پوستر فناوری های نوین

Print to PDF without this message by purchasing novaPDF (http://www.novapdf.com/)

بررسی روش های ارتقاء بهره وری و کیفیت در صنعت داروهای گیاهی و تاثیر آن در افزایش تولیدات داخلی دارو

علی اکبر جعفری[1*]، زهره جعفری[2]

[1*] دانشگاه آزاد اسلامی، واحد پرند، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، تهران، ایران

[2] گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اراک، اراک، ایران

Email: a.jafary63@yahoo.com

چکیده

صنعت داروسازی از صنایع بسیار مهم موجود در کشور می باشد و یکی از مصادیق تولید در عرصه صنایع مختلف، صنعت داروسازی است. اگر چه صنعت دارو در ایران در سال های اخیر پیشرفت قابل توجهی داشته، اما دو عامل اساسی جزو مشکلات این صنعت است که شامل تهیه مواد اولیه ارزان خارجی با کیفیت پایین و عدم برخورداری از تکنولوژی روز دنیا و پایین بودن بهره وری که باعث افزایش هزینه های تولید و کاهش سطح کیفی محصولات شده است. بنابراین برای تحول در صنعت داروسازی باید به ارتقاء بهره وری و کیفیت در شرکتهای تولیدی توجه و اهمیت بیشتری داده شود. همانطور که می دانیم اهمیت گیاهان دارویی و شناساندن نقش حیاتی آن در پیشبرد اهداف ملی، منطقه ای و جهانی برای تحقق خود کفایی دارویی، توسعه اقتصادی و حضور فعال در بازار های جهانی بر کسی پوشیده نیست. بنابراین مقاله حاضر سعی دارد تا یاد آور شود که وجود استعدادهای بالقوه عظیم ملی و نیز فرهنگ استفاده از گیاهان دارویی در کشور توجه بیش از پیش مسئولین کشور به این مقوله را نیاز دارد و بر هر متخصص دلسوزی این باور را خاطر نشان می نماید که اگر به این مسئله بصورت یک ضرورت ملی و با نگرش سیستمیک و جامع

Print to PDF without this message by purchasing novaPDF (http://www.novapdf.com/)

نگرانه عنایت شود، می تواند علاوه بر دستیابی به مدیریت توسعه پایدار در این بخش بالاخص در ابعاد کلان توسعه اقتصادی – زیست محیطی، بهداشتی، امنیت غذایی و ذخایر ژنتیکی در عرصه ملی و جهانی بعنوان یک منبع درآمد ارزی برای کشور محسوب و ایفای نقش نماید.

کلمات کلیدی: گیاهان دارویی، بهره وری، توسعه اقتصادی ، خود کفایی دارویی

مقدمه :

سرعت رشد صنایع و توسعه آن در دهه های اخیر حاکی از آن است که کشورمان درحال گذر از یک اقتصاد نیمه صنعتی به یک اقتصاد صنعتی است. می توان گفت درجه توسعه یافتگی صنایع مختلف به میزان قابل توجهی به آشنایی با تئوری های بهره وری و راهکارهای افزایش بهره گیری مطلوب و بهینه از منابع و امکانات تولید وابسته می باشد که تامین کننده بهره وری و افزایش مستمر در شرکتهای مختلف است. از این رو به آشنایی شرکتها با مفاهیم بهره وری و راهکارهای افزایش آن تاکید می شود. با وجود تعاریف زیاد درباره بهره وری، به منظور اجرایی کردن آن می بایست تعریفی هماهنگ و سازگار با شرایط و نیازهای معین سازمان به کار برد و از طریق مشارکت کلیه کارکنان قدمهای موثری را در این راه برداشت. بد نیست نگاهی به مفهوم بهره وری از دیدگـــــاه کوهئی گوشی موسس مرکز بهره وری ژاپن بیندازیم. کوهئی گوشی موسس مرکز بهره وری ژاپن بر روی کارت تبریکـــــــی که برای دوستانش می فرستد می نویسد:

بهره وری هدفی است که ازطریق بهسازی مستمر تجهیزات مادی و نیروی انسانی قابل حصول است. این جمله ساده و در عین حال پرمعنی، روشن ترین تعریفی است که واقعیت بهره وری را نشان می دهد، زیرا در بهره وری پیشرفت روحی و روانی انسانها به اندازه مواد و تجهیـــــزات مورد توجه قرار می گیرد.

Print to PDF without this message by purchasing novaPDF (http://www.novapdf.com/)

سه استراتژی عمده برای بهبود بهره وری

زمانی که بهره وری کل افزایش یابد، هزینه تمام شده به ازای هر واحد، کاهش می یابد. بنابراین می توانیم با توجه به رابطه بین بهره وری کل و هزینه و اینکه «قیمت= هزینه تمام شده+ حاشیه سود»، یکی از این سه راه را برای بهبود بهره وری در نظر بگیریم:

۱- قیمت کمتر محصول به معنای افزایش سهم بیشتر از بازار و در نتیجه سود بیشتر در آینده

۲- قیمت قبل اما کسب سود بیشتر به ازای هر واحد

۳- همزمان قیمت کمتر و سود بیشتر

یکی از مصادیق تولید در عرصه صنایع مختلف، صنعت داروسازی است. داد و ستد تولیدات صنعت داروسازی یکی از بزرگترین تجارت ها در جهان است. داروسازی خارج از اینکه یک صنعت حساس محسوب می شود، یک صنعت پرسود هم به شمار می رود؛ اگر چه صنعت دارو در ایران در سال های اخیر پیشرفت قابل توجهی داشته، اما دو عامل اساسی جزو مشکلات این صنعت است که شامل تهیه مواد اولیه ارزان خارجی با کیفیت پایین و عدم برخورداری از تکنولوژی روز دنیا و پایین بودن بهره وری که باعث افزایش هزینه های تولید و کاهش سطح کیفی محصولات شده است.

در سال‌های اخیر با دستیابی و ورود به دانش روز تولید دارو از جمله بیوتکنولوژی، صنایع داروسازی کشور با استفاده از توان علمی و تخصصی موجود در کشور موفق به تولید داروهای تخصصی شده‌اند که این موضوع مزیتی را برای صنعت داروسازی در منطقه ایجاد نموده است. اما به رغم امکانات و توانایی‌های

Print to PDF without this message by purchasing novaPDF (http://www.novapdf.com/)

موجود در صنایع داروسازی کشور این صنعت همانند سایر صنایع با ورود به اقتصاد آزاد و بازار رقابت با مشکلات و چالش‌هایی رو به رو شده و آسیب‌پذیری آن بیشتر شده است. با عنایت به مزیتهای بالقوه و بالفعل این صنعت به جهت نقش مستقیمی که در ایجاد ارزش افزوده و ارزآوری دارد، ترسیم برنامه ای بلند مدت و کوتاه مدت جهت توسعه توان تولیدی ورقابتی آن برای اقتصاد ملی بسیار با اهمیت تلقی می‌شود.

بنابراین راهکارهایی همانند افزایش تولید داروهای ژنریک تجاری، افزایش هولدینگ های دارویی، همکاری متقابل سیستم بانکی کشور با صنایع دارویی، تغییر نظام قیمت گذاری توسط وزارت بهداشت، ارتقا کیفیت داروها، واردات با توجه به نیاز بازار، سرمایه گذاری در عرصه داروهای گیاهی به عنوان منبعی برای جایگزینی با داروهای نوین و فرهنگ سازی برای مصرف داروهای تولید داخل و داروهای گیاهی برای حل مشکلات مذکور پیشنهاد می شود. امروزه اهمیت گیاهان دارویی و شناساندن نقش حیاتی آن در پیشبرد اهداف ملی، منطقه ای و جهانی برای تحقق سلامت و نشاط جوامع، خود کفایی دارویی، ایجاد اشتغال، توسعه اقتصادی، امنیت غذایی و حفظ ذخایر ژنتیکی و حضور فعال در بازار های جهانی بر کسی پوشیده نیست. میلیونها نفر از مردم جهان در زمینه کشت، برداشت فرآوری و سایر جنبه های گیاهان دارویی فعالیت دارند. حجم تجارت جهانی گیاهان دارویی و فرآورده های آن به ۱۰۰ میلیارد دلار در سال رسیده است. براساس آمار سازمان بهداشت جهانی بیش از ۸۰ درصد از مردم جهان برای درمان انواع بیماریها از گیاهان دارویی و یا روشهای طب مکمل و سنتی استفاده می کنند. کشور ایران مهد استفاده از طب سنتی و داروهای گیاهی است. در حال حاضر حدود ٦٦ هزار هکتار از اراضی کشاورزی کشور در استان های مختلف، به کشت گیاهان دارویی اختصاص دارد. از مجموع مزارع اختصاص یافته به گیاهان دارویی، حدود ٦٥ هزار تن محصول تولید می شود. بنابراین، می توان گفت که افزایش بهره وری در صنایع

Print to PDF without this message by purchasing novaPDF (http://www.novapdf.com/)

داروسازی با عنایت به تولیدات داخلی و عرصه داروهای گیاهی از ابزارهای کارآمد برای افزایش بهبود سطح زندگی مردم و ایجاد ثروت ملی است.

نتیجه گیری :

سهم کشور ما در فرآوری، تولید و تجارت این محصول چشم گیر نیست به همین منظور برای پیشرفت در این موضوع توجه به منابع طبیعی، حفظ پوشش گیاهی، جلوگیری از چرای بی رویه عرصه های منابع طبیعی و بهره برداری اصولی از گیاهان دارویی و صنعتی ضروری به نظر می رسد، همچنین در بخش کشاورزی توجه خاص به کاشت گیاهان دارویی و تربیت نیروهای متخصص این رشته در سطح ملی، تدوین یک برنامه مدون ملی، عدم ترویج موادخام، کسب تکنولوژی لازم جهت فرآوری گیاهان و بسته بندی مناسب و توجه لازم به صادر کنندگان موضوعی در خور توجه است. به طوری که در مجموع می شود گفت که توجه به افزایش بهره وری و کیفیت داروهای گیاهی کشور از نظر اقتصادی برای توسعه صنعت داروسازی حیاتی بوده و ضمینه ساز تحول در این عرصه برای کشور بوده و نیازمند برنامه ریزی های جامع کوتاه مدت و بلند مدت می باشد.

منابع:

۱ – ریچارد ای. داچ، عشق به تولید، ترجمه مسعود نیازمند، نشر ساپکو ۱۳۷۹

۲ – رابرت هلر، ترجمه سعید علیمیرزایی، اداره کردن افراد در محیط کار، انتشارات سارگل ۱۳۸۱

۳ – رابرت هلر، ترجمه دکتر خدایار ابیلی و سعید علیمیرزایی، مدیریت تغییر، انتشارات سارگل ۱۳۸۲

٤ – غلامرضا خاکی، مدیریت بهره وری، نشریات بهره وری سازمان بهره وری ملی ایران

٥ – بهزاد جعفری قوشچی، راههای افزایش کارآیی، مجله تدبیر، شماره ۱۲٦ مهر ۱۳۸۱

٦– ناصرالدین احدی نیا، راهکارهای افزایش بهره وری، ماهنامه تدبیر، سال شانزدهم،۱۳۸۵، شماره ۱۵۷

Print to PDF without this message by purchasing novaPDF (http://www.novapdf.com/)

بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی قسمتهای مختلف گردو

علی اکبر جعفری*

* دانشگاه آزاد اسلامی، واحد پرند، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، تهران، ایران

Email: a.jafary63@yahoo.com

چکیده :

در سالهای اخیر، تحقیقات زیادی در زمینه ارزیابی خواص آنتی رادیکالی و آنتی اکسیدانی منابع طبیعی صورت گرفته است. آنتی اکسیدان های طبیعی معمولا ترکیبات فنولیک گیاهی می باشند که از منابع مختلف گیاهی به دست می آیند. از جمله این منابع طبیعی گردو می باشد که حاوی مقادیر فراوانی ترکیبات آنتی اکسیدانی است که البته بخشهای مختلف دارای میزان متفاوتی از این خواص آنتی اکسیدانی هستند. لذا هدف این تحقیق شناسایی خواص آنتی اکسیدانی اسانس قسمتهای مختلف گردو می باشد. در این مطالعه نمونه ها بطور جداگانه با دستگاه کلونجر اسانس گیری شدند. سپس خواص آنتی اکسیدانی اسانس های تهیه شده با استفاده از روش مهار رادیکال پایدار 2 و 2 دی فنیل -1 - پیکریل هیدرازیل (DPPH) محاسبه گردید. در میان نمونه های جمع آوری شده، نمونه تهیه شده از پوست مغز گردو بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی را از خود بروز داد. پارامتر IC 50 نیز از روی منحنی، در نقطه ای که مقدار DPPH باقیمانده ۵۰ درصد باشد، تعیین شد که این مقدار برای نمونه های پوست مغز گردو، مغز گردو، پوست سبز گردو و برگ درخت گردو به ترتیب ۰/۰۱۵± ۱۹ ، ۰/۱۲±۲۲ ، ۰/۲٤ ± ۲۷ و ۰/۱۷ ± ۲۹ میکروگرم در میلی لیتر بود. نتایج نشان دهنده فعالیت آنتی اکسیدانی معنی دار و قابل قبول اسانس پوست مغز گردو در

Print to PDF without this message by purchasing novaPDF (http://www.novapdf.com/)

تمام نمونه های جمع آوری شده می باشد و بنابراین می توان از آن به عنوان یک منبع آنتی اکسیدانی طبیعی در صنایع غذا و دارو استفاده کرد.

کلمات کلیدی : اسانس، گردو، خواص آنتی اکسیدانی، کلونجر، DPPH

مقدمه :

رادیکال های آزاد قادرند به مولکول های سامانه های بیولوژیک بدن آسیب وارد نمایند و باعث بروز بسیاری از بیماری ها در موجودات زنده و به ویژه انسان ها شوند. بخش عمده ای از این ترکیبات مضر در اثر اکسیداسیون مواد غذایی به خصوص چربی ها تولید می شوند که این مساله سلامت مصرف کننده را به خطر می اندازد. اثر زیان بخش رادیکال های آزاد را می توان توسط آنتی اکسیدان ها کاهش داد چون این مواد ، باعث به اندام انداختن و مهار تولید رادیکال های آزاد می شوند و از این طریق باعث پیشگیری از بیماری های احتمالی ناشی از وجود و فعالیت آنها خواهند شد(۱).

در سالهای اخیر ، تحقیقات زیادی در زمینه ارزیابی خواص آنتی رادیکالی و آنتی اکسیدانی منابع طبیعی صورت گرفته است. آنتی اکسیدان های طبیعی معمولا ترکیبات فنولیک گیاهی می باشند که از منابع مختلف گیاهی به دست می آیند(۲). توجه به اثرات جانبی ناخواسته برخی داروهای شیمیایی ضرورت توجه بیشتر به اثرات احتمالی منابع طبیعی و گیاهان دارویی بر عملکرد بخش های مختلف بدن را توجیه می نماید، بطوریکه منابع طبیعی امروزه مورد توجه کشورهای پیشرفته جهان قرار گرفته و به عنوان مواد اولیه جهت تبدیل به داروهای بی خطر برای انسان تلقی می شوند. در این میان گردو که دارای جایگاه خاصی در

Print to PDF without this message by purchasing novaPDF (http://www.novapdf.com/)

الگوی تغذیه انسان است، حایز اهمیت می باشد. گردو جز خانواده جاگلانداسه[1] می باشد و به صورت وسیع در طب سنتی استفاده می شود(۳).

در طب سنتی از گردو برای درمان نارسایی وریدی، پروستات، سرفه، درمان ناراحتی معده و درمان دیابت استفاده می شود. مطالعات اخیر پژوهشگران نشان می دهد عصاره مغز گردو دارای خواص آنتی اکسیدانی بالایی بوده و در کاهش بیماری های عروق کرونر قلب، التهاب، درمان امراض جلدی و فشار خون بالا، مفید است(٤). از مغز گردو برای کاهش چربی خون استفاده می شود. از پوست درخت گردو و پوست سبز گردو به عنوان ماده قابض، همچنین جهت درمان ورم مفاصل، شست وشو و التیام زخم ها و درمان ترشحات زنانه و بیماری سل استفاده می شود (۵). به هر حال گردو در طب سنتی و صنعت داروهای طبیعی و گیاهی از جایگاه مهمی برخوردار می باشد و نظر به اینکه امروزه توجه زیادی به خاصیت آنتی اکسیدانی عصاره منابع طبیعی می شود، هدف این مطالعه تعیین میزان فعالیت آنتی اکسیدانی قسمتهای مختلف گردو با استفاده از آزمون رادیکال DPPH می باشد .

مواد و روش ها

جمع آوری نمونه ها و اسانس گیری :

پژوهش حاضر، مطالعه ای آزمایشگاهی در مورد خواص آنتی اکسیدانی گردو می باشد. نمونه های مورد نیاز برای این آزمایش در اواخر شهریور ماه ۱۳۹۲ از رویشگاه های طبیعی مختلف جمع آوری گردید. سپس توسط یک گیاهشناس شناسایی شده و مورد تایید قرار گرفت. بعد از آن نمونه ها درون کیسه های

[1] - Juglandaceae

Print to PDF without this message by purchasing novaPDF (http://www.novapdf.com/)

پلاستیکی تمیز قرار داده شده و به آزمایشگاه منتقل شدند. در آزمایشگاه بخشهای مختلف مورد نیاز جدا شده و پس از خرد شدن آماده انجام آزمایش گردید. برای انجام مرحله اسانس گیری از دستگاه کلونجر استفاده گردید. به این منظور مقدار مشخصی از هر نمونه جداگانه به روش تقطیر با آب (Hydrodistilation) در دستگاه کلونجر (Clevenger) به مدت ۲ ساعت اسانس گیری شد.

تعیین فعالیت آنتی اکسیدانی به روش DPPH :

در این بررسی اثر آنتی اکسیدانی اسانس ها با استفاده از روش اندازه گیری کاهش ظرفیت رادیکالی (RSC) به کمک ۲،۲-دی فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل (DPPH) مورد ارزیابی قرار گرفت. در این روش برای مقایسه اثر آنتی اکسیدان اسانس از بوتیل هیدروکسی تولوئن (BHT) استفاده شد. نمونه ها با غلظت های متفاوت با یک میلی لیتر از محلول میکرومولار DPPH مخلوط شده و به وسیله ی متانول ۹۵ درصد به حجم چهار میلی لیتر رسید و برای مدت زمان ٦٠ دقیقه در تاریکی تکان داده شد. جذب محلولهای حاصله و شاهد (حاوی مواد شیمیایی یکسان ، بجز نمونه) بعد از این مدت زمان ، در طول موج ٥١٧ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپیکتروفوتومتر خوانده شد.

درصد RSC بوسیله فرمول زیر محاسبه گردید :

$$RSC\ (\%) = 100 \times (A\ blank - A\ sample\ /A\ blank)$$

که A blank و A sample ، به ترتیب میزان جذب شاهد و نمونه می باشند. فعالیت آنتی اکسیدانی اسانس ها به صورت مقدار IC50 نشان دهنده غلظتی از ترکیب است که باعث ٥٠ درصد بازدارندگی در

Print to PDF without this message by purchasing novaPDF (http://www.novapdf.com/)

ظرفیت رادیکالی می گردد . این مقدار ، به وسیله آنالیز همبستگی خطی حاصل از مقادیر RSC برای غلظت های مختلف نمونه، تعیین شد. همانطور که گفته شد، نتایج بدست آمده با مقدار IC50 آنتی اکسیدان BHT به عنوان کنترل مثبت مقایسه گردید.

نتایج و بحث :

در این مطالعه فعالیت آنتی اکسیدانی اسانس مغز گردو، پوست مغز گردو، برگ درخت گردو و همچنین پوست سبز گردوهای جمع آوری شده توسط روش ۲و۲دی فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل (DPPH) ارزیابی گردید. در این تست که با سه بار تکرار انجام می گردد، غلظتی از عصاره ها را که ۵۰ درصد رادیکال را مهار می نماید (IC_{50}) در مقایسه با غلظت هیدروکسی تولوئن بوتیله (BHT) مقایسه می گردد. همانگونه که مشاهده می شود، توانایی مهار رادیکال آزاد توسط نمونه های پوست مغز گردو، مغز گردو، پوست سبز گردو و برگ درخت گردو به ترتیب ۰/۰۱۵± ۱۹ ، ۰/۱۲±۲۲ ، ۰/۲٤ ± ۲۷ و ۰/۱۷ ± ۲۹ میکروگرم در میلی لیتر می باشد. همچنین بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی مربوط به نمونه جمع آوری شده از پوست مغز گردو دارای میزان IC_{50} معادل با ۰/۰۱۵± ۱۹ می باشد. اختلاف آماری معنی داری بین نتایج به دست آمده برای اسانس نمونه ها مشاهده نشد. مقدار F آزمون تجزیه واریانس معنی دار نمی باشد. این بدین معنی است که همه اسانس ها با یکدیگر تفاوت معنی دار ندارند. در نتیجه انجام آزمون مقایسه میانگین چند دامنه ای دانکن تفاوت معنی داری بین میانگین مقدار فعالیت اسانس ها نشان نداد و همه اسانس ها در یک گروه قرار گرفتند. در حالیکه مقدار IC_{50} در نمونه استاندارد هیدروکسی تولوئن بوتیله (BHT)۰/۲۲ ±۸ میلی گرم بر میلی لیتر به دست آورده شد. نتایج نشان داده است که فعالیت آنتی اکسیدانی گردوهای مربوط به

Print to PDF without this message by purchasing novaPDF (http://www.novapdf.com/)

نمونه پوست مغز گردو نسبت به نمونه های جمع آوری شده از دیگر قسمتهای گردو بالاتر بوده و کمترین میزان را نیز نمونه های مربوط به برگ درخت گردو داشت. با توجه به مطالعات صورت گرفته و بر اساس شواهد موجود ارتباط مثبتی بین بالا بودن ترکیبات فنلی و فعالیت آنتی اکسیدانی مواد وجود دارد. بنابراین استفاده از نتایج دیگر مطالعات در کنار این تحیق و مقایسه بین آنها می تواند کمک بسیاری به شناخت ما از خواص آنتی اکسیدانی این گیاه داشته باشد.

REFERENCES:

1.Flanagan J. Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAP) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: A comparative study. J. Agric. Food Chem. 2002; 50: 3122 - 8.

2. Bektas T and Munevver SH. Screening of the antioxidant potentials of six Salvia species from Turkey.

Food Chem. 2006; 95: 200 – 4

3.Yasoubi P, Barzegar M, Sahari MA and Azizi MH. Total phenolic contents and antioxidant activity of pomegranate (Punica granatum L.) peel extracts. J. Food Sci. Technol. 2007; 9: 35 - 42.

4.Shahsavari N, Barzegar M, Sahari MA and Naghdibadi H. Antioxidant activity and chemical characterization of essential oil of Bunium persicum . Plant Foods Hum. Nutr. 2008; 63: 183 -8.

5. Lee SJ. Umano K, Shibamoto T and Lee KG. Identification of volatitle components in basil (Ocimum basilicum L.) and thyme leaves (Thymus vulgaris L.) and their antioxidant properties. Food Chem . 2005; 91: 131 – 7.

Print to PDF without this message by purchasing novaPDF (http://www.novapdf.com/)

کالیبراسیون دستگاه ترموسایکلر جهت بررسی تنوع ژنتیکی سرخس Asplenium L. با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR

معصومه خانعلی پور*[1]، آرمان محمودی اطاقوری[2]، علیرضا نقی نژاد[3]، کمال کاظمی تبار[4]

دانشجوی کارشناسی ارشد سیستماتیک گیاهی دانشگاه مازندران[1]

استادیار گروه زیست شناسی دانشگاه مازندران[2]

دانشیار گروه زیست شناسی دانشگاه مازندران[3]

دانشیار گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری[4]

چکیده:

تکنیک ISSR-PCR روشی ساده، سریع و نیمه‌اختصاصی با تکرارپذیری بالا جهت انجام مطالعات مولکولی می‌باشد در این روش یک پرایمر مکمل با میکروساتلایت هدف مورد استفاده قرار می‌گیرد. DNA با خلوص بالا و همچنین مقادیر ویژه‌ای از مواد مورد استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلیمرازی نیاز است تا بالاترین بازدهی حاصل گردد، از این جهت در پژوهش حاضر با هدف بررسی تنوع ژنتیکی سرخس Asplenium L.، ابتدا DNA با روش ترکیبی CTAB-Dellaporta از این گیاه استخراج گردید، سپس PCR با مقادیر ۱.۲۵ میکرولیتر PCR buffer، ۰.۵ میکرولیتر Mgcl2 ، ۰.۳۲ میکرولیتر dNTP، ۰.۹٤ میکرولیتر پرایمر، ۰.۲ میکرولیتر Taq پلیمراز و ۲ میکرولیتر DNA در حجم ۱۲.۵ میکرولیتر انجام گردید، در نهایت با تنظیم چرخه‌های دمایی نتایج مطلوبی حاصل می‌شود. پرایمرهای مورد استفاده پلی‌مورفیسم جمعیت‌های گردآوری شده از سه استان گیلان، گلستان و مازندران را به خوبی نشان می‌دهد.

واژگان کلیدی: واکنش زنجیره ای پلیمرازی، مارکر ISSR ، پلی مورفیسم، Asplenium

Print to PDF without this message by purchasing novaPDF (http://www.novapdf.com/)

مقدمه:

تیره Aspleniaceae یکی از بزرگترین تیره‌ها در گروه پتریدیوفیتا می‌باشد. جنس .Asplenium L از جمله غنی‌ترین گروه سرخس‌ها با بیش از ۷۰۰ گونه شناخته شده است.[۲] این جنس شامل چندین کمپلکس گونه‌ای می‌شود که از نظر تاکسونومیکی بحث‌برانگیز می‌باشد.[۳] دو گونه مورد مطالعه در این تحقیق A.trichomansوA.adiantumnigrum می‌باشند. گاهی جمعیت‌های ترکیبی از این دو گونه در رویشگاه‌های صخره‌ای و بر روی دیوارها قابل مشاهده است. این دو گونه از نظر توزیع اکولوژیکی و جغرافیایی با هم همپوشانی دارند[۱]. مارکرهای DNA شاخص مهمی در زمینه اصلاح نباتات بویژه برای مطالعه تنوع ژنتیکی و نقشه برداری ژن می‌باشند[٤]. در این تحقیق برای اولین بار در جهان تنوع ژنتیکی دو گونه ذکر شده از جنس .Asplenium L با استفاده از مارکر ISSR مورد مطالعه قرار گرفتند و شرایط بهینه‌سازی دستگاه ترموسایکلر در این پژوهش معرفی گردید.

مواد و روشها:

نمونه‌های برگ فریز شده سرخس Asplenium در آزمایشگاه اصلاح نباتات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری مورد آزمایش قرار گرفتند. استخراج DNA با استفاده با روش ترکیبی CTAB-Dellaporta انجام پذیرفت. نمونه‌های برگی را با استفاده از ازت مایع پودر شده و به تیوب‌های سرد انتقال داده شد. سپس ۱۰۰۰ میکرولیتر بافر استخراج و ۰.۰۱ گرم pvp به تیوب‌ها اضافه گردید و نمونه‌ها به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه ورتکس شدند سپس ٦۰ میکرولیتر (۲۰٪) SDS به آنها اضافه شد. بعد از ۲ دقیقه ورتکس ملایم به مدت ۳۰ دقیقه در بن‌ماری با دمای ٦۰ درجه قرار داده شد.در ادامه مقدار ۲۰۰ میکرولیتر (۱۰٪)CTAB گرم و ۲۰۰ میکرولیتر (۵M) Nacl به هر تیوپ اضافه شده و تیوب‌ها مجددا در بن ماری

Print to PDF without this message by purchasing novaPDF (http://www.novapdf.com/)

با دمای ٦٠ درجه به مدت ٣٠ دقیقه حرارت داده شدند ، سپس مخلوط حاصل را بین دو تیوب ١.٥ تقسیم شده و ٣٧٥ میکرولیتر کلروفرم و ایزوآمین الکل به هر تیوب اضافه شد و پس از ورتکس ملایم،تیوپ‌ها به مدت ده دقیقه با دور١٣٠٠٠ سانتریفیوژشدند در ادامه٤٠٠ میکرولیتر از فاز رویی به تیوب‌های ١.٥ انتقال داده شد و به هریک از تیوپ‌ها ١٠٠٠ میکرولیتر ایزوپروپانول سرد و ٥٠ میکرولیتر استات سدیم اضافه شد. سپس تیوب‌ها را به فریزر ٢٠- به مدت حداقل ٣٠ دقیقه (یک شب) انتقال داده‌شد. با سانتریفیوژ مجدد تیوب‌ها با دور ١٣٠٠٠ به مدت ده دقیقه DNA رسوب کرده ومایع رویی حذف شد. پس از افزودن ٣٠٠ میکرولیتر الکل سرد و سانتریفیوژ به مدت ٣ دقیقه،الکل تخلیه شده و تیوب‌ها در دمای محیط خشک می‌شوند. سپس ٦٠ میکرولیتر TE به تیوب‌ها اضافه شده و به مدت ٢ ساعت در بن ماری قرارداده می‌شود تا DNA در TE حل شود و در نهایت تیوب‌ها به فریزر ٢٠- انتقال می‌یابد. سنجش DNA استخراج شده با استفاده از الکتروفورز و اسپکتروفوتومتری نشان‌دهنده کمیت و کیفیت مطلوب ماده وراثتی می‌باشد. پس از استخراج ماده وراثتی واکنش زنجیره‌ای پلیمرازی را با مقادیر ١.٢٥ میکرولیتر PCR buffer، ٠.٥ میکرولیتر Mgcl2، ٠.٣٢ میکرولیتر dNTP، ٠.٩٤ میکرولیتر پرایمر، ٠.٢ میکرولیتر Taq پلیمراز در حجم ١٢.٥ میکرولیتر مورد آزمون قرار گرفت(شکل ١) .برنامه PCR مورد استفاده برای تکنیک ISSR-PCR، بدین شرح می‌باشد: دمای ٩٤ درجه به مدت ٥ دقیقه، ٩٢ درجه ١ دقیقه، ٥٥ درجه به مدت ١ دقیقه (دمای annealling برای پرایمرهای مختلف متفاوت می باشد)، ٧٢ درجه به مدت ١ دقیقه و ٧٢ درجه به مدت ٥ دقیقه و با تعداد سیکل ٣٥ بار می‌باشد.

نتایج و بحث:

Print to PDF without this message by purchasing novaPDF (http://www.novapdf.com/)

انتخاب بهترین روش استخراج یکی از مراحل مهم در مطالعات مولکولی می‌باشد. در بعضی مواقع بهینه‌سازی پروتوکل استخراج در سطح گونه امری ضروری جهت بهینه‌سازی شرایط PCR می‌باشد[۵]. گیاه Asplenium نیز گیاهی دارویی با متابولیت‌های ثانویه فراوان می‌باشد. دستیابی به پروتوکل استخراج مناسب جهت حذف بازدارنده‌های PCR از اهمیت خاصی برخوردار است. پس از سنجش چندین پروتوکل استخراج DNA با استفاده از روش ترکیبی CTAB – Dellaporta، بهترین کیفیت و کمیت DNA حاصل گردید. بهینه‌سازی واکنش زنجیره‌ای پلیمرازی (PCR) جهت کاهش هزینه و زمان مورد نیاز برای مطالعه تنوع ژنتیکی کاربرد دارد. در این تحقیق با تغییر مقادیر مختلف DNA و $Mgcl_2$ و تغییرات چرخه دمایی دستگاه ترموسایکلر به یک شرایط مطلوب جهت تکثیر توالی DNA دست پیدا کردیم. ابتدا مقادیر غلظت $Mgcl_2$ را در سطوح مختلف ۰.۷۵، ۱، ۱.۵ میکرولیتر با مقدار DNA با غلظت ۷۰ نانوگرم در میکرولیتر را مورد آزمون قرار می‌دهیم. سپس گرادیانت دمای Annealing برای هر پرایمر جهت تعیین بهترین دما مورد استفاده قرار گرفت. در نهایت واکنش کلی بدست آمد که نتایج آن در شکل‌های ۲، ۳ و ٤ به آن اشاره شد. باندهای مشاهده شده روی ژل آگارز ۱.۵٪ پلی‌مورفیسم قابل قبولی را نشان می‌دهند.

شکل ۱– مشخصات مواد مورد استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلیمرازی (PCR)

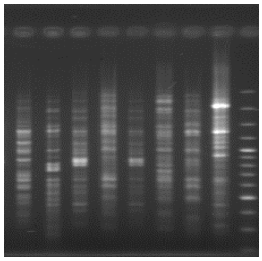
نام اختصاری	غلظت ماده	مقدار حجم در ۱۲.۵ میکرولیتر
PCR buffer	10X	۱.۲۵ µl
dNTP	10mM	۰.۳۲µl
$Mgcl_2$	50mM	۰.۵µl
Primer	10 µM	۲µl
Taq پلیمراز	5 u/µl	۰.۲µl

Print to PDF without this message by purchasing novaPDF (http://www.novapdf.com/)

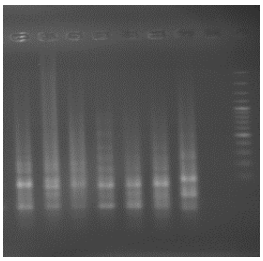
شکل ۲- توالی آغازگرها

نام آغازگر	توالی آغازگر
ISSR20	ATGATGATGATGATGATGG
ISSR17	ACACACACACACACACC

شکل ۳- آغازگر ISSR 20



شکل۴- آغازگر ISSR 17



منابع:

[1] Pangua, Emilia,. Lindsay, Stuart,. Dyer, Adrian. Spore Germination and Gametophyte Development in Three Species of Asplenium.(1994). Annuals of Botany73; 587- 593.
[2] Chang, Yanfen,. Shugang Lu, Jie Li,. Schneider, Harald. Species diversity and reticulate evolution in the Asplenium normale complex (Aspleniaceae) in China and adjacent areas.(2013). Taxon62(4):673-693.
[3] Ekrt, Libor,. Stech Milan,. A morphometric study and revision of the Asplenium trichomanes group in the Czech Republic.(2008). Preslia80: 325-347.
[4] Pradeep Reddy, M,. Sarla, N,. Siddiq, E.A. Inter simple sequence repeat (ISSR) Polymorphism and application in plant breeding.(2002). Euphytica 128: 9-17.
[5] Doosty, Behrooz,. Drikvand, Reza,. Salahvarzi, Elham,. Amiri, Hamzeh,. Hadian, Javad,. Comparative Analysis and Optimization of Different DNA Extraction protocols in Satureja khuzistanica.(2012). International Journal of Biology: Vol.4, No.4.

Print to PDF without this message by purchasing novaPDF (http://www.novapdf.com/)