئیدهای گروه تروپان، هیوسیامین و آسکوپولامین مورد اهمیت می‌باشد، این مواد آنتی کلینرژیک هستند و سیستم عصبی پاراسمپاتیک را تحت تاثیر قرار داده و در پزشکی برای آرام نمودن علائم بیماری پارکینسون، گشاد کردن مردمک چشم و افزایش ضربان قلب، خنثی کردن سستی ماهیچه‌های صاف ناشی از ترکیبات فسفره‌ی آلی، کاهش ترشح عرق و اسید معده مورد استفاده قرار می‌گیرند. در مطالعه حاضر، برای اولین بار القاء ریشه‌های مویین از ریزنمونه‌هایی با سنین مختلف شامل: برگ یک هفته‌ای، برگ دوهفته‌ای، برگ چهار هفته‌ای، گیاه بذرالبنج مشبک (*Hyoscyamus reticulatus*) با استفاده از چهار سویه آگروباکتریوم رایزوژنز شامل D7, A13, 15834 و A7 بررسی گردید. برای بررسی نوع ریزنمونه، از ریزنمونه‌های کوتیلدون، هیپوکوتیل، برگ دو هفته‌ای، میانگره دو هفته‌ای، برگ چهار هفته‌ای و میانگره چهار هفته‌ای استفاده گردید. همچنین اثر دو نوع روش تلقیح (روش غوطه‌وری و روش تزریق) بر درصد تولید ریشه‌های مویین در ریزنمونه‌های کوتیلدون بررسی گردید. به منظور مقایسه اثر محیط‌های کشت مختلف بر استقرار ریشه-های مویین در محیط مایع، چهار محیط کشت MS, 1/2MS, 1/4MS و B5 بررسی گردید. در آزمایشی جداگانه تاثیر غلظت-های مختلف کلشی‌سین (صفر، ۰/۰۱ ، ۰/۰۳ و ۰/۰۵ درصد) و نیترات نقره (صفر، ، ۰/۰۵، ۱ و ۲ میلی‌مولار) و تابش UV-B بر زیست توده ریشه‌های مویین حاصل از تلقیح ریزنمونه کوتیلدون توسط سویه A7 آزمایش گردید. میزان تولید آلکالوئید هیوسیامین و اسکوپولامین توسط دستگاه GC/MS اندازه‌گیری شد. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که القاء ریشه مویین در گیاه بذرالبنج مشبک، تحت تاثیر سویه‌های آگروباکتریوم رایزوژنز و نوع ریزنمونه قرار گرفت. بررسی‌ها نشان داد که در بین ریزنمونه‌های مطالعه شده، ریزنمونه کوتیلدون و سویه A7 حداکثر القاء ریشه مویین را نشان داد. نتایج نشان داد که نوع روش تلقیح تاثیر معنی-داری بر درصد القاء ریشه‌های مویین نداشت. در بررسی سرعت رشد ریشه‌های مویین در چهار محیط‌کشت مایع، تولید و رشد ریشه‌های مویین بطور معنی‌داری تحت تاثیر نوع محیط پایه قرار گرفت و بطور کلی میزان رشد ریشه‌ها در محیط‌های MS و B5 بیشتر بود. نتایج حاصل از بررسی غلظت‌های مختلف کلشی‌سین، نیترات نقره و تابش UV-B بر میزان رشد ریشه‌های مویین نشان داد که غلظت‌های مختلف کلشی‌سین باعث افزایش وزن تر و خشک و افزایش مقدار آلکالوئید هیوسیامین گردید ولی غلظت-های مختلف نیترات نقره و زمان ۹ دقیقه در تابش UV-B باعث کاهش معنی‌دار وزن تر و خشک و مقادیر آلکالوئید هیوسیامین و اسکوپولامین گردید. آنالیز PCR با پرایمرهای اختصاصی ژن *rol* B نیز تولید ریشه‌های تراریخت را تائید نمود.

کلمات کلیدی: آگروباکتریوم رایزوژنز، بذرالبنج مشبک، ریشه های مویین، آلکالوئید هیوسیامین و اسکوپولامین

تقدیم به ...

پدر و مادر عزیزم،

آن ها که وجودم برایشان همه رنج بوده و وجودشان برایم همه عمر، ان ها که راستی قامتم، در شکست قامتشان تجلی یافت، در

برابر وجود گرامیشان زانوی ادب بر زمین می نهم و با دلی مملو از عشق و محبت و خضوع بر دستشان بوسه می زنم.

و تقدیم به...

برادر بزرگوارم،

که نگاه همیشه مهربانش آرامش بخش راهم بود.

تشکر و قدردانی

حمد و سپاس ایزد منان را که کرامت عطوفت بی انتهایش را در لحظه لحظه این دوران پرتلاش به من ارزانی داشت و توفیق گام نهادن در مسیر علم و دانش را به من عنایت فرمود. بی شک موفقیت در انجام این تحقیق بدون راهنمایی بزرگوارانی که در طی این مسیر مرا یاری نموده اند میسر نبود و در این راه خود را مدیون اساتید گرانقدری می دانم که علم و معرفت را به من آموختند. اکنون که به لطف و یاری خداوند متعال ، مراحل نگارش وتدوین تحقیق به اتمام رسیده است لازم میدانم مراتب امتنان و قدردانی فراوان خویش را تقدیم سرورانی نمایم که ارائه پایاتامه حاضر مرهون مساعدتهای بیشائبه آنان بوده است.

بر خود واجب می دانم که از زحمات و راهنمایی های علمی و اخلاقی استاد راهنمای ارجمندم، جناب آقای دکتر بهمن حسینی که از رهنمودها و حمایت های بی دریغشان در کلیه مراحل این تحقیق و در دوران تحصیل برخوردار بودم قدردانی نمایم و امیدوارم در آینده نیز از علم ایشان بهره مند شوم.

مفتخرم که استاد فرزانه، جناب آقای اسماعیل رضایی چیانه که قبول زحمت نموده و به عنوان استاد راهنما با نظرات ارزشمند و مساعدتهای بی دریغ خویش راه گشای انجام تحقیق شدند، کمال تشکر و قدردانی را از ایشان دارم.

از اساتید محترم ناظر پایان نامه جناب آقای دکتر محمد قاجی و دکتر پرویز نوروزی که زحمت مطالعه پایان نامه را عهده دار بودند و با راهنمایی ها و نظرات سازنده باعث غنی تر شدن پژوهش حاضر گردیدند نهایت قدردانی را می نمایم.

از اساتید گرانقدر آقایان دکتر عباس حسنی، دکتر علیرضا فرخزاد، دکتر زهره جبارزاده، مرحوم دکتر رسول جلیلی مرندی، دکتر لطفعلی ناصری، دکتر محمد قاجی و دکتر محمد رضا اصغری، دکتر پرویز نوروزی، دکتر حمید حسن پور که چه در دوران تحصیل و مراحل انجام این تحقیق که هریک با صرف وقت و ارائه نظرات ارزنده خویش زمینه پربارتر شدن این پایان نامه را فراهم نمودند بسیار سپاسگزارم.

همچنین از کارکنان و پرسنل محترم گروه علوم باغبانی بخصوص سرکار خانم مهندس آقایی ، خانم مهندس جلیل دوست، آقایان مهندس تقی لو و محسنی آذر کمال تشکر وقدر دانی را دارم.

سپاس از خانواده بزرگوارم، که همواره مشوقم بوده اند. از زحمات بیدریغ، محبتها و صبر بی پایانشان قدردانی میکنم .وجودشان همواره برای من دریایی از مهربانی ولطف بوده است.

از تمام دوستان و عزیزان همکلاسی بخصوص خانم ها نسرین ایوبی، سپیده جوانبخت و افسانه بی قامت که طی این مدت به بنده لطف و عنایت داشته اند از صمیم قلب سپاسگزارم و از خداوند منان برای تمامی این عزیزان آرزوی سلامتی و توفیق روز افزون را خواهانم.

همچنین خود را قدردان و سپاسگزار تمام کسانی می دانم که هریک به نحوی در اجرای این پژوهش بنده را یاری بنده را یاری نمودند و نامشان در این جا ذکر نگردید.

فهرست مطالب

عنوان	شماره صفحه
فصل اول: مقدمه و کلیات	۱
۱-۱- اهمیت گیاهان دارویی	۲
۱-۲- تیره بادمجان (تیره سیب زمینی)	۳
۱-۳- انتشار جغرافیایی	۳
۱-۴- مشخصات گیاهشناسی بذرالبنج مشبک (*Hyoscyamus reticulatus*)	۴
۱-۵- نیازهای اکولوژیکی	۵
۱-۶- ترکیبات شیمیایی و مواد مؤثره	۵
۱-۷- خواص درمانی و کاربردهای دارویی بذرالبنج مشبک	۶
۱-۸- تاریخچه و معرفی آلکالوئیدها	۷
۱-۹- آلکالوئیدهای تروپانی	۹
۱-۱۰- تولید متابولیتهای ثانویه از طریق کشت درون شیشه‌ای	۱۰
۱-۱۱- تفاوت متابولیت‌های ثانویه با متابولیت‌های اولیه	۱۰
۱-۱۲- راهکارهای مختلفی به منظور افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهی از طریق کشت بافت وجود دارد	۱۱
۱-۱۳- تولید متابولیت‌های ثانویه از طریق کشت بافت	۱۱
۱-۱۳-۱- کشت سلول گیاهی برای تولید متابولیت‌های ثانویه	۱۲
۱-۱۳-۲- کشت اندام برای تولید متابولیت‌های ثانویه	۱۳
۱-۱۳-۳- تثبیت سلول‌های گیاهی برای تولید متابولیت‌های ثانویه	۱۳
۱-۱۴- کشت ریشه‌های مویین برای تولید متابولیت‌های ثانویه	۱۳
۱-۱۴-۱- انتخاب لاین‌های ریشه مویین	۱۴
۱-۱۴-۲- مزیت کشت ریشه‌های مویین	۱۵

۳-۱۴-۱- مشکلات بالقوه ریشه‌های مویین ۱۶
۱-۳-۱۴-۱- سرکوب همزمان ژن‌های داخلی و خارجی ۱۶
۲-۳-۱۴-۱- احتمال کاهش تعداد کروموزوم‌ها در طی واکشت ۱۶
۳-۳-۱۴-۱- تغییرات مرفولوژیکی گیاهان باززا شده ۱۷
۴-۳-۱۴-۱- تشدید بیان آنزیم‌های کلیدی همیشه باعث بهبود متابولیت‌های ثانویه نمی‌گردد ۱۷
۵-۳-۱۴-۱- تنظیم متفاوت متابولیسم ثانویه در گونه‌های نزدیک ۱۷

۱۵-۱- دستورزی ژنتیکی گیاهان با استفاده از آگروباکتریوم رایزوژنز ۱۸
۱-۱۵-۱- طبقه بندی آگروباکتریوم‌ها ۱۸
۲-۱۵-۱- اساس ایجاد تومور و پلاسمید Ti ۱۹
۳-۱۵-۱- پلاسمید Ti ۲۰
۴-۱۵-۱-T- DNA ۲۰
۵-۱۵-۱- ژن‌های بیماریزایی ۲۲
۶-۱۵-۱- ژن‌های کروموزومی ۲۲
۷-۱۵-۱- انتقال T- DNA ۲۳
۱۶-۱- تحریک زایی ۲۵
۱۷-۱- هدف تحقیق ۲۸
فصل دوم: بررسی منابع ۲۹
۱-۲- تاثیر نوع سویه آگروباکتریوم رایزوژنز، سن و نوع ریزنمونه گیاهی بر القاء ریشه های مویین ۳۰
۲-۲- تاثیر روش‌های مختلف تلقیح بر القاء ریشه‌های مویین ۳۲
۳-۲- تاثیر نوع محیط کشت بر رشد ریشه‌های مویین ۳۳

۲-۴- تاثیر محرک بر رشد و تولید متابولیت های ثانویه در ریشه‌های مویین ۳۴

۱-۴-۲- تاثیر محرک نیترات نقره بر رشد و تولید متابولیت های ثانویه در ریشه‌های مویین ۳۵

۲-۴-۲- تاثیر محرک کلشی‌سین بر رشد و تولید متابولیت های ثانویه در ریشه‌های مویین ۳۶

۳-۴-۲- تاثیر محرک پرتوی ماوراء بنفش بر رشد و تولید متابولیت های ثانویه در ریشه‌های مویین ۳۷

فصل سوم: مواد و روش‌ها ۴۰

۱-۳- آماده سازی محیط کشت ۴۱

۱-۱-۳- اجزای محیط کشت بافت‌های گیاهی ۴۱

۱-۱-۱-۳) نمک‌های غیرآلی و مواد معدنی ۴۱

۲-۱-۱-۳) هورمون‌ها ۴۱

۳-۱-۱-۳) ویتامین‌ها ۴۱

۴-۱-۱-۳) کربوهیدارتها ۴۲

۵-۱-۱-۳) عامل ژله ای کننده ۴۲

۲-۳- تهیه محیط کشت B5 ۴۲

۳-۳- تهیه محیط کشت MS ۴۲

۴-۳- تهیه محیط کشت 1/2MS و 1/4MS ۴۲

۵-۳- کشت گیاه بذرالبنج مشبک: ۴۳

۱-۵-۳- تهیه محلول ذخیره تیمار شکستن بذر ۴۳

۲-۵-۳- استریل کردن و کشت بذور ۴۳

۶-۳- سویه باکتری ۴۴

۳-۷- تهیه محیط کشت LB (Luria – Bertani) ۴۴
۳-۷-۱- کشت باکتری در محیط LB جامد ۴۴
۳-۷-۲- آماده سازی باکتری جهت تلقیح ریزنمونه‌های گیاهی ۴۵
۳-۸- بررسی نوع سویه باکتری و سن ریزنمونه گیاهی ۴۶
۳-۹- بهینه سازی ظهور ریشه‌های مویین ۴۶
۳-۱۰- بررسی نوع ریزنمونه گیاهی ۴۷
۳-۱۱- بررسی اثر روش تلقیح بر درصد ریشه‌زایی ۴۸
۳-۱۲- بررسی اثر نوع محیط کشت بر رشد ریشه‌های مویین ۴۹
۳-۱۳- تاثیر محرک نیترات نقره بر میزان رشد ریشه‌های مویین ۴۹
۳-۱۴- تاثیر محرک کلشی‌سین بر میزان رشد ریشه‌های مویین ۵۰
۳-۱۵- تاثیر محرک UV بر میزان رشد ریشه‌های مویین ۵۰
۳-۱۶- عصاره‌گیری متانولی جهت اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی ۵۱
۳-۱۶-۱- اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی ۵۱
۳-۱۷- استخراج آلکالوئیدها ۵۲
۳-۱۸- اثبات مولکولی ماهیت تراریختی ریشه‌های مویین ۵۳
۳-۱۸-۱- استخراج DNA ژنومی ۵۳
۳-۱۸-۲- تعیین کیفیت DNA ۵۴
۳-۱۸-۳- واکنش زنجیره‌ای پلی مراز (PCR) ۵۵
۳-۱۸-۴- واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر ۵۵
۳-۱۸-۵- الکتروفورز ژل آگارز ۵۶

فهرست مطالب

عنوان	شماره صفحه
۱۹-۳- آنالیز داده‌ها و محاسبات آماری	۵۶
فصل چهارم: نتایج و بحث	۵۷
۱-۴- تاثیر نوع سویه و سن ریزنمونه در القاء ریشه های مویین	۵۸
۲-۴- تاثیر نوع ریزنمونه در القاء ریشه های مویین	۶۰
۳-۴- مدت زمان ظهور ریشه های مویین	۶۲
۴-۴- اثر نوع روش تلقیح بر درصد ریشه زایی	۶۴
۵-۴- تاثیر نوع محیط کشت بر میزان رشد و فعالیت آنتی‌اکسیدانی ریشه های مویین	۶۵
۶-۴- تاثیر محرک نیترات نقره بر میزان رشد و فعالیت آنتی‌اکسیدانی ریشه های مویین	۶۸
۷-۴- تاثیر محرک کلشی‌سین بر میزان رشد و فعالیت آنتی‌اکسیدانی ریشه های مویین	۷۱
۸-۴- تاثیر محرک UV بر میزان رشد و فعالیت آنتی‌اکسیدانی ریشه های مویین	۷۳
۹-۴- تائید مولکولی ماهیت تراریختی ریشه های مویین	۷۶
۱۰-۴- مقایسه نوع و مقدار ترکیبات آلکالوئیدی هیوسیامین و آسکوپولامین	۷۸
۱۱-۴- نتیجه گیری کلی	۸۴
۱۲-۴- پیشنهادات	۸۵
منابع	۸۶

فهرست اشکال

شکل ۱-۱- شکل شماتیک جامع از شبکه‌های انتقال سیگنال الیسیتور.	۲۷

شکل ۱-۳- کشت درون شیشه‌ای بذر بذرالبنج مشبک ۴۳

شکل ۲-۳- کشت باکتری در محیط کشت LB مایع ۴۵

شکل ۳-۳- ظهور ریشه‌های مویین از ریزنمونه‌های برگ یک هفته‌ای ۴۷

شکل ۴-۳- ریزنمونه‌های مختلف بذرالبنج مشبک تلقیح یافته با باکتری آگروباکتریوم رایزوژنز ۴۸

شکل ۵-۳- بررسی انواع روش‌های تلقیح بوسیله سویه A7 آگروباکتریوم رایزوژنز در ریزنمونه کوتیلدون در گیاه بذرالبنج مشبک ۴۹

شکل ۱-۴- تعیین کیفیت DNA استخراج شده از ریشه های تراریخت ریزنمونه های بذرالبنج مشبک ۷۷

شکل ۲-۴- آنالیز واکنش زنجیره ای پلیمراز جهت تعیین حضور ژن *rol* B در ریشه های تراریخت بذرالبنج مشبک ۷۷

شکل ۳-۴- آنالیز GC/MS مقدار هیوسیامین در ریشه‌های غیرتراریخت بذرالبنج مشبک ۸۰

شکل ۴-۴- آنالیز GC/MS مقدار اسکوپولامین در ریشه‌های غیرتراریخت بذرالبنج مشبک ۸۱

شکل ۵-۴- آنالیز GC/MS مقدار هیوسیامین در ریشه‌های تراریخت بذرالبنج مشبک ۸۱

شکل ۶-۴- آنالیز GC/MS مقدار اسکوپولامین در ریشه‌های تراریخت بذرالبنج مشبک ۸۱

شکل ۷-۴- آنالیز GC/MS مقدار هیوسیامین در ریشه‌های تراریخت، تیمار نیترات نقره (۲ میلی‌مولار) بذرالبنج مشبک ۸۲

شکل ۸-۴- آنالیز GC/MS مقدار اسکوپولامین در ریشه‌های تراریخت، تیمار نیترات نقره (۲ میلی‌مولار) بذرالبنج مشبک ۸۲

شکل ۹-۴- آنالیز GC/MS مقدار هیوسیامین در ریشه‌های تراریخت، تیمار کلشی‌سین (۰/۰۵ درصد) بذرالبنج مشبک ۸۲

شکل ۱۰-۴- آنالیز GC/MS مقداراسکوپولامین در ریشه‌های تراریخت، تیمار کلشی‌سین (۰/۰۵ درصد) بذرالبنج ۸۲

مشبک

شکل ۱۱-۴- آنالیز GC/MS مقدار هیوسیامین در ریشه‌های تراریخت، تیمار UV (زمان ۹ دقیقه) بذرالبنج مشبک ۸۳

شکل ۱۲-۴- آنالیز GC/MS مقدار اسکوپولامین در ریشه‌های تراریخت، تیمار UV (زمان ۹ دقیقه) بذرالبنج مشبک ۸۳

فهرست جداول

جدول ۱-۳- مقدار ترکیبات مورد نیاز جهت تهیه ۱۰۰ میلی‌لیتر بافر استخراج CTAB ۵۵

جدول ۲-۳- مقدار ترکیبات مورد نیاز جهت تهیه ۱۰ میلی لیتر بافر استخراج TE ۵۵

جدول ۱-۴- جدول تجزیه واریانس تاثیر نوع سویه و سن ریزنمونه بر القاء ریشه مویین در گیاه بذرالبنج مشبک ۵۹

جدول ۲-۴- نتایج تجزیه واریانس تاثیر نوع ریزنمونه بر درصد القاء ریشه‌های مویین در گیاه بذرالبنج مشبک ۶۱

جدول ۳-۴- جدول تجزیه واریانس تاثیر نوع سویه و نوع ریزنمونه بر مدت زمان ظهور ریشه‌های مویین ۶۳

جدول ۴-۴- نتایج تجزیه واریانس اثر روش تلقیح بر درصد القاء ریشه های مویین در گیاه بذرالبنج مشبک ۶۵

جدول۵-۴- نتایج تجزیه واریانس تاثیر نوع محیط‌کشت بر وزن تر، وزن خشک و فعالیت آنتی‌اکسیدانی ریشه‌های مویین ۶۷

جدول۶-۴- نتایج تجزیه واریانس تاثیر محرک نیترات نقره بر وزن تر، وزن خشک و فعالیت آنتی‌اکسیدانی ریشه‌های مویین ۶۹

جدول۷-۴- نتایج تجزیه واریانس تاثیر محرک کلشی‌سین بر وزن تر، وزن خشک و فعالیت آنتی‌اکسیدانی ریشه‌های مویین ۷۲

جدول۸-۴- نتایج تجزیه واریانس تاثیر سطوح مختلف UV-B بر وزن تر، وزن خشک و فعالیت آنتی‌اکسیدانی ریشه-های مویین ۷۴

جدول۹-۴- اندازه‌گیری مقادیر ترکیبات آلکالوئیدی تروپان در ریزنمونه‌های مختلف بذرالبنج مشبک ۸۰

فهرست نمودارها

نمودار ۱-۴- مقایسه اثرات متقابل نوع سویه باکتری و سن ریزنمونه بر درصد القاء ریشه مویین بذرالبنج مشبک ۶۰

نمودار ۲-۴- مقایسه میانگین اثرات ساده نوع ریزنمونه بر درصد القاء ریشه‌های مویین بذرالبنج مشبک ۶۱

نمودار ۳-۴- مقایسه میانگین اثرات متقابل نوع سویه باکتری و نوع ریزنمونه گیاهی در مدت زمان ظهور ریشه‌های مویین در بذرالبنج مشبک ۶۳

نمودار ۴-۴- مقایسه میانگین اثرات ساده تاثیر نوع محیط کشت بر وزن تر و خشک ریشه های مویین در بذرالبنج مشبک ۶۷

نمودار ۵-۴- مقایسه میانگین اثرات ساده تاثیر نوع محیط کشت بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی ریشه‌های مویین ۶۸

نمودار ۶-۴- مقایسه میانگین اثرات ساده تاثیر غلظت‌های مختلف نیترات نقره بر وزن تر و خشک ریشه‌های مویین ۷۰

نمودار ۷-۴- مقایسه میانگین اثرات ساده تاثیر محرک نیترات نقره بر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی ریشه‌های مویین ۷۰

نمودار ۸-۴- مقایسه میانگین اثرات ساده تاثیر محرک کلشی‌سین بر وزن تر و خشک ریشه‌های مویین در بذرالبنج مشبک ۷۲

نمودار ۹-۴- مقایسه میانگین اثرات ساده تاثیر محرک کلشی‌سین بر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی ریشه‌های مویین ۷۳

نمودار ۱۰-۴- مقایسه میانگین اثرات ساده تاثیر سطوح مختلف UV-B بر وزن تر و خشک ریشه‌های مویین ۷۵

نمودار ۱۱-۴- مقایسه میانگین اثرات ساده تاثیر سطوح مختلف UV-B بر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی ریشه‌های مویین ۷۵

فصل اول

مقدمه وکلیات

۱-۱-اهمیت گیاهان دارویی

قدمت شناخت خواص دارویی گیاهان، شاید بیرون از حافظه تاریخ باشد. یکی از دلایل مهم این قدمت، حضور باورهای ریشه دار مردم سرزمین‌های مختلف درخصوص استفاده از گیاهان دارویی است. اطلاعات مربوط به اثرها و خواص دارویی گیاهان، از زمان‌های بسیار دور بتدریج سینه به سینه منتقل گشته، با آداب و سنن قومی درآمیخته و سرانجام در اختیار نسل‌های معاصر قرار گرفته است. طبق برخی «سنگ نبشته» ها و شواهد دیگر، به نظر می‌رسد مصریان و چینیان در زمره نخستین اقوام بشری بوده باشند که بیش از ۲۷ قرن قبل از میلاد مسیح، از گیاهان به عنوان دارو استفاده کردند و حتی برخی از گیاهان را برای مصرف بیشتر در درمان دردها کشت داده‌اند (Principe, 1988). مردم یونان باستان، خواص دارویی برخی از گیاهان را به خوبی می دانسته‌اند. بقراط حکیم بنیانگذار طب یونان قدیم و شاگرد وی ارسطو و دیگران، برای استفاده از گیاهان در درمان بیماری‌ها ارزش زیادی قائل بوده‌اند. آن‌ها علاوه‌بر استفاده از گیاهان یونان، از گیاهان کشورهای دیگر هم استفاده می‌برده‌اند. پس از آن‌ها، یکی از شاگردان ارسطو به نام تئوفراست مکتب درمان با گیاه را بنیاد نهاد. پس از آن، دیوسکورید در قرن اول میلادی، مجموعه‌ای از ۶۰۰ گیاه دارویی با ذکر خواص درمانی هر یک را تهیه و بصورت کتابی درآورد که این کتاب بعدها سرآغاز بسیاری از مطالعات علمی در زمینه گیاهان مذکور گردید، بطوری‌که مثلا جالینوس پزشک معروف یونانی در کارهای خود به کتاب دیوسکورید استناد کرده است (Rosengarten, 1969). در قرون هشتم تا دهم میلادی، دانشمندان ایرانی؛ ابوعلی سینا، محمد زکریای رازی و دیگران، به دانش «درمان با گیاه» رونق زیادی دادند و گیاهان بیشتری را در این رابطه معرفی کردند و کتاب‌های معروفی چون قانون و الحاوی را به رشته تحریر درآوردند (Farnsworth and Bingel, 1971). پس از آن، درمان با گیاه همچنان ادامه یافت. در قرن سیزدهم، ابن بیطار مطالعات فراوانی در مورد خواص دارویی گیاهان انجام داد و خصوصیات بیش از ۱۴۰۰ گیاه دارویی را در کتابی که از خود به جای گذاشته، یادآور شد. پیشرفت اروپاییان در استفاده دارویی از گیاهان در قرن هفده و هجده، ابعاد وسیعی یافت و از قرن نوزدهم کوشش‌هایی همه جانبه برای استخراج مواد مؤثره از گیاهان دارویی و تبیین معیارهای معینی برای تجویز و مصرف آن‌ها شروع شد. کوشش‌های آن زمان تا به امروز هم ادامه یافته و در حال حاضر نیز با سرعت هر چه بیشتر به پیش می‌رود. بطوریکه سازمان بهداشت جهانی[1] تخمین زده است که بیش از ۸۰ درصد از مردم به صورت سنتی و یا مدرن از گیاهان دارویی استفاده می کنند. بعلاوه برخی از داروهای شیمیایی نیز با الگو برداری از مواد گیاهی ساخته شده‌اند (Tripathi and Tripathi, 2003). اگرچه تقاضا برای این ترکیبات افزایش یافته است اما بسیاری از گیاهان، زیستگاه‌های طبیعی محدودی دارند و بسته به شرایط محیطی و

[1] World Health Organization

جغرافیایی محل رویش گیاه جمع آوری آن‌ها با مشکلاتی همراه است. 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 و کشت زراعی این گیاهان، توجه محققین را به استفاده از راهکارهای فناوری زیستی جهت افزایش تولید و بهره‌وری گیاهان دارویی معطوف نموده است. فناوری زیستی با بهره‌گیری از علوم مختلف مانند بیوشیمی، ژنتیک و . . . و با استفاده از راهکارهای کشت سلول‌ها، اندام‌ها و بافت‌ها، مهندسی ژنتیک، نشانگرهای مولکولی، بررسی مسیرهای مؤثر درتولید آن‌ها و افزایش بیان ژن قادر است کارآیی گیاهان را به عنوان منابع تجدیدپذیر جهت تولید دارو افزایش دهد (Kumar and Gupta, 2008; Mulabagal and Tsay, 2004) . کشت سلول، بافت‌ها و اندام‌های گیاهی امکان تکثیر انبوه و سریع گیاهان و تولید متابولیت‌های ثانویه را در شرایط درون شیشه‌ای[1] فراهم می‌سازد. با استفاده از کشت درون شیشه‌ای گیاه، علاوه بر دسترسی به منابع اولیه دارو در شرایط کنترل شده و مستقل از محیط، افزایش تولید ترکیبات نسبت به گیاه و تولید ترکیبات جدیدنیز امکان پذیر می‌گردد (Bourgaud *et al*., 2002). مهندسی ژنتیک، شامل روش‌های مبتنی بر ژنتیک سلولی و مولکولی، نشانگرهای مولکولی، کشت سلول و بیوشیمی می باشد. این فناوری امکان شناسایی مسیرهای بیوشیمیایی و ژن‌های دخیل در این مسیرها، دست‌ورزی ژن‌ها و انتقال آن‌ها را از موجودی به موجود دیگر فراهم می‌نماید. تولید گیاهان تراریخته یکی از مهم‌ترین کاربردهای مهندسی ژنتیک است.

۲-۱-تیره بادمجان (تیره سیب زمینی)[2]

گیاهان این تیره در تمام سطح کره زمین خصوصاً در نواحی گرم فراوان هستند. این تیره شامل ۴۰ جنس و ۲۰۰ گونه است. گیاهان این تیره به اشکال مختلف علفی، درخت و درختچه می‌باشند. برگ‌های آن‌ها ساده، متناوب و فاقد گوشوارک، گل‌هایشان منظم و پیوسته گلبرگ، پوشش گل پنتامر، نافه دارای پنج پرچم است که بر روی یک پیرامون (ایزواستمون) قرار گرفته و به لوله جام متصل است. در گیاهان این تیره، تخمدان دو خامه‌ای و میوه‌ها به صورت کپسول یا سته می‌باشد (حریری، ۱۳۷۶).

۳-۱-انتشار جغرافیایی

[1] *In vitro*

[1] Solanaceae

همه ساله، زمین‌های زراعی وسیعی در اکثر کشورهای اروپایی مانند آلمان، یوگسلاوی، روسیه و مجارستان برای کشت این گیاه اختصاص می‌یابد. این گیاه در نواحی مرکزی ایران در اطراف تهران، در شمال کشور و درشمال غرب در منطقه آذربایجان یافت می‌شود (امیدبیگی، ۱۳۸۸).

۴-۱-مشخصات گیاهشناسی بذرالبنج مشبک (*Hyoscyamus reticulatus*)

بذرالبنج مشبک گیاهی است از راسته: سولانالها (Solanales)– تیره: بادمجان (Solanaceae)– جنس: هیوسیاموس (Hyoscyamus) – گونه: رتی‌کولاتوس (reticulatus). گونه‌های مختلف بذرالبنج، گیاهانی یک‌ساله، دوساله و یا چندساله‌اند. مهم‌ترین آن‌ها عبارتنداز: گونه نایجر[۱] گیاهی است علفی و به دو فرم یک ساله و دو ساله مشاهده می‌شود. گونه‌های دیگر عبارتند از: گونه اگرستیس[۲]،گونه موتیکوس[۳]، گونه آلبوس[۴]، گونه آئیروس[۵]، گونه فیسیلوس[۶]، گونه رتی‌کولاتوس[۷]، گونه دوسرتاروم[۸] و گونه بوویانوس[۹].در برخی منابع، گونه رتی‌کولاتوس به نام بذرالبنج مشبک به خاطر نوع برگ و بذرش هم نام شده است (مظفریان، ۱۳۸۲).

گونه رتی‌کولاتوس، گیاهی علفی، یکساله یا دوساله است که به اغلب علف کش‌ها حساس می‌باشد. این گیاه بومی مناطق خشک و نیمه خشک مصر، جنوب غرب آسیا، ایران و ترکیه است. گونه‌های دوساله دارای ریشه‌های مستقیم به طول ۱۰ تا ۲۰ سانتی‌متر می‌باشند که این ریشه‌ها انشعاب‌های کمی دارند. گیاه شامل ساقه‌های منشعب شده یا ساده، برافراشته و پوشش یافته با پایه اصلی و برگ‌های دمبرگدار بدون گلبرگ، برگ‌های بالا بی‌ساقه، جدا شده با دو طرف برگدار، قطعه قطعه شده یا کامل. این برگ‌ها بریدگی‌های نسبتاً عمیقی دارند. کاسه گل ۲۰- ۱۰ میلی‌متر، میوه ۳۰- ۲۰ میلی‌متر در میانه جمع نشده، دندانه‌های نوک تیز،

---

[1] *Hyoscyamus niger* L

[2] . *Hyoscyamus agrestis KIT.*

[3] *Hyoscyamus muticus L*

[4] *Hyoscyamus albus L*

[5] *Hyoscyamus aureus* L

[6] *Hyoscyamus pusillus* L

[7] *Hyoscyamus reticulatus* L

[8] *Hyoscyamus dosertorum* L

[9] *Hyoscyamus boveanus* L.

سوزناک و دارای پیچش یا انحنا، جام گل زرد کم رنگ که به‌زودی تبدیل به جام ارغوانی متمایل به بنفش با رگه‌بندی‌های مشبک مانند به اندازه ۳۰- ۲۰ میلی‌متر می‌شود، بساک زرد رنگ و اکثراً زنگوله شکل می‌باشد. در نواحی زمین‌های غلات، مکان‌های ضایعات، کنار جاده‌ها، کناره‌های تاکستان‌ها از ۱۰ تا ۱۲۰۰متر قرار دارد (Deivis, 1987). میوه گیاه از نوع سته و بذرهای داخل آن بسیار کوچک و سبک هستند. وزن هزار دانه ۰/۵ تا ۰/۹ گرم است.

تمام پیکر گیاه حاوی ماده مؤثره‌ای (آلکالوئیدی[1]) است که کمیت و کیفیت آن در اندام‌های مختلف متفاوت است. آلکالوئیدهای بذرالبنج از نوع تریپتوفان واقعی بوده و سمی نیز می‌باشند. بذرها در اوایل بهار که درجه حرارت خاک بین ۷ تا ۸ درجه سانتی گراد باشد، جوانه می‌زنند. قوه رویشی بذرهای گیاهان دوساله بسیار کم است و فقط زمانی که یک دوره سرما را گذرانده باشند، توانایی رویش خواهند داشت. رشد اولیه گونه‌های مختلف بذرالبنج بسیارکند و آهسته است. در گونه‌های دوساله، سال اول فقط پیکر رویشی گیاه رشد می‌کند (تنها دارای رشد رویشی است) و برگ‌های طوقه‌ای به هم فشرده بوجود می‌آیند. گلدهی در سال دوم رویش پس از بهاره شدن انجام می‌گیرد اولین گلها، از اوایل سال دوم (اواسط بهار) ظاهر می‌شوند (امیدبیگی، ۱۳۸۸).

درگیاهان یک ساله، گل‌ها بین ماه‌های تیر و مرداد پدیدار می‌شوند. گل‌ها در هر دو گونه اعم از یک ساله یا دوساله به مدت زیادی (بین ۱ تا ۲ ماه) روی گیاه باقی می‌مانند. در گیاهان دوساله، میوه‌ها اوایل تیر و در گیاهان یک ساله اواخر تابستان می‌رسند. بذرهای بذرالبنج بسیار سبک هستند و پس از رسیدن به اطراف پراکنده شده و سپس به صورت علف هرز در منطقه می‌رویند. از اینرو، جمع‌آوری میوه‌ها باید به موقع انجام گیرد. بذرها تا ۴ الی ۷ سال، قوه رویشی مناسبی دارند (امیدبیگی، ۱۳۸۸).

۱-۵-نیازهای اکولوژیکی

این گیاهان تقریباً در هر اقلیمی قادر به رویش می‌باشند. بذرالبنج مشبک، گیاهی روز بلند است که در طول رویش به مقدار زیادی نور احتیاج دارد. برای تسریع در رشد و نمو و افزایش مواد مؤثره (آلکالوئیدها)، به مواد هوموسی و خاکهای غنی از نیتروژن نیاز دارند، به طوری که کمبود مواد و عناصر غذایی در خاک، اثرهای نامطلوبی در رویش این گیاه دارد (امیدبیگی، ۱۳۸۸).

۱-۶-ترکیبات شیمیایی و مواد مؤثره

مقدار آلکالوئیدها در اندام‌های مختلف گیاه متفاوت است. ریشه‌ها از ۰/۰۸ تا ۰/۱۵ درصد، برگ‌ها از ۰/۰۶ تا ۰/۱۷ درصد و ساقه از ۰/۰۲ درصد آلکالوئید برخوردارند. دانه‌های بذرالبنج ۰/۰۶ تا ۰/۱ درصد آلکالوئید دارند. مهم‌ترین آلکالوئیدها را

[1] Alkaloid

هیوسیامین[1]، آتروپین[2] و آسکوپولامین[3] تشکیل می‌دهد. این گیاه در مرحله گلدهی از بیشترین مقدار آلکالوئید برخوردار است. به جز آلکالوئید، مواد دیگری نظیر فلاون گلیکوزیدها[4] (نظیر هیوسیپیکرین[5] و هیوسرین[6]) و کومارین[7] وجود دارد. بذرها همچنین حاوی ۲۵ الی ۳۵ درصد چربی می‌باشند (امیدبیگی، ۱۳۸۸).

آتروپین مخلوط راسمیک D وL- هیوسیامین می‌باشد که از راسیمیزاسیون هیوسیامین در حین استخراج به دست می‌آید. بیشترین فعالیت فارماکولوژی هیوسیامین به ایزومر چپ گرد آن L- (هیوسیامین) نسبت داده می‌شود. اسکوپولامین چپ گرد به هیوسین معروف می‌باشد (Manske, 1954). هیوسیامین و اسکوپولامین به عنوان داروهای مهارکننده اعصاب پاراسمپاتیک می باشند و در واقع آنتاگونیست رقابتی استیل کولین درگیرنده‌های موسکارینی می‌باشند (Kutchan, 1995).

۷-۱-خواص درمانی و کاربردهای دارویی بذرالبنج مشبک

در صنایع داروسازی، در تولید داروهای ضد آسم، آرام‌بخش، ترمیم‌کننده سیستم اعصاب و تسکین دهنده ناراحتی‌های سالخورده‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. هیوسیامین در درمان بیماری‌های اعصاب و روان و همچنین در تهیه داروهای ضد تهوع و ضد دریازدگی کاربرد فراوانی دارد (امیدبیگی، ۱۳۸۸). این آلکالوئید در گشاد کردن مردمک چشم نیزکاربرد دارد (میرحیدر، ۱۳۷۳). از این آلکالوئید برای برطرف کردن حالت‌های اسپاسم و در بیماری‌های مسافرتی نیز استفاده می‌شود (Trease, 1989). اسکوپولامین دارای خاصیت آرام‌کننده سلسله عصبی با اثر بسیار قوی است و از آن برای تسکین ناراحتی‌های عصبی، پارکینسون، لرزش‌های زمان کهولت، تشنج مخصوص و رفع تحریکات شدید مجنونین استفاده می‌شود. اسکوپولامین خواب‌آور است و می‌توان با بکارگیری آن اثر مورفین را تقویت کرد. این آلکالوئید دارای اثر قوی بازکننده مردمک چشم است (زرگری، ۱۳۶۸). بعد از خشک

[1] Hyoscyamine

[2] Atropine

[3] Scopolamine

[4] Flavone glycosides

[5] Hyoscipicin

[6] Hyoscerin

[7] Coumarine

شدن گیاه دارای عطری تخدیرکننده است و باید در پاکت‌های دربسته نگه‌داری شود و برای مداوای بیماری عصبی و تنفسی استفاده می‌گردد (امیدبیگی، ۱۳۸۸).

۸-۱-تاریخچه و معرفی آلکالوئیدها

آلکالوئیدها بسیار متنوع می‌باشند، به‌طوری‌که تعداد آلکالوئیدهای شناخته شده موجود در گیاهان، بر چند هزار بالغ می‌گردد. اولین آلکالوئیدها در بین سال‌های ۱۸۰۳ تا ۱۸۱۶ از پیکر گیاهان جدا گشت. در سال‌های اخیر نیز بعضی آلکالوئیدهای جدید مورد شناسایی قرار گرفتند. آلکالوئیدها از گذشته‌های دور مورد استفاده بودند. عصاره گیاه هیوسیاموس مصری (موتیکوس) برای زیبایی چهره استفاده می‌شده است. به عنوان مثال عصاره پوست درخت *Cinchona officinalis* به عنوان ضد مالاریا و همینطور عصاره حاصل از خشخاش و نیز مورفین از آلکالوئیدهایی بود که در سال ۱۸۰۵ گزارش شد. اولین بار واژه آلکالوئید به معنی شبه قلیا[1] توسط یک داروشناس آلمانی به نام W. Meibnerfi بکار برده شد. اولین آلکالوئید سنتزی، کونین بود که توسط لیدنبرگ[2] در سال ۱۸۸۶ سنتز شد. برای نخستین بار، یک محقق آلمانی به نام مایسنر[3] از آلکالوئیدها به عنوان مواد ازته‌ای که خاصیت قلیایی دارند و و در محیط اسیدی نمک تولید می‌کنند، نام برده است. آلکالوئیدها در انسان واکنش‌های فیزیولوژیکی قوی همراه با اثرهای مخصوص ایجاد می‌کنند و بویژه بر سیستم عصبی تاثیر دارند. پلتیر[4] در سال، ۱۹۸۲ این تعریف را برای آلکالوئیدها بکار برد «یک آلکالوئید، یک ترکیب آلی حلقوی حاوی نیتروژن در حالت اکسیداسیون منفی است که از توزیع محدود در موجودات زنده برخوردار است.» اگرچه، آلکالوئید به معنی شبه قلیا است و خاصیت قلیائی یکی از ویژگی‌های مهم این گروه از ترکیبات در نظر گرفته می‌شود، ولی برخی از ترکیبات خنثی نظیر کلشی‌سین[5] که از گیاه گل حسرت استخراج می‌شود و نیتروژن آن در یک گروه آمیدی قرار دارد، به عنوان یک آلکالوئید محسوب می‌شود.

آلکالوئیدها را بر حسب خصوصیات بیوشیمیایی و شیمیایی در سه گروه قرار می‌دهند:

[1] Alkanet

[2] Lydenberg

[3] Meissner

[4] Peleter

[5] Colchicin