تاثیر اسید سالیسیلیک بر تولید آتروپین در کشت کالوس گیاه *Datura metel* L.

وحید زنگنه[1] ، غلامرضا اصغری[2*] ، علی اکبر احسان پور[3]

گروه فارماکوگنوزی ، دانشکده داروسازی و علوم دارویی ، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران[1]

مرکز تحقیقات علوم داروئی اصفهان ، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران[2]

گروه زیست شناسی ، دانشکده علوم ، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران[3]

تاریخ دریافت : 88/5/14 ، تاریخ پذیرش : 88/9/25

Influence of Salicylic acid on Atropine Production in *Datura metel* L. Callus Cultures

Zangeneh V, Asghari G[*], Ehsanpour A,

[1]Isfahan Pharmaceutical Sciences Research Center, Isfahan University of Medicinal Sciences, Isfahan, Iran
[2]Drug Applied Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.
[3]Biology department, Faculty of Science, Isfahan University, Isfahan, Iran.

Received: 5 Aug. 2009, Accepted: 16 Dec. 2009

Objectives: Atropine is a pharmaceutical important alkaloid, with anticholinergic activity. Elicitor treatment appears to be the most successful techniques employed to stimulate biosynthesis of secondary metabolites. In present study callus culture of *Datura metel* were treated with salicylic acid in order to stimulate the biosynthesis of atropine. **Methods:** Callus culture of *Datura metel* were established by transferring seedling on solidified MS medium. Optimal callus of fifth generation were subjected to medium supplemented with different concentration of salicylic acid. After twenty eight days calluses were collected, dried and extracted. The atropine was determined using HPLC method. **Results:** Treatment of the culture with 25, 50, 200 µM salicylic acid increased callus dried weight. No significant differences were observed in atropine production in callus treated with 25, 50, 200 µM salicylic acid. **Conclusion:** It seems that salicylic acid in specific concentration can stimulate primary metabolism in callus culture of *Datura metel* but no changes was observed in secondary metabolism related to atropine production. It may conclude that salicylic acid effect on secondary metabolite production in plant cell culture related to the moiety of target compound and plant genetics.

Key words: *atropine, Callus, salicylic acid, Datura metel*

زمینه وهدف: داتورا متل (*Datura metel*) حاوی آتروپین با خاصیت آنتی کلینرژیکی است. تیمار با الیسیتورها یکی از راههای افزایش تولید متابولیتهای ثانویه در محیط کشت سلولهای گیاهی می باشد. در این مطالعه تاثیر اسید سالیسیلیک بر میزان تولید آتروپین در کشت کالوس گیاه داتورا مورد بررسی قرار گرفت. روشها: ابتدا دانه رستهای گیاه جهت تهیه کالوس به محیط کشت موراشیگ و اسکوگ (MS)منتقل شد ند. کالوسهای بدست آمده در محیط کشت حاوی غلظتهای مختلف اسید سالیسیلیک واکشت شدند. کالوسهای هر تیمار به صورت خشک و تر توزین شدند . آنالیز آتروپین به روش HPLC انجام گرفت. یافته ها : تفاوت معنی داری در وزن کالوسهای تازه نمونه تیمار در مقایسه با شاهد مشاهده نگردید. امّا وزن کالوسهای خشک شده تیماردر غلظتهای 25 ، 50 و 200 میکرو مولار اسید سالیسیلیک در مقایسه با نمونه شاهد افزایش نشان داد. اسید سالیسیلیک بر تولید آتروپین اثری نداشت. نتیجه گیری : اسید سالیسیلیک می تواند فعالیت متابولیسم اولیه را در کالوسها ی داتورا تحریک کند ولی با توجه به عدم تاثیر آن بر تولید آتروپین به نظر میرسد که تاثیر آن به ماهیت ترکیب هدف و ژنتیک گیاه بستگی دارد.

واژه های کلیدی : *Datura metel* ، *کالوس* ، *اسید سالیسیلیک* ، *آتروپین*

*Corresponding Author: Gholamreza Asghari , Professor , Isfahan Pharmaceutical Sciences Research Center , Isfahan University of Medical Sciences , Isfahan , Iran.Tel:+98-311-7922644; Fax: +98-311-6680011; E-Mail : asghari@pharm.mui.ac.ir

*نویسنده مسئول : غلامرضا اصغری، استاد مرکز تحقیقات علوم داروئی اصفهان ، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان ، اصفهان ، ایران ، تلفن: 7922644- 0311 ، نمابر: 0311-6680011

Archive of SID

www.SID.ir

1 – مقدمه

Datura metel گیاهی از خانواده سیب زمینی (Solanaceae) است و جنس داتورا حاوی آلکالوئیدهای آتروپین و اسکوپولامین با خاصیت آنتی کلینرژیکی است. این آلکالوئیدهااز نظر اقتصادی و دارویی دارای اهمیت قابل توجهی هستند(1). با توجه به اثرات آنتی کلینرژیکی آتروپین ، این ترکیب در ایست قلبی و برادیکاردی سینوسی و قبل از بیهوشی جهت کاهش ترشحات مجاری تنفسی و غدد بزاقی و نیز به عنوان آنتی دوت در مسمومیت با ارگانوفسفره ها و جهت ایجاد میدریاز درچشم پزشکی استفاده می شود(2). به علت تأثیر عوامل محیطی بر مقدار و ماهیت ترکیبات شیمیایی تولید شده در زراعت گیاهان، در سالهای اخیر روشهای کشت بافت گیاهی مورد توجه قرار گرفته است. تحریک مسیرهای متابولیکی در سلولهای گیاهی کشت شده به کمک الیستیورهای زیستی (elicitors) مانند میسیلیوم اتوکلاوشده قارچهای پاتوژن و عصاره های پروتئینی مختلف و الیستیورهای غیر زیستی مانند دما و تغییرات اسیدیته محیط میتواند منجر به افزایش قابل توجه در تولید متابولیتهای ثانویه شود(3). بررسیها نشان می دهد، مواجهه گیاهان با الیسیتورها یا حمله پاتوژنهای نا آشنا موجب یکسری واکنشهای دفاعی می گردد که در انتها به افزایش تولید متابولیتهای ثانویه منجر می شود(4،5). تحقیقات صورت گرفته نشان داده است اسید سالیسیلیک همچون سایر الیسیتورها بیان ژنهای مرتبط با بیوسنتز و تولید تعداد زیادی از دسته های مختلف متابولیتهای ثانویه را در گیاه القاء می کند(6). تیمارکشت ریشه مویی Brugmansia candida با اسید سالیسیلیک تولید تروپان آلکالوئیدهای اسکوپولامین و هیوسیامین را به طور قابل توجهی افزایش داده است(7). تولید ایندول گلوکزاینولاتها در کشت سلولی گیاه Arabidopsis و تجمع ایندول آلکالوییدها درکشت کالوس گیاه پروانش با استفاده از اسید سالیسیلیک افزایش یافته است(8،9). همچنین نشان داده شده است که اسید سالیسیلیک باعث افزایش تولید تاکسول و سایر تاکسانها در کشت سوسپانسیون سلولی گیاه سرخدار شده است (10). در این مطالعه تاثیر الیسیتور اسید سالیسیلیک در غلظتهای مختلف بررشد کالوس ومیزان تولید آلکالوئید آتروپین در کشت کالوس گیاه *Datura metel* مورد بررسی قرارمی گیرد.

2 – مواد و روشها

2-1: کشت کالوس

بمنظور تهیه کالوس *Datura metel* ابتدا بذر گیاه که از هرباریوم دانشکده داروسازی اصفهان تهیه شده بود به کمک اتانول و هیپو کلریت سدیم استریل شد و در پتری دیش استریل که یک عدد کاغذ صافی و آب مقطردر آن بود قرار داده شد ، پتری دیشها را در اتاق کشت در تاریکی و دمای 25 درجه سانتیگراد منتقل شد. بعد از 10 تا 12 روز دانه رستهای بدست آمد. دانه رستها در اندازه های 5 تا 10 میلی متر بریده شده و به شیشه های درب دار حاوی محیط کشت جامد حاوی پودر محیط کشت موراشیگ و اسکوگ (MS) (4/4گرم در لیتر) ، آگار (10گرم در لیتر)، شکر (30گرم در لیتر) ، کینتین (0/1میلیگرم در لیتر) ،2و4-دی کلرو فنوکسی استیک اسید (1میلیگرم در لیتر) ، اسید آسکوربیک (5میلیگرم در لیتر) ،آب نارگیل (10میلی لیتر در لیتر) منتقل شد. بعد از 28 روز کالوسهای شاداب به رنگ کرم روشن ایجاد شد. به منظور تکثیر کالوسهای بدست آمده واکشت کالوسها به محیط کشتهای جدید انجام شد(11). پس از پنج دوره واکشت، کالوسهای بدست آمده به محیط کشتهای MS جامد حاوی مواد قبلی به علاوه غلظتهای 25 ، 50، 100 و 200 میکرو مولار اسید سالیسیلیک منتقل شدند. از هر تیمار 3 تکرار انجام شد. 3 تکرار از کالوسها نیز در محیط کشت فاقد اسید سالیسیلیک بعنوان شاهد واکشت گردیدند. کالوسها در اتاق کشت ، در دمای 25 درجه سانتی گراد و رژیم نوری 24 ساعت تاریکی نگهداری شدند.

2-2: استخراج آتروپین

بعد از گذشت چهار هفته از واکشت کالوسها به محیط کشت حاوی تیمارهای متفاوت اسید سالیسیلیک، کالوسها به رشد کافی رسیدند. کالوسها از شیشه خارج و بوسیله ترازوی آنالیتیکال توزین شدند. کالوسها را در آون دمای 50 درجه سانتی گراد خشک کرده و وزن خشک آنها نیز اندازه گیری و پودر شدند. پودر کالوسها به طور جداگانه جهت عصاره گیری به لوله های شیشه ای در پیچ دار منتقل شدند. عصاره گیری از کالوسها با استفاده از خاصیت قلیایی آلکالوئیدها به کمک تغییرات pH انجام گرفت. ابتدا 10 میلی لیتر اتانول 96 درجه حاوی کدیین بعنوان استاندارد داخلی با غلظت 25 میکروگرم در میلی لیتر اضافه شد بعد از 48 ساعت ، شیشه ها به بن ماری منتقل شد تا حلال اتانول تبخیر گردد. سپس 5 میلی لیتر اسید سولفوریک 5 درصد اضافه شد بعد از مدت 16 ساعت در 3 مرحله هر

Archive of SID

www.SID.ir

بار 3 میلی لیتر کلروفرم به مخلوط اضافه شد و ته نشت کلروفرمی حاوی مواد رنگ دار خارج شد. محلول اسیدی رونشست، فیلتر شده و با استفاده از سود 1 نرمال pH محلول در هر شیشه به حجم 10 میلی لیتر رسانده شد. سپس در 3 مرحله ، هربار 3 سی سی کلروفرم به محلول باقی مانده اضافه و ته نشست کلروفرمی حاوی آلکالوئیدها جدا شد. حلال تبخیر شده و باقی مانده در فاز متحرک به کار رفته در سیستم HPLC حل گردید. سپس از فیلترهای با منافذ 0/45 میکرومتر گذارنده شد (12).

3-2: آنالیز آتروپین

به منظور اندازه گیری مقدار آتروپین در نمونه ها و بررسی صدق قانون بیر لامبر ، ابتدا غلظتهای استاندارد 2/5 ، 5 ،10 ،15 ،25 ،30 ،35 ،40 و 45 میکروگرم در میلی لیتر از آتروپین تهیه و به سیستم تزریق و منحنی کالیبراسیون رسم شد. برای آنالیز HPLC فاز متحرک شامل : بافر تری اتیل آمین با pH=2/7 ، متانول ، استونیتریل به نسبت 78 ،18و 4 تهیه شد. در این سیستم از دتکتور : UV با طول موج 230 نانومتر، مدل: Waters 2487، ستون کروماتوگرافی : Nova Pack C18 و پمپ : Waters 515 استفاده شد. سرعت فاز متحرک نیز در اندازه گیریها ml/min 0/9تنظیم شد. از کدئین بعنوان استاندارد داخلی با غلظت 25 میکروگرم در میلی لیتر در رسم منحنی استاندارد و در آنالیز نمونه ها و براساس نسبت سطح زیر پیک آتروپین به سطح زیر پیک استاندارد داخلی استفاده گردید. پس از تزریق نمونه ها به سیستم HPLC با استفاده از نرم افزار Millenium سطح زیر پیکها اندازه گیری و نهایتاً با استفاده از معادله خط به دست آمده از منحنی استاندارد ، غلظت آتروپین موجود در کشت های سلولی گیاه با توجه به نسبت سطح زیر پیک آتروپین به سطح زیر پیک استاندارد داخلی محاسبه شد.

آنالیز آماری ANOVA بر اساس تست Fisher – PLSD برای بررسی نتایج وزن کالوسهای تازه و خشک و غلظت آتروپین تحت تاثیر غلظت اسید سالیسیلیک انجام گرفت. سطح اطمینان برای وجود تفاوت معنی دار آماری 95 درصد در نظر گرفته شد. برای رسم نمودارها نیز از نرم افزار Excel استفاده شده است.

3 – نتایج

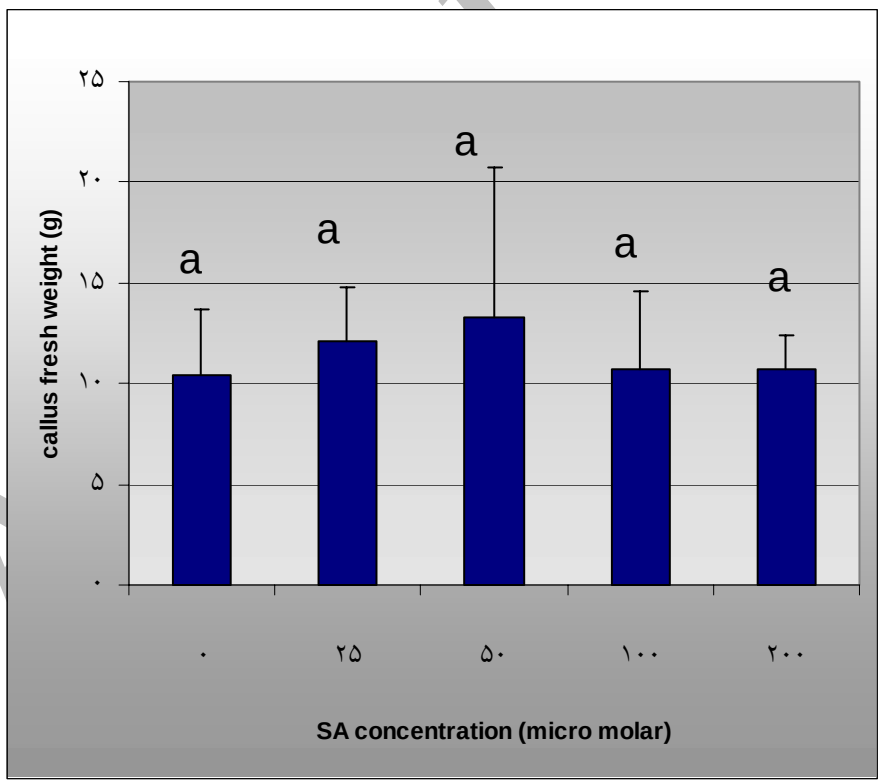
کالوس شاداب و خوش رشد گیاه تهیه گردید. عکس کالوس بدست آمده از دانه رستهای گیاه *Datura metel* در محیط MS جامد در شکل شماره 1 قابل مشاهده است. نتایج بدست آمده مربوط به توزین کالوسهای تر و خشک در نمودارهای شماره 1و2 آورده شده است. نمودارهای رسم شده بر اساس میانگین سه تکرار در هر غلظت است. نتایج آنالیز آماری نیز در نمودارها آورده شده است. حروف غیر مشترک در هر ستون بیانگر معنی دار بودن اختلاف داده ها می باشد.($P\leq 0/05$)

بعد از تزریق غلظتهای استاندارد آتروپین همراه با غلظت مشخص از استاندارد داخلی، منحنی استاندارد براساس نسبت سطح زیر پیک آتروپین به سطح زیر پیک استاندارد داخلی در برابر غلظتهای استاندارد رسم گردید(نمودار شماره3). معادله خط $Y= 0.0212 X$ حاصل شد و ضریب همبستگی ($R^2= 0/9957$) بدست آمد. محاسبه غلظت آتروپین با استفاده از معادله خط انجام گرفت. نتایج تأثیر سالیسیلیک اسید بر تولید آتروپین در نمودار شماره 4 آورده شده است.

Archive of SID

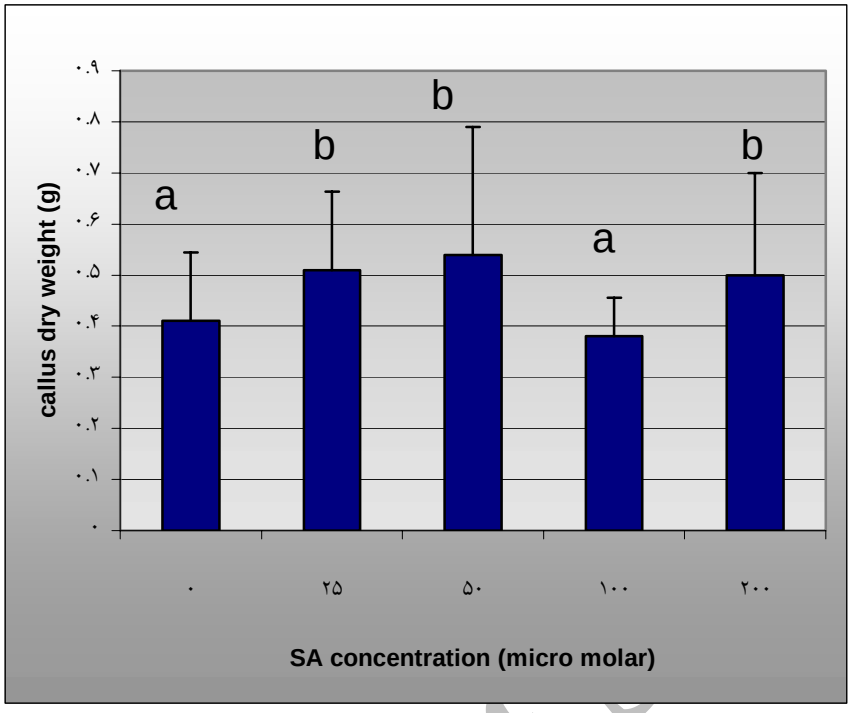
www.SID.ir

شکل 1. کالوس *D. metel* در محیط کشت MS جامد

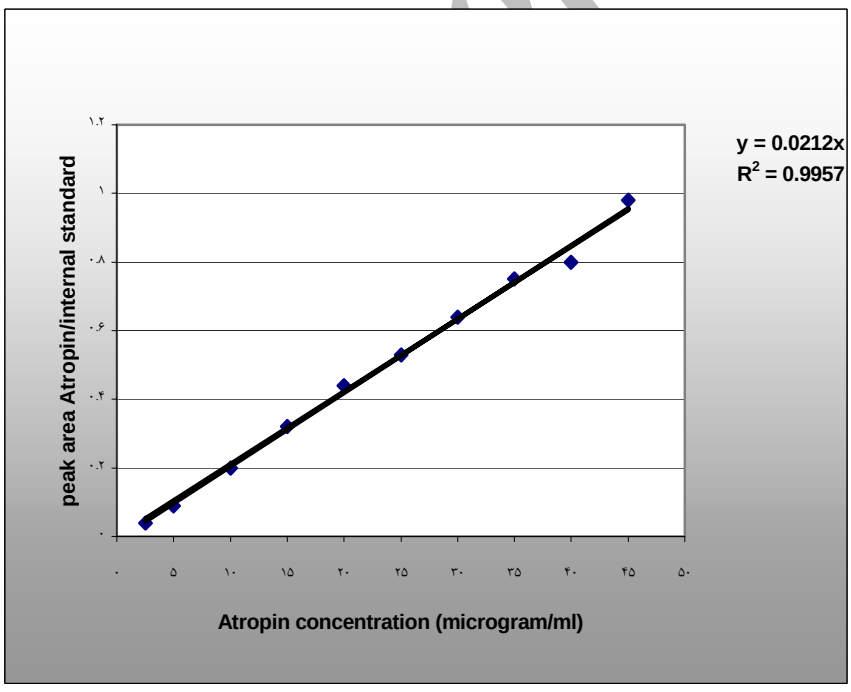


نمودار 1 . اثر غلظتهای مختلف اسید سالیسیلیک بر وزن ترکالوس تازه *D. metel* حروف مشابه نشان دهنده عدم وجود تفاوت معنی دار آماری بین داده ها است

www.SID.ir

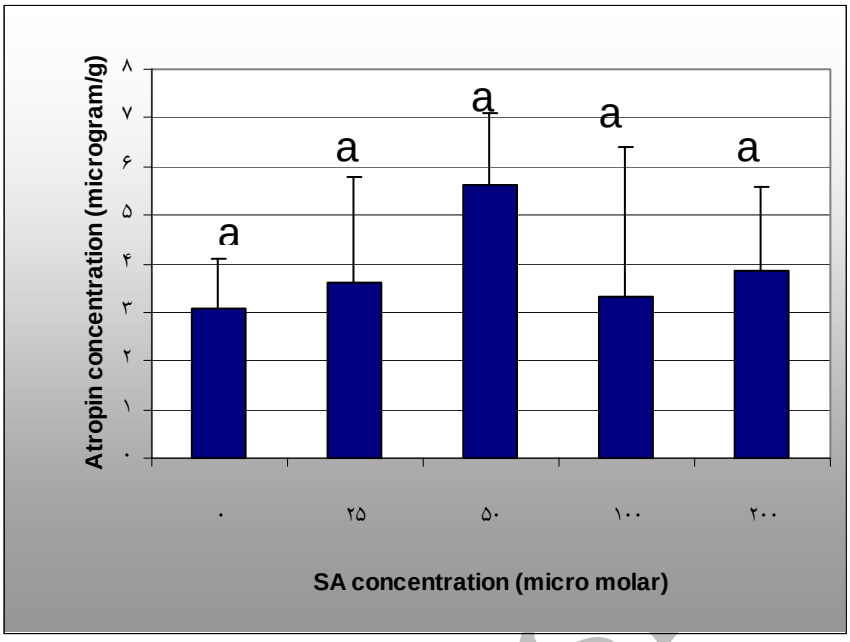


نمودارشماره 2 . اثر غلظتهای مختلف اسید سالیسیلیک بر وزن خشک کالوس *D. metel* حروف مشابه نشان دهنده عدم وجود تفاوت معنی دار آماری بین داده ها است



نمودارشماره 3. منحنی استاندارد جهت تعیین مقدار آتروپین در کشت کالوس *D. metel*

www.SID.ir



نمودارشماره 4. تاثیر غلظتهای مختلف اسید سالیسیلیک بر میزان تولید آتروپین در کالوس *D. metel* حروف مشابه نشان دهنده عدم وجود تفاوت معنی دار آماری بین داده ها است

4 – بحث

همانطور کـه در نمودارهـای شـماره 1و2 ملاحظـه میشـود تفاوت معنی داری در وزن کالوسهای تر مشاهده نمی شـود، اما در وزن خشـک بـا غلظتهـای اسـید سالیسـیلیک 25، 50 و200 میکرومولار تیمار داده شده نسـبت بـه نمونـه شـاهد افزایش معنی داری اتفاق افتاده اسـت. بیشـترین مقـدار وزن خشک مربوط به غلظت 50 میکرو مولار اسـید سالیسـیلیک است که حدود 31 درصـد افـزایش نشـان مـی دهـد. ایـن افزایش نشاندهنده تاثیر اسید سالیسیلیک بر تحریـک تکثیـر سلولها و فعالیت های متابولیسم اولیه سلولی در کـالوس *Datura metel* است. البته ارتباط مستقیمی بین غلظـت اسـید سالیسیلیک و افـزایش وزن خشـک وجـود نـدارد. در یـک مطالعه مشابه تأثیر اسید سالیسیلیک در غلظتهـای 5، 15،30 و 45 میلـی گـرم در لیتـر بـر میـزان تولیـد گلیکوزیـد سالیدروزاید درکشت سوسپانسیون سلولی گیـاه *Rhodiola sachalinensis* وزن خشک سلولها در غلظت 15 میلـی گـرم در لیتر افزایش در غلظت 5 میلی گرم در لیتر بدون تغییـر و در غلظت 30 و 45 میلی گرم در لیتر کـاهش داشـته اسـت (13) در حالی که در کشـت کـالوس گیـاه رونـاس(*Rubia cordifolia*) با افزودن غلظتهای 10و20 میلی گـرم در لیتـر اسید سالیسـیلیک تفـاوت معنـی داری در افـزایش وزن تـر کالوس گیاه مشاهده نشده است(14). با توجه به اینکه اسید سالیسیلیک در سیستمهای دفاعی سلولهای بعنـوان مولکـول علامت دهنده نقش خود را ایفا می کند (15) بـه نظـر مـی رسد که ارتباط و یا عدم ارتباط مستقیم بین غلظت الیسـیتور و القاء فعالیتهای متابولیسمی اولیه که منجر بـه افـزایش وزن تر و خشک سلولها می شـود بـه ماهیـت ترکیـب و گیـاه و غلظت اسید سالیسیلیک بستگی داشته باشد.

همانطور که در نتایج تأثیر سالیسیلیک اسید بر تولید آتروپین در نمودار شماره 4 آورده شده است آنالیز آماری انجام شده برروی داده ها نشان دهنده عدم تأثیر سالیسیلیک اسید بر تحریک تولید آتروپین در کشت کالوس *Datura metel* است.

در یک مطالعه بـا اضـافه کـردن متیـل جاسـمونات ، اسـید سالیسیلیک و الیسـتیور قـارچی، تولیـد تاکسـول در کشـت سوسپانسیون *Taxus baccata* L. 16 برابر نسبت بـه نمونـه شاهد افزایش داشته است(16). در مطالعه دیگری در مـورد تاثیر الیسیتورهای اسید سالیسـیلیک ومتیـل جاسـمونات بـر متابولیسم تروپان آلکالوئیدها در کشت ریشه مـویی گیـاه *Brugmansia suaveolens* L.، تولید هیوسیامین 10 برابـر نسـبت به نمونه شاهد افـزایش نشـان داده اسـت (17). در مطالعـه دیگری تاثیر الیسیتور اسید سالیسیلیک درغلظت 200 میکرو مولار بر تولید تروپـان آلکالوئیـدها در کشـت ریشـه مـویی *Atropa belladona* L. مورد بررسی قرار گرفـت . نتـایج ایـن بررسی نشان می دهد مشابه مطالعه جاری اسید سالیسـیلیک

Archive of SID

www.SID.ir

تاثیری بر تولید تروپان آلکالوئید ها در مقایسه با نمونه شاهد نداشته است (18). همچنین بطور مشابه گزارش شده است افزایش اسید سالیسیلیک درغلظت 0/3، 0/5 و 1 میلی مولار تاثیری در بیوسنتز ترکیبات کانابینوییدی در کشت سوسپانسیون گیاه حشیش نداشته است(19). همچنین گزارش مشابهی در خصوص عدم تاثیر اسید سالیسیلیک در افزایش تولید سیلیمارین در کشت سوسپانسیون گیاه خارمریم(*Silybum marianum*)منتشر شده است (20) در حالی که در کشت ریشه مویین گیاه خارمریم تولید سیلیمارین با افزودن غلظتهای 1،2 ، 4 ،6 و 8 میلی گرم در50 میلی لیتر اسید سالیسیلیک افزایش یافت و غلظت 6میلی گرم در افزایش تولید سیلیمارین موثرتر گزارش شده است(21). تولید ترکیبات آنتراکینون در کشت کالوس گیاه روناس(*Rubia cordifolia*) بر اثر اسید سالیسیلیک و متیل جاسمونات افزایش داشته است ولی از حضور الیسیتور ایتیفن تاثیری نپذیرفته است(14). در مطالعات تأثیرغلظت اسید سالیسیلیک بر افزایش میزان تولید آزادیراچتین(azadirachtin) درکشت ریشه مویین گیاه *Azadirachta indica* و تولید بتانین در کشت ریشه مویین گیاه چغندر قند نشان داده است (22 و 23) با افزودن غلظتهای 0/1 به1 میلی مول اسید سالیسیلیک تفاوت معنی داری در افزایش تولید گلیسیریزین در کشت ریشه گیاه شیرین بیان(*Glycyrrhiza glabra*) مشاهده شده است در حالی که در کشت سلولی گیاه درمنه(Artemisia annua) تولید آرتمیزنین با افزودن غلظتهای 10، 20، 30و 50 میلی گرم در لیتر استیل اسید سالیسیلیک افزایش یافت ولی تفاوت معنی داری در افزایش تولید آرتمیزنین بین تاثیر بعضی از غلظتهای مذکور مشاهده نشده است (25 و 26). به نظر می رسد غلظت الیسیتور و نوع کشت نیز در القاء فعالیتهای متابولیسم ثانویه نقش اساسی داشته باشد.

5 – نتیجه گیری

نتایج بدست آمده در تعیین مقدار آتروپین با در نظر گرفتن دیگر تحقیقات انجام گرفته نشاندهنده تاثیر متفاوت اسید سالیسیلیک بر تحریک متابولیسم ثانویه در گیاهان مختلف می باشد شاید بتوان نتیجه گرفت ، تاثیر اسید سالیسیلیک بر تولید متابولیت ثانویه در کشت سلولی گیاهان به ماهیت ترکیب هدف و تفاوت ژنتیکی و مسیرهای متابولیسمی گیاهان مختلف بستگی دارد .

6 – تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان وهمکاری در آنالیز نمونه ها توسط جناب آقای دکتر جابر امامی و آقای دکتر علی ترک لادانی انجام شده است که بدینوسیله تقدیر و تشکر می شود.

References:

1. Trease G., Evans W.C. Pharmacognosy. 15th ed. Tindall, London, 2002, 342-344.
2. Samuelsson G. Drugs of natural origin (4th edn). Swedish Pharmaceutical Press, Stockholm, 1999.
3. Wang Y., Yuan Y., WU J. Induction study of methyl jasmonate and salicylic acid on taxane production in suspension culture of Taxus chinensis, Biochem. Eng. J., 2004, 19: 259-265.
4. Zhao J., Fujita K., Yamada J., Saka K. Improved beta thujaplicin production in Cupresus lusitsnica suspension culture by fungal elicitor and methyl jasmonate, Appl. Microbial Biotechnol., 2001, 55: 301-305.
5. Jian Z., Lavrence C.D., Robert V. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites, Biotechnology Advances, 2005, 23: 283–333.
6. Taguchi G., Yazawa T., Hayashida N., Okazaki M. Molecular cloning and heterologous expression of novel glucosyltransferases from tobacco cultured cells that have broad substrate specificity and are induced by salicylic acid and auxin, Eur. J. Biochem., 2001, 268: 4086– 94.
7. Pitta-Alvarez S.I, Spollansky T.C., Giulietti A.M. The influence of different biotic and abiotic elicitors on the production and profile of tropane alkaloids in hairy root cultures of Brugmansia candida. Enzyme Microb. Technol. 2000, 26: 252–258.
8. Mikkelsen M.D., Petersen B.L., Glawischnig E., Jensen A.B., Andreasson E., Halkier B.A. Modulation of CYP79 genes and glucosinolate profiles in Arabidopsis by defense signaling pathways, Plant Physiol., 2003, 131: 298–308.
9. Zhao J., Zhu W.H., Hu Q., He X.W. Improved indole alkaloid production in Catharanthus roseus suspension cell cultures by various chemicals, Biotechnol. Lett., 2000, 22: 1221–1226.
10. Wang, Y.D, Wu, G.C., Yuan, Y.J. Salicylic acid-induced taxol production and isopentenyl pyrophosphate biosynthesis in suspension cultures of Taxus chinensis var., Cell Biol. Int., 2007, 31: 1179-1183.
11. Asghari G., Salimian T. Influnce of fructose, glucose and sucrose on flavonolignans formation in Silybum marianum callus culture, J. Med. Plants., 2008, 7(26): 16-24.

Archive of SID

www.SID.ir

12. Iranbakhsh A. Optimization of growth and tropan alkaloids in Datura stramunium suspension culture, Pejuhesh and Sazandegi, 2004, 62: 26-30.
13. Wu S., Zu Y., Wu M. High yield production of salidroside in the suspension culture of Rhodiola sachalinensis, J., Biotech., 2003, 106: 33–43.
14. Bulgakov V.P., Tchernoded G.K., Mischenko N.P., Khodakovskaya M.V., Glazunov V.P., Radchenko , S.V., Zvereva , E.V., Fedoreyev , S.A., Zhuravlev Y.N. Effect of salicylic acid, methyl jasmonate, ethephon and cantharidin on anthraquinone production by Rubia cordifolia callus cultures transformed with the rol B and rol C genes, J. Biotech., 2002, 97: 213–221.
15. Shualev V., Leon J., Raskin I. Is salicylic acid a translocated signal of systemic acquired resistance in tobacco? Plant Cell., 1995, 7: 1691–1701.
16. Khosroushahi A.Y., Valizadeh M., Ghasempour A., Khosrowshahli M., Naghdibadi H., Dadpour M.R., Omidi Y. Improved Taxol production by combination of inducing factors in suspension cell culture of Taxus baccata. Cell Biol. Int., 2006, 30: 262-269.
17. Rawia Z., Michael W. Induction of tropan alkaloid formation in transformed root culture of Brugmancia suaveolens (Solanaceae), Z. Naturforsch., 2004, 59: 863-867.
18. Kung T.L, Hiroshi H., Takashi Y., Tohru K., Yasuo I., Koichiro S. Responses of transformed Root culture of Atropa belladonna to salicylic acid stress. J. Biosci. Bioeng, 2001, 91: 586-589.
19. Flores-Sanchez I.J., Peˇcb J., Fei J., Choi Y.H., Duˇsek J., Verpoorte R. Elicitation studies in cell suspension cultures of Cannabis sativa L., J. Biotechnology .2009, 143: 157–168.
20. S´anchez-Sampedro M.A., Fern´andez-T´arrago J., Corchete P.Yeast extract and methyl jasmonate-induced silymarin production in cell cultures of Silybum marianum (L.) Gaertn., Journal of Biotechnology, 2005, 119: 60–69.
21. Khalili M., Hasanloo T., Kazemi Tabar S.K., Rahnama H. Influence of exogenous salicylic acid on flavonolignans and lipoxygenase activity in the hairy root cultures of Silybum marianum Cell Bio. Int., 2009, 33: 988-994.
22. Satdive R.K., Fulzele D.P., Eapen S. Enhanced production of azadirachtin by hairy root cultures of Azadirachta indica. Juss by elicitation and media optimization, J. Biotechnol., 2007, 128: 281-289.
23. Savita B.C., Thimmaraju R., Bhagyalakashmi N., Ravishankar G.A. Different biotic and abiotic elicitors influence betalanin production in hairy root cultures of Beta vulgaris in shake-flask and bioreactor, Process Biochem., 2006, 41: 50-60.
24. Szepesi A., Poo´r P., Ge´mes K., Horva´th E., Tari I. Influence of exogenous salicylic acid on antioxidant enzyme activities in the roots of salt stressed tomato plants, Acta Biol. 2008, 52: 199-200.
25. Baldi A., Dixit V.K., Yield enhancement strategies for artemisinin production by suspension cultures of Artemisia annua, Bioresource Technology, 2008, 99: 4609–4614.
26. Shabani L., Ehsanpour A.A., Asghari G., Emami J. Glycyrrhizin production from in vitro cultured Glycyrrhiza glabra L. elicited by methyl jasmonate and salicylic acid, Russ. J. Plant Physiol., 2009, 56 (5): 621-626.

Archive of SID

www.SID.ir