بسم الله الرحمن الرحیم

صاحب امتیاز: جهاددانشگاهی

مدیر مسؤول: دکتر شاهین آخوندزاده‌بستی

سردبیر: دکتر معصومه شفیعی

هیأت تحریریه (به ترتیب الفبا):

دکتر شاهین آخوندزاده‌بستی — دکتر افشین زرقی
دکتر غلامرضا امین — دکتر سیدهادی صمصام‌شریعت
دکتر محمدرضا اویسی — دکتر سیدعلی ضیائی
دکتر کامبیز بقالیان — دکتر منوچهر قارونی
دکتر حسین حسین‌زاده — دکتر ایرج نوروزیان
دکتر صغری جاروندی — دکتر حسین وطن‌پور
دکتر عباس حاجی‌آخوندی — دکتر نرگس یاسا
دکتر عبدالحسین روستائیان — مهندس داراب یزدانی

مدیر اجرایی: دکتر احمدرضا همتی‌مقدم

شورای اجرایی: دکتر امیرحسین جمشیدی، مهندس موسی خانی، مصطفی افضل و لیلا قوی‌پنجه

ویراستار فارسی: دکتر امیرحسین جمشیدی

ویراستار انگلیسی: دکتر احمد ابراهیمی

لیتوگرافی و چاپ: شرکت ایرانچاپ

تلفن: ۲۹۹۹۹

تصویر روی جلد: گیاه سرخدار (*Taxus baccata* L.)

فصلنامه

گیاهان دارویی

پژوهشکده گیاهان دارویی

جهاددانشگاهی

شماره چهاردهم، بهار ۱۳۸٤

خلاصه مقالات این فصلنامه در بانک‌های اطلاعاتی Chemical Abstracts (CA)، NAPRALERT، IMEMR، EMBASE و Index Copernicus نمایه می‌شود.

آدرس:

تهران، خیابان انقلاب اسلامی، خیابان قدس خیابان بزرگمهر غربی، شماره ۹۷

صندوق پستی: ۱۴٤٤٦-۱۳۱٤٥

تلفن: ٦٤٦٢۱۷۹ و ٦۹٥۰٤٤۷، نمابر: ٦٤٦٥٥٥٤

پست الکترونیک: contact@imp.ac.ir

www.imp.ac.ir

هر گونه استفاده از مطالب نشریه بدون ذکر منابع ممنوع است.

راهنمای نگارش و ارسال مقاله برای فصلنامه علمی- پژوهشی گیاهان دارویی

اصول کلی

۱- نشریه گیاهان دارویی به صورت فصلنامه منتشر می‌شود. این فصلنامه حاوی مقالاتی در زمینه‌های علوم پایه و بالینی مرتبط با گیاهان دارویی شامل فارماکوگنوزی، فارماکولوژی پایه و بالینی، سم‌شناسی پایه و بالینی و فارماسوتیکس می‌باشد.

۲- نوع مقالاتی که در فصلنامه چاپ می‌شود عبارت است از:

- مقالات تحقیقاتی (Research Article): حاصل یافته‌های پژوهشی نویسندگان می‌باشد.
- مقالات مروری (Review Article): موارد استثنایی زمینه‌های مذکور را مطرح می‌نماید.
- گزارشهای موردی (Case Report): موارد استثنایی زمینه‌های مذکور را مطرح می‌نماید.

۳- مقاله بایستی تاکنون در مجلات داخل کشور به چاپ نرسیده و همزمان برای چاپ نشریه داخلی دیگری ارسال نشده باشد.

٤- مسؤولیت صحت مطالب مندرج در مقاله به عهده نویسنده و یا نویسندگان است.

٥- مقاله ارسال شده، توسط هیأت تحریریه بررسی می‌شود سپس توسط سه داور ارزیابی و بعد از آن به تایید نهایی هیأت تحریریه می‌رسد و فصلنامه دراصلاح دستوری و املایی آن مختار است.

٦- تمام مقالات باید با رعایت اخلاق در تحقیقات بالینی و حیوانی و با توجه به بیانیه‌های مشخص در اخلاق پژوهش انجام شده باشد.

نحوه تهیه مقاله

• زبان فصلنامه فارسی است، لذا حتی‌المقدور باید از کلمات فارسی برای بیان مطالب علمی استفاده شود و مقاله بایستی فاقد اشکالات املایی یا نکات دستوری باشد.

• تمامی مطالب متن، منابع، ماخذ و جداول باید یک خط در میان (double space) تایپ شده و دارای حاشیه ۲/۵ سانتیمتر از هر طرف باشد. قلم به کار رفته ترجیحاً لوتوس و اندازه آن ۱۲ باشد.

• تمامی مقالات باید مشتمل بر بخش‌های زیر باشد و هر بخش در صفحه جداگانه‌ای تایپ گردد.

۱- **عنوان مقاله**: عنوان مقاله با قلم ضخیم (bold) تایپ شود. آنگاه نام نویسنده یا نویسندگان، رتبه علمی، آدرس دقیق (شامل نام دانشگاه یا دانشکده، موسسه و واحد تحقیقاتی مرتبط و ...) و کد پستی قید گردد. در پایان صفحه، آدرس مکاتبه‌ای به زبان فارسی همراه با آدرس دقیق و کدپستی، شماره نمابر، تلفن و درصورت امکان پست الکترونیک (E-mail) باشد. همچنین مؤلف مسؤول (corresponding author) با علامت * متمایز شود.

۲- **چکیده مقاله**: چکیده فارسی بایستی دارای بندهای مقدمه، هدف از تحقیق، روش تحقیق، یافته‌ها و نتیجه‌گیری بوده و آنها را به طور اختصار بیان نماید (حداقل ۱۵۰ کلمه و حداکثر ۲۵۰ کلمه). این نکته برای چکیده مقاله به زبان انگلیسی نیز صادق است.

در پایان چکیده مقاله باید تعدادی گل واژه (Keyword) معرفی شود (حداقل ۳ و حداکثر ٥ عبارت، در چکیده فارسی به زبان فارسی و در چکیده انگلیسی به زبان انگلیسی).

۳- **مقدمه**: مقدمه باید ضمن بیان هدف و مسأله مورد تحقیق، حاوی خلاصه‌ای از مطالعات و مشاهدات مرتبط با تحقیق مورد نظر در چند سال اخیر همراه با ذکر منابع و مأخذ آنها باشد. لازم به یادآوری است که نباید در این قسمت داده‌ها و یا نتیجه‌گیری کار گزارش شود.

۴- **مواد و روش‌ها**: مواد و روش تحقیق به معنای بیان واضح موضوعات مشاهداتی یا آزمایشی است به طوری که تکرار آن در آزمایشگاه‌ها یا مراکز دیگر امکان پذیر باشد. مواردی که باید رعایت شوند، عبارت است از: **الف**- منابع تهیه مواد آزمایشگاهی **ب**- چگونگی انتخاب نمونه و کنترل **ج**- ذکر منبع و مرجع روش کار **د**- روش آماری به کار رفته.

۵- **نتایج**: در این بخش بایستی نتایج به دست آمده از تحقیق بدون بحث بیان گردد و نباید داده‌های جداول، تصاویر و نمودارها مجدداً در این قسمت تکرار شوند. شماره جداول، تصاویر و نمودارها بایستی با دقت در متن ذکر گردند وهر کدام در صفحات جداگانه‌ای آورده و شماره گذاری شوند.

۶- **بحث**: در این بخش باید نتایج به دست آمده از تحقیق با دیگر تحقیقات انجام شده در جهان مقایسه گردد و مورد بحث قرار گیرد. همچنین بایستی علت موارد اشتراک و اختلاف با مطالعات دیگر محققان آورده شود. در پایان بحث نتیجه کلی از تحقیقات و پیشنهادهای تحقیقاتی برای آینده حداکثر در ۳ الی ٥ سطر بیان گردد.

۷- **تقدیر و تشکر**: در این بخش می‌توان از تأمین کنندگان بودجه و امکانات کار و اشخاص دیگری که در انجام تحقیق کمک نموده‌اند، سپاسگزاری نمود.

۸- **منابع و مأخذ**: منابع در متن به ترتیب، شماره‌گذاری شده و بر طبق همان شماره در فهرست منابع به صورت ذیل ذکر گردند:

الف) منابع فارسی

مقاله: نام خانوادگی نویسنده یا نویسندگان/ نام کوچک نویسنده یا نویسندگان/ عنوان مقاله/ نام کامل مجله/ سال انتشار/ شماره جلد/ شماره صفحه.

مثال: اسدی محمد حسین، کریمی‌پور مجتبی، خوش‌باطن علی، بهادران حسین و عمیدی فردین. بررسی اثرات ترمیمی پماد گیاهی فاندمول در زخمهای سوختگی درجه دو در موش بزرگ آزمایشگاهی. *مجله پزشکی کوثر*. ۱۳۷۸، شماره ٤، صفحات ٦-۲٤۱.

کتاب: نام خانوادگی نویسنده یا نویسندگان/ نام کوچک نویسنده یا نویسندگان/ نام کتاب/ شماره چاپ/ نام ناشر/ سال انتشار/ شماره جلد/ شماره صفحه.

مثال:زرگری علی. *گیاهان دارویی*. چاپ ششم. موسسه انتشارات و چاپ دانشگاه تهران. ۱۳۷٥، جلد سوم، صفحات ٦-۳٤۳.

ب) منابع انگلیسی:

مقاله: نام خانوادگی نویسنده یا نویسندگان/ نام کوچک نویسنده یا نویسندگان / عنوان مقاله/ نام اختصاری مجله/ سال انتشار/ شماره جلد/ شماره صفحه.

مثال:

-Harkey MR, Henderson GL, Gershwin ME, Stem JS and Hechman RM. Variability in commercial ginseng products: an analysis of 25 preparations. *Am. J. Clin. Nutr*. 2001; 73: 1101- 1106.

کتاب: نام خانوادگی نویسنده یا نویسندگان/ نام کوچک نویسنده یا نویسندگان/ نام کتاب/ شماره چاپ/ نام ناشر/ محل انتشار کتاب/ سال انتشار/ شماره صفحه.

-Duke JA. Handbook of Medicinal Herbs. 2nd ed. CRC Press LLC. USA. 2001, pp: 256-7.

-Wink M. Special Nitrogen Metabolism In: Dey PM and Harborne JB. *Plant Biochemistry*. Acadmic Press. USA. 1997, pp: 439-57.

ذکر اسامی تمامی نویسندگان کتب و یا مقالات الزامی است.

۹- **تصاویر، نمودارها و جداول**: نسخه اصلی تصاویر، نمودارها و جداول هر کدام در صفحات جداگانه و در کاغذ A4 گلاسه ارسال گردد. ذکر شماره هر کدام، نام نوسینده اول و جهت تصویر در پشت هر یک ضروری است. تعداد تصاویر، نمودارها و جداول نباید بیش از ٦ مورد باشد. عکسها حتی المقدور به صورت سیاه و سفید تهیه شود. در صورت تمایل برای چاپ رنگی هزینه بر عهده نویسنده می‌باشد.

۱۰- **زیرنویس تصاویر و نمودارها**: در این بخش زیرنویس تصاویر و نمودارها در صفحه‌ای جداگانه با ذکر شماره آنها به دقت شرح داده می‌شود. لازم است اختصارات موجود در تصاویر، در زیرنویس فارسی توضیح داده شود.

• مقالات تحقیقاتی و موردی شامل موارد ۱ تا ۱۰ است.

• مقالات مروری شامل بخش‌های: مقدمه، اصل مقاله، تشکر ومنابع می‌باشد.

نحوه ارسال مقاله:

نویسنده و یا نویسندگان باید اصل مقاله به انضمام سه نسخه کپی آن را به آدرس زیر ارسال دارند. لازم به ذکر است ارسال دیکست حاوی متن مقاله با نرم افزار Word 2000 الزامی است. در ضمن ارسال مقاله از طریق سایت www.sid.ir نیز امکان‌پذیر می‌باشد.

آدرس: تهران، خیابان انقلاب اسلامی، خیابان قدس، خیابان بزرگمهر غربی، شماره ۹۷، صندوق پستی ١٤٤٦-١٣١٤٥

تلفن: ٦٤٦٢١٧٩- ٦٩٥٠٤٤٧ (٠٢١) و نمابر: ٦٤٦٥٥٥٤ (٠٢١)

پست الکترونیک: contact@imp.ac.ir

تولید متابولیت‌های ثانویه و مواد دارویی از طریق کشت بافت و سلول‌های گیاهی

بهنام حبیبی خانیانی[1]*، احمد معینی[2]، محمدرضا عبدالهی[3]

۱-کارشناس ارشد اصلاح نباتات از دانشگاه تربیت‌مدرس، عضو هیأت علمی پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی

۲- استادیار، گروه اصلاح نباتات، دانشگاه تربیت مدرس

۳- دانشجوی دکتری اصلاح نباتات، دانشگاه تربیت مدرس

* آدرس مکاتبه: تهران، خیابان انقلاب اسلامی، خیابان قدس، خیابان بزرگمهر غربی، پلاک ۹۷، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی، صندوق پستی: ۱٤٤٦- ۱۳۱٤٥، تلفن: ٦٤٦۲۱۷۹ (۰۲۱)، نمابر: ٦٤٦٥٥٥٤ (۰۲۱)

پست الکترونیک: Habibi@IMP.ac.ir

تاریخ تصویب: ۸٤/۲/۱۷

چکیده

واکنش‌های شیمیایی که در گیاهان روی می‌دهد به عنوان متابولیسم شناخته شده و متابولیت‌های اولیه شامل ترکیبات بیوشیمیایی مهم یعنی کربوهیدرات‌ها، پروتئین‌ها و چربی‌ها می‌باشند. سایر ترکیبات بیوشیمیایی که جزء این سه گروه نباشد به عنوان متابولیت‌های ثانویه شناخته می‌شوند که دامنه وسیعی از مواد مانند ترکیبات دارویی، چاشنی‌های غذایی، حشره‌کش‌ها و رنگ‌های طبیعی را شامل می‌شوند. کشت بافت گیاهی یکی از مهم‌ترین تکنیک‌ها در راستای تولید صنعتی متابولیت‌های ثانویه است زیرا پتانسیل تولید این مواد در شرایط طبیعی بسیار محدود می‌باشد. تکنیک‌های مورد استفاده در این زمینه عمدتاً عبارتند از: کشت سلول، کشت اندام و کشت ریشه‌های مویین. از طریق کشت سلول‌های گیاهی به روش‌های مختلفی می‌توان میزان تولید متابولیت‌های ثانویه را افزایش داد که از این روش‌ها می‌توان به انتخاب لاین‌های سلولی با تولید بالا، تغییر عناصر غذایی و هورمون‌های محیط کشت، بهینه‌سازی شرایط کشت، استفاده از تکنیک انگیزش و همچنین انتقال ترکیبات تولید شده در شرایط *in situ* اشاره نمود. به طور کلی می‌توان گفت که استفاده از این تکنیک‌ها در تولید برخی ترکیبات دارویی طبیعی می‌تواند سود اقتصادی بالایی را به همراه داشته باشد.

گل‌واژگان: متابولیت‌های ثانویه، کشت بافت، کشت سلول، کشت ریشه مویین

مقدمه

بشر در طول قرن‌ها به گیاهان به عنوان منبع کربوهیدرات، پروتئین و چربی وابستگی کامل داشته است. علاوه براین گیاهان منبع طیف وسیعی از متابولیت‌های ثانویه می‌باشند. عمدتاً یکسری از واکنش‌های شیمیایی که واسطه آنزیمی دارند در گیاه زنده به عنوان متابولیسم شناخته می‌شوند. این واکنش‌های شیمیایی با هم هماهنگ شده تا مسیرهای متابولیکی که در آنها سنتز مولکول‌هایی مثل قندها، اسیدهای آمینه، اسیدهای چرب عمده، نوکلئوتیدها و پلیمرهای حاصل از آنها (DNA, RNA) انجام می‌شود به دست آیند. این تجمع به عنوان متابولیسم اولیه در نظر گرفته می‌شود و ترکیبات تولیدشده که برای زنده ماندن و سالم ماندن گیاه لازم هستند متابولیت اولیه نامیده می‌شوند. همچنین در گیاهان، مسیرهای متابولیکی دیگری نیز وجود دارد که محصول این مسیرها برای موجود کاملاً مشخص نیست که به این ترکیبات متابولیت‌های ثانویه اطلاق می‌گردد و به مسیر تولید آنها متابولیسم ثانوی گویند. تولید متابولیت‌های ثانویه بخشی از سیستم دفاعی گیاه را تشکیل می‌دهد. متابولیت‌های ثانویه جنبه‌های مهمی از کیفیت غذای انسان (رنگ، طعم و بو) را تعیین می‌کنند. برخی از آنها نظیر رنگدانه‌های گیاهی برای تنوع گلها و گیاهان زینتی مهم هستند. تعدادی از متابولیت‌های ثانویه گیاهی برای تولید داروها، حشره‌کش‌ها، چاشنی‌های غذایی، رنگ‌ها و خوشبوکننده‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند [۱].

مسیرهای متابولیکی بخشی از برنامه تکاملی به حساب می‌آیند و در حقیقت متابولیسم ثانویه نشانه تمایز سلول است و تشکیل متابولیت‌های ثانویه نشانه اختصاصی شدن سلول‌ها است. بررسی‌ها نشان داده است که میزان استفاده از گیاهان در طب از حدود ۳ درصد در سال ۱۹۹۱ به ۳۷ درصد در سال ۱۹۹۸ رسیده است [۲]. علی‌رغم پیشرفت‌ها در زمینه شیمی مصنوعات ما هنوز به منابع بیولوژیکی برای تولید تعدادی از متابولیت‌های ثانویه از جمله مواد دارویی نیازمندیم[۳]. با توجه به آنکه در طبیعت سرعت تولید متابولیت‌های ثانویه آهسته بوده و مدت زمان طولانی برای تولید لازم است بنابراین میزان تولید اقتصادی نبوده و ضروری به نظر می‌رسد که برای تولید سریع و انبوه متابولیت‌های ثانویه و مواد دارویی، از فنون کشت بافت گیاهی به طور بهینه استفاده گردد.

استفاده از علم بیوتکنولوژی در راستای تولید متابولیت‌های ثانویه و مواد دارویی

علم بیوتکنولوژی از طریق کشت سلول، بافت یا اندام، در شرایط درون شیشه‌ای[1] فرصتی را فراهم می‌کند تا ترکیب مورد نظر به دست آید. توسعه روش‌های ریزازدیادی برای تولید تعدادی از گونه‌های گیاهان دارویی و همچنین ضرورت استفاده از آن در بسیاری موارد گزارش شده است [٤]. افزایش به کارگیری روش‌های کشت سلول و اندامهای گیاهی منجر به تولید متابولیت‌های گیاه در مقیاس وسیع به این شیوه شده است. پیشرفت در تحقیقات زیست‌شناسی مولکولی، جنبه جدیدی را در کشت درون شیشه‌ای ایجاد کرده است که افزایش عملکرد و همچنین تولید محصولات متعدد یا محصولات جدید از گیاهان تراریخت از آن جمله می‌باشد [۱]. علاوه بر این، نیاز به داروهای موثر و فاقد اثرات جانبی ضروری می‌نماید تا از مواد طبیعی با ایمنی لازم استفاده گردد که در ذیل به روش‌های جدید تولید متابولیت‌های ثانویه اشاره می‌شود:

۱- کشت سلول گیاهی برای تولید متابولیت‌های ثانویه

کشت سلول‌های گیاهی یک منبع مناسب و مهم برای تولید متابولیت‌های ثانویه باارزش در اکثر گیاهان است [۵،٦،۷]. سلول‌های گیاهی از نظر بیوسنتزی خاصیت توتی‌پتانسی[2] دارند بدین معنی که هر سلول تحت کشت، تمام اطلاعات ژنتیکی گیاه والد را دارا است و از این‌رو این توانایی را دارد تا دامنه‌ای از مواد شیمیایی را که در گیاه والدینی یافت می‌شود تولید نماید [۱]. مزیت این روش در مقایسه با تولید از طریق کشت‌های رایج به شرح ذیل است:

- این روش مستقل از تغییرات فصلی، جغرافیایی و فاکتورهای محیطی مختلف می‌باشد.

[1] *in vitro*
[2] Totipotency

– در این روش ممکن است ترکیبات جدیدی تولید شوند که در شرایط طبیعی در گیاه مادری وجود نداشته باشند.
– تولید با هزینه کم و سرعت بالا انجام می‌گیرد.

۱-۱- برخی تکنیک‌ها جهت افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در شرایط کشت سلولی

۱-۱-۱-انتخاب لاین‌های سلولی با قابلیت تولید بالا

در این روش یک گیاه مادری که حاوی سطوح بالایی از متابولیت‌های مورد نظر است انتخاب شده و کالوس‌زایی در این گیاه القا می‌شود تا لاین‌های سلولی با تولید بالا به دست آید. سپس یک غربال در جمعیت ناهمگن برای کلونی‌های سلولی مختلف که دارای بالاترین میزان از محصولات مورد نظر هستند انجام می‌گیرد. از ناهمگنی ژنتیکی (از نظر فعالیت بیوشیمیایی) در داخل جمعیت سلول‌ها برای حصول لاین‌های سلولی با قابلیت تولید بالا استفاده می‌گردد [۱].

۱-۱-۲-بهینه‌سازی عناصر غذایی و تنظیم‌کننده‌های رشد محیط کشت

۱-۱-۲-۱- قند

مقدار ساکارز بر میزان تولید و تجمع متابولیت‌های ثانویه در کشت‌های سلولی موثر می‌باشد. به طور مثال، در کشت سلولی گیاه حسن یوسف[1] با ۲/۵ و ۷/۵ درصد ساکارز، میزان عملکرد رزمارینیک اسید به ترتیب برابر با ۰/۸ و ۳/۳ گرم در لیتر بوده است و در اغلب موارد گزارش شده که با افزایش میزان قندها در محیط کشت میزان تولید متابولیت‌های ثانویه افزایش می‌یابد، در برخی موارد نیز عکس این قضیه گزارش شده است [۸].

۱-۱-۲-۲- نیتروژن

نسبت آمونیوم به نیترات و همچنین میزان کل نیتروژن در محیط کشت به طور چشمگیری بر میزان تولید متابولیت‌های ثانویه تاثیر دارد. به طور مثال سطوح پایین آمونیوم و سطوح بالای نیترات باعث تحریک تولید شیکونین[2] و بتاسیانین[3] می‌شود در حالی‌که نسبت بالاتر آمونیوم به نیترات، تولید بربرین[4] و اوبیکینون[5] را در کشت‌های سلولی کاهش می‌دهد [۹].

۱-۱-۲-۳- فسفات

میزان بالای فسفات در محیط کشت باعث افزایش رشد سلول می‌شود در حالی‌که می‌تواند تاثیر منفی بر تجمع متابولیت‌های ثانویه داشته باشد و بسته به گونه گیاهی و ترکیب محیط کشت، افزایش فسفات می‌تواند تاثیر مثبت یا منفی بر تجمع متابولیت‌های ثانویه داشته باشد[۱].

۱-۱-۲-٤- تنظیم‌کننده‌های رشد

نوع و مقدار اکسین یا سیتوکینین، یا نسبت اکسین به سیتوکینین، تشکیل و تجمع متابولیت‌های ثانویه را در سلول‌های گیاهی کشت شده تغییر می‌دهد [۹]. مشخص شده است که تنظیم‌کننده رشد 2,4D[1] از تولید متابولیت‌های ثانویه در بسیاری از موارد ممانعت به عمل می‌آورد. همچنین مشخص شده که اسیدجیبرلیک و اسیدآبسزیک، تولید آنتوسیانین را در برخی از کشت‌های درون شیشه‌ای متوقف می‌سازند [۱۰].

۱-۱-۲-۵- پیش‌ماده‌ها

اضافه کردن پیش‌ماده‌ها برای افزایش متابولیت‌های ثانویه در کشت سلول‌های گیاهی به طور غالب استفاده می‌شود و هر ترکیبی (ترکیب حد واسط) که در آغاز یک مسیر بیوسنتزی متابولیت‌های ثانویه قرار دارد می‌تواند جهت افزایش عملکرد متابولیت به کار رود. به طور مثال اضافه کردن فنیل آلانین به عنوان یک پیش ماده باعث بهبود عملکرد تولید رزمارینیک اسید در کشت سلولی گیاه حسن یوسف شده است [۱۱]. در آزمایش دیگری با افزودن پیش‌ماده‌های موالونات و ان-بنزوییل گلایسین به کشت سوسپانسیون سلولی گیاه سرخدار میزان تولید تاکسول تا حدود ۳ برابر افزایش یافت [۱۲].

۱-۱-۳- بهینه‌سازی شرایط محیط کشت

۱-۱-۳-۱- درجه حرارت محیط کشت

دمای ۲۵ – ۱۷ درجه سانتی‌گراد به طور معمول جهت القا بافت کالوس و رشد سلول‌های کشت شده مورد استفاده قرار

---

[1] *Coleus blumei*
[2] Shikonin
[3] Betacyanin
[4] Berberine
[5] Ubiquinone
[1] 2,4-dichlorophenoxyacetic acid

می‌گیرد با این وجود درجه حرارت مناسب برای هر گونه گیاهی ممکن است متفاوت باشد [۱].

۱-۱-۳-۲- نور

به طور کلی هم کیفیت و هم شدت نور می‌تواند بر میزان تولید متابولیت‌های ثانویه تاثیرگذار باشد و این بستگی به گونه گیاهی دارد. برای مثال مشخص شده که تجمع آنتوسیانین به میزان بسیار زیادی به وسیله نور در کشت سلولی گیاه هویج[1] و هیبریدهای انگور تحریک می‌شود [۱۰].

۱-۱-۳-۳- pH محیط کشت

به منظور تولید حداکثر متابولیت‌های ثانویه در محیط‌های کشت سلولی معمولاً pH محیط کشت باید بین ٦ – ٥ تنظیم شود و از pH بالاتر بایستی خودداری گردد.

۱-۱-۳-٤- تهویه محیط کشت

به هم زدن و هوادهی محیط کشت برای تولید متابولیت‌های ثانویه در مقیاس وسیع ضروری است. گزارش شده که افزایش میزان اکسیژن به میزان ٥٠ درصد، مقدار یک نوع آلکالویید را تا حد ۳ g/l در محیط کشت به مدت ۲۰ روز پس از رشد در یک بیورآکتور افزایش می‌دهد [۱۳]. در اغلب موارد مشخص شده که تهویه سریعتر و مطلوبتر موجب افزایش تولید انواع متابولیتها در کشت‌های سلولی می‌گردد.

۱-۱-٤- انگیزش[2]

در طبیعت در برخی موارد متابولیت‌های ثانویه گیاهی به عنوان یک مکانیسم دفاعی در برابر حمله پاتوژن‌ها تولید می‌شوند و مشخص شده که گیاهان هنگامی که با ترکیباتی با منشای پاتوژنی[3] روبرو می‌شوند چنین واکنش مشابهی را از خود نشان می‌دهند. الیسیتورها سیگنال‌هایی تولید می‌کنند که باعث تحریک تشکیل متابولیت‌های ثانویه می‌شوند و از این روش می‌توان برای تولید بیشتر متابولیت‌ها استفاده نمود [۱]. الیسیتورها می‌توانند بسته به نوع گیاه و نوع متابولیت مورد نظر از ارگانیسم‌ها استخراج شوند و یا اینکه از برخی مواد شیمیایی به عنوان الیسیتور استفاده نمود[١٤]. برای مثال مشخص شده که افزودن نیترات نقره، کلرید کبالت، سولفات وانادیل و فنیل آلانین به عنوان الیسیتورهای شیمیایی و همچنین استفاده از الیسیتورهای استخراجی از قارچ *Rhizopus stelonifera* در کشت سوسپانسیون سلولی درخت سرخدار[1]، میزان تاکسول تولید شده نسبت به حالتی که هیچ الیسیتوری اضافه نشده بود، چندین برابر افزایش یافت[١٤].

۱-۱-٥- نفوذپذیر کردن سلول

در بسیاری از موارد، محصولات تولید شده در کشت سوسپانسیون سلولی، در واکوئل‌های سلول گیاهی ذخیره می‌شوند. به منظور آزاد کردن این محصولات از واکوئل سلول گیاهی، دو مانع غشایی یعنی غشا پلاسما و تونوپلاست بایستی نفوذپذیر باشند. تلاش‌هایی برای نفوذپذیر کردن سلول‌های گیاهی به طور موقت انجام شده است تا بدین وسیله سلول‌ها را زنده نگه دارند و مدت زمان انتقال متابولیت‌ها را به داخل یا خارج سلول کوتاه کنند [١٥،١٦]. بدین منظور از موادی مثل ایزوپروپانول[2] و DMSO (دی متیل سولفوکساید) استفاده شده است [۱].

۱-۱-٦- انتقال محصولات درشرایط *in situ*

گاهی اوقات تجمع کم متابولیت‌های ثانویه در کشت‌های سلولی ممکن است به دلیل فقدان بیوسنتز آنزیم‌های کلیدی نباشد بلکه ممکن است به دلایل بازداری به حالت فیدبک، تجزیه آنزیمی یا غیر آنزیمی محصولات در محیط کشت یا فرار بودن مواد تولید شده باشد. در چنین مواردی این امکان وجود دارد که با اضافه کردن یک مکان مصنوعی کاذب برای تجمع متابولیت‌های ثانویه تولید شده، مقدار محصول را افزایش دهیم. یکی از این مکان‌های مصنوعی، یک ترکیب رزینی به نام XAD-7 می‌باشد که در کشت سلول‌های گیاهی بدین منظور استفاده می‌گردد[۱].

۲- کشت اندام‌های گیاهی برای تولید متابولیت‌های ثانویه

چون تولید متابولیت‌های ثانویه بیشتر در بافت‌های تمایز یافته انجام می‌شود، تلاش‌های زیادی صورت گرفته تا بتوان

[1] *Daucus carota*
[2] Elicitation
[3] Elicitores

[1] *Taxus baccata*
[2] Isopropranol

ترکیبات دارویی بسیار مهم را از طریق کشت ریشه و ساقه گیاه به دست آورد. کشت چنین اندام‌هایی از نظر تولید نسبتاً پایدارتر می‌باشد [۱۷]. سیستم ریشه‌ای گیاهان عالی عموماً رشد آهسته‌تری داشته و برای برداشت مشکل می‌باشد و بدین دلیل برای تولید متابولیت‌هایی که در ریشه گیاه وجود دارد معمولاً از کشت ریشه مویین استفاده می‌شود. در تعدادی از گیاهان دارویی از جمله شابیزک، پروانش کبیر، گل انگشتانه و درمنه کشت بافت ساقه به منظور تولید متابولیت‌های ثانویه مورد مطالعه قرار گرفته است[۱۸].

۳- کشت ریشه‌های مویین برای تولید متابولیت‌های ثانویه

با توجه به توانایی باکتری *Agrobactrium rhizogenes* برای القای ریشه‌های مویین در تعدادی از میزبان‌های گیاهی، می‌توان از این ریشه‌ها به عنوان منبعی برای تولید مواد دارویی استفاده نمود [۱۹]. ریشه‌های مویین به وسیله انتقال T-DNA (Transfer DNA) از پلاسمید *Agrobactrium rhizogenes* به بافت‌های میزبان القا می‌شوند که در نتیجه، ویژگی سنتز هورمون اکسین توسط ژنهایی که بوسیله DNA باکتریایی کد می‌شوند به میزبان سرایت می‌کند. به منظور مطالعه روی تولید انبوه ریشه‌های مویین، در مواردی آنها را در بیورآکتورها کشت کرده‌اند. کشت ریشه‌های مویین در بسیاری از گیاهان دارویی ازجمله کاسنی، تاتوره، سنا، سرخارگل، جینسینگ، مریم‌گلی، افسنطین، سنبل‌الطیب، بذرالبنج و شیرین‌بیان برای تولید متابولیتهای ثانویه مورد استفاده قرار گرفته است[۱۸]. اساساً اهمیت ریشه‌های مویین به دلیل رشد سریع آنها بدون نیاز به اکسین‌های خارجی است. چشمگیرترین موفقیت در زمینه تولید ریشه‌های مویین در مقیاس وسیع در بیورآکتورها در مورد کشت ریشه مویین گیاه دارویی جینسینگ (*Panax ginseng*) به دست آمده است که در یک محفظه رشد با ظرفیت ۲۰ تن انجام گرفته است[۱].

٤- تثبیت سلول‌های گیاهی برای تولید متابولیت‌های ثانویه

در این تکنیک سلول‌های گیاهی مورد نظر یا یک آنزیم فعال (از لحاظ کاتالیزوری) را در یک ستون ثابت محصور کرده و از ورود آن به فاز مایع جلوگیری می‌کنند. این ستون مانند یک کارخانه عمل کرده که مواد ورودی (پیش‌ماده‌ها) از یک‌طرف وارد ستون شده و از طرف دیگر ماده موثره مورد نظر خارج می‌شود مزیت این سیستم سرعت بالای عملکرد آن می‌باشد. آلجینات کلسیم رایج‌ترین ماده‌ای است که به منظور محصور کردن سلول‌ها و آنزیمها به کار می‌رود [۱]. از این تکنیک برای تولید مواد موثر در کشت سلولی گیاهانی مانند هویج، پروانش کبیر، گل‌انگشتانه، خشخاش، توتون و اسطوخودوس استفاده شده است.

۵- نتیجه‌گیری

اگر چه از طریق کشت سلول‌های گیاهی می‌توان طیف وسیعی از متابولیت‌های ثانویه را تولید کرد اما در برخی موارد تولید آنها، اقتصادی بوده است. تولید ترکیباتی با حجم کم و قیمت بالا از قبیل ترکیبات ضدسرطان و ضدایدز از جمله مواردی است که می‌توان با این تکنیک به طور اقتصادی تولید نمود. در حال حاضر استفاده از این تکنولوژی در تولید تعداد اندکی از مواد دارویی ارزش اقتصادی بالایی را به همراه داشته است. امید است که با پیشرفت علم در زمینه‌های بیوشیمی، تنظیم مسیر تولید متابولیت‌های ثانویه و همچنین توانایی ظهور صفات مطلوب بوسیله انتقال ژن، این تکنولوژی به سمت تولید طیف وسیعی از مواد دارویی طبیعی پیش رود.

منابع

1. Ramachandra Rao S, Ravishankar GA. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances* 2002; 20: 101-153.

2. Brevoort P. The blooming U.S. botanical market: A new overview. *Herbalgram*. 1998; 44: 33 - 46.

3. Pezzuto JM. Natural product cancer chemoprotective agents. In: Arnason JT, Mata R, Romeo JT, editors. *Recent advances in phytochemistry*. Phytochemistry of medicinal plants. New York: Plenum press. 1995; 29: 19-45.

4. Naik GR. Micropropagation studies in medicinal and aromatic plants. In: Khan IA, Khanun A, editors. *Role of biotechnology in medicinal and aromatic plants*. Hyderbad: Ukaz publications. 1998; 50-56.

5. Alfermann AW, Petersen M. Natural products formation by plant cell biotechnology. *Plant Cell, Tissue and Org Culture* 1995; 43: 199-205.

6. Dornenburg H, Knorr D. Production of the phenolic flavour compounds with cultured cells and tissue of *Vanilla planifolia* species. *Food Biotechnol*. 1996; 10: 75-92.

7. Ravishankar GA, Bhyalakshmi N, Ramachandra Rao S. Production of food additives. In: Ramawat KG, Merillon JM, editors. *Biotechnology: secondary metabolites*. New Delhi: Oxford IBH. 1999; 89-110.

8. Misava M. Production of useful plant metabolites. In: Flechter A, editors. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* Berlin: springer-Verlag. 1985; 59-88.

9. Bohn H, Rink E. Betalaines. In: Constabel F, Vasil I, editors. *Cell culture and somatic cell genetics of plants*. New York: Academic Press. 1988; 5: 449-463.

10. Seitz HU, Hinderer W. Anthocyanins. In: constabeb F, Vasil I, editors. *Cell culture and somatic cell genetics of plants*. San Diego: Academic Press. 1988; 5: 49-76.

11. Ibrahim RK. Regulation of synthesis of phenolics. In: Constabel F, Vasil I, editors. *Cell culture and somatic cell genetics of plants*. San Diego: Academic Press. 1987; 4: 77-95.

12. Cusido R M, Palazon J, Bonfill M, Navia-osorio A, Morales C, Pinol M T. Improved paclitaxel and baccatin III production in suspension cultures of *Taxus media*. *Biotechnol. Prog*. 2002; 18: 418-423.

13. Kreis W, Reinhard E. The production of secondary metabolites by plant cells cultivated in bioreactors. *Planta Med*. 1989; 55: 409-416.

١٤. یاری خسروشاهی احمد. *بررسی پاسخ به کشت بافت در سرخدار و میزان تاکسول تولیدی در شرایط In vitro*. پایان‌نامه دوره کارشناسی‌ارشد بیوتکنولوژی. دانشگاه تبریز. ۱۳۸۳، صفحات ۵۳، ۸٦، ۸۷ و ۹۱.

15. Brodelius P, Nilsson K. Permeabilization of immobilized plant cells resulting in release of intracellularly stored products with preserved cell viability. *Eur. J. Appl. Microbial. Biotechnol*. 1983; 17: 275-280.

16. Parr AJ, Robins RJ, Rhodes MJC. Release of secondary metabolites by plant cell cultures. In: webb C, Mavituna F, editors. *Plant and animal cells: process possibilities*. Chichester: Ellos Horwood. 1987; 229-237.

17. Roja G. *Biotechnology of indigenous medicinal plants*. Ph.D Thesis. Bombay University. Bombay. 1994.

18. Ravishankar GA, Ramachandra Rao S. Biotechnological production of phyto-pharmaceuticals. *J. Biochem. Mol. Biol. Biophys.* 2000; 4: 73-102.

19. Flores He, Vivanco JM, Loyola-Vorgas M. Radicle biochemistry: the biology of root-specific metabolism. *Trends. Plant. Sci.* 1999; 4: 220-226.