ژنتیک نوین
دوره هفتم، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۱
صفحه ۲۲۰- ۲۰۹

راهکارهای بیوتکنولوژی در افزایش کارآیی گیاهان دارویی

منصور امیدی*[۱]، نرجس فرزین[۲]

۱-استاد، دانشگاه تهران، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، کرج، ایران
۲-کارشناس ارشد بیوتکنولوژی، مرکز پژوهشی گیاهان دارویی جندی شاپور، کاشان، ایران.

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی:momidi@ut.ac.ir

(تاریخ دریافت:۸۹/۱۲/۱ - تاریخ پذیرش: ۹۰/۱۲/۹)

چکیده

گیاهان دارویی از هزاران سال پیش به عنوان یکی از مهمترین منابع دارویی کاربرد داشته‌اند. در دوران جدید فناوری زیستی با استفاده از راهکارهایی نظیر کشت سلول‌ها، اندام‌ها و بافت‌ها، مهندسی ژنتیک و کاربرد نشانگرهای مولکولی قادر است کارآیی و بهره‌وری گیاهان دارویی را به عنوان منابع تجدیدپذیر جهت تولید دارو افزایش دهد. کشت سلول، بافت‌ها و اندام‌های گیاهی امکان تکثیر سریع و انبوه بسیاری از گیاهان دارویی مهم را فراهم نموده است. گیاهان تکثیر شده از طریق کشت‌های *in vitro* عاری از بیماری و از لحاظ ژنتیکی و کیفی یکنواخت می‌باشند. نگهداری کشت سلول یا بافت گیاهی به روش انجماد در نیتروژن مایع، یک روش مناسب جهت حفظ گیاهان دارویی در معرض انقراض می‌باشد. طی سالهای اخیر کشت سوسپانسیون سلولی و اندام (ساقه و ریشه مویین) جهت تولید متابولیت‌های ثانویه و مطالعهٔ مسیر بیوسنتز متابولیت‌ها و افزایش بیان ژن مورد توجه قرار گرفته است.در این رابطه کشت سلولی طیف وسیعی از گیاهان دارویی بررسی شده است و ترکیبات مهمی نظیر: فلاونوئیدها، تانن‌ها، آلکالوئیدها و ترپنوئیدها از این طریق تولید شده‌اند. ترکیبات محیط کشت، ریزنمونه، شرایط فیزیکی، افزودن پیش‌سازها، استفاده از القاگرهای زنده و غیر زنده، افزایش نفوذپذیری سلول، دور کردن محصول از محل تولید، بی‌تحرک نمودن سلولهای گیاهی و انتخاب سلولهای با کارآیی بالا، از مهمترین فاکتورهای موثر در افزایش تولید متابولیت ثانویه در کشت سلولی می‌باشند. از طرفی مهندسی ژنتیک گیاهی نقش چشمگیری در زمینه شناسایی و دستکاری ژنتیکی آنزیم‌های دخیل در مسیر متابولیکی بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه ایفا نموده است. انتقال ژن یک ابزار قوی جهت افزایش بازدهی و تولید متابولیتهای ثانویه‌ای است که محدودیت بازدهی دارند. نشانگرهای مولکولی به دلیل عدم وابستگی به سن، شرایط فیزیولوژیکی و محیطی گیاه، ابزاری قدرتمند جهت شناسایی دقیق گونه‌های مهم دارویی، بررسی تنوع ژنتیکی، طبقه‌بندی ذخائر توارثی و تعیین نقشه ژنتیکی آنها می‌باشند. این مقاله مروری است بر راهکارهای مختلف فناوری زیستی که در افزایش بهره‌وری گیاهان دارویی و تولید داروهای گیاهی با کیفیت مطلوب‌تر موثر می‌باشد. بررسی های انجام شده در این مقاله با تاکید بر گیاهان بومی و مهم ایران از جمله باریجه و آنغوزه انجام شده است.

واژه‌های کلیدی

ریزازدیادی، گیاهان دارویی، متابولیت‌های ثانویه، مهندسی ژنتیک، نشانگرهای مولکولی.

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

گیاهان دارویی یکی از مهمترین منابع دارویی است که از هزاران سال پیش کاربرد داشته‌اند. سازمان بهداشت جهانی تخمین زده است که بیش از ۸۰ درصد از مردم به صورت سنتی و یا مدرن از گیاهان دارویی استفاده می‌کنند. بعلاوه بسیاری از داروهای شیمیایی نیز با الگوبرداری از مواد گیاهی ساخته شده‌اند (Tripathi and Tripathi 2003). اگرچه تقاضا برای این ترکیبات افزایش یافته است اما بسیاری از این گیاهان، زیستگاه‌های طبیعی محدود دارند و بسته به شرایط محیطی و جغرافیایی محل رویش گیاه، جمع آوری آنها با مشکلاتی مواجه است. از طرف دیگر تولیدات این گیاهان به شدت وابسته به محیط و همچنین قارچ های همزیست است. غلظت پایین این ترکیبات در گیاه، محدودیت منابع طبیعی، تخریب روزافزون جنگل‌ها، مراتع و فضای سبز، نابودی گونه‌های متنوع گیاهی و جانوری، مشکلات مرتبط با اهلی نمودن وکشت زراعی این گیاهان، توجه محققین را به استفاده از راهکارهای فناوری زیستی جهت افزایش تولید و بهره‌وری گیاهان دارویی معطوف نموده است. فناوری زیستی با بهره‌گیری از علوم مختلف مانند بیولوژی، بیوشیمی، ژنتیک و ... و با استفاده از راهکارهای کشت سلول‌ها، اندام‌ها و بافت‌ها، مهندسی ژنتیک، نشانگرهای مولکولی، بررسی مسیرهای موثر در تولید آن ها و افزایش بیان ژن قادر است کارآیی گیاهان را به عنوان منابع تجدیدپذیر جهت تولید دارو افزایش دهد(Mulabagal and Tsay 2004; Kumar and Gupta 2008).

کشت سلول، بافت‌ها و اندام‌های گیاهی امکان تکثیر انبوه و سریع گیاهان و تولید متابولیتهای ثانویه را در شرایط *in vitro* فراهم می‌سازد. 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 می‌گردد (Bourgaud et al. 2002). مهندسی ژنتیک: شامل روشهای مبتنی بر ژنتیک سلولی و مولکولی، نشانگرهای مولکولی، کشت سلول و بیوشیمی می‌باشد. این فناوری امکان شناسایی مسیرهای بیوشیمیایی و ژن های دخیل در این مسیرها، افزایش بیان این ژن ها، دست‌ورزی آن ها و انتقال آنها را از موجودی به موجود دیگر فراهم می‌نماید. تولید گیاهان تراریخته یکی از مهمترین کاربردهای مهندسی ژنتیک است(Carron et al. 1994; Urbanova et al. 2006; Kumar and Gupta 2008). نشانگرهای مولکولی: ابزاری مفید و دقیق جهت بررسی روابط خویشاوندی و روند تکاملی، شناخت تنوع ژنتیکی، طبقه‌بندی ذخائر توارثی و تعیین نقشه ژنتیکی جهت مطالعات ژنتیکی پایه و روشن شدن عمل ژن و تنظیم بیان ژن می‌باشند. همچنین ردیابی صفات مطلوب و سهولت انتخاب به کمک نشانگرها از طریق تعیین پیوستگی آنها با صفات مهم زراعی(Marker-Aided Selection or MAS) امکان گزینش سریع و دقیق ژنوتیپ‌های مطلوب را در مراحل اولیه رشد فراهم کرده و طول دوره به‌نژادی را کوتاه می‌نماید (Joshi et al. 2004). شناسایی pathway های موثر در تولید ماده مورد نظر ، افزایش بیان ژن های مورد نظر و خاموشی یا کنترل ژن های دیگر از مواردی است که بنظر می رسد می توانند بخش بزرگی از نیازهای جامعه بشری را رفع نماید. در این مقاله ضمن بررسی ظرفیت های گیاهان دارویی و توانمندی های بیوتکنولوژی در افزایش مواد موثر آن ها ، مروری اجمالی بر تحقیقات انجام شده توسط نویسنده در زمینه‌های کشت بافت، تولید متابولیت های ثانویه، مهندسی ژنتیک، نشانگرهای مولکولی و سیتوژنتیک گیاهان دارویی انجام شده است.

کشت بافت گیاهان دارویی

کشت بافت گیاهی در زمینه گیاهان دارویی کاربردهای متعددی دارد که مهمترین آنها عبارتند از: تکثیر انبوه و سریع گیاهان دارویی یکنواخت از لحاظ محتوای ژنتیکی و کیفی، حفظ گونه‌های گیاهی در حال انقراض از طریق نگهداری در شرایط انجماد[1] و تولید متابولیتهای ثانویه در شرایط *in vitro* از طریق کشت سوسپانسیون سلولی و کشت اندام (Tripathi and Tripathi 2003;Mulabagal and Tsay 2004).

[1] Cryopreservation
[2] Marker-Aided Selection or MAS

Archive of SID
www.SID.ir

تکثیر درون شیشه‌ای

روشهای سنتی تکثیر گیاهان دارویی همانند سایر گیاهان شامل روشهای جنسی (تکثیر با بذر) و غیرجنسی نظیر: قلمه، خوابانیدن، پاجوش و ... می‌باشد. گیاهان تکثیر شده با بذر عمدتا" از لحاظ ژنتیکی یکنواخت نیستند و گیاه حاصل دارای تمام خواص گیاه مادری نیست. به همین جهت تکثیر غیرجنسی به جنسی ترجیح داده می‌شود. روشهای سنتی تکثیر غیرجنسی عمدتا" با مشکلات متعددی از جمله محدودیت گیاه مادری و بازدهی پایین مواجه است. کشت بافت، نوعی تکثیر غیرجنسی در محیط *in vitro* است. 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 نسبتا" محدود می‌باشد (Tripathi and Tripathi 2003, Seyed-Tabatabae and Omidi 2011).

مهمترین روش‌های تکثیر درون شیشه‌ای گیاهان ریزازدیادی، اندام‌زایی از طریق کالوس و جنین‌زایی سوماتیکی است.

ریزازدیادی: تکثیر کلون در شرایط این ویترو را ریزازدیادی می‌نامند. ریزازدیادی امکان تکثیر سریع و انبوه ژنوتیپ‌های مطلوب و تولید گیاهان یکسان عاری از بیماری (به‌خصوص عاری از ویروس‌ها) را فراهم می‌سازد. امروزه در زمینه ریزازدیادی گیاهان دارویی متعددی مانند اوکالیپتوس (Mamaghani et al. 2009)، آلوئه‌ورا (Zarinpanje 2010; Hashemabadi and Kaviani, Aggarwal and Barna 2004 (2008; Mukherjee and Chowdhury 2008)، باریجه (Imani , and Omidi 2011, Sarabadani et al. 2008)، آنغوزه (Zare et al. 2010)، مارچوبه (Stajner et al. 2002)، رز (Carelli and Echeverrigaray 2002)، استویا (Sivaram and Mukundan 2003)، سیر (Khan et al. 2004)، یام (Kadota and Niimi 2004)، نعناع (Shasany et al. 1998)، سرخدار (Chang et al. 2001, Omidi et al. 2011)، شابیزک (Benjamin et al. 1987)، بارهنگ (Barna and Wakhlu 1988)، مورد (Khosh-Khui et al. 1984) و زنجبیل (Faria and Illg 1995) تحقیقات متعددی انجام شده و امکان تکثیر سریع و انبوه برخی از گونه‌های آنها فراهم گردیده است. مهمترین عوامل موثر بر افزایش کارایی ریزازدیادی درون شیشه‌ای گیاهان دارویی ریزنمونه و ژنوتیپ گیاهی، میزان تنظیم کننده‌های رشد، محیط کشت و عوامل فیزیکی (Satheesh and Bhavanandan 1988; Mantell and Hugo 1989; Basu and Chand 1996; Shasany et al. 1998) می‌باشد. در گیاه آلوئه بخش‌های مختلفی از گیاه مانند برگ، نوک شاخساره، جوانه‌های جانبی، قطعه‌های ساقه و ریشه به عنوان ریزنمونه بررسی شده است که عمده نتایج نشان می‌دهد نوک شاخساره و جوانه های جانبی بهترین ریزنمونه جهت ریزازدیادی آن می‌باشند. بعلاوه بسته به ژنوتیپ گیاه، ترکیبات مختلفی از تنظیم کننده‌های رشد روی میزان شاخه‌زایی و پرآوری آن تاثیر دارد (Garro-Monge et al. 2008; Hashemabadi and Kaviani 2008). تحقیقات نشان داده که ریزازدیادی مناسب ترین محیط برای باززایی و ریزازدیادی باریجه محیط کشت MS تغییر یافته با ترکیب هورمونی BA و NAA بود.(Imani and Omidi 2011 , Sarabadani et al 2008 al.2008) شابیزک از طریق مریستم انتهایی و جانبی در محیط حاوی BA (Benjamin et al. 1987)، شاخه‌زایی مستقیم یام از خوشچه‌ها در محیط دارای کایتین (Kadota and Niimi 2004)، شاخه‌زایی مورد از مریستم انتهایی و جانبی در محیط دارای NAA و BA (Khosh-Khui et al. 1984) امکان پذیر است.

اندام‌زایی از طریق کالوس: گزارشهای متعددی در زمینه تکثیر گیاهان دارویی از طریق کالزایی وجود دارد. کالوس یک توده سلولی کم و بیش سازمان نیافته، با دیواره سلولی نازک می‌باشد که معمولا" از سلولهای پارانشیمی بوجود آمده است. تولید کالوس، قابلیت باززایی کالوس و ریشه‌زایی گیاهچه به عوامل متعددی بستگی دارد که مهمترین آنها ژنوتیپ، ریز نمونه و شرایط فیزیولوژیک آن، نوع محیط کشت و عناصر غذایی، عوامل فیزیکی و شرایط محیطی از قبیل: نور، دما و pH، تنظیم کننده‌های رشد و ویتامینها می باشد. درگیاه *Doiscorea alata* نوع ریزنمونه، محیط کشت و دوره فتوپریودی (Mantell and Hugo 1989) و در *Hyoscyamus muticus* نوع ریزنمونه و هورمونها (Basu and Chand 1996) نقش تعیین کننده‌ای در کالزایی و باززایی گیاه از کالوسها دارند. کالوس‌زایی و تکثیر از طریق کالوسها در گیاهان دارویی متعددی از جمله: در آلوئه ورا محیط

Archive of SID
www.SID.ir

کشت پایه MS همراه باα-Naphtalene acetic acid (NAA) به میزان یک میلی گرم درلیتر و ترکیب ویتامینی شامل ۰/۴ میلی گرم درلیتر Thiamine Hcl، ۰/۵ میلی گرم درلیتر Prydoxine Hcl ، ۰/۵ میلی گرم درلیتر Nicotinic acid و Myo-Inositol به میزان ۱۰۰ میلی گرم درلیتر بهترین محیط کشت جهت القا بافت پینه(صد در صد کالزایی) بود (Zarinpanje et al. 2011). در سرخدار باززایی در محیط کشت MS تکمیل شده با Kin , BAP و ذغال فعال حاصل شد(Sasan et al. 2012). در سیکاس (*Cycas revolute*) در محیط کشت MS ½ و BAP با ۲۰۰ لوکس نور ۱۶ ساعته تولید گیاهچه بصورت مستقیم و غیر مستقیم حاصل شد (Mohaiseni 2011). در باریجه (Imani and Omidi (Sarabadani et al 2008 , 2011 ، رازیانه (Sarkheil et al. (2009 ،آنغوزه (Zare et al. 2010)، مشگک (Iravani et al. (2010 ، ختمی (Lesan et al. 2009)، فندق (Ebrahimi and Omidi 2011) ، خشخاش(Karimane and Omidi 2009)، مریم نخودی (Seyfi and Omidi 2006)؛ (*H. muticus* Basu and Chand, 1996)، پونه آبی: (*Mentha arvensis* Shasany et al. 1998)، علف دندان: (*Plumbago rosea* Satheesh and Bhavanandan, 1988)، (*D. alata* Mantell and Hugo 1989)، (*Cephaelis ipecacuanha* Rout et al. 1992) و جینکو: (*Ginkgo biloba* Tolyat et al. 2009) نیز این شرایط بررسی شده است. باززایی از طریق جنین‌زایی سوماتیکی: جنین‌زایی سوماتیک فرآیندی است که طی آن گروهی از سلول‌ها یا بافت‌های سوماتیک به جنین تبدیل می‌شوند. این جنین‌ها شبیه جنین‌های زیگوتی هستند و در محیط کشت مناسب می‌توانند به گیاه تبدیل شوند. کاهش غلظت تنظیم کننده‌های رشد روی محیط کشت سبب رشد و جوانه‌زایی جنین‌های سوماتیکی می‌شود. باززایی گیاهان با استفاده از جنین‌زایی سوماتیکی، در بسیاری از گونه‌های گیاهان دارویی از جمله: زیره سیاه(Houri et al. 2008) اوکالیپتوس(Shabannejad et al. 2009) ،مارچوبه: (*Asparagus cooper* Kunitake and Mii 1997)، آلوئه‌ورا : (*Aloe barbadensis* Garro-Monge et al. 2008)، (*Podophyllum hexandrum* Arumugam and Bhojwani 1990)، صمغ عربی: (*Acacia catechue* Rout and Samantaray 1995) و زعفران: (*Crocus sativus* Chaloushi et al. 2007) با موفقیت انجام شده است. در آلوئه ورا از نظربیشترین درصد تشکیل جنین های بدنی بر روی بافت پینه(۵۰درصد) محیط کشت پایهMS همراه با N^6-Benzyladenin (BAP) به میزان ۵ میلی گرم درلیتر وNAA به میزان ۰/۲ میلی گرم درلیتر و ترکیب ویتامینی فوق الذکر به عنوان بهترین محیط کشت شناخته شد (Zarinpanjeh et al. 2011). در کشت بافت زیره سیاه بیشتر و بزرگترین غده ها در محیط MS با IBA و Kin و NAA حاصل شد (Houri et al. 2008).

تولید متابولیت‌های ثانویه

متابولیت‌های ثانویه، مواد آلی شیمیایی پیچیده‌ای هستند که گیاهان در طول حیات خود تولید می‌نمایند؛ ولی در رشد و نمو و فعالیت‌های حیاتی آنها نقشی ندارند و عمدتا" به منظور دفع آفات، جذب حشرات گرده افشان و مبارزه با بیماری‌های میکروبی در گیاه تولید می‌شوند. مواد معطر، مواد موثره دارویی، چاشنی‌ها، شیرین کننده‌های طبیعی، مواد ضد میکروبی، فرمون‌ها، حشره‌کش‌ها، علف‌کش‌ها، قارچ‌کش‌ها، هورمون‌های گیاهی و مواد آللوپاتیک از این جمله می‌باشند. بر اساس برخی از تخمین‌ها حداقل ۱۰۰۰۰۰ متابولیت ثانویه از ۵۰۰۰۰ گونه گیاهی شناسایی شده است و هرسال ۴۰۰۰ متابولیت جدید از واریته‌های مختلف گیاهی کشف می‌شود (Kumar and Gupta 2008). برخی از این ترکیبات مانند: دیجی‌توکسین، شیکونین، عطر جاسمین و داروهای ضد سرطان مانند: وین‌بلاستین، وین‌کریستین و تاکسول از ارزش اقتصادی بالایی برخوردارند و قیمت آنها از چند دلار تا چند هزار دلار به ازای هر کیلو تغییر می‌کند. تولید انبوه و سریع این مواد پیچیده در مقیاس زیاد از طریق روش‌های شیمیایی عمدتا" مشکل و یا غیرممکن می‌باشد و از سویی محدودیتهای مختلف مانع تامین این مواد از طبیعت است. استفاده از راهکارهای فناوری زیستی از جمله کشت سوسپانسیون سلولی، کشت اندام (کشت ریشه‌های موئین و ساقه) راه حلی مناسب برای تولید سریع و انبوه متابولیت‌های ثانویه می‌باشد (Pezzuto 1996;Bourgaud et al. 2002; Rao and Ravishankar 2002 ;Mulabagal and Tsay 2004) تولید متابولیت‌های ثانویه با استفاده از روش‌های مبتنی بر کشت بافت دارای مزایای متعددی است. در شرایط *in vitro* تولید متابولیت ثانویه تحت تأثیر عوامل

Archive of SID
www.SID.ir

محیطی مختلف نظیر اقلیم، آفات، بیماری‌های میکروبی، تنش‌های فصلی و جغرافیایی قرار نمی‌گیرد؛ رشد سلول‌ها را می‌توان به صورت خودکار کنترل کرد و فرآیندهای متابولیکی را تنظیم نمود؛ فرآورده‌های مفید را می‌توان تحت شرایط کنترل شده تولید کرد و محصولات خالص‌تر و مطمئن‌تر به بازار عرضه نمود؛ کشت سلولی می‌تواند راهکار مناسبی برای گیاهانی باشد که طول دوره رشدی طولانی و غیر اقتصادی دارند. به عنوان مثال شقایق کبیر (*Papaver bracteatum*) که منبع بتائین است دو تا سه فصل وقت لازم دارد، تا به مرحلهٔ رسیدگی کامل برسد اما تولید آن از طریق کشت سلول در محیط شیمیایی کنترل شده سریع می‌گردد. بعلاوه از کشت سلولی می‌توان برای مطالعهٔ بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه استفاده کرد (Bourgaud et al. 2002; Rao and Ravishankar 2002). تاکنون کشت سلولی طیف وسیعی از گیاهان بررسی شده است و ترکیبات مهم و بسیار زیادی از این کشت‌ها جدا شده‌اند که می‌توان به فلانوئیدها، تانن‌ها، آلکالوئیدها، ترپنوئیدها، افزودنی‌های غذایی مثل وانیل، رنگهای آنتوسیانینی و طعم دهنده‌ها اشاره نمود. محققان در برخی از گیاهان موفق شده‌اند که با استفاده از کشت سلول مقادیر بیشتری از متابولیت را نسبت به گیاه تولید کنند؛ بعنوان مثال می‌توان به افزایش تولید رزماریک اسید در کشت سلول گیاهی مریم گلی (*Salvia officinalis*) (Hippolyte et al. 1992) و آنتراکینون در کشت گیاهی توت هندی یا درخت نانی (*Morinda citrifolia*) (Zenk et al. 1975) نسبت به گیاه مادری اشاره نمود. در حال حاضر واحدهای صنعتی کشت سلول گیاهی متعددی بنیانگذاری شده است. ترکیباتی مانند شیکونین بعنوان رنگ طبیعی استخراج شده از سنگدانه (*Lithospermum erythrorhizon*)، بربرین از *Coptis japonica* و تاکسول از سرخدار (*Taxus bacata* L) در مقیاس صنعتی به تولید انبوه رسیده‌اند.

عوامل متعددی نظیر ترکیبات محیط کشت، ریز نمونه، شرایط فیزیکی، القاء، نفوذپذیری و ... در کشت سوسپانسیون سلولی و تولید متابولیت ثانویه موثرند. عمده اجزای محیط کشت سلول‌های گیاهی از قبیل قندها، فسفات، نیترات و تنظیم کننده‌های رشد، شاخص‌های مهمی در رشد و تجمع متابولیت‌های ثانویه می‌باشند. تحقیقات نشان داده است که بهترین غلظت سوکروز برای تجمع ایندول آلکالوئید در کشت سلولی پروانش (*Catharanthus roseus*) غلظت‌های ۴ تا ۱۲ درصد وزنی-حجمی است. کاهش آمونیوم و افزایش نیترات باعث افزایش تولید شیکونین و بتاسیانین می‌شود، در حالی که نسبت‌های بالاتر آمونیوم به نیترات تولید بربرین و یوبیکینون را افزایش می‌دهد. مقادیر زیادی فسفات باعث افزایش رشد سلول می‌شود و عمدتا" اثری منفی بر تجمع متابولیت‌های ثانویه دارد. کاهش فسفات تجمع آجمالسین را در کشت سلولی پروانش و آلکالوئیدها را در اسفند (*Peganum harmala*) و افزایش آن سنتز دیگوکسین را در گل انگشتانه (*Digitalis purpurea*) و بتاسیانین را در سلمه تره (*Chenopodium rubrum*) و سرخاب (*Phytolacca americana*) تحریک می‌کند. علاوه بر مواد غذایی محیط کشت، شرایط محیط کشت مانند: نور، دما، pH و اکسیژن نیز بر تجمع متابولیت‌های ثانویه موثر می‌باشد. نوردهی بر تجمع ترکیب سزکوئی‌ترین‌ها در کشت‌های کالوس گیاه بابونه و محرومیت از نور بر افزایش تجمع مونوترپن‌ها در کشتهای کالوس لیمو ترش (*Citrus limon*) تاثیر دارد. افزودن دی‌اکسیدکربن به سوسپانسیون‌های سلولی انگور موسکات، سنتز مونوترین‌ها و تشکیل سینالول را القا نموده است (Rao and Ravishankar 2002;Mulabagal and Tsay 2004).

سایر اقداماتی که می‌توانند در افزایش تولید متابولیتهای ثانویه موثر باشند عبارتند از: افزودن پیش‌سازها، القاگرهای زنده (با منشاء قارچی، باکتریایی و مخمر) و غیر زنده (پلی ساکاریدها، گلیکو پروتئین‌ها، آنزیم‌های غیر فعال شده، نمک‌های فلزات سنگین و زانتان) به عنوان آغازگر در تشکیل متابولیت‌های ثانویه، افزایش نفوذ پذیری سلول با استفاده از حلال‌های آلی، دی متیل سولفوکسید (DMSO) و پلی ساکاریدهایی مانند کیتوزان و یا اولتراسونیکاسیون، دور کردن محصول از محل تولید، بی تحرک نمودن سلولهای گیاهی، انتخاب سلولهایی با تولید و کارآیی بالا. تولید تجاری کاپسایسین (عامل عمده تندی فلفل) در برگیرنده مراحل متعددی است که امروزه تولید آن از طریق کشت‌های سلولی بی‌تحرک شده امکان پذیر شده است (Johnson et al. 1990) و جهت افزایش مقدار کاپسایسین از القاگرها، عوامل افزایش نفوذ پذیری و انتخاب لاینهای با سطح تولید بالا

Archive of SID
www.SID.ir

(Salgado and Ochoa-Alejo 1990) استفاده شده است. اضافه نمودن برخی از پیش‌سازها سبب افزایش تولید تاکسول در کشت سلولی سرخدار شده است (Fett-Neto et al. 1994). انتخاب لاین سلولی با کارآیی بالا در کشت سلولی *Euforbia millii* پس از ۲۴ بار انتخاب سبب افزایش معنی‌دار تولید آنتوسیانین شده است (Yamamoto et al. 1982).در تحقیقات مختلفی تاثیر بعضی الیسیتورهای زیستی و غیر زیستی برتولیدات ثانویه اوکالیپتوس *Ducrosia anethifolia*، مشگک (Assareh et al. 2009) و بذرالبنج *Hyocyamus sp.* (Shafie et al. 2009) (Ghorbanpoor et al. 2010) بررسی شد.

از آنجا که عموماً تولید متابولیتهای ثانویه در بافتهای تمایز یافته بیشتر است، تلاش‌هایی در جهت کشت ساقه و ریشه به منظور تولید ترکیبات مهم دارویی انجام گرفته است. کشت‌های اندام نسبتاً پایدارند و ترکیبات ثانویه در اندامهای کشت شده در دوره‌های زمانی کوتاهتری نسبت به گیاه تولید می‌شوند (Subroto et al. 1996). توانایی باکتری *Agrobacterium rhizogenes* در القای ریشهٔ مویی در تعدادی از گیاهان منجر به استفاده از ریشه‌های موئین به عنوان منبعی برای تولید فرآورده‌های دارویی شده است (Cai et al. 1995; Maldonado-Mendoza et al. 1993; Pradel et al. 1997; Subroto et al. 1996). تولید انبوه ریشه موئین درجینسینگ در بیورآکتور ۲۰ تنی با بازدهی mg/l ۵۰۰ ساپونین در روز امکان پذیر شده است (Jeong et al. 2002). در اغلب کشتهای اندام تولید متابولیت همراه با رشد اتفاق می‌افتد؛ بنابراین امکان تولید ریشه و متابولیت در یک بیورآکتور وجود دارد. درحالی که در کشت سوسپانسیون سلولی عموما" مرحله تولید توده سلولی و متابولیت در دو بیورآکتور جداگانه انجام می‌شود (Bourgaud et al. 2002).

در سالهای اخیر توانایی کشت سلولهای گیاهی در شرایط *in vitro* برای تبدیل زیستی (Biotransformation) یک پیش‌ساز کم ارزش به فرآورده نهایی ارزشمند بررسی شده است. سلولهای گیاهی می‌توانند یک منبع جایگزین مناسب برای تولید ترکیبات با ارزشی باشند که سنتز آنها از طریق روشهای شیمیایی مشکل است. در این رابطه می‌توان به تبدیل زیستی ژرانیول به نرول از طریق سلولهای غیرمتحرک شده انگور و سوسپانسیون سلولی جعفری اشاره نمود (Guardiola et al. 1996).

مهندسی ژنتیک

پیشرفت‌های اخیر در زمینهٔ ژنتیک گیاهی و تکنولوژی DNA نوترکیب، نقش چشمگیری در بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه ایفا نموده است. بخش عمده تحقیقات در زمینهٔ متابولیت‌های ثانویه، در زمینه شناسایی و دستکاری ژنتیکی آنزیم‌های دخیل در مسیر متابولیکی سنتز یک متابولیت ثانویه، متمرکز شده است. ژنهای کنترل کننده متابولیتهای ثانویه عموما" بیش از یک ژن می باشند. اگرچه تحقیقات فراوانی طی سی سال گذشته در زمینه تولید متابولیتهای ثانویه انجام شده است؛ ولیکن به دلیل فقدان اطلاعات پایه در رابطه با مسیرهای بیوسنتز متابولیتهای ثانویه، کنترل چند آنزیمی مسیرهای تولید این مواد، عدم آشنایی و دسترسی کافی به بیورآکتورها تولید اقتصادی آنها به جز در موارد خاص امکان پذیر نشده است (Bourgaud et al. 2002). در سالهای اخیر تحقیقات زیادی بر اساس مارکرهای مولکولی برای شناسایی و مشخص نمودن مکان ژنومی آنها آغاز شده است. نواحی ژنتیکی کنترل کننده متابولیتهای ثانویه در بین ژنوتیپهای مختلف نیز متفاوت است. تجزیه QTL می‌تواند یک راهکار مناسب برای درک ژنتیکی بیوسنتز متابولیتها در گیاه باشد. کلون کردن و توالی‌یابی یک QTL از ژن *cap* که عامل تندی در فلفل است، نشان داد که ژنهای کاملا" متفاوتی از ژنهای ساختاری در بیوسنتز capsaicinoids دخالت دارد. توالی‌یابی EST برخی از گیاهان مانند درمنه، خشخاش، سرخدار، نعناع، و توتون در تجزیه و تحلیل ژنتیکی مسیرهای متابولیکی آرتمیزین، مورفین تاکسول، منتول، نیکوتین موثر بودند (Kumar and Gupta 2008).

در بیوسنتز مونوترپن‌ها در آویشن (*Thymus vulgaris*) و نعناع فلفلی (*Mentha piperita*) یک سیستم چند ژنی با برهم‌کنش اپستاتیک نقش دارد. اما در پونه آبی (*M. aquatica*) همه ژنهای دخیل در مسیرهای بیوشیمیایی مونوترپنها به صورت دو آللی با وراثت ساده غالب و مغلوبی است. مطالعات ژنتیکی در *Mentha* منجر به شناسایی چندین مکان چند آللی شده است. آنزیم لیمونین سنتاز توسط یک ژن دو آللی کنترل می‌شود و اثرات اپستاتیک بین این دو ژن تولید ترانس کاروئول (carveol) و

Archive of SID
www.SID.ir

ترانس ایزوپیپریتنول (isopiperitenol) و یا لیمونین است. برهم کنش اپستاتیک یک آلل سوم با این دو ژن سنتز لینالول و لینالیل استات را کنترل می‌کند. در پیاز (*Allium*) سنتز فراکتان توسط یک ژن غالب *Frc* تنظیم می‌شود.

باکتری خاکزی *Agrobacterium* به عنوان ابزار طبیعی مهندسی ژنتیک در اکثر گونه‌های گیاهی و بخصوص در گیاهان دولپه می‌باشد. گونه‌های مختلف این باکتری، مهندسان طبیعی هستند که بیماری‌های تومور گال طوقه (Yun et al. 1992) و ریشهٔ مویین (Tepfer 1990) را در گیاهان سبب می‌شوند. انتقال ژن یا تراریزش ژنتیکی یک ابزار قوی برای افزایش بازدهی و تولید متابولیتهای ثانویه‌ای است که محدودیت بازدهی دارند. اگرچه روشهای مختلف مانند بمباران ذره‌ای، الکتروپوریشن و ... برای انتقال ژن وجود دارد؛ اما استفاده از *A. tumefaciens* به دلایل متعدد از جمله: بازدهی بیشتر با هزینه کمتر، امکان انتقال قطعات بزرگ DNA و انتقال تعداد کپی DNA کم نسبت به سایر روشها ارجحیت دارد. انتقال ژنهای گزارشگر *gus* و *npt*II به کلم و کلزا (Christey and Sinclair 1992)، ژن گزارشگر *gfp* به پروانش (*Cat. roseus*) (Hughes et al. 2002)، ژن لکتین نخود به شبدر قرمز (*Trifolium repens* L) و تراریزش شابیزک(*A. belladonna*) جهت بهبود ترکیبات آلکالوئیدی آن با آگروباکتریوم انجام شده است (Cucu et al. 2002; Yun et al. 1992). یک ژن آنتی سنس دی هیدروفلاونول ردوکتاز (DFR) به ریشه های مویین یونجه زرد (*Lotus corniculatus*) انتقال داده شده است. انتقال این ژن به دو ژنوتیپ S33 و S50 سبب کاهش بیوسنتز تانن و در ژنوتیپ S41 سبب افزایش تجمع تانن گردید که این امر می‌تواند ناشی از تاثیر ژنوتیپ بر انتقال ژن باشد (Carron et al. 1994). تحقیقات نشان داده که ریشه‌های مویین تولید شده به‌وسیلهٔ باکتری *A. rhizogenes* به علت پایداری و تولید زیاد ریشه‌ها در شرایط کشت عاری از هورمون، بافتی مناسب برای تولید متابولیت‌های ثانویه می‌باشند (Argolo et al. 2000; Tepfer, 1990). کشت ریشه‌های موئین جهت تولید متابولیتهای ثانویه برخی از گونه‌های دارویی از جمله باریجه (Montazeri 2009) دیجیتالیس:*Digitalis lanata* (Park and Facchini 2000)، خشخاش: *Papaver somnifera* (Pradel et al.1997)، درمنه: *A*rtemisia *annua* (Cai et al. 1995)، تاجریزی: *Opium poppy* (Park and Facchini 2000)، *Solanum aviculare* (Argolo et al. 2000)، *Panax ginseng* (Jeong et al. 2002) و تاتوره: *Datura stramonium* (Maldonado-Mendoza et al. 1993) انجام شده است. ریشه‌های موئین تولید شده در گیاه تاتوره تا ۵ سال از لحاظ تولید آلکالوئیدهای تروپانی از پایداری بالایی برخوردارند (Maldonado-Mendoza et al. 1993). شرایط متعددی در استقرار یک سیستم کشت ریشه های موئین برای هر گونه گیاهی خاص نقش دارند که مهمترین آنها سویه باکتری آگروباکتریوم رایزوژنز، ریزنمونه، آنتی بیوتیک مناسب برای حذف باکتری‌ها و محیط کشت می‌باشند. برای القای ریشه های مویین اغلب از هیپوکوتیل، برگ، ساقه، برگچه، ریشه‌چه، کوتیلدون، راس ساقه و پروتوپلاست استفاده می‌شود. ترکیبات غذایی محیط کشت، منبع کربن، pH محیط، نور، هورمونها، حرارت، فلزات سنگین، غلظت فسفات و نیترات، آمونیاک و الیسیتورها بر میزان القای ریشه‌های موئین و تولید متابولیتها موثر می‌باشند (Zhou et al. 1998)

درمنه (*A. annua* L) منبع دارویی آرتمیزنین (به عنوان یک ماده ضد تب و ضد مالاریا) است که به دلیل منابع محدود، کاربرد فراوان و مشکل بودن ساخت شیمیایی این ماده تلاش‌های زیادی برای افزایش تولید آرتمیزنین صورت گرفته است. توانایی ریشه‌های مویین جهت رشد با تراکم بالا و تولید مقادیر معنی‌داری از آرتمیزین (۴ mg/l) آن را به یک سیستم مناسب برای کشت صنعتی در بیوراکتور تبدیل کرده است. ریشه مویین درمنه از لحاظ بیوشیمیایی یک مدل پایدار برای مطالعه مراحل متابولیسم ترپنوئیدها از جمله آرتمیزنین می‌باشد (Cai et al. 1995). در سالهای اخیر تحقیقات زیادی در زمینه تنظیم مولکولی بیوسنتز آرتمیزین انجام شده است و ژنهای آنزیمهای کلیدی در بیوسنتز این ماده مانند فارنسیل دی فسفات سنتاز (FPS) و آمورفا ۴ و ۱۱ دی‌ان‌سنتاز (AMS) شناسایی و کلون شده‌اند (Sharafi et al. 2006). البته همیشه افزایش بیان آنزیمهای کلیدی سبب بهبود تولید متابولیتهای ثانویه نمی‌شود. ژن کد کننده دو آنزیم کلیدی ۳-هیدروکسی-۳-متیل- گلوتاریل کوآنزیم آ ردکتاز و موریسمات پیروات لیاز در سنتز شیکونین به ریشه های موئین سنگدانه انتقال

Archive of SID
www.SID.ir

داده شدند، اما با وجود بیان بالای این دو ژن و افزایش سطح آنزیمها، در میزان شیکونین تولید شده تغییری مشاهده نشده است (Koehle et al. 2002).

القای ریشه‌های موئین ممکن است بر مسیر متابولیکی نیز تاثیر بگذارد و سبب تولید ترکیبات جدیدی شود که در شرایط عادی در ریشه‌های غیرتراریخت تولید نمی‌شوند. در ریشه‌های موئین تراریخت گیاه لبدسه یا سپرک (*Scutellaria baicalensis*) گلوکوزید کانژوکه شده از فلاونوئیدها تجمع می‌یابد در حالی که در ریشه گیاه غیر تراریخت گلوکز کانژوکه شده تجمع پیدا می‌کند (Nishikawa and Ishimaru 1997). ریشه‌های موئین به علت الحاق تصادفی T-DNA به ژنوم گیاه، سطوح مختلفی از متابولیتها را تولید می‌کنند. (Mano et al. 1989) با تجزیه ۴۵ کلون ریشه موئین *Duboisia leichhardtii* دریافتند که تنوع معنی‌داری بین کلونها از لحاظ سرعت رشد و محتوای آلکالوئیدی وجود دارد (Mano et al. 1989).

نشانگرهای مولکولی

عوامل متعددی نظیر خاک و شرایط آب و هوایی محتوای ترکیب دارویی گیاه را تحت تأثیر قرار می‌دهند. همچنین ممکن است بین ژنوتیپ‌های مختلف یک گونه از لحاظ ترکیب دارویی فعال نیز تفاوت وجود داشته باشد که این امر می‌تواند بر کیفیت نهایی دارو تأثیر داشته باشد. جهت استانداردسازی داروهای گیاهی از روشهای متعددی نظیر ارزیابی مورفولوژیک و تعیین نیمرخ شیمیایی (Chemo profiling) مواد گیاهی استفاده می‌شود. ارزیابی مورفولوژیک مواد گیاهی بر اساس پارامترهایی نظیر شکل، اندازه، رنگ، بافت، خصوصیات سطح گیاه، مزه و غیره صورت می‌گیرد. مشکلی که در شناسایی گونه‌های گیاهان دارویی با استفاده از صفات مرفولوژیک وجود دارد، وجود نامهای گیاهشناسی متفاوت در مورد یک گیاه در نواحی مختلف جهان است. در این حالت ممکن است گونه‌های گیاهان دارویی نادر و مفید، با گونه‌های دیگری که از لحاظ مرفولوژیکی به گیاه اصلی شبیه‌اند، اشتباه فرض شوند.

نیمرخ شیمیایی، الگوی شیمیایی ویژه‌ای برای یک گیاه است که از تجزیهٔ عصارهٔ آن گیاه به وسیلهٔ روش‌هایی چون TLC و HPLC حاصل می‌شود. همچنین بسیاری از تکنیک‌های آنالیز همچون تجزیه حجمی، کروماتوگرافی گازی، کروماتوگرافی ستونی و روش‌های اسپکتروفتومتریک نیز برای کنترل کیفی و استانداردسازی مواد دارویی گیاهی مورد استفاده قرار می‌گیرند. اگرچه با این روشها، اطلاعات زیادی در مورد یک گیاه دارویی و ترکیبات دارویی موجود در آن فراهم می‌آید ولی معایبی نیز دارند. به عنوان مثال برای اینکه یک ترکیب شیمیایی به‌عنوان یک نشانگر جهت شناسایی یک گیاه دارویی خاص مورد استفاده قرار گیرد، باید مختص همان‌گونهٔ گیاهی خاص باشد؛ در حالی‌که همهٔ گیاهان دارویی دارای یک ترکیب شیمیایی منحصر به‌فرد نیستند. همچنین بین بسیاری از مولکول‌های شیمیایی که به‌عنوان نشانگر مورد نظر می‌باشند، هم‌پوشانی معنی‌داری وجود دارد؛ بعلاوه فاکتورهای درونی چون عوامل ژنتیکی و فاکتورهای بیرونی چون کشت، برداشت، خشک‌کردن و شرایط انبارداری نیز می‌توانند پروفیل شیمیایی یک گیاه را تغییر دهند (Joshi et al. 2004).

نشانگرهای DNA به دلیل عدم وابستگی به سن، شرایط فیزیولوژیکی و محیطی گیاه دارویی ابزاری قدرتمند در استفاده کارآ از گونه‌های مؤثر دارویی محسوب می‌شوند. نیمرخی که از انگشت نگاری DNA یک گیاه دارویی به‌دست می‌آید، کاملاً به همان گونه اختصاص دارد. همچنین شکل فیزیکی نمونه برای ارزیابی آن گونه اهمیت ندارد و می‌توان علاوه بر بافت تازه، از بافت خشک نیز DNA استخراج نمود (Joshi et al. 2004). از نشانگرهای DNA می‌توان برای شناسایی دقیق گونه‌های گیاهان دارویی مهم استفاده نمود که این امر در گونه‌ها و یا واریته‌هایی که از لحاظ مرفولوژیکی و فیتوشیمیایی به هم شبیهند، بسیار حائز اهمیت است. انواع مختلفی از نشانگرهای مولکولی DNA از قبیل RFLP، RAPD، SSR، AFLP برای بررسی ساختار ژنتیکی موجودات وجود دارد. نشانگر مولکولیRAPD جهت شناسایی دقیق گونهٔ *P ginseng* در بین جمعیت‌های جینسنگ (Ha et al. 2002) و بررسی تنوع ژنتیکی در ژرم‌پلاسم ریحان ایرانی (Parizadeh 2009)، سیر ایرانی (Abdoli et al. 2008)، *Artemisia capillaris* (Zamani et al. 2008) *Taxus baccata* *T.* (Sangwa et al. 1999) *A. annua* (Hasan et al. 2009) *Allium wallichiana*، *Juniperus communis* L، *schoenoprasum* L (Joshi et al. 2004) *Capsicum annuum*

Archive of SID
www.SID.ir

استفاده شده است. همچنین از نشانگر RFLP برای بررسی تنوع در بادرنجبویه (*Melissa officinalis*)، شیرین بیان (*Glycerrhiza*)، سرخارگل (*Echinacea purpurea*) و نشانگر AFLP برای بررسی تنوع ژنتیکی باریجه (Khunani 2008)، آرتمیزیا-(Naseri-Rad 2011)، ختمی *Althaea spp* (Dastmalchi et al 2010)، رازیانه (Hassani et al. 2011) شلغم روغنی (*Brassica campestris*) بکار رفته است (Joshi et al. 2004).

در سال‌های اخیر مطالعات زیادی به‌منظور تعیین رابطهٔ بین نشانگرهای DNA و تنوعات کمی وکیفی ترکیبات فعال دارویی در بین گونه‌ها و خویشاوندان نزدیک گیاهان دارویی صورت گرفته است. به عنوان مثال از نشانگر RFLP برای شناسایی مواد فیتوشیمیایی سرخارگل و از نشانگر RAPD برای بررسی کیمیوتیپ های مختلف از لحاظ میزان روغن در ژنوتیپهای مختلف ژرانیوم (*Pelargonium graveolens*) و ترکیبات فلاونوئیدی در *Aconitum* استفاده شده است(Joshi et al. 2004).

سیتوژنتیک

مطالعات سیتوژنتیک یکی از مراحل اساسی برای شناسایی و دسته بندی موجودات و بررسی روند تکاملی آنها می باشد ضمن اینکه نتایج بررسی های سیتوژنتیکی می تواند بعنوان اطلاعات پایه ای ارزشمند جهت انجام سایر پژوهش ها در زمینه های اصلاحی و بیوتکنولوژیکی مورد استفاده قرار گیرد. با تهیه کاریوتایپ و مطالعات سیتوژنتیکی می توان به گروه بندی گونه ها و جمعیت های مختلف پرداخت. برای بسیاری از گیاهان دارویی در کشور مطالعات سیتوژنتیکی اندکی صورت گرفته است. در این رابطه تهیه کاریوتایپ و بررسی سیتوژنتیکی باریجه *Ferula gummosa* (Parsa 2010) و مشگک *Ducrosia anethifolia.* (Obeidi and Omidi 2010) برای اولین باردر کشور انجام شد. این مطالعات پایه هی می تواند مقدمه ای برای دیگر مطالعات بیوتکنولوژی این گونه های دارویی مهم کشور باشد

نتایج و بحث

فناوری زیستی قادر است کارآیی گیاهان دارویی را جهت تولید دارو افزایش دهد. کشت سلول، بافت و اندام گیاهی امکان تولید سریع و انبوه ژنوتیپ‌های مطلوب با محتوای ژنتیکی یکسان و کیفیت یکنواخت، در زمان کوتاه‌تر و فضای محدود را فراهم می‌سازد. امروزه تعداد زیادی از گیاهان دارویی از طریق ریزازدیادی قابل تکثیر می‌باشند. اگرچه تولید متابولیتهای ثانویه از طریق کشت سوسپانسیون سلولی و اندام در طیف وسیعی از گیاهان دارویی بررسی شده است ولی در حال حاضر این روش فقط برای ترکیبات با ارزش افزوده بالا نظیر داروهای ضد سرطان (تاکسول، وین‌کریستین و وین‌بلاستین) به صورت صنعتی کاربرد دارد. شناسایی و دستکاری ژنتیکی آنزیم‌های دخیل در مسیر متابولیکی بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه و تراریزش ژنتیکی و استفاده از الیسیتورهای زیستی و غیر زیستی جهت افزایش مقدار متابولیت‌های ثانویه و تولید متابولیتهای جدید می‌تواند زمینه را برای کاربرد کشت سلولی در سایر گیاهان نیز فراهم نماید.

فاکتورهای متعددی نظیر شرایط اقلیمی و ژنتیکی بر محتوای ترکیبات دارویی گیاه و کیفیت نهایی دارو موثرند. در سال‌های اخیر مطالعات زیادی به‌منظور تعیین رابطهٔ بین نشانگرهای مولکولی و تنوعات کمی وکیفی ترکیبات فعال دارویی در بین گونه‌ها و خویشاوندان نزدیک گیاهان دارویی صورت گرفته است. نشانگرهای مولکولی به دلیل عدم وابستگی به سن، شرایط فیزیولوژیکی و محیطی گیاه دارویی ابزاری قدرتمند در استفاده کارآ از گونه‌های مؤثر دارویی محسوب می‌شوند. به‌کارگیری توأم روشهای مولکولی و آنالیز شیمیایی چون TLC و HPLC می‌تواند اطلاعات مربوط به یک گونهٔ دارویی خاص و همچنین کنترل کیفی و کمی ترکیب دارویی مورد نظر را در سطح صنعتی افزایش دهد. بنظر می رسد در آینده نه چندان دور استفاده از الیسیتورهای زیستی و غیر زیستی و نیز استفاده از تک سلولی ها و بیوراکتورهی منبع عمده ای برای تولید دارو در جهان می باشد.

Archive of SID

www.SID.ir

منابع

Abdoli M, Habibi Khaniani B, Baghalian K, Shahnazi S, Rassouli H, et al. (2009) Classification of Iranian garlic (*Allium sativum* L.) ecotypes using RAPD marker Journal Medicinal Plants 8: 45-51.

Aggarwal D, Barna KS (2004) Tissue culture propagation of elite Plant of *Aloe vera* Linn. Journal Plant Biochemistry & Biotechnology 13: 77-79.

Argolo AC, Charlwood BV, Pletsch M (2000) The regulation of solasodine production by *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots of *Solanum aviculare*. Planta Medica 66: 448-451.

Arumugam N, Bhojwani SS (1990) Somatic embryogenesis in tissue cultures of *Podophyllum hexandrum*. Canadian Journal of Botany 68: 487-491.

Avansians R (2009) Study of hairy root induction by *Agrobacterium rhizogenes* in *Papaver somniferum* L. and its effect on secondary metabolites production. University of Tehran. Iran. (In Farsi).

Barna K, Wakhlu A (1988) Axillary shoot induction and plant regeneration in *Plantago ovata* Forssk. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 15: 169-173.

Basu P, Chand S (1996) Regeneration of plantlets from root-derived callus of Egyptian Henbane. Cell Chromosome Research 19: 31-34.

Benjamin BD, Roja P, Heble M, Chadha M (1987) Multiple shoot cultures of *Atropa belladona*: effect of physicochemical factors on growth and alkaloid formation. Journal Plant Nutrient 129: 129-135.

Bourgaud F, Gravot A, Goniter E (2002) Production of plant secondary metabolites. Plant science 161: 839-851.

Cai G, Li G, Ye H, Li G (1995) Hairy root culture of *Artemisia annua* L. by *Ri* plasmid transformation and biosynthesis of artemisinin. Chinese Journal of Biotechnology 11: 227-235.

Carelli BP, Echeverrigaray S (2002) An improved system for the *in vitro* propagation of rose cultivars. Scientia Horticulturae 92 69-74.

Carron T, Robbins M, Morris P (1994) Genetic modification of condensed tannin biosynthesis in *Lotus corniculatus*. Hererologous antisense dihydroflavonol reductase down-regulates tannin accumulation in hairy root cultures. Theoretical and Applied Genetics 87: 1006-1015.

Chaloushi B, Zarghami R, Abd-Mishani C, Omidi M, Agayev Y, et al. (2007) Effects of different hormonal treatments on the callus production and plantlet regeneration in saffron (*Crocus sativus* L.). Pakistan Journal of Biological Sciences 15: 1625-1631.

Chang SH, Ho CK, Chen ZZ (2001) Micropropagation of *Taxus mairei* from mature trees. Plant Cell Reports 20: 496-502.

Christey M, Sinclair B (1992) Regeneration of transgenic kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*), rape (*B. napus*) and turnip (*B. campestris* var. *rapifera*) plants via *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation. Plant science 87: 161-169.

Cucu N, Gabriela, Gavrila L (2002) Genetically modified medicinal plants. II. Transfer and expression of a marker kanamycin resistance gene in *Atropa belladonna* plants. Romanian Biotechnological Letters 7: 869-874.

Dastmalchi T, Omidi M, Torabi S, Arefi HM, Etminan AR, et al. (2011) Evaluation of genetic variation in marsh mallow and hollyhock accessions (*Althaea & Alcea spp L.*) using AFLP markers. (In Farsi). Modern Genetics Journal 6: 79-87.

Faria R, Illg R (1995) Micropropagation of *Zingiber spectabile* Griff. Science Horticulture 62: 135-137.

Fett-Neto AG, Stewart JM, Nicholson SA, Pennington JJ, Di-Cosmo F (1994) Improved taxol yield by aromatic carboxylic acid and amino acid feeding to cell cultures of *T. cuspidata*. Biotechnology and Bioengineering 44: 967-971.

Garro-Monge G, Gatica-Arias AM, Valdez-Melara M (2008) Somatic embryogenesis, plant regeneration and acemamnan detection in aloe (*Aloe barbadensis* MILL.). Agronomia Costarricense 32: 41-52.

Ghorbanpour M (2010) The study on Alkaloid metabolites of *Hyoscyamus sp*. in response to drought, nitrogene level,PGPR effect and its study on *in-Vitro* culture. (In Farsi). University of Tehran.

Guardiola J, Iborra JL, Rodenas L, Canovas M (1996) Biotransformation from geraniol to nerol by immobilized grapevine vells (*V. vinifera*). Applied Biochemistry and Biotechnology 56: 169-180.

Ha WY, Shaw PC, Liu J, Yau FC, Wang. J (2002) Authentication of *Panax ginseng* and *Panax quinquefolius* using amplified fragment length polymorphism (AFLP) and directed amplification of minisatellite region DNA (DAMD). Journal of Agricultural and Food Chemistry 50: 1871-1875.

Hasan SMZ, Shafie MSB, Shah RM (2009) Analysis of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) of *Artemisia capillaris* (Wormwood capillary) in East Coast of Peninsular Malaysia. World Applied Sciences Journal 6: 976-986.

Hashemabadi D, Kaviani B (2008) Rapid micropropagation of *Aloe vera* L. via shoot multiplication. African Journal of Biotechnology 7: 1899-1902.

Hassani MH, Torabi S, Omidi M, Etmina AR, Dasmalchi (2011) Evalution of genetics diversity in Fennel accessions using AFLP markers. Iranian Journal of field crop science 42: 597-604 (In Farsi).

Hippolyte I, Marin B, Baccou JC, Jonard R (1992) Growth and rosmarinic acid production in cell suspension cultures of *Salvia officinalis* L. Plant Cell Reports 11: 109-112.

Houri M, Shahrzad S, Nouri AS, Omidi M, Ghamarizare A (2008) Production of Tubers from embryo in *Bunium persicum* Boiss. 10th Iranian Genetics Society Congress. Tehran. Iran. (In Farsi).

Hughes E, Hong S, Shanks J, San K, Gibson S (2002) Characterization of an inducible promoter system in

Archive of SID

Catharanthus roseus hairy roots. Biotechnology Progress 18: 1183-1186.
Imani N (2011) The study on micro propagation of *Ferula gummosa* Boiss, using meristem explants. Tehran: University of Tehran.
Irvani N, Solouki M, Omidi M, Zare AR, Shahnaz S (2010) Callus induction and plant regeneration in *Dorem ammoniacum* D , an endangered medicinal plant. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 100: 293-299.
Jeong G, Park D, Hwang B, Park K, Kim S, et al. (2002) Studies on mass production of transformed *Panax ginseng* hairy roots in bioreactor. Applied Biochemistry and Biotechnology 98: 1115-1127.
Johnson T, Ravishankar GA, Venkataraman LV (1990) *In vitro* capsaicin production by immobilized cells and placental tissues of *Capsicum annuum* L. grown in liquid medium. Plant Science Asia 70: 223-229.
Joshi K, Chavan P, Warude D, Patwardhan B (2004) Molecular markers in herbal drug technology. Current Science 87: 159-165.
Kadota M, Niimi Y (2004) Improvement of micropropagation of Japanese yam using liquid and gelled medium culture. Scientia Horticulturae 102: 461-466.
Karimaneh Z (2009) The Study on the effect of plant growth regulators, concentration, medium and explants on the calus induction, regeneration and suspension culture of *Papaver somniferum* L. University of Tehran. Iran (In Farsi).
Khan N, Alam MS, Nath UK (2004) *In vitro* regeneration of garlic through callus culture. Journal of Biological Sciences 4: 189-191.
Khosh-Khui M, Shekafandeh A, Azarakhsh H (1984) Micropropagation of myrtle. Scientia Horticulturae 22: 139-146.
Khunani Z (2008) Assessment of Genetic diversity in the Samples of *Ferula gummosa* from Iran using AFLP markers. University of Tehran. Iran (In Farsi).
Koehle A, Sommer S, al KYe (2002) High level expression of chorismate pyruvate-lyase (ubic) and HMG-CoA reductase in hairy root cultures of *Lithospermum erythrohizon*. Plant and Cell Physiology 43: 894-902.
Kumar J, Gupta PK (2008) Molecular approaches for improvement of medicinal and aromatic plants. Plant Biotechnology Reports 2: 93-112.
Kunitake H, Mii M (1997) Somatic embryogenesis and its application for breeding and micropropagation in Asparagus (*Asparagus officinalis* L.). Plant Biotechnology 15: 51-63.
Lesan S, Omidi M, Torabi S, Miri M, Raad MB, et al. (2009) The effect of various levels of hormones and explants on callus induction of *Althaea* sp. 6th National Biotechnology Congress. Tehran. Iran. (In Farsi).
Maldonado-Mendoza IE, Ayora-Talavera T, Loyola-Vargas VM (1993) Establishment of hairy root cultures of *Datura stramonium*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 33: 321-329.
Mamaghani MS, Assareh MH, Omidi M, Matinizadeh M, Ghamari-Zare A, et al. (2009) The effect of thidiazuron level on *in vitro* regeneration type and peroxidase profile in *Eucalyptus microtheca* F. Muell. Plant Growth Regulation 59: 199-205.
Mano Y, Ohkawa H, Yamada Y (1989) Production of tropane alkaloid by hairy root cultures of *Duboisia leichhardtii* transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. Plant science 59: 191-201.
Mantell S, Hugo S (1989) Effects of photoperiod, mineral medium strength, inorganic ammonium, sucrose and cytokinin on root, shoot and microtuber development in shoot cultures of *Dioscorea alata* L. and *D. bulbifera* L. yams. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 16: 23-37.
Montazeri F (2009) Study of hairy root induction by *Agrobacterium rhizogenes* in *Ferula gummosa* and its effect on secondary metabolites production. University of Teahran. Iran (In Farsi).
Mukherjee A, Chowdhury BR (2008) The *In vitro* propagation of *Aloe vera* sp. TIG Research Journal 1: 116-119.
Mulabagal V, Tsay HS (2004) Plant cell cultures-an alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites. International Journal of Applied Science and Engineering 2: 29-48.
Naseri-Rad S (2011) Sequensing for the promoter of CYP71AV1 gene related to synthesize of Artemisinin in *Artemisia annua*. University of Tehran. Iran. (In Farsi).
Nishikawa K, Ishimaru K (1997) Flavonoids in root cultures of *Scutellaria baicalensis*. Journal Plant Physiology 151: 633-636.
Obeidi L (2010) The Cytogenetic Study of *Ducrosia anethifolia*. University of Ilam, Iran (In Farsi).
Omidi M, Sasan B, Naghavi MR, Etminan A, Kalatejari S (2011) Effect of Growth Regulators, Medium and Explant on Callus Induction in *Taxus baccata*. Iranian J of Rangelads and Forests Plant Breeding and Genetic Research 27: 316-325 (In Farsi).
Parizad M (2009) Evaluation of Genetic diversity in Iranian Basil populations (*Ocimum basilicum* L.) using Morphological and Molecular RAPD markers.University of Tehran, Iran (In Farsi).
Park SU, Facchini PJ (2000) *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation of *opium poppy*, *Papaver somniferum* l, and *California poppy*, *Eschscholzia californica* cham, root cultures. Journal of Experimental Botany 51: 1005-1016.
Parsa MB (2010) Cytological Study of *Ferula gummosa.* University of Isfahan. Iran (In Farsi).
Pezzuto J (1996) Taxol production in plant cell culture comes of age. Nature Biotechnology 14: 1083.
Pradel H, Dumkelehmann U, Diettrich B, Luckner M (1997) Hairy root cultures of *Digitalis lanata*, Secondary metabolism and plant regeneration. Journal Plant Physiology 151: 209-215.
Rao SR, Ravishankar GA (2002) Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. Biotechnology Advances 20: 101-153.

Archive of SID
www.SID.ir

Rout GR, Mallick UC, Das P (1992) *In-vitro* plant regeneration from leaf callus of *Cephaelis ipecacuanha*. Advances in Plant Science 5: 608-613.
Rout GR, Samantaray S (1995) Somatic embryogenesis and plant regeneration from callus culture of *Acacia catechu* - a multipurpose leguminous tree. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 42: 283-285.
Salgado GR, Ochoa-Alejo N (1990) Increased capsaicin content in PFP resistant cells of chilli pepper (*Capsicum annuum*). Plant Cell Reports 8: 617-620.
Sangwa RS, Sangwan NS, Jain DC, Kumar S, Ranade SA (1999) RAPD profile based genetic characterization of chemotypic variants of *Artemisia annua* L. Biochemistry and Molecular Biology International 47: 935-944
Sarabadani-Tefreshi R, Omidi M, Bihamta MR, Mirzaie R (2008) The Effects of Explant and Different Hormones Concentration on Callus Induction and Shoot Regeneration of Galbanum (*Ferula gummosa* B.). Seed and Plant 24: 763-766. (In Farsi).
Sarkheil P, Omidi M, Peyghambari SA, Davazdahemami S (2009) Effects of plant growth regulators and explants on callogenesis, regeneration and suspension culture in *Foeniculum vulgare* Mill. Journal of Medicinal and Aromatic Plants 25 364-375.
Sasan B, Omidi M, Naghavi MR, Kalatejari S, Etminan A (2012) Effect of Growth Regulators, Medium and Activated Charcoal on Micropropagation in *Taxus baccata*. Iranian Journal of Plant and Ecology (In Farsi).
Satheesh KK, Bhavanandan KV (1988) Micropropagation of *Plumbago rosea* Linn. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 15: 275-278.
Sayed-Tabatabae BE, Omidi M (2011) Plant Cell and Tissue Culture. Tehran University Press, Tehran, Iran. PP: 368.
Seyfi H (2006) The Study on the effect of hormone concentration, medium and explant in callogenesis, regeneration and suspension culture of *Teucrium polium*. University of Tehran, Iran (In Farsi).
Shabannejad-Mamaghani M, Assareh MH, Omidi M, Matinizadeh M, Ghamari-Zare A, et al. (2009) The effect of thidiazuron level on in vitro regeneration type and peroxidase profile in *Eucalyptus microtheca* F. Muell Plant Growth Regulation 59: 199-205.
Shafiee M (2009) Studying of light and hormone effect on plant suspension culture of (*Ducrosia anethifolia*). University of Zabol, Iran. (In Farsi).
Sharafi A, Sohi HH, Tabar KK (2006) Overview on Tissue Culture, Regeneration and Gene Transfornation to *Artemisia annua* L. Journal of Medicinal Plants 5: 1-10.
Shasany AK, Khanuja SPS, Dhawan S, Yadav U, Sharma S, et al. (1998) High regenerative nature of *Mentha arvensis* internodes. Journal of Biosciences 23: 641-646.
Sivaram L, Mukundan U (2003) *In vitro* culture studies on *Stevia rebaudiana*. *In Vitro* Cellular and Developmental Biology 39: 520-523.
Stajner N, Bohanec B, Jakse M (2002) *In vitro* propagation of *Asparagus maritimus* - A rare Mediterranean salt-resistant species. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 70: 269-274.
Subroto MA, Kwok K, Hamill JD, Doran PM (1996) Coculture of genetically transformed roots and shoots for synthesis, translocation and biotransformation of secondary metabolites. Biotechnology Bioengineering 49: 481-494.
Tepfer D (1990) Genetic transformation using *Agrobacterium rhizogenes*. Physiologia Plantarum 79: 140-146.
Tolyat M, Abdoli M, Ghorbani-Moshgin M, Khalighi-Sigaroodi F, Omidi M (2009) Propagation of *Ginkgo biloba* L. Through Tissue Culture of Various Plant Parts. Journal of Medicinal Plants 8: 156-163.
Tolyat M, Abdoli M, Moshgin MG, Khalighi-Sigaroodi F, Omidi M (2008) Propagation of (*Ginkgo biloba* L.) Through Tissue Culture of Various Plant Parts. Journal Of Medicianal Plant 8: 156-163. (In Farsi).
Tripathi L, Tripathi JN (2003) Role of biotechnology in medicinal plants. Tropical Journal of Pharmaceutical Research 2: 243-253.
Urbanova M, Kosuth J, Cellarova E (2006) Genetic and biochemical analysis of *Hypericum perforatum* L. plants regenerated after cryopreservation. Plant Cell Reports 25: 140-147.
Yamamoto Y, Mizuguchi R, Yamada Y (1982) Selection of a high and stable pigment-producing strain in cultured *Euforbia millii* cells. Theoretical and Applied Genetics 61: 113-116.
Yun DJ, Hashimoto T, Yamada Y (1992) Metabolic engineering of medicinal plants: transgenic *Atropa belladonna* with an improved alkaloid composition. Proc Nat Acad Sci USA 89: 11799-11803.
Zamani S, Abbasian Z, KHaksar G, Movahedi S, Talebi M, et al. (2008) Genomic diversity among yew (*Taxus baccata* L) genotypes of Iran revealed by random amplified polymorphism DNA markers. International Journal of Agriculture & Biology 10: 648-652.
Zare AR, Solouki M, Omidi M, Iravani N, Mahdi-Nejad N , et al. (2010) Callus Induction and Plant Regeneration in *Ferula assa foetida* L. (Asafoetida), an Endangered Medicinal plant. Trakia Journal of Sciences 8: 11-18.
Zarinpanje N (2010) The study of callus induction and regeneration of *Aloe Vera*. Theran: University of Tehran.
Zarinpanje N, Oladzad A, Omidi M (2011) Callus induction , regeneration and planet in *Aloe vera* L. The 12th Iranian crop production and breeding congress .Tehran, Iran. (In Farsi).
Zenk MH, EI-Shagi H, Schulte U (1975) Anthraquinone production by cell suspension cultures of *Morinda citrifolia*. Planta Medica Supplement 28: 79-101.
Zhou L, Wang J, Yang C (1998) Progress on plant hairy root culture and its chemistry. Induction and culture of plant hairy roots. Natural Product Research and Development (in Chinese with an English abstract) 10: 87-95.

Archive of SID