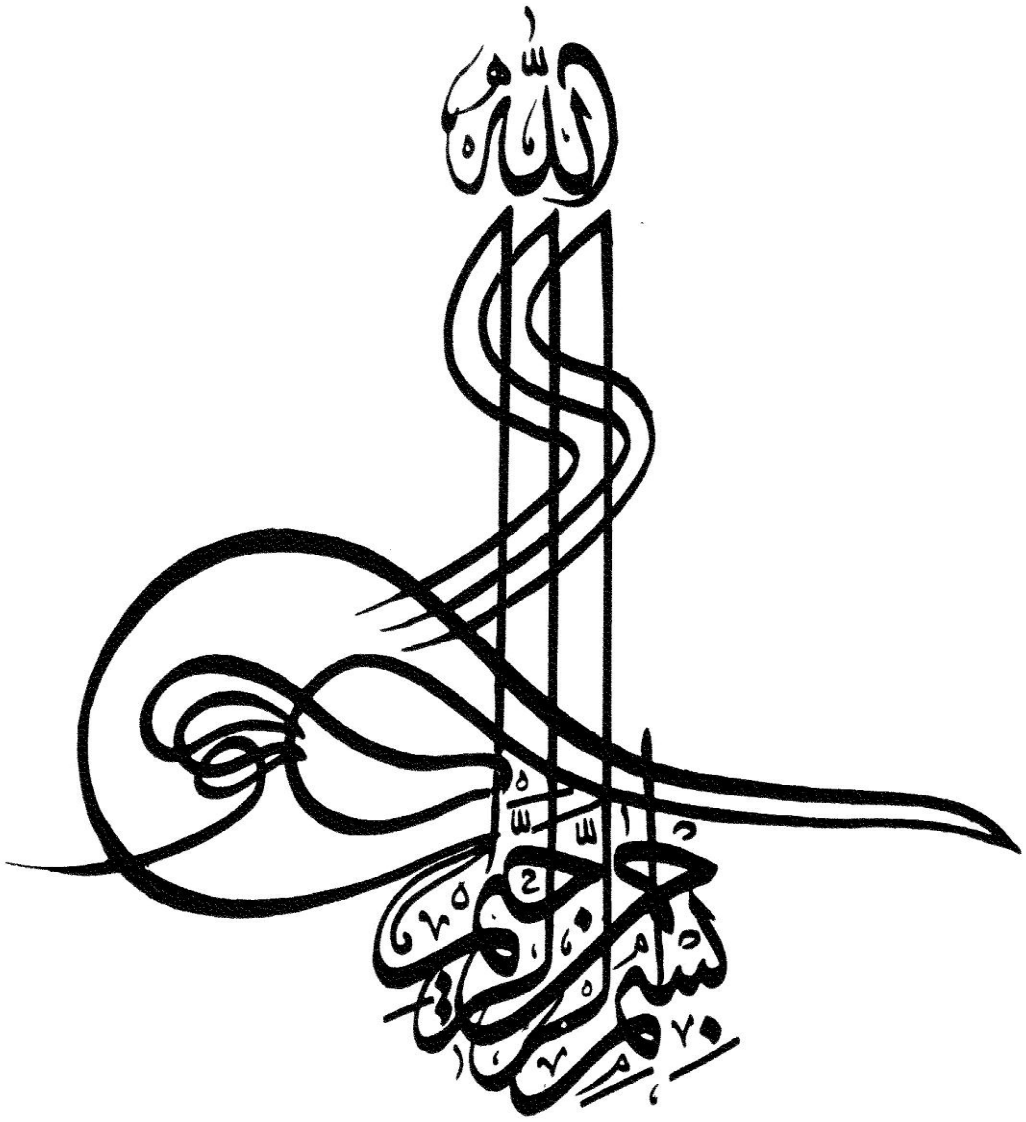
الله
بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه شهید چمران اهواز

دانشکده کشاورزی

۹۲۳۶۷۱۴۴

پایان نامه کارشناسی ارشد رشته مهندسی کشاورزی

گرایش اصلاح نباتات

عنوان:

جداسازی ژن‌های پینن سنتاز و گلیسرآلدهید۳- فسفات دهیدروژناز از گیاه دارویی بومادران (*Achillea millefoloium* L.)

اساتید راهنما:

دکتر حمید رجبی معماری

دکتر داریوش نباتی احمدی

استاد مشاور:

دکتر افراسیاب راهنما

نگارنده:

مریم جاودان اصل

بهمن ماه سال ۱۳۹۲

اگر شایسته تقدیم باشد؛

تقدیم به :

پیشگاه ساحت مقدس قطب عالم امکان و محور عالم وجود، ولی عصر حضرت مهدی (عج الله تعالی فرجه الشریف)

و تقدیم به :

پدر و مادر عزیزم، مهربان فرشتگانی که

لحظات ناب باور بودن، لذت و غرور دانستن، جسارت خواستن، عظمت رسیدن

و تمام تجربه های یکتا و زیبای زندگیم، مدیون حضور سبز آن هاست.

و خواهرهای مهربان و برادر خوبم،

همراهان همیشگی و پشتوانه های زندگیم.

سپاسگزاری

حمد و سپاس خدای را که سخنوران در ستودن او بمانند و شمارندگان، شمردن نعمت های او ندانند و کوشندگان، حق او را گزاردن نتوانند. و سلام و درود بر محمد و خاندان پاک او، طاهران معصوم، هم آنان که وجودمان وامدار وجودشان است.

با تشکر و سپاس ویژه از استاد دانشمند، فرهیخته و مهربانم جناب آقای دکتر حمیدرجبی معماری که با کرامتی همچون خورشید، سرزمین دل را روشنی بخشیدند و گلشن سرای علم و دانش را بارا هنمایی های کارساز و سازنده بارور ساختند و از محضر پرفیض شان بهره ها بردم. همچنین از اساتید گرامی جناب آقای دکتر داریوش نباتی احمدی و جناب آقای دکتر افراسیاب راهنما که سمت استاد راهنمای دوم و استاد مشاور پروژه را به عهده داشتند و اینجانب را مرهون راهنمایی های عالمانه شان قرار دادند، صمیمانه تشکر و قدردانی می نمایم. از زحمات داوران محترم این پایان نامه جناب آقای دکتر محمدرضا سیاهپوش و جناب آقای دکتر اسفندیار فاتح که نظرات سازنده خود را مطرح ساختند تشکر و سپاسگزارم. از اساتید فرزانه و دلسوز؛ جناب آقای دکتر موسی مسگرباشی و جناب آقای دکتر محمدرضا سیاهپوش و تمامی اساتید بزرگواری که در طول مدت تحصیل افتخار شاگردیشان را داشته و از محضر آن ها بهره برده ام، کمال تشکر و قدردانی را دارم. سپاس فراوان از خانواده عزیز، دلسوز و فداکارم که پیوسته جرعه نوش جام تعلیم و تربیت، فضیلت و انسانیت آنها بوده ام و هرگز مجنتشان به واژه و عبارت تصویر نخواهد شد.

از مسئولان محترم آزمایشگاه شیمی تجزیه، آزمایشگاه سیتوژنتیک و آزمایشگاه ویروس شناسی، سرکار خانم مهندس راهداریان، جناب آقایان مهندس سرخه و مهندس محمودی و از کارشناس محترم باغ گیاهشناسی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز سرکار خانم مهندس چیت ساز به جهت کمک های بی دریغشان سپاسگزارم.

با سپاس بی دریغ خدمت دوستان و هم کلاسی های خوبم آقایان مهندس حسن سلانیه، امید خاکپور، یاسین معزز، مصطفی مومن زاده شوشتری، صادق کلانتر هرمزی، سید محسن سهرابی، میثم زمانیان، مسلم بهمن کار و خانم ها سرکار خانم مهندس مریم دوستی، بهاره ذاکر قرآن، فاطمه زاهدی، زهرا علیزاده، مهرناز تناور، اکرم اورکی، بهاره طهماسبی، سمیه عباسیان، فاطمه شرفی، مرضیه خیراندیش، معصومه کرمی هوانی و سانا ز اسدپور که من را صمیمانه و مشفقانه در این پروژه یاری نمودند و حضورشان دشواری ها را برایم شیرین ساخت.

«و من الله التوفیق»

مریم جاودان اصل

بهمن ماه ۱۳۹۲

چکیده پایان نامه

نام خانوادگی: جاودان اصل	**نام:** مریم	**شماره دانشجویی:** ۹۰۳۶۷۰۲
عنوان پایان نامه: جداسازی ژن‌های پینن سنتاز و گلیسرآلدهید۳- فسفات دهیدروژناز از گیاه دارویی بومادران (*Achillea millefoloium* L.)		
اساتید راهنما: دکتر حمید رجبی معماری – دکتر داریوش نباتی احمدی		
استاد مشاور: دکتر افراسیاب راهنما		
درجه تحصیلی: کارشناسی ارشد	**رشته:** مهندسی کشاورزی	**گرایش:** اصلاح نباتات
دانشگاه: شهید چمران اهواز	**دانشکده:** کشاورزی	**گروه:** زراعت و اصلاح نباتات
تاریخ فارغ التحصیلی: ۱۳۹۲/۱۱/۲۹		**تعداد صفحات:** ۱۴۸
کلید واژه‌ها: بومادران، پینن سنتاز، گلیسرآلدهید۳- فسفات دهیدروژناز، لینالول سنتاز		

بومادران (*Achillea millefolium* L.) گیاهی چندساله و تتراپلوئید (۲n=۴x=۳۶) از خانواده گل‌ستاره‌ای‌ها (Asteraceae) و یکی ازگونه‌های باارزش دارویی و صنعتی موجود در مراتع ایران است که در طب سنتی برای درمان زخم‌ها استفاده شده است. اسانس گیاه بومادران دارای ترکیب‌هایی از جمله مونوترپن و سسکوئی‌ترپن‌های مختلف بوده که پینن و لینالول از اجزای اصلی تشکیل‌دهنده آن می‌باشند. این دو ترکیب دارای ارزش دارویی و اثرات ضدآفت و ضدمیکروبی بوده و در صنایع غذایی، عطرسازی و آرایشی و بهداشتی کاربرد دارند. ژن GAPDH نیز یک ژن مرجع است که به عنوان کنترل داخلی در مطالعات بیان ژن جهت نرمال‌سازی نتایج به کار می‌رود. هدف از این پژوهش، استفاده از راهکار آغازگرهای دژنره و تکنیک PCR برای جداسازی ژن‌های پینن سنتاز، لینالول سنتاز و گلیسرآلدهید۳- فسفات دهیدروژناز از گیاه دارویی بومادران بود. تاکنون هیچ گزارشی از حضور این ژن‌ها در بانک ژن جهانی موجود نمی‌باشد. بدین منظور یک جفت آغازگر دژنره برای هر یک از ژن‌های پینن سنتاز و لینالول سنتاز و یک جفت آغازگر اختصاصی برای ژن GAPDH بر اساس نواحی حفاظت شده ژن‌های رمزکننده آن‌ها در سایر گیاهان طراحی گردید. جهت استخراج RNA کل از برگ و گل گیاه بومادران از پنج روش استفاده گردید که از بین آن‌ها RNA استخراج شده از گل با روش فنل- کلروفورم کیفیت و کمیت بالاتری را نسبت به بقیه نشان داد. برای جداسازی قطعه‌ای از هر ژن، از تکنیک PCR، آغازگرهای دژنره و cDNA گل به عنوان الگو استفاده گردید. محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز گردید و تکثیر باندهای مورد انتظار برای ژن‌های پینن سنتاز، لینالول سنتاز و گلیسرآلدهید۳- فسفات دهیدروژناز به ترتیب، با طول حدود ۲۵۰، ۷۲۰ و ۶۶۶ جفت باز مشاهده گردید. با آنالیزهای بیوانفورماتیکی، نتایج توالی‌یابی با داده‌های موجود در بانک ژن جهانی (NCBI) مقایسه گردید. نتایج این پژوهش، مشابهت بالای توالی این ژن‌ها را با ژن‌های متناظر در سایر گیاهان (مانند درمنه) نشان داد و صحت توالی‌یابی را تأیید نمود. توالی این ژن‌ها در بانک ژن جهانی ثبت گردید.

فصل اول

مقدمه و هدف

فصل اول: مقدمه و هدف

۱-۱- مقدمه

گیاهان دارویی گیاهانی هستند که یک یا تعدادی از اندام‌های آن‌ها حاوی مواد مؤثره[1] است. این مواد دارای خواص دارویی مؤثر بر موجودات زنده هستند و می‌توانند برای مداوای برخی بیماری‌ها مورد استفاده قرار گیرند. کاشت، داشت و برداشت این گیاهان به منظور استفاده از اندام‌های مختلف گیاه یا ماده مؤثره آن‌ها انجام می‌شود.

به دلیل اثبات اثرات مخرب و جانبی داروهای شیمیایی و کم بودن عوارض جانبی داروهای گیاهی و همچنین گوناگونی ترکیب‌های مؤثره آن‌ها، گرایش عمومی جامعه به استفاده از داروها و درمان‌های گیاهی و به طور کلی فرآورده‌های طبیعی به‌ویژه در طی سال‌های اخیر رو به افزایش بوده است، به گونه‌ای که بیش‌از ۶۰٪ مردم آلمان و بلژیک و ۷۴٪ انگلیسی‌ها تمایل به استفاده از درمان‌های طبیعی گیاهی دارند (امیدبیگی، ۱۳۷۹؛ فیاض و همکاران، ۱۳۹۰). در سال‌های گذشته پذیرش عموم برای استفاده از گیاهان دارویی در سیستم دارویی معمول آمریکا به صورت منحنی U شکل درآمده است. چنین وضعیتی در اکثر مناطق جهان نیز گزارش شده است (فتاحی و فتاحی، ۱۳۸۹). در حال حاضر، بیش از ۲۵٪ از داروهای موجود منشأ گیاهی دارند و ۱۲٪ داروها نیز از منابع میکروبی ساخته شده‌اند. قابلیت تولید داروهای گیاهی در طبیعت بسیار بالا است و ارزش اقتصادی و تجاری گیاهان دارویی فوق‌العاده زیاد می‌باشد (فیاض و همکاران، ۱۳۹۰).

از سوی دیگر گیاهان دارویی جزء ذخایر و منابع طبیعی هستند و بسیاری از کشورها کم و بیش از یک چنین منبعی برخوردارند که نوع، تعداد و تنوع گونه‌های گیاهی بر اساس شرایط و

1- Active substances

موقعیت جغرافیایی هر منطقه متفاوت است. متأسفانه سودآوری‌های کلان اقتصادی و توجه روزافزون به تجارت جهانی گیاهان دارویی، مشکلات و مسائل ناگواری را برای این منابع به وجود آورده و نسل گونه‌های گیاهی را با خطر انقراض مواجه ساخته است. چرا که بخش عظیمی از تجارت، مربوط به گونه‌های گیاهی دارویی است که از طبیعت جمع‌آوری شده و بعضاً با شیوه‌های نادرست، نه تنها به انقراض نسل گونه‌ها می‌انجامد (فیاض و همکاران، ۱۳۹۰) بلکه برداشت از منابع وحشی که منبع یا به‌عبارتی مخزن اصلی مواد خام است، باعث از دست رفتن تنوع ژنتیکی و تخریب زیستگاه‌ها می‌شود (فتاحی و فتاحی، ۱۳۸۹).

در حال حاضر کاهش جمعیت، از دست رفتن تنوع ژنتیکی، از بین رفتن ژنوتیپ‌های محلی و تخریب زیستگاه‌ها نگران‌کننده است. از آن‌جایی که کشور ایران دارای منابع غنی ژرم‌پلاسم است (فتاحی و فتاحی، ۱۳۸۹)، استفاده مطلوب، منطقی و بهینه از گیاهان دارویی که به‌لحاظ فناوری بسیار کم‌هزینه‌تر و ساده‌تر از صنایع دارویی شیمیایی است، می‌تواند ضمن تأمین بخشی از نیازهای عمده بهداشتی و درمانی جامعه از خروج مقادیر متنابهی ارز جلوگیری نموده و مانع گسترش وابستگی به بیگانگان شود. بنابراین با اتخاذ سیاست‌ها و راهکارهای مناسب و مبتنی بر یک شناخت واقع‌گرایانه از وضعیت موجود این منابع و کاربرد روش‌های علمی و صحیح می‌توان به درکی واقعی و اصولی در خصوص نقش و بازدهی گیاهان دارویی در جوامع رو به رشدی همچون ایران رسید و علاوه‌بر حفظ و حراست از این سرمایه‌های ملی به شکوفایی و توسعه پایدار جامعه نیز دست یافت. با وجود توانایی‌های بالقوه و وجود تعداد زیادی از گونه‌های گیاهان دارویی در کشورمان که هنوز با توجه به بازارهای جهانی مطالعه نشده‌اند، پژوهش و تحقیق در این زمینه ضروری به‌نظر می‌رسد (فیاض و همکاران، ۱۳۹۰).

با وجود مزایای اصلاحی گیاهان دارویی ازجمله تنوع طبیعی بالا، روش‌های اصلاح کلاسیک و بیوتکنولوژیکی می‌تواند باعث بهبود صفات کشاورزی و مواد مؤثره در گیاهان دارویی شود. در این رابطه انتقال ژن به منظور تغییر مسیرهای بیوسنتزی به سمت بیوسنتز متابولیت‌های هدف می‌تواند به کار رود (فتاحی و فتاحی، ۱۳۸۹). به‌علاوه استفاده از مهندسی ژنتیک امکان دست‌ورزی سطوح و ترکیب مواد مؤثر فعال در گیاهان دارویی را امکان‌پذیر می‌نماید (عیوضی، ۱۳۹۰). از سویی دیگر وجود توالی ژنومی کامل برای برنج و افزایش سریع در جزئیات منابع ژنومی برای چندین گونه مدل دیگر مانند گوجه‌فرنگی، یونجه و صنوبر فرصتی برای بهبود گیاهان دارویی با مقایسه ژنتیکی را فراهم نموده است (فتاحی و فتاحی، ۱۳۸۹).

به دلیل کاربردهای فراوان، متابولیت‌های ثانویه موضوع جالبی برای تحقیقات اصلاح نباتات از طریق فنون مولکولی و مهندسی ژنتیک محسوب می‌شوند. پیشرفت‌های اخیر در زمینهٔ مهندسی ژنتیک گیاهی و DNA نوترکیب، قادر است کارآیی گیاهان دارویی را جهت تولید متابولیت‌های ثانویه افزایش دهد (امیدی و فرزین، ۱۳۹۱).

کلید اصلی مهندسی ژنتیک، داشتن اطلاعات کافی درخصوص مسیرهای بیوسنتزی موردنظر (اسپرینگوب[1] و همکاران، ۲۰۰۳) و الگوی بیان ژن‌های مسئول سنتز محصولات طبیعی خاص که امکان دست‌ورزی آن‌ها وجود دارد (عیوضی، ۱۳۹۰) می‌باشد، اما فقدان اطلاعات توالی، اصلی‌ترین محدودیت مطالعه‌ی متابولیسم ثانویه در گیاهان غیرمدل است (چن و هارمون[2]، ۲۰۰۶).

1- Springob
2- Chen and Harmon

با توجه به اهمیت و کاربرد وسیع اسانس‌ها در زمینه‌های گوناگون و توجه جهانی به گیاهان حاوی اسانس (شمس اردکانی و همکاران، ۱۳۸۴)، طی سی سال گذشته تحقیقات فراوانی در زمینه تولید متابولیت‌های ثانویه انجام شده است که بخش عمده این تحقیقات (امیدی و فرزین، ۱۳۹۱) در گیاهان دارویی و عطری در ارتباط با روشن شدن مسیر بیوسنتزی متابولیت‌های ثانویه مهم، شناسایی آنزیم‌های مرتبط، جداسازی ژن‌های کدکننده، دستکاری ژنتیکی آنزیم‌های دخیل در مسیر متابولیکی سنتز یک متابولیت ثانویه و استفاده از روش‌های انتقال ژن متمرکز شده است (فتاحی و فتاحی، ۱۳۸۹). این امر دارای سه دلیل عمده می‌باشد. اول این‌که گیاهان منبع اصلی تولید و توسعه‌ی داروهای جدید هستند. دوم این که گیاهان دارای متابولیت‌های ثانویه‌ی ارتقادهنده‌ی سطح سلامت هستند و سوم به‌دلیل مطالعه‌ی مقاومت گیاهان در برابر آفات و بیماری‌ها که در این زمینه متابولیت‌های ثانویه نقشی حیاتی ایفا می‌نمایند (ورپورت[1] و همکاران، ۱۳۹۱).

در همین رابطه مهندسی متابولیک ترپنوئیدها به دلیل اهمیت اکولوژیکی و تجاری آن‌ها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (گالیلی[2] و همکاران، ۲۰۰۲). از دیدگاه اصلاح نباتات، مهندسی ترپنوئیدها قادر است منجر به بهبود بسیاری از صفات از جمله: مقاومت به آفات و بیماری‌ها، کنترل علف‌های هرز، تولید مواد دارویی، بهبود عطر و رایحه‌ی گیاهان زینتی و گرده‌افشانی گیاهان بذری، بهبود عطر میوه و سبزیجات گردد (ورپورت و همکاران، ۱۳۹۱). در زمینه اصلاح گیاهان دارویی آن‌چه که در اولویت اهداف اصلاحی قرار می‌گیرد، ارتقاء کمیت و کیفیت آن دسته از ترکیبات متابولیتی و مواد مؤثر موجود در اندام این گیاهان است که مورد نیاز صنایع وابسته می‌باشد (عیوضی، ۱۳۹۰).

1- Verpoorte
2- Galili

گیاهان دارویی خانواده کاسنی به دلیل انعطاف اکولوژیک بسیار زیاد نسبت به اقلیم‌های متنوع، ذخایر ژنتیکی مهمی محسوب می‌شوند. در این خانواده جنس *Achillea* دارای ۸۵ گونه است که بیشتر در اروپا، آسیا و قسمت‌هایی از آمریکای شمالی پراکنده هستند (کندن[1] و همکاران، ۲۰۰۳). گونه بومادران هزاربرگ، یکی از گونه‌های با ارزش دارویی و صنعتی موجود در مراتع ایران از این تیره گیاهی است. این گیاه به طور خودرو در دشت‌ها، کنار جاده‌ها و نواحی کوهستانی می‌روید (زرگری، ۱۳۷۵).

بومادران هزاربرگ با نام علمی *Achillea millefolium* L. گیاهی علفی، چندساله و از لحاظ ژنتیکی تتراپلوئید (۲n=۴x=۳۶) (فارسی و همکاران، ۱۳۸۰) متعلق به خانواده گل‌ستاره‌ای‌ها[2] می‌باشد (پولسن[3]، ۲۰۰۲؛ کاوال کنتی[4] و همکارن، ۲۰۰۶؛ امیدبیگی، ۱۳۹۰). این گیاه در نقاط مختلف ایران و جهان می‌روید (شمس اردکانی و همکاران، ۱۳۸۴) و شامل بیش از ۱۰۰ گونه در سراسر جهان می‌باشد که ۱۹ گونه از این جنس از جمله *Achillea millefolium* در ایران شناخته شده است (جایمند و همکاران، ۱۳۸۳).

بومادران، گیاه دارویی شناخته‌شده‌ای است که هزاران سال است در درمان انواع مختلفی از اختلالات و بیماری‌ها به‌خصوص بیماری‌های عفونی مورد استفاده قرار می‌گرفته است (آرورا و کایور[5]، ۱۹۹۹). این گیاه به‌فراوانی در طب سنتی برای درمان بیماری‌ها به طور عام و زخم‌ها و سوختگی‌ها به طور خاص، مورد استفاده بوده است (تاجیک و شکوهی ثابت جلالی، ۱۳۸۷). کارکردهای دارویی مختلف بومادران مانند درمان زخم‌ها و فعالیت‌های ضدالتهابی و ضداسپاسم،

1- Candan
2- Asteraceae
3- Paulsen
4- Cavalcanti
5- Arora and Kaur

آن را به عنوان یک گیاه مهم دارویی مطرح ساخته است (بندک[1] و همکاران، ۲۰۰۷). بومادران در فارماکوپه‌های مختلفی در جهان و همچنین در فارماکوپه ایران به عنوان یکی از گیاهان دارویی مهم معرفی گردیده است (قاسمی دهکردی و همکاران، ۱۳۸۲). در برخی مناطق دنیا علاوه بر استفاده‌های دارویی از گونه *millefolium* به عنوان گیاه زینتی و پوششی نیز استفاده می‌کنند (امین[2] و همکاران، ۲۰۰۸).

امروزه توجه عمومی نسبت به استفاده دارویی از این گیاه گسترش یافته است و گزارش‌های متعددی در مورد کاربرد فرآورده‌های تهیه شده از بومادران در درمان انواع مختلفی از اختلالات و بیماری‌ها وجود دارد (تاجیک و شکوهی ثابت جلالی، ۱۳۸۷). گیاه بومادران عمدتاً حاوی اسانس، فلاونوئید، آلکالوئید و تانن می‌باشد (شمس اردکانی و همکاران، ۱۳۸۴). اسانس گونه *Achillea millefolium* دارای ترکیب‌هایی از جمله مونوترپن و سسکوئی‌ترپن‌های مختلف به عنوان اجزای اصلی بوده (جایمند و رضایی، ۱۳۸۳) که ترکیبات عمده اسانس آن شامل پینن[3]، کاریوفیلن[4](اردکانی[5] و همکاران، ۲۰۰۶)، کامفور[6]، میرسن[7]، لینالول[8] و سینئول[9] می‌باشد (اینوسنتی[10] و همکاران، ۲۰۰۷). روغن اساسی بومادران دارای تأثیرات مهارکنندگی بر باکتری‌های گوناگون می‌باشد (بارل[11] و همکاران، ۱۹۹۱). همچنین اسانس گیاه در زمینه‌های

1- Benedek
2- Amin
3- Pinene
4- Caryophyllene
5- Ardekani
6- Camphor
7- Myrcene
8- Linalool
9- Cineol
10- Innocenti
11- Barel

گوناگون دارویی، آرایشی، بهداشتی و غذایی اهمیت و کـاربرد وسـیعی دارد (شـمس اردکـانی و همکاران، ۱۳۸۴).

جهت استفاده از این گیاه چنان‌چه نمونه‌ها از طبیعت جمع‌آوری شوند، ضمن اثرات مخربی که این روش بر طبیعت خواهد گذاشت، پاسخ‌گوی نیاز رو به رشد نیز نخواهد بود. کشت این گیاه در شرایط مزرعه نیز تحت تأثیر شرایط آب و هوایی قرار گرفته و جواب‌گوی نیازها نخواهـد بـود. درصورتی‌که در شرایط آزمایشگاهی با روش‌هایی مانند کشت بافت یا انتقـال ژن کدکننـده آنـزیم سنتزکننده متابولیت موردنظر به باکتری یا مخمر می‌توان متابولیت‌های باارزش موردنظر را در تمام فصول سال و با مقدار و کیفیت دلخواه تولید نمود. انتظار می‌رود بیوتکنولوژی نقش زیادی در تولید محصولات گیاهان دارویی از طریق بیوسنتز و مهندسی ژنتیک داشته باشد، به طوری که از وابستگی به مقادیر بالای نمونه‌های گیاهی کاسته و فشار ازبین‌برنده بر تعدادی از منابع بیوژنتیک کـه از منـابع طبیعی و جنگل‌های منطقه‌ای برداشت می‌شوند را کاهش دهد.

۱-۱-۱- اهمیت اجرای طرح

مطالعات بیوتکنولوژیکی در زمینه گیاهان دارویی بیشتر بـر شناسـایی مسـیر بیوسـنتزی و ژن‌های دخیل به منظور یافتن راهکارهای مناسـب جهـت تولیـد بیشـتر بـا هزینـه کمتـر متمرکـز می‌باشد. از یک سو، روشن‌سازی مسیرهای بیوسنتزی و تعیین تـوالی ژن‌هـای دخیـل و مشـخص کردن نقش متابولیت‌های ثانویه در یک اکوسیسـتم مـی‌توانـد دیـد جدیـدی را در زمینـه توسـعه کشاورزی پایدار ایجاد کند و از سـویی دیگـر، بـا توجـه بـه اهمیـت اقتصـادی ترکیبـات ترپنـی دست‌ورزی متابولیسم ترپن‌های گیاهی توجه زیادی را در بیوتکنولوژی گیاهی بـه خـود معطـوف

داشته است. با توجه به کاربردهای فراوان پینن و لینالول در صنایع مختلف و نیز ژن گلیسرآلدهید۳- فسفات دهیدروژناز[1] در مطالعات بیان ژن و نیز دیدگاه‌های مختلفی که ممکن است مورد بررسی قرار گیرند، مانند مهندسی هترولوگوس در سایر گونه‌های گیاهی یا در میکروب‌هایی مانند باکتری و مخمر، نیاز به شناخت توالی این ژن‌ها در گیاهان مختلف ممکن است در سال‌های آتی افزایش پیدا کند.

از آن‌جایی که پینن و لینالول از ترکیبات اصلی اسانس بومادران می‌باشند، لذا این گیاه می‌تواند منبع مناسبی برای جداسازی ژن‌های کدکننده آنزیم‌های پینن سنتاز و لینالول سنتاز باشد. به منظور رسیدن به این اهداف شناخت و تعیین توالی ژن‌های مسیر بیوسنتزی آن‌ها نیاز می‌باشد اما با این وجود تاکنون هیچ اطلاعاتی در مورد ژن‌های پینن سنتاز و گلیسرآلدهید۳- فسفات دهیدروژناز و لینالول سنتاز در گیاه بومادران وجود ندارد و تنها اطلاعات بسیار محدودی در مورد چند ژن دیگر از خانواده ترپنوئید بومادران (پازوکی و رجبی معماری) در بانک ژن موجود است.

ژن‌های پینن سنتاز و لینالول سنتاز و گلیسرآلدهید۳- فسفات دهیدروژناز، به ترتیب ژن‌های کدکننده‌ی آنزیم‌های سنتزکننده در مسیر بیوسنتز مونوترپن‌های پینن و لینالول و آنزیم گلیسرآلدهید۳- فسفات دهیدروژناز یک آنزیم کلیدی در مسیر گلیکولیز می‌باشند. به همین جهت شناسایی و جداسازی ژن‌های کدکننده پینن سنتاز، لینالول سنتاز و گلیسرآلدئید۳- فسفات دهیدروژناز از گیاه بومادران گام مؤثری در یافتن راهکارهای هوشمندانه برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه از جمله مواد مؤثره دارویی و ارزشمند این گیاه و همچنین بررسی میزان بیان ژن‌های آن خواهد بود.

1- Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)

۱-۲- هدف اجرای طرح

۱- جداسازی ژن‌های کدکننده آنزیم‌های پینن سنتاز، گلیسرآلدهید۳- فسفات دهیدروژناز و لینالول سنتاز از گیاه بومادران با طراحی پرایمرهای دژنره مناسب و با استفاده از روش PCR

۲- تعیین توالی ژن‌های جداسازی شده موردنظر

۳- انجام آنالیزهای بیوانفورماتیکی

۴- ثبت توالی ژن‌های جداسازی شده در بانک ژن جهانی (NCBI)

فصل دوم

مروری بر منابع موجود

فصل دوم: مروری بر منابع موجود

۲-۱- تاریخچه گیاهان دارویی

دانستن تاریخ هر علمی در فهم و استفاده از آن مؤثر است. تاریخچه استفاده از گیاهان دارویی و طب سنتی حاصل تلاش، سعی و خطاهای بشر می‌باشد. در مسیر تکاملی طب گیاهی، اصول علم تجربی، اسطوره، فلسفه و مذهب طی هزاران سال بر آن تأثیر گذاشته‌اند (مینائی، ۱۳۸۱). سابقه استفاده از گیاهان دارویی برای درمان بیماری‌ها و به دست آوردن سلامتی به چند هزار سال قبل از میلاد مسیح برمی‌گردد. مصریان، رومیان و چینی‌ها از جمله جوامع انسانی پیشرو در مصرف گیاهان دارویی بوده‌اند که از خواص گیاهان اطلاع داشته و آن را مکتوب نموده‌اند (صفایی‌خرم و هکاران، ۱۳۸۹).

از نظر تاریخی گیاهان دارویی اهمیت فراوانی در توسعه جوامع داشته‌اند و تحقیقات وسیعی برای یافتن فرآورده‌ها و مواد طبیعی دارویی گیاهی در طول تاریخ انجام شده است (فیاض و همکاران، ۱۳۹۰). اختراع نوشتن سبب شد تا دانش گیاهی نیز ثبت و باقی بماند. در خاورمیانه اولین نوشته‌ها در لوحه‌های گلی پاپیروس مصری یافت شده در بین‌النهرین حاوی جزئیات استفاده از گیاهان دارویی در درمان بیماری‌ها است. حدود ۲۰۰۰ سال قبل از میلاد، بانیپال پادشاه سومری‌ها دستور جمع‌آوری اولین مفردات پزشکی دنیا را صادر نمود که در آن ۲۵۰ داروی گیاهی لیست شده است. پاپیروس ابرز[1] که حدود ۱۵۰۰ سال قبل از میلاد نوشته شده است، شامل ۸۷۶ نسخه می‌باشد که در آن گیاهان زیادی به چشم می‌خورد (مینائی، ۱۳۸۱). تئوفراست[2]، یکی از شاگردان ارسطو بوده که مکتب درمان با گیاه را بنیان‌گذاری نمود. یکی از قدیمی‌ترین مفردات

1- Ebers
2- Theophrastus

پزشکی که در قرن اول میلادی نوشته شده نوشته شده است، کتاب دیوسکرایدز پدانیوس[1] به نام دماتریا مدیکا[2] می‌باشد که حاوی ۶۰۰ گیاه درمان‌گر همراه با تصویر، خواص درمانی، توضیح، روش تهیه و اخطار مربوطه در آن درج شده است (امیدبیگی، ۱۳۷۹؛ مینائی، ۱۳۸۱). در قرن ۱۷ میلادی باغ دارویی چلسی برای تحقیقات داروسازی استفاده شد. در سال ۱۹۶۸ انجمن پزشکی گیاهی بریتانیا تأسیس شد و فارماکوپه[3] گیاهی بریتانیا را منتشر ساخت. در قرن اخیر اتحادیه اروپا قانون لزوم انجام آزمایشات بالینی بر روی گیاهان دارویی همانند داروهای شیمیایی را وضع کرده است (مینائی، ۱۳۸۱).

انسان در تمام دوران تاریخی چاره‌ای جز توسل به گیاهان نداشت. تاریخ طب در کشور ما مربوط به دوره آریایی بوده و اوستا (۶۵۰۰ ق.م) اولین کتابی است که از گیاهان دارویی سخن گفته است. اولین پزشک ایرانی تریتیه پدر گرشاسب پهلوان بوده است که از کاربرد گیاهان دارویی و عصاره آنها اطلاع داشته است و قدیمی‌ترین گیاه دارویی در طول تاریخ، «هوم» گیاه مقدس آیین زرتشت بوده است (سنجری، ۱۳۸۸). در قرن هشتم تا دهم میلادی ابوعلی‌سینا و محمد زکریای رازی به دانش درمان با گیاه رونق زیادی دادند و کتاب‌های قانون و الحاوی را به رشته تحریر درآوردند (امیدبیگی، ۱۳۷۹).

۲-۲- خصوصیات گیاهان دارویی

1- Dioscarides Pedanios
2- De Materia Medica
3- Pharmacopoeia

در پیکره گیاهان دارویی مواد خاصی ساخته و ذخیره می‌شوند که دارای خواص متعددی هستند، از جمله این که می‌توانند به عنوان مواد مؤثره[1] برای مداوای برخی بیماری‌ها مورد استفاده قرار گیرند. این مواد طی یک سلسله فرآیندهای ویژه و پیچیده بیوشیمیایی به مقدار بسیار کم (کمتر از یک درصد وزن خشک گیاه) ساخته می‌شوند و به متابولیت‌های ثانویه نیز معروف‌اند. این مواد اساساً از ترکیبات سازنده گیاه نبوده و ترکیبات فرعی هستند. ممکن است اندام خاصی حاوی مواد مؤثره موردنظر باشد و معمولاً از اندام موردنظر به صورت تازه استفاده نمی‌شود. بر اساس نوع متابولیت‌های ثانویه گیاهان به صورت دارویی، ادویه‌ای و عطری مورد استفاده می‌باشند (امیدبیگی، ۱۳۷۹).

۲-۳- دلایل رویکرد به گیاهان دارویی

۱- عوارض جانبی و اثرات سوء داروهای شیمیایی

۲- عدم ساخت مصنوعی برخی مواد فعال بیولوژیک در صنایع داروسازی

۳- استفاده روزافزون اسانس‌ها و مواد مؤثره در ساخت مواد شیمیایی خانگی نظیر شامپو، صابون، عطر، اودکلن، خوشبوکننده‌های هوا و غیره

۴- استفاده روزافزون در صنایع غذایی؛ کنسروسازی، شیرینی‌سازی، نوشابه‌سازی و غیره به منظور بهبود در رنگ، طعم و مزه آن‌ها (امیدبیگی، ۱۳۷۹)

۵- اشتهاآور بودن و افزایش سلامت دستگاه گوارش (ماسارووویکووا و کرالووا[2]، ۲۰۰۶).

۲-۴- اهمیت گیاهان دارویی

1- Active substances
2- Masarovičová and Králová

گیاهان دارویی از ارزش و اهمیت خاصی در تأمین بهداشت و سلامت جوامع هم به لحاظ درمان و هم پیشگیری از بیماری‌ها برخوردار بوده و هستند. این بخش از منابع طبیعی قدمتی هم‌پای بشر داشته و یکی از مهم‌ترین منابع تأمین غذا و داروی بشر در طول نسل‌ها بوده‌اند (فیاض و همکاران، ۱۳۹۰). گیاهان دارویی از مواهب خدادادی هستند که میراثی ارزشمند برای سلامت جامعه بشری محسوب می‌شوند. براساس آمار سازمان بهداشت جهانی[1] حدود ۸۰ درصد از مردم دنیا برای مراقبت‌های اولیه بهداشتی ترجیح می‌دهند که عصاره گیاهان و یا ماده مؤثره آن‌ها را مصرف نمایند (آذرنیوند و همکاران، ۱۳۸۸). امروزه گیاهان دارویی در ایالات متحده آمریکا به عنوان مکمل‌های غذایی عرضه می‌شوند و این قانون کلی در سراسر آمریکا است، در حالی که در قسمت‌های دیگر جهان گیاهان دارویی به عنوان دارو عرضه می‌گردند (صفایی‌خرم و هکاران، ۱۳۸۹).

رویکرد جهانی مردم به سمت استفاده از داروهای با منشأ طبیعی در چند دهه اخیر موجب توسعه روزافزون تولید گیاهان دارویی، فرآوری و فرمولاسیون داروهای گیاهی و تجارت آن در سطح دنیا گردیده است. کشورهای آسیایی به خصوص چین به دلیل تنوع آب و هوایی و پوشش متنوع گیاهی، تأمین‌کننده‌های اصلی گیاهان و کشورهای اروپائی، آمریکایی و برخی از کشورهای آسیایی تولیدکننده عمده داروهای گیاهی محسوب می‌شوند (سنجری و همکاران، ۱۳۸۸). در سال ۲۰۰۲ فروش جهانی داروهایی با منشأ گیاهی از طریق نسخه و بدون نسخه حدود ۳۰ میلیارد دلار بوده است. گروه‌های اصلی داروهای مشتق‌شده از گیاهان شامل ترپن‌ها (۳۴ درصد)، گلیکوزیدها (۳۲ درصد)، آلکالوئیدها (۱۶ درصد) بوده و سایر انواع ۱۸ درصد تجارت را به خود اختصاص داده‌اند (سنجری و همکاران، ۱۳۸۸). مطابق گزارش سازمان

1- World Health Organization (WHO)