دانشکده‌ی علوم پایه

گروه آموزشی زیست شناسی

پایان‌نامه برای دریافت درجه‌ی کارشناسی ارشد

در رشته‌ی زیست شناسی گرایش فیزیولوژی گیاهی

عنوان:

تاثیرات ترکیبات مختلف هورمونی و برخی القاکننده ها بر متابولیت های ثانویه در کالوس گیاه داتوره *Datura metel*

اساتید راهنما:

دکتر سید مهدی رضوی

دکتر علیرضا قاسمیان

استاد مشاور:

دکتر عزت نوری زاده

پژوهشگر:

مهرداد نورآذر

زمستان 1396

نام خانوادگی دانشجو: نورآذر نام: مهرداد

عنوان پایان‌نامه:

تاثیرات ترکیبات مختلف هورمونی و برخی القاکننده ها بر متابولیت های ثانویه در کالوس گیاه داتوره *Datura metel*

اساتید راهنما: دکتر سید مهدی رضوی - دکتر علیرضا قاسمیان

استاد مشاور: دکتر عزت نوری زاده

مقطع تحصیلی: **کارشناسی ارشد** رشته: زیست شناسی

گرایش: فیزیولوژی گیاهی دانشگاه: **محقق اردبیلی**

دانشکده: علوم پایه تاریخ دفاع: 1396/10/4 تعداد صفحات: 111

چکیده:

گیاه تاتوره با نام علمی (*Datura metel* L.) یک ساله، با بوی نامطبوع و سمی بوده و متعلق به تیره سیب زمینی (*Solanaceae*) می باشد که به وسیله بذر تکثیر می یابد. این گیاه به دلیل دارا بودن مواد دارویی نظیر آتروپین و هیوسین (اسکوپولامین) جزو گیاهان دارویی محسوب می شود. با توجه به پیشرفت‌های اخیر در زمینه فنون کشت بافت و استخراج متابولیت‌های ثانویه از این طریق، در این پژوهش ریزنمونه برگ گیاه مذکور از نظر کالوس‌زایی و استفاده از الیسیتورها در جهت افزایش متابولیت‌های ثانویه مورد بررسی قرار گرفت. در ابتدای کار به علت این که جوانه زنی در بذر گیاه تاتوره رخ نداد، از تیمارهای مکانیکی شامل کشت جنین، ایجاد شکاف با اسکالپل، سوراخ کردن بذر با سوزن و ساییدن بذر با استفاده از سنباده، استفاده شد. تیمار کشت جنین و تیمار با اسکالپل مناسب ترین تیمارها بودند که به ترتیب باعث جوانه زنی بذرها در حدود 87 و 55 درصد شدند. ولی به دلیل سهولت ایجاد تیمار با اسکالپل از این تیمار برای ادامه پژوهش استفاده شد. در مرحله دوم پژوهش از تیمارهای هورمونی 2و4- دی کلروفنوکسی استیک اسید (2,4-D) به عنوان اکسین و کینتین (Kin) به عنوان سیتوکینین در غلظت های 0/5، 1 و 2 میلی گرم بر لیتر برای القای کالوس در ریزنمونه برگ گیاه تاتوره استفاده شد. نتایج حاصل نشان داد که غلظت 1 میلی گرم بر لیتر 2,4-D و 1 میلی گرم بر لیتر Kin بهترین تیمار هورمونی برای القای کالوس می باشد. در ادامه ی پژوهش از همین تیمار هورمونی به عنوان شاهد برای بررسی تاثیر الیسیتورهای مورد استفاده شامل سرمای 8 درجه سانتی گراد (24 ساعت و 48ساعت)، آمونیوم نیترات با غلظت (10میلی مولار و 30 میلی مولار) و پوترسین با غلظت (1/5 میلی مولار و 3 میلی مولار) بر روند تولید متابولیت های ثانویه (آلکالوئیدها) استفاده شد. نتایج حاصل نشان داد که از بین 6 تیمار اعمال شده در مقایسه با شاهد، 24 ساعت سرمای 8 درجه سانتی گراد به عنوان تیمار فیزیکی و 1/5 میلی مولار پوترسین به عنوان تیمار شیمیایی مناسب ترین تیمارها بودند که سبب افزایش دو برابری میزان آلکالوئید تام نسبت به شاهد شدند.

کلید واژه‌ها: آلکالوئید تام، القای کالوس، الیسیتور، تاتوره (*Datura metel* L.)، کینتین، 2,4-D

فهرست مطالب

شماره و عنوان مطالب **صفحه**

فصل اول: مقدمه

1-1- گیاهان

دارویی..... 2

1-1-1- دلایل رویکرد به گیاهان دارویی

..... 5

1-2- کشت بافت

..... 7

1-2-1- تاریخچه کشت بافت در گیاهان .....

9

1-2-2- کاربرد کشت بافت کشت بافت .....

12

1-2-3- دلایل رویکرد به کشت بافت .....

13

1-2-4- انواع کشت بافت (یا کشت درون شیشه ای) .....

15

1-2-5- مزایای کشت بافت گیاهی .....

18

1-2-6- تاثیر مواد گیاهی در کشت بافت .....

19

1-3- مفهوم متابولیسم، متابولیت های اولیه و متابولیت های ثانویه .....

20

1-4- کاربرد متابولیت های ثانویه گیاهی .....

23

1-5- مسیر اصلی بیوسنتزی متابولیت های ثانویه
23.....
1-6- راه کارهای افزایش متابولیت های ثانویه گیاهی از طریق کشت بافت .....
28
1-7- الیسیتورها 28
1-7-1- الیسیتورهای زیستی .....
29
1-7-2- الیسیتورهای غیر زیستی .....
29
1-7-3- مسیر سیگنال رسانی مرتبط با فعالیت الیسیتورها جهت افزایش میزان متابولیت ثانویه در گیاه .....
32
1-8- طبقه بندی مواد موثره گیاهان دارویی .....
34
1-8-1- آلکالوئیدها .....
35
1-8-1- نقش آلکالوئیدها در گیاهان .....
35
1-8-2- گلیکوزیدها .....
36
1-8-3- اسانس ها .....
37
1-9- محیط کشت .....
38
1-9-1- انتخاب محیط کشت.....
39
1-9-2- محیط کشت MS یا موراشیگ و اسکوگ .....
40
1-10- تنظیم کننده های رشد .....
41

1-10-1- اکسین ها 42
1-10-2- سیتوکینین ها..... 44
1-11- عوامل موثر بر رشد و نمو در شرایط آزمایشگاه 45
1-12- القای کالوس 46
1-12-1- انواع کالوس 47
1-12-2- عوامل موثر بر تشکیل کالوس 48
1-13- واکشت 49
1-14- قهوه ای شدن بافت ها در حین کشت و واکشت 50
1-15- مشخصات گیاه شناسی 52
1-15-1- مشخصات تیره سولاناسه 52
1-15-2- مشخصات جنس تاتوره (*Datura*) 53
1-15-3- کاربرد و اهمیت گونه های جنس *Datura* 54
1-15-4- خاستگاه و پراکنش گیاه دارویی تاتوره 55
1-15-5- مشخصات گونه *Datura metel* 56
1-15-6- مواد موثره ی گونه *Datura metel* 58

1-15-6-1- مسیر بیوسنتزی تروپان آلکالوئیدها (هیوسیامین و اسکوپولامین) .....
59
1-16- اهداف پژوهش .....
62

فصل دوم: مواد و روش ها

2-1- ماده گیاهی 64
2-1-1- سترون کردن (استریل کردن) بذرها .....
64
2-2- محیط کشت 65
2-2-1- محلول پایه ماکروالمان ها (10 برابر یا 10x) .....
65
2-2-2- محلول پایه میکروالمان ها (100 برابر یا 100x) .....
65
2-2-3- محلول پایه آهن (100 برابر یا 100x) .....
67
2-2-4- محلول پایه ویتامین ها و ترکیبات ضروری (1000 برابر یا 1000x)
..... 67
2-2-5- محلول پایه هورمون ها .....
68
2-2-6- روش تهیه یک لیتر محیط کشت .....
68
2-3- طرح آزمایش 69
2-3-1- آزمایش اول: بررسی جوانه زنی بذرهای گیاه تاتوره (*D.metel*) .....
69
2-3-1-1- شکستن خواب و تحریک جوانه زنی بذر تاتوره با تیمارهای مکانیکی .....
69

2-3-2- آزمایش دوم: بررسی القای کالوس در گیاه تاتوره (*D.metel*) .....
71
2-3-2-1-انتخاب ریزنمونه .....
71
2-3-3- آزمایش سوم: بررسی تاثیر الیسیتورها بر تولید متابولیت های ثانویه گیاه تاتوره (*D.metel*)
73.....
2-3-3-1- واکشت .....
75
2-4- عصاره گیری از کالوس های گیاه (*D.metel*) .....
75
2-5- تعیین مقدار آلکالوئید کل با دستگاه اسپکتروفتومتری .....
76
2-6- طرح آزمایش و بررسی های آماری .....
77
2-7- مشخصات دستگاه ها و ترکیبات شیمیایی .....
77

فصل سوم: نتایج پژوهش

3-1- نتایج حاصل از بررسی جوانه زنی بذرهای تاتوره (*D.metel*) .....
80
3-2- نتایج القای کالوس در گیاه (*D.metel*) .....
84
3-3- نتایج مربوط به سنجش میزان آلکالوئید تام عصاره های متانولی کالوس ها، تحت تاثیر الیسیتورها .....
88

فصل چهارم: بحث و نتیجه گیری

4-1- بحث و نتیجه گیری در نتایج حاصل از آزمایش اول (بررسی جوانه زنی) .....
95
4-2- بحث و نتیجه گیری در نتایج حاصل از آزمایش دوم (القای کالوس) .....
97
4-3- بحث و نتیجه گیری در نتایج حاصل از آزمایش سوم (تاثیر الیسیتورها بر میزان آلکالوئید تام) .....
98
پیشنهادات .....
102
فهرست منابع و مآخذ .....
103

فهرست جدول‌ها

شماره و عنوان جدول **صفحه**

جدول (1-1): گروه های مختلف متابولیت ثانویه، منابع و عملکرد زیستی آن ها..... 25

جدول (2-1): غلظت نمک‌ها و ویتامین‌های موجود در محیط کشت پایه MS 66

جدول (2-2): ترکیبات محیط کشت مورد استفاده جهت القای کالوس در گیاه تاتوره (*Datura metel* L.)..... 72

جدول (2-3): ترکیبات محیط کشت برای بررسی تاثیر الیسیتورها بر تولید آلکالوئید تام در گیاه *D.metel* 74

جدول (3-1): نتایج تجزیه واریانس (میانگین مربعات) صفات مورد مطالعه در تیمارهای مکانیکی بذر *D.metel* 80

جدول (3-2): مقایسه میانگین صفات مورد مطالعه تحت تاثیر تیمارهای مکانیکی مختلف در گیاه (*D.metel*) 81

جدول (3-3): نتایج تجزیه واریانس صفات مورد بررسی کالوس های حاصل از تیمارهای هورمونی در (*D.metel*)..... 84

جدول (3-4): نتایج تجزیه واریانس میزان آلکالوئید تام عصاره های متانولی تحت تاثیر الیسیتورها در (*D.metel*)..... 89

جدول (3-5): مقایسه میانگین میزان آلکالوئید تام عصاره های متانولی تحت تاثیر الیسیتورها در گیاه (*D.metel*) 90

فهرست شکل‌ها

شماره و عنوان شکل **صفحه**

شکل (1-1): شمایی از تاریخچه کشت بافت 12

شکل (1-2): مسیرهای اصلی بیوسنتز متابولیت های ثانویه 27

شکل (1-3): طبقه بندی الیسیتورها 30

شکل (1-4): مجموعه پاسخ های دفاعی مرتبط با تیمار گیاه توسط الیسیتورها 33

شکل (1-5): اولین رویدادهای فعال شده توسط الیسیتورها در گیاه 34

شکل (1-6): ساختار شیمیایی 4 نوع اکسین 43

شکل (1-7): ساختار شیمیایی 3 نوع سیتوکینین 45

شکل (1-8): گیاه *D.metel* رشد یافته از بذر در محیط کشت MS 57

شکل (1-9): گیاه تاتوره (*D.metel*) و اندام های مختلف آن (گل، میوه، برگ، بذر و ...) 58

شکل (1-10): چرخه بیوسنتزی تروپان آلکالوئیدها 61

شکل (2-1): قلمه زنی کیاه تاتوره در محیط کشت MS تحت شرایط استریل 72

شکل (2-2): الف) اتوکلاو ب) ژرميناتور 78

شکل (2-3): الف) هود لامینار فلو ب) pH متر ج) ترازوی حساس 78

شکل (3-1): نمودار اثر تیمارهای مکانیکی مختلف بر درصد جوانه زنی بذر تاتوره .....
82
شکل (3-2): گیاهچه های حاصل از تیمار با اسکالپل در محیط کشت MS .....
83
شکل (3-3): نمودار مقایسه میانگین تاثیر تیمارهای مکانیکی بر GR، GI و MGT بذر تاتوره .....
83
شکل (3-4): کالوس زایی در ریزنمونه ها تحت تیمار هورمونی MS+2,4-D (1 mg/L)+Kin (1 mg/L) .....
85
شکل (3-5): میانگین وزن تر کالوس ها گیاه تاتوره در سطوح مختلف هورمونی .....
86
شکل (3-6): میانگین وزن خشک کالوس ها در گیاه تاتوره در سطوح مختلف هورمونی .....
87
شکل (3-7): میانگین محتوای ماده خشک کالوس های گیاه تاتوره در سطوح مختلف هورمونی .....
87
شکل (3-8): منحنی استاندارد اسکوپولامین .....
88
شکل (3-9): میانگین میزان آلکالوئید تام عصاره های متانولی تحت تاثیر الیسیتورها .....
91
شکل (3-10): الف) تیمار 24 ساعت سرمای 8 °C ب) تیمار 1/5 میلی مولار پوترسین .....
92
شکل (3-11): تصویری از کالوس ها زیر لوپ آزمایشگاهی .....
93
شکل (3-12): تصویری از غده ها و کرک های حاوی عصاره در زیر لوپ آزمایشگاهی .....
93

فصل اول:

مقدمه

1-1- گیاهان دارویی[1]

گیاهان دارویی گیاهانی هستند که یک یا برخی از اندام های آنها حاوی ماده ی مؤثره است و این اندام ها به صورت تازه، خشک شده یا فرآوری شده جهت تشخیص، درمان،پیشگیری، کمک به اعمال فیزیولوژیک و حفظ بهداشت بدن انسان یا حیوانات و دیگر گیاهان به کار می روند. این ماده مؤثره که کم تر از ۱٪ وزن خشک مواد موجود در گیاه را تشکیل می دهد، طی یک سلسله فرایندهای ویژه وپیچیده ی بیوشیمیایی به مقدار بسیار کم تولید می شوند. این ترکیبات متابولیت های ثانویه[2] نامیده می شوند (امیدبیگی، ۱۳74).

درواقع گیاهانی که حداقل دارای صفات زیر باشند، گیاه دارویی، نامیده می شوند:

۱- در پیکر این گیاهان مواد ویژه ای به عنوان مواد مؤثر یا متابولیت های ثانویه ساخته و ذخیره می شوند که برای مداوای برخی از بیماری ها مورد استفاده قرار می گیرند. مواد مذکور طی فرآیندهای ویژه و پیچیده ی بیوشیمیایی و به مقدار بسیار کم ساخته می شوند.

۲- اغلب ممکن است اندام ویژه ای چون ریشه، برگ ها، ساقه ، گل، میوه و غیره بیشترین مواد مؤثر را داشته باشند، بنابراین همیشه نمی توان کل اندام گیاه را منبع ماده دارویی ویژه ای دانست.

3- اندام گیاهی برداشت شده، آماده سازی و فرآوری می شوند، یعنی تحت تأثیر عملیات ویژه ای مانند جداسازی، خرد شدن، خشک کردن، تخمیر و غیره قرار گرفته و سپس استفاده می شوند.به طور معمول

1- Medicinal plants
2- Secondary metabolites

این اندام ها به صورت سنتی و فقط با خشک کردن به عنوان کالای عطاری عرضه می شوند (ابراهیم پور و عیدی زاده، 1388).

همچنین کاشت، داشت و برداشت گیاهان دارویی نیز به منظور استفاده از متابولیت های ثانویه آن ها انجام می گیرد. امروزه پوشش و تراکم گیاهان دارویی موجود عرصه های طبیعی با برداشت مستقیم بیش از اندازه، چرای بی رویه و تبدیل مراتع و جنگل ها به اراضی زراعی شدیداً در حال کاهش و تخریب است و حفظ آن مدیریت ویژه ای را بر اساس حساسیت ها و قابلیت های این گیاهان طلب می کند. بعضی از گیاهان در مواجهه با تنش های محیطی مواد ثانویه تولید می کنند که اغلب به عنوان مواد دارویی و صنعتی مورد استفاده قرار می گیرد. بنابراین محیط های دارای تنش می توانند برای تولید گیاهان دارویی مورد توجه قرار گیرند.از طرفی تولید مواد ثانویه صرف انرژی بیشتری را برای این گیاهان به دنبال دارد و توان رقابتی آنها را در مقایسه با گیاهان همراه کاهش می دهد. در چنین شرایطی اعمال چرای متعادل، اهلی کردن گیاهان دارویی و احیاء رویشگاه ها برای حفظ و بقاء این گیاهان ضروری است (هادی، 1383).

گیاهان دارویی به دلیل مواد دارویی طبیعی موجود در اسانس و عصاره ی آنها یکی از مهم ترین منابع دارویی می باشند که از هزاران سال پیش برای درمان بیماری ها کاربرد داشته اند (هادی، ۱۳۸۳). در سال 1956 یک شرکت دارویی در آمریکا[1] اولین بیمار را از طریق متابولیت‌های حاصل از کشت توده-ای سلول درمان کردند. کول و استابو (1967) و هبل و همکاران (1968) توانستند مقادیر بیشتری از ترکیبات ویسناجین[2] و دیوسنجین[3] را با استفاده از کشت بافت در مقایسه با کشت طبیعی (استخراج از گیاه کامل) به دست آورند (فرشادفر و بخشی،1389).

1- Pfizer Inc
2- Visnagin
3- Diosgenin
4- Tripathi

اسانس یا متابولیت های ثانویه موجود در گیاهان دارویی امروزه کاربردهای بسیاری از لحاظ صنعتی، تجاری، پزشکی، داروسازی و ... دارند. به علاوه برخی از داروهای شیمیایی نیز با الگوبرداری از مواد گیاهی ساخته شده اند (تریپاتی[1]، ۲۰۰۳).

یک داروی با ارزش که بخشی از آن از طریق کشت سلول گیاهی تولید می‌شود پاکلیتاکسل[2] است. یک داروی ضد سرطان که در اصل از پوست درختان سرخدار[3]50-60 ساله استخراج می‌شود (اوکسمان و اینزه[4]، 2004). برای بیش تر جمعیت دنیا گیاهان دارویی از مهم ترین منابع تهیه داروها جهت تامین امنیت زندگی می باشند. امروزه به دلیل اینکه سنتز مصنوعی این مواد مشکل می باشد و تولید مصنوعی از لحاظ اقتصادی مقرون به صرفه نیست در چنین در چنین مواردی استفاده از گیاهان دارویی وحشی، کشت شده و کشت سلولی گیاهان دارویی می تواند یک ابزار قدرتمند برای تولید متابولیت های ثانویه محسوب گردد (راویشانکار و ونکاتارامون[5]، ۱۹۹۸) امروزه، سازمان بهداشت جهانی اعلام نموده که بش از 80 درصد مردم دنیا هنوز در طب سنتی از گیاهان دارویی برای درمان استفاده می نمایند. گیاهان همچنین منبع بسیاری از درمان های جدید نیز می باشند. تقر یباً یک چهارم داروهای تولید شده حاوی عصاره های گیاهی یا ترکیباتی هستند که از مواد گیاهی به دست آمده اند یا براساس ترکیبات گیاهی مدل سازی شده اند (هادی، ۱۳۸۳).

استفاده از گیاهان دارویی تاریخچه طولانی داشته و مورد توجه زیادی بوده است. اگرچه مصرف داروهای گیاهی با توسعه صنایع شیمیایی محدود شده است، اما چشم انداز استفاده از این گیاهان رو به افزایش است (رشیدی و همکاران ۱۳۹۰) و با توجه به عوارض جانبی استفاده از دارو های شیمیایی، لزوم بهره گیری از طبیعت و گیاهان دارویی در سال های اخیر در جهت درمان و بهبود بیماری ها بیش از پیش مورد توجه صاحب نظران قرار گرفته و این امر لزوم تحقیق بیشتر در زمینه اثربخشی گیاهان دارویی را برای ما آشکار می سازد (مرشدی و همکاران، ۱۳۹۰).

1- Paclitaxel
2- Taxus brevifolia
3- Oksman & lnze
4- Ravishankar & Venkataramon

در سالیان اخیر تمایل به استفاده از گیاهان دارویی و ترکیبات حاصل از آن‌ها در حال افزایش است. در حال حاضر بیش از 40 درصد داروهای مصرف شده در کشورهای پیشرفته غربی، دارای منشآ گیاهی می‌باشد (موران[1] و همکاران، 2003).

جالب توجه این است که 52 درصد از تمام داروهای ضدسرطان تاکنون به طورمستقیم یا غیرمستقیم از منابع طبیعی مشتق شده است.

کشور ایران به علت تنوع اقلیمی، ویژگی های خاص ژئو مرفولوژیک مناطق مختلف و شرایط آب و هوایی متنوع، جایگاه تنوع رشد گیاهان مختلف از جمله گیاهان دارویی بوده و دارای پتانسیل های فراوانی است که باید شناسایی شوند و زمینه های مناسب بهره برداری از آنها فراهم آید. علی رغم آنکه این سرزمین زرخیز یکی از گنجینه های بزرگ گیاهان دارویی و معطر دنیا محسوب می شود، سهم کشور ما در فرآوری ، تولید و تجارت جهانی این محصولات ناچیز می باشد (امیدبیگی، 1374).

1-1-1- دلایل رویکرد به گیاهان دارویی

استفاده روز افزون مردم از گیاهان دارویی، هم در کشورهای توسعه یافته و هم در کشورهای در حال توسعه و همچنین تمایل شرکت های تولید کننده ی مواد دارویی به دارو های دارای منشاء گیاهی را به دلایل زیر می توان نسبت داد:

1- تهیه برخی از مواد مؤثّره‌ی فعال که در صنایع دارویی از اهمیت بسیار بر خوردار هستند به طور مصنوعی امکان پذیر نبوده و تنها به صورت طبیعی از گیاهان مورد نظر قابل استخراج اند. این دسته از مواد یا به طور کلی ساختمان شیمیایی ناشناخته ای دارند و یا به دلیل داشتن ساختمان شیمیایی بسیار پیچیده تهیه آن ها به صورت مصنوعی مشکل و مستلزم هزینه بسیار است (امیدبیگی، ۱۳۷۴).

۲- برخی از مواد طبیعی گیاهی به صورت مستقیم قابل استفاده نیستند یعنی در صورت استفاده مستقیم فاقد ارزش دارویی می باشند و پس از تأثیر فرآیندهای شیمیایی از اسانس و طعم مطلوب تری برخوردار خواهند بود (امیدبیگی، ۱۳۷۴).

5- Moran

۳- مواد دارویی شیمیایی به طور سریع اثر می بخشند و دارای یک تأثیر مشخص نیز می باشند و عوارض جانبی نا مطلوبی نیز بر بدن انسان بر جای می گذارند و همچنین آلودگی های زیست محیطی آنها کره زمین را تهدید می کند در حالی که مواد دارویی حاصله از گیاهان با آنکه اثر بخشی تدریجی دارند اما دارای اثرات مفید جانبی بسیاری می باشند و از این رو فواید جامعی از نظر دوام سلامت بدن دارند (امیدبیگی، ۱۳۷۴).

۴- گیاهان دارویی جزء ذخایر و منابع طبیعی هستند و بسیاری از کشورها کم یا زیاد از یک چنین منبعی برخوردارند که نوع تعداد و تنوع گونه های گیاهی بر اساس شرایط و موقعیت جغرافیایی هر منطقه متفاوت است (امیدبیگی، ۱۳۷۴).

5- مواد موثره گیاهان به خصوص عطریات و اسانس ها موارد استفاده متعدد در صنایع مواد شیمیایی خانگی و لوازم آرایشی دارند. (امیدبیگی، ۱۳۷۴).

۶- استفاده از مواد موثره گیاهان دارویی در صنایع غذایی روز افزون می باشد که از قدیم الایام معمول بوده اما اکنون در صنایع نوپای نوشابه سازی ، کنسروسازی ، شیرینی سازی جهت بهتر شدن طعم و رنگ و بوی محصولات در سطح دقیق تر و حساب شده تری استفاده می گردد (امیدبیگی، 1374)

۷- مواد موثره گیاهان دارویی علاوه بر این که مزه و طعم خوبی دارند اشتها آور نیز هستند و سبب هضم مواد غذایی و سلامت کار دستگاه گوارش می گردد (امیدبیگی، ۱۳۷۴).

8- مصرف طولانی داروهای شیمیایی یا در برخی موارد مصرف مقطعی این داروها می تواند عوارض جانبی بر جای گذاشته که بعضاً از خود بیماری نیز خطرناک تر هستند. همچنین استفاده ی مداوم، بی رویه و نادرست داروهای شیمیایی باعث ایجاد میکروب های بسیار مقاوم شده که داروهای شیمیایی بر روی آنها بی تاثیر و یا کم اثرند و در نتیجه بیماران باید به سوی آنتی بیوتیک ها و داروهای شیمیایی قوی تری روی آورند. در حالی که بسیاری از داروهای گیاهی ضمن اینکه اثرات مثبت فراوانی دارند، هیچ ضرر و عارضه ای را در پی نخواهند داشت (ابراهیم پور و عیدی زاده، 1388).

۹- در حال حاضر، استفاده بی رو به از ذخایر ژنتیکی، به ویژه گیاهان دارویی به آسیب پذیری منابع طبیعی منجر شده است. یکی از راهکارهای امید بخش و موفق در این زمینه تولید متابولیت های ثانویه و ترکیبات دارویی گیاهی در شرایط آزمایشگاهی و سیستم راکتورهای زیستی گیاهی است، که با فراهم آوردن امکان کنترل دقیق تر عوامل مؤثر در تولید بیشتر این متابولیت های ثانویه در موارد متعددی به تولید اقتصادی ترکیبات مهم گیاهی منتج می شود (تیسرات و برهو[1]، ۲۰۰۹).

1-2- کشت بافت[2]

یکی از بخش های مهم بیوتکنولوژی "کشت بافت" است که کاربردهای مختلف آن در زمینه گیاهان دارویی از جنبه های مختلفی قابل بررسی است. کشت سلول و بافت گیاهی که با عناوین کشت in vitro و یا کشت استریل نیز مطرح می شود، ابزاری مهم در مطالعات پایه و کاربردی بوده و نیز دارای کاربردهای تجاری است. اگرچه استریت (۱۹۷۷) در استفاده از این واژه، موارد محدودی مد نظرش بود، اما در حال حاضر به عملیاتی نظیر کشت سلول ها، بافت ها و اندام های استریل و اجزای آنها تحت شرایط مطلوب فیزیکی و شیمیایی در آزمایشگاه، کشت بافت گیاهی اطلاق می شود. کشت بافت گیاهی یک نام اختصاری برای کشت پروتوپلاست، کشت سلول، کشت بافت و کشت اندام گیاه می باشد. این انواع مختلف کشت، به عنوان یک عامل عمومی، شامل رشد مواد گیاهی عاری از میکروب در یک محیط گندزدایی شده، مانند محیط کشت غذایی ضدعفونی شده درون لوله ی آزمایش می باشد . در سال های اخیر روش های کشت بافت گیاهی به یک ابزار بسیار قوی برای تکثیر نژادی بسیاری از گونه های گیاهی تبدیل شده است (فرشادفر و بخشی، 1389).

به طور کلی به کشت مواد گیاهی عاری از میکروب اعم از بذر، جنین، بافت، سلول و پرتوپلاست گیاهان عالی در محیط ضدعفونی شده درون ظروف استریل مانند لوله آزمایش، کشت درون شیشه ای گیاهی (کشت بافت گیاهی) گفته می شود. از کشت درون شیشه ای گیاهی به منظور گیاه افزایی، به نژادی

1- Tisserat & Berhow
2- Tissue culture

گیاهی، تولید فرآورده های بیوشیمیایی، بیماری شناسی گیاهی، نگه داری و انبار کردن بافت های گیاهی، پژوهش های علمی و غیره استفاده می شود. ریزازدیادی یکی از جنبه های تجاری استفاده از کشت درون شیشه ای است و مزایای زیادی نسبت به روش های متداول ازدیاد رویشی دارد. هدف ریزازدیادی تولید انبوه گیاهچه های همسان از نظر ژنتیکی با رشد و نمو طبیعی، در کم ترین زمان و با کم ترین هزینه است. هم اکنون کاربرد ریزازدیادی در باغبانی، کشاورزی و جنگل دارای در حال گسترش است (سیدطباطبایی و امیدی، 1388).

کشت بافت مبتنی بر سه توانایی اصلی گیاه ایجاد شده است:

1- توانمندی (Totipotency): قابلیت یا توانایی ارثی یک سلول گیاهی برای رشد و تبدیل به گیاهی کامل در صورت تحریک مناسب است. قدرت باززایی تاکید دارد که تمام اطلاعات مورد نیاز برای رشد و تولید مثل موجود در داخل یک سلول قرار دارد. اگرچه به لحاظ تئوری تمام سلول های گیاهی دارای توانمندی هستند ولی سلول های مریستمی بهترین سلول هایی هستند که قادر به بروز این توانمندی می باشند.

۲- عدم تمایز (Dedifferentiation): به معنی ظرفیت سلول های بالغ، برای برگشت به شرایط مریستمی و تولید یک نقطه ی رشد جدید می باشد، که با تمایز مجدد که قدرت سازماندهی و تشکیل اندام جدید می باشد، ادامه می یابد.

۳- قابلیت یا آمادگی (Competency): قابلیت درون زاد یک سلول یا بافت مشخص به رشد در مسیری ویژه را توصیف می کند . برای مثال، سلول هایی که از نظر جنین زایی دارای شایستگی هستند قادر به توسعه به جنین های کاملاً فعال می باشند. نقطه ی مقابل آن عدم قابلیت و یا عدم صلاحیت مورفوژنتیکی است (فرشادفر و بخشی، 1389).

کاربرد کشت بافت در جهت باززایی، تولید تجاری گیاهان دارویی و استخراج متابولیت های ثانویه از آنها در سالهای اخیر مورد توجه زیادی قرار گرفته است. باززایی در شرایط آزمایشگاهی (in vitro) روشی بسیار مفید جهت تولید داروهای گیاهی باکیفیت است. گیاهان دارویی منابع خیلی مهمی از داروهای حفاظت کننده ی زندگی برای اکثریت جمعیت جهان میباشد. روش های بر پایه بیوتکنولوژی برای

انتخاب، دستورزی و حفظ ژنوتیپ های بحرانی گیاهان دارویی مهم می باشد. باززایی درون شیشه ای، پتانسیل خیلی قوی را برای تولید گیاهان با کیفیت بالا از لحاظ دارویی دارا می باشد. امروزه استفاده از انواع کشت بافت برای افزایش تولیدات مواد دارویی خالص کاربرد فراوانی دارد. تولید متابولیت های ثانویه در شیشه از طریق کشت بافت های گیاهی امکان پذیر است. استقرار موفق لاین های سلولی که منتهی به تولید درصد بالایی از ترکیبات ثانویه در کشت های سوسپانسیون سلولی شده به وسیله تعداد زیادی از محققین گزارش شده است (تریپاتی، ۲۰۰۳).

تکنیک "کشت بافت" برای اولین بار، در سال های ۱۹۴0- ۱۹۳۹ در مورد گیاهان به کار گرفته شد. فرآورده های حاصل از متابولیسم ثانویه گیاهی جزو گران بهاترین ترکیب شیمیایی گیاهی هستند. در سال 1956 بود که یک شرکت دارویی در کشور آمریکا (Pfizer Inc) اولین بار مقاله ای را در مورد تولید متابولیت ها با استفاده از کشت تودهای سلول ها منتشر کرد. متابولیت های ثانویه که در گیاهان وجود دارند پس از استخراج و خالص سازی، در فرآورده های دارویی، آرایشی - بهداشتی و صنعتی کاربرد دارند. اسانس ها، عصاره ها و رنگ های گیاهی مثال هایی از این متابولیت های ثانویه هستند. بخش اعظم بازار گیاهان دارویی دنیا، به تولید و عرضه ی متابولیت های ثانویه ی مشتق از این گیاهان مربوط می شود (ابراهیم پور و عیدی زاده، ۱۳۸۸). مواردی وجود دارد که میزان متابولیت های موجود در سلول های کشت بافت شده خیلی بیشتر از میزان آن در گیاه کامل است و یا حتی سلول های کشت بافت شده، متابولیت هایی تولید می کنند که در گیاه اولیه تولید نمی شود. کول و استابو (۱۹۶۷) و هبل و همکاران (۱۹۶۸) توانستند مقادیر بیشتری از ترکیبات ویسناجین و دیوسجنین را با استفاده از کشت بافت نسبت به حالت طبیعی (استخراج از گیاه کامل) به دست آورند.

1-2-1- تاریخچه کشت بافت گیاهان

کشت بافت گیاهی بر اساس نظریه‌ی شوان و شیلدن در سال 1838 مبنی بر دارا بودن خاصیت توتی‌پوتنسی[1] سلول‌ها پایه‌گذاری شد. توتی‌پوتنسی خاصیتی است که بر اساس آن یک سلول دارای توان

1- Totipotency

تبدیل شدن به موجود کامل است. در واقع تئوری آنها پایه و اساس کشت بافت و سلول گیاهی بود، هرچند آنها در عمل موفق به رفع مشکلات تکنیکی برای اجرای کار نشدند (فرشادفر و بخشی، 1389). شاید اولین قدم در زمینه کشت بافت گیاهی در سال 1756 توسط هنری-لوئیس داهامل منسیو، هنگامی که وی شاهد تشکیل کالوس در حین مطالعه اولیه مواد التیام دهنده زخم‌های گیاهی بود، برداشته شد (گاتریت[1]، 1985).

اساس تئوری کشت بافت گیاهی توسط گوتلیب هابرلنت[2] از آکادمی علوم آلمان در سال 1902، بعد از آزمایش‌های وی روی کشت تک سلولها، پیشنهاد گردید (هابرلنت، 1902). هابرلنت این فرضیه را مطرح کرد که سلول های گیاهی تمایز یافته دارای خاصیت توتی پوتنسی هستند، این نظریه مورد تأیید قرار نگرفت (فرشادفر، ۱۳۸۹). وی اظهار داشت که طبق پژوهش های او، مطالعه سیستماتیک سازمان یافته ای روی کشت سلول های رویشی ایزوله شده گیاهان عالی انجام نشده است. نتایج آزمایش های انجام شده، بیانگر خواص و پتانسیل های سلول به عنوان یک ارگانیسم اساسی بود. به علاوه این آزمایش ها اطلاعاتی در مورد ارتباط داخلی و اثرات تکاملی سلول های یک ارگانیسم چند سلولی را فراهم می کرد (کریکوریان و برکام[3]، ۱۹۶۹). هابرلنت اولین گام عملی را در کشت آزمایشگاهی برداشته و در محیط کربوهیدرات مبادرت به کشت سلول های منفرد و ایزوله فتوسنتزی برگ و سلولهای متفاوت دیگر نمود که علی رغم زنده ماندن قادر به تکثیر نبود و این تلاش او با موفقیت همراه نبود. با این وجود وی اظهار داشت که می توان به طور موفق جنین‌های مصنوعی حاصل از سلولهای رویشی را کشت کرد. بنابراین او به طور واضح نظریه توتی پوتنسی را بیان نمود و نشان داد که تکنیک کشت سلول‌های ایزوله گیاهی در محلول غذایی، روش آزمایشی جدیدی برای بررسی مسایل مهم است. بر اساس تحقیقات او در سال 1902 و سال های بعد از آن، هابرلنت به عنوان پدر کشت بافت گیاهی نام گرفت.

به دلیل تاخیر در کشف هورمون های گیاهی، کشت بافت گیاهی، پس از کشت بافت حیوانی وانسانی، شروع شد. در سال ۱۹۰۷ اولین کشت سلول های حیوانی و انسانی انجام شد اما در کشت سلول های گیاهی پیشرفتی وجود نداشت. اولین هورمون تنظیم کننده رشد که کشف شد، اکسین (ایندول

1- Gautheret
2- Haberlandt
3- Krikorian & berquam

استیک اسید) بود که موفقیت بزرگی را برای کشت بافت در شرایط درون شیشه، به وجود آورد. در بین سال های ۱۹۲۵-1920روبین و کوت کشت ریشه را انجام دادند.

اولین کشت بافت گیاهی واقعی توسط گاتریت (1935و1934) از بافت آوندی افرا صورت گرفت (نوبکورت[1]، 1939). گاتریت با به کارگیری ایندول استیک اسید در محیط کشت، توانست رشد بافت تمایز نیافته را در سطوح برش یافته بافت‌های گیاهی القاء کند. این توده سلولی تمایز نیافته را کالوس نامیدند.

در سال 1939 وایت اولین کشت موفقیت آمیز بافت‌های کالوس توتون را انجام داد. در طی سال های ۱۹۳۵-۱۹۵۵ کوشش های فراوانی مانند کشت واقعی و دراز مدت کالوس از بافت ریشه هویج توسط گاتریت و نوبکورت، باززایی اندام ها از بافت های کالوس در سکویا توسط بال و اولین کاربرد ریزازدیادی توسط مورن و مارتین انجام شد.

با کشف دیگر هورمون تنظیم کننده رشد به نام کینتین (نوعی سیتوکینین) در سال 1955 توسط میلر و همکارانش انگیزه بیشتری را فراهم نمود. از آن زمان به بعد پیشرفت های همه جانبه رخ داد. اسکوگ و میلر در سال 1957 موفق شدند تمایزیابی کالوس های توتون را با استفاده از تعادل اکسین وسیتوکینین در محیط کشت مورد بررسی قرار دهند که مشخص شد مقدار زیادتر اکسین نسبت به سیتوکینین موجب ریشه زایی و نسبت وارونه ساقه‌دهی و همچنین نسبت یکسان این دو تنظیم کننده رشد سبب تولید کالوس می‌شود (سیدطباطبایی و امیدی، 1388). در سال 1958 راینرت موفق به تولید ساقه و ایجاد گیاه از طریق کالوس شد (هادی، 1383).

پیشرفت مهم دیگری در سال ۱۹۶۲ صورت گرفت که آن معرفی و تولید محیط کشت MS (موراشیگ و اسکوگ[2]) بود. این محیط یکی از بهترین محیط های کشتی است که امروزه نیز کاربرد فراوان دارد (پیریک[3]، 1987). در سال ۱۹۶۵ ماهش وری گیاه داتوره (*Datura*) را با استفاده از دانه گرده باززایی (تجدید نسل) نمود، این عمل را آندروژنز در شیشه گویند (فرشادفر و بخشی، 1389). در

1- Nobecourt
2- Murashige & Skoog
3- Pierik

سال 1970 اولین امتزاج موفقیت آمیز پروتوپلاست در محیط کشت تحقق یافت. در همین سال انتخاب موتان های بیوشیمیایی در شرایط آزمایشگاهی صورت گرفت (سیدطباطبایی و امیدی، 1388)

به طور کلی شمای مختصری از تاریخچه کشت بافت در شکل (1-1) آورده شده است:

سال	مرحله
شوان و شیلدن ۱۸۳۸	توتی پوتنسی سلول
هابرلنت ۱۹۰۲	برطرف کردن مشکلات تکنیکی
هاریسون- باروز، کارل ۱۹۰۹- ۱۹۰۷	انجام کشت بافت گیاهی و حیوانی
گاتریت، نوبکورت، وایت ۱۹۳۹- ۱۹۳۲	کشت مداوم و موفق بافت گیاهی
۱۹۷۰- ۱۹۳۹	دوره ی گسترش سریع

شکل (۱-۱): شمایی از تاریخچه کشت بافت (پیریک، ۱۹۸۷)

در هر صورت از اوائل دهه ی 50 در قرن بیستم کشت بافت در انواع گونه ها گسترش سریعی یافت. در دهه ی 1970 کشت سلول و بافت گیاهی وارد مرحله ی نوینی از تکامل خود شد. طبق نظر موراشیگ تا سال ۱۹۷۷ بیش از ۶۰۰ گونه از گیاهان زینتی به طریق کلون تکثیر شدند (پیریک، ۱۹۸۷).

1-2-2- کاربرد کشت بافت

کشت بافت در زمینه گیاهان دارویی کاربردهای متعددی دارد که مهم ترین آن ها تکثیر انبوه و سریع گیاهان دارویی یکنواخت از لحاظ محتوای ژنتیکی و کیفی، حفظ گونه های گیاهی در حال انقراض و تولید متابولیت های ثانویه در شرایط in vitro از طریق کشت سوسپانسیون سلولی و کشت اندام می باشد. شناسایی اهمیت تجاری متابولیت‌های ثانویه در سال‌های اخیر منجر به علاقمندی شدید برای

بررسی سوخت و سازهای ثانویه و به ویژه امکان تغییر تولید زیستی آنها با استفاده از تکنولوژی کشت بافت و سلول شده است (مولاباگال و تسی[1] 2004؛ تریپاتی، 2003). با استفاده از کشت in vitro گیاه علاوه بر دسترسی به منبع اولیه دارو در شرایط کنترل شده و مستقل از محیط، افزایش تولید ترکیبات نسبت به گیاه و تولید ترکیبات جدید نیز امکان پذیر می گردد (بورگاد[2] و همکاران، ۲۰۰۲).

منبع بسیاری از مواد مورد استفاده در صنایع داروسازی را گیاهان تامین می کنند که این مواد گیاهی تحت عنوان متابولیت‌های ثانویه معرفی می‌شوند. در برخی موارد سنتز مصنوعی این مواد مشکل می‌باشد و یا تولید مصنوعی آنها از لحاظ اقتصادی مقرون به صرفه نمی‌باشد، بنابراین استفاده از کشت سلولی می‌تواند یک ابزار قدرتمند برای تولید متابولیت‌های ثانویه محسوب شود (راویشانکار و ونکاتارامون، 1998)

با استفاده از فنون کشت بافت و سلول گیاهی به سهولت می توان اقدام به ایجاد گیاهان هاپلوئید نمود. هم چنین محققین از روش فوق برای اصلاح گیاهان دارویی جهت ایجاد گیاهان همانند و همگن و یا غیرهمانند و ناهمگن و ایجاد جهش استفاده می‌کنند (امید بیگی، 1374).

1-2-3- دلایل رویکرد به کشت بافت

برخی از گیاهان زیستگاه های طبیعی محدود دارند و بسته به شرایط محیطی و جغرافیایی محل رویش گیاه، جمع آوری آن ها با مشکلاتی مواجه است. محدودیت منابع طبیعی، تخریب روزافزون جنگل ها، مراتع و فضای سبز، نابودی گونه های 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 بهره وری گیاهان دارویی معطوف نموده است. یکی از روش‌های مدرن استفاده از فن‌آوری کشت سلول و بافت‌های گیاهی است که از این طریق می توان نسبت به تکثیر گیاهان مختلف اعم از صنعتی، داروئی، مرتعی، و کشاورزی اقدام نمود. از طرف دیگر کشت بافت گیاهی می تواند بستر مناسبی جهت حفظ و نگهداری گونه‌ها و ژنوتیپ‌های مادر و یا در حال انقراض طبیعت به عنوان منابع با ارزش ژرم پلاسم

1- Mulabagal & Tsay
2- Bourgaud

محسوب شود (فرشادفر و بخشی، 1389). استفاده از روش های بیوتکنولوژی به منظور تکثیر و افزایش توان ژنتیکی گیاهان دارویی و همچنین شناسایی سریع تر و دقیق تر ژنوتیپ هایی که فرآورده بیشتری تولید می کنند، می تواند بسیار مفید و از لحاظ تجاری بسیار سودآور باشد (ابراهیم پور و عیدی زاده، 1388). فن‌آوری کشت سلولی گیاه نقش مهمی را در حل معضل گرسنگی در جهان از طریق توسعه محصولات کشاورزی با بازده بالاتر و مقاوم به پاتوژن ها و شرایط ناسازگار محیطی و شرایط اقلیمی ایفاء می‌کند. استفاده از تکنولوژی کشت بافت گیاه در سه زمینه اهمیت پیدا می‌کند که عبارتند از: (1) اصلاح و ژنتیک، (2) به عنوان یک مدل برای مطاله ژنتیک، فیزیولوژی، بیوشیمی و پاتولوژی گیاه، (3) برای تولید متابولیت های ثانویه از اندام ها یا کشت سلولی مایع (مولاباگال و تسی، 2004).

گرایش به استفاده از گیاهان دارویی برای تولید دارو در اکثر کشورها در حال افزایش است و کشور ما نیز از این قاعده مستثنی نیست. کشور ما با دارا بودن شرایط مختلف آب و هوایی و برخورداری از منابع عظیم گیاهان دارویی می‌تواند در این زمینه پیشرو باشد و از پتانسیل‌های موجود این گیاهان بهره ببرد. بهره‌برداری غیر صحیح و بی‌رویه در گذشته‌های نه‌چندان دور از منابع ژنتیکی علاوه بر اینکه میزان تولید سنتی را پایین آورده است باعث به خطر افتادن وجود این منابع گردیده است (روت[1] و همکاران، 2000).

روش های سنتی تکثیر گیاهان دارویی همانند سایر گیاهان شامل روش های جنسی(تکثیر با بذر) و غیر جنسی نظیر قلمه، خوابانیدن، پاجوش و ... می‌باشد. گیاهان تکثیر شده با بذر عمدتاً از لحاظ ژنتیکی یکنواخت نیستند و گیاه حاصله دارای تمام خواص گیاه مادری نیست، به همین جهت تکثیر غیرجنسی به جنسی ترجیح داده می‌شود. روش های سنتی تکثیر غیرجنسی عمدتاً با مشکلاتی از جمله محدودیت گیاه مادری و بازدهی پایین مواجه است. کشت بافت، نوعی تکثیر غیرجنسی در شرایط in vitro می باشد. مزیت تکثیر از طریق کشت بافت نسبت به سایر روش‌های مرسوم، تولید تعداد زیادی گیاه با محتوای ژنتیکی یکسان و کیفیت یکنواخت در زمان کوتاهتر و فضای نسبتاً محدود می‌باشد. از مهم ترین

1- Rout

روش های تکثیر درون شیشه ای گیاهان، ریزازدیادی، اندام زایی از طریق کالوس و ... می باشد (تریپاتی، 2003). این روش ها علاوه بر تکثیر در جهت اصلاح این گیاهان نیز به کار می رود و امروزه استفاده از این روش ها به طور گسترده در جهت تولید گیاهان دارویی کاربرد دارد.

1-2-4- انواع کشت بافت (یا کشت درون شیشه ای)

به عملیاتی نظیر کشت سلول ها، بافت ها و اندام های استریل و اجزای آنها تحت شرایط مطلوب فیزیکی و شیمیایی در آزمایشگاه، کشت بافت گیاهی اطلاق می شود. کشت بافت گیاهی یک نام اختصاری برای کشت پروتوپلاست، کشت سلول، کشت بافت و کشت اندام گیاه می باشد.

دی فوسارد (1976) به طور کلی سه نوع کشت در شیشه (این ویتر) را در گیاهان عالی معرفی کرده است:

1) سازمان یافته: کشت گیاهان (جنین و بذر) و اندام‌ها را کشت سازمان‌یافته می‌نامند. در این روش ساختار سازمان‌یافته ویژه یک گیاه یا اندام منفرد حفظ می‌شود. اگر ساختار سازمان‌یافته متلاشی نشود، نتایج حاصل کاملا شبیه پایه مادری خواهند بود. در این مورد می‌توان کشت مریستم و نوک ساقه را نام برد.

2) سازمان نیافته: در این حالت سلول‌ها یا بافت‌هایی که از یک قسمت سازمان‌یافته گیاه جداسازی و کشت شده و پس از تمایز زدایی یک ساختار سازمان نیافته به فرم کالوس به وجود می‌آید. رشد سازمان نیافته، اساساً براثر کاربرد غلظت های بالای اکسین و یا سیتوکینین در محیط رشد به وجود می آید. کشت-های کالوس از ثبات ژنتیکی کمی برخوردارند.

3) حدواسط: این نوع کشت در حدواسط دو مورد فوق قرار می‌گیرد. سلول‌های یک بافت یا اندام جدا شده از گیاه،ابتدا تمایززدایی کرده (به صورت تمایز نیافته درآمده) و سپس تولید بافت کالوس می‌کنند و بعداً با تمایز مجدد اندام‌های کامل (ساقه یا ریشه نابجا) و یا جنین سوماتیکی تولید می‌کنند. بنابراین ساختارهای تمایزیافته می‌توانند از کشت‌های سازمان نیافته با استفاده از تکنیک های خاص و یا به‌طور

خودبه‌خودی تولید شوند. درهمه ی این موارد، نتایج حاصل، کاملاً شبیه به والدین خود نیستند (فرشادفر و بخشی، 1389).

هر گیاه شامل بذر و اندام های متفاوت است و هر اندام شامل تعدادی بافت است و بافت ها نیز از سلول های اختصاصی به وجود آمده اند. حذف دیواره این سلول ها توسط آنزیم، منتج به تولید پروتوپلاست می شود. با توجه به مطالب ذکر شده و وجود مواد ساختمانی متفاوت، انواع مختلفی از کشت بافت (یا کشت درون شیشه ای) به صورت زیر وجود دارد:

- **کشت بذر یا گیاه کامل:**

شامل کشت بذر در شرایط درون شیشه ای است که یک گیاهچه و نهایتاً یک گیاه کامل ایجاد می شود.

- **کشت جهت تولید کالوس:**

اگر یک بافت تمایزیافته از گیاه جدا شده و تحت شرایط آزمایشگاهی کشت گردد و تولید توده تمایز نیافته‌ای به نام کالوس نماید آن را کشت کالوس می‌گویند که می توان این کالوس را دوباره کشت نمود. کالوس یک توده سلولی کم و بیش سازمان نیافته با دیواره سلولی نازک می باشد که معمولاً از سلول های پارانشیمی به وجود آمده است. هر میلی متر مکعب کالوس از هزاران سلول تشکیل شده و هر یک از آن‌ها توانایی تشکیل یک جنین را دارند لذا نسبت تکثیر می‌تواند بسیار زیاد باشد. تولید کالوس و قابلیت باززایی کالوس، به عوامل متعددی بستگی دارد که مهم ترین آن ها ژنوتیپ، ریزنمونه و شرایط فیزیولوژیک آن، نوع محیط کشت و عناصر غذایی، عوامل فیزیکی و محیطی از قبیل نور، دما و pH، تنظیم کننده های رشد و ویتامین ها می باشد (سیدطباطبایی و امیدی، 1388). فرآیند ایجاد کالوس از یک قطعه گیاهی کشت شده را می توان به ۳ مرحله تقسیم کرد: اول شروع تشکیل کالوس، دوم تقسیم سلولی، و سوم تکثیر و تمایز سلول های کالوس. در مرحله تشکیل کالوس، همزمان با آماده شدن سلول ها برای تقسیم، متابولیسم سلولی افزایش می یابد.

Family name: Mehrdad Name: Nourazar

Title of Thesis: Effects of different hormonal combinations and elicitors on secondary metabolites in callus of *Datura metel*

Supervisor(s): Dr. Seyed Mahdi Razavi - Dr. Alireza Ghasemian
Advisor: Dr. Ezzat Noorizadeh

Graduate Degree: **Master of Science (M.Sc.)**
Major: Biology Specialty: Plant Physiology
University: **Mohaghegh Ardabili** Faculty: Basic Sciences
Graduation date: 25/12/2017 Number of pages: 111

Abstract:

Datura metel L. is an annual plant, toxic herb with an unpleasant smell. This species belongs to the *Solanaceae* family. Due to having a valuable drug such as atropine and hyoscine, the herb is considered to be a medicinal herb. This research aimed to investigate the explants of the *D.metel* for callus induction and using of different elicitors to increase secondary metabolites. At the first stage, in order to breaking seed dormancy some treatments (mechanical scratching) such as embryo culture, scalpel treatment, needle treatment, and corundum treatment were used. The results showed most suitable treatments were embryo culture and scalpel treatments, which resulted in germination of seeds at 87% and 55% respectively. For continue research of treatment scalpel was used because it was easy and fast. At the second stage of research, the combination of Auxin hormone including 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) and cytokinin hormone including kinetin (Kin) at concentrations of 0.5, 1 and 2 mg/L were used to induce callus in leaves *Datura*. After four weeks, our results showed the best hormone treatment for callus induction is the concentration of 1 mg/L 2,4-D and 1 mg/L Kin. In the following research, the effects of different elicitors including cold 8 °C for (24 and 48 hours), ammonium nitrate (10 mM and 30 mM) and putrescine (1.5 mM and 3 mM) on the production of secondary metabolites were studied. Then calluses were used for extraction. Methanolic extracts from calluses were analysed by means of spectrophotometer. The results showed that the most suitable elicitors were cold 8 °C for (24 hours) and 1.5 mM putrescine, resulted in double increase of total alkaloid amount.

Keywords: Callus induction, *Datura metel*, Elicitor, Kinetin, Total alkaloid, 2,4-D.

University of Mohaghegh Ardabili

Faculty of Basic Sciences

Department of Biology

Thesis submitted in partial fulfilment of the requirements for the degree of M.Sc. in Plant Physiology

Title:

Effects of Different Hormonal Combinations and Elicitors on Secondary Metabolites in Callus of *Datura metel*

Supervisors:

Seyed Mahdi Razavi (Ph. D)

Alireza Ghasemian (Ph. D)

Advisor:

Ezzat Noorizadeh (Ph. D)

By:

Mehrdad Nourazar

December – 2017