نشریه علمی ترویجی فناوری گیاهان دارویی ایران
دوره۴- شماره ۲- پیاپند ۷- پائیز و زمستان ۱۴۰۰

ارزیابی فناوری کشت بافت در تولید برخی متابولیت‌های ثانویه در گیاهان

Evaluation of tissue culture technology in the production of some secondary metabolites in plants

سید فاضل فاضلی کاخکی[۱]، ناصر بیک‌زاده[۱*]

۱. استادیار آموزشی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مشهد، ایران ، (نگارنده مسئول)

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۹/۰۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۰/۱۱ - شناسانهٔ برنمود رقمی:10.22092/mpt.2022.360743.1116

چکیده

فاضلی کاخکی، س. ف.، بیک زاده؛ ن.، . ارزیابی فناوری کشت بافت در تولید برخی متابولیت‌های ثانویه در گیاهان .
نشریه علمی ترویجی فناوری گیاهان دارویی ایران، دوره ۴ - شماره ۲- پیاپند ۷- پائیز و زمستان ۱۴۰۰ صفحه: ۱۰۷ -۹۶

گیاهان از طریق چندین مسیر متابولیک، ترکیباتی تولید می‌کنند که می‌توانند با سرعت و به طور موثری در برابر عوامل زیستی و غیرزیستی تنش‌زا واکنش نشان دهند. برخی از این ترکیبات، نیازهای روزافزون بشر به موادی مانند داروها، مواد مغذی و مواد شیمیایی کشاورزی را تأمین می‌کنند. به دست آوردن ترکیبات با ارزش گیاه از طریق انجام عملیات زراعی، بسیار مشکل بوده و زمان‌بر بوده و سنتز ترکیبات با منشا گیاهی به دلیل داشتن ساختار و خصوصیات مولکولی پیچیده، اغلب اقتصادی نیست. بنابراین تولید متابولیت های ثانویه در گیاهان از طریق کشت بافت یک راهکار جذاب برای تولید آن‌ها می باشد. یکی از راه‌های تولید متابولیت‌های ثانویه، استفاده از الیسیتورها (Elicitor) یا محرک‌ها می‌باشد. الیسیتورها شامل مواد شیمیایی و یا بیوفاکتورهایی هستند که می‌توانند تولید متابولیت‌های ثانویه در مو جودات زنده را تحریک کنند. به منظور تولید ترکیب فنلی آنتراکینون (Anthraquinone)، به شرایط خاص و دو سال زمان نیاز است ولی با استفاده از کشت بافت، در مدت چهار هفته به حداکثر تولید این ترکیب می‌توان دست یافت. در مواردی دیگر، تولید شیکونین و تاکسول از طریق کشت بافت با موفقیت به صورت صنعتی انجام و کاربرد تجاری آن نیز صورت گرفته است. بنابراین استفاده از فناوری کشت بافت می تواند در تولید متابولیت‌های ثانویه بدون توجه به منشاء جغرافیایی گیاه، موثر باشد.

واژه های کلیدی: آنتوسیانین، الیسیتور (Elicitor)، فلاونوئید، محیط کشت.

آدرس پست الکترونیکی نگارنده مسئول: beiczadeh@gmail.com

مقدمه

طیف وسیعی از ترکیبات در گیاهان برای رشد، نمو و پاسخ به شرایط محیطی، سنتز می‌شوند. این ترکیبات در سه گروه قرار می گیرند: الف) متابولیت های اولیه مانند نوکلئیک اسیدها، آمینواسیدها و قندها که در سلول های گیاهی تولید و نقش حیاتی در متابولیسم و تولید مثل دارند. ب) پلیمرهای مولکولی با وزن زیاد مانند سلولز، لیگنین و پروتئین هایی که نقش ساختمانی دارند. ج) متابولیت های ثانویه که مستقیما در رشد و نمو گیاه نقشی ندارند اما در حفاظت و دفاع از گیاه در برابر تنش های زنده و غیرزنده نقش حیاتی دارند (Pagare et al., 2015). متابولیت ها ساختارهای شیمیایی متعددی داشته و در هر گیاه خصوصیات منحصر به فردی دارند. این ترکیبات به شش دسته عمده شامل پلی‌کتیدها و اسیدهای چرب، ایزوپرنوئیدها (ترپنوئیدها) و استروئیدها، فنیل پروپانوئیدها (ترکیبات اسید فنولیک)، آلکالوئیدها، اسیدهای آمینه ویژه، پپتیدها و کربوهیدرات‌های ویژه تقسیم می شوند که هر کدام نقش و کارکرد ویژه ای دارد (Slipa et al., 2018). برای مثال ترپنوئیدها دارای ارزش اقتصادی بوده و در طعم و عطر غذا، کیفیت میوه و عطر گل‌ها به کار می روند. از کاربردهای دارویی آن‌ها می توان به خواص ضدسرطانی، ضدمیکروبی، ضدقارچی و فعالیت های ادرارآوری اشاره کرد و برخی از آن‌ها در تدافعات بین عوامل بیماری زا و حشرات نقش دارند (Chen et al., 2020). فنولیک ها نیز از جمله ترکیبات باثبات گیاهی بوده که در اثر محرک‌های خارجی مانند آلودگی میکروبی و مواد تنش زای شیمیایی در گیاه ساخته می شوند. فلاونوئیدها نقش هایی از قبیل حفاظت در مقابل علف خوارها، رنگ‌گیری شکوفه ها، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، ضدقارچی و میکروبی در گیاه دارند (Farah and Marino, 2006). متابولیت‌های ثانویه‌ای مانند آلکالوئیدها، فلاونوئیدها، ترپنوئیدها و آنتوسیانین ها مولکول‌هایی با فعالیت بیولوژیکی زیاد بوده و از ارزش اقتصادی بالایی برخوردار هستند (Praveen and Murthy, 2011). به دست آوردن ترکیبات با ارزش گیاهی از طریق کشت و کار گیاه در عرضه طبیعی کار مشکلی است. از طرفی سنتز ترکیبات با منشاء گیاهی، اغلب اقتصادی نیست چون ساختار و خصوصیات پیچیده مولکولی دارند. بنابراین تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان از طریق کشت بافت یک راه چاره و جذاب برای استخراج این مواد می‌باشد. سلول های گیاهی توانایی بیوسنتز متابولیت ها را داشته و این سلول‌ها از طریق تغییر خودبخودی متغییرهایی می توانند به صورت فعال، آن‌ها را سنتز نمایند. این متغییرهای طبیعی شناسایی و در مقیاس صنعتی مورد بهره برداری قرار گرفته است. در سال ۱۹۸۳، برای اولین بار شیکونین (shikonin) به صورت صنعتی از طریق کشت بافت در صنایع شیمیایی میسویی تولید شد (Hara, 2020). در تولید متابولیت های ثانویه از طریق کشت بافت برخلاف تولید آن‌ها در گیاه، اغلب کمیت های مختلفی از متابولیت ها تولید می شوند و این ممکن است با زمان تغییر کند. بر اساس جدول ۱، تولید و تجمع بسیاری از متابولیت ها در کشت بافت، بسیار بیش‌تر از

جدول ۱. میزان فرآورده حاصل از کشت بافت در مقایسه با گیاه مادری

نام فرآورده	نام گیاه	عملکرد (درصد ماده خشک)		نسبت کشت بافت به گیاه	منبع
		کشت بافت	گیاه		
Ajmalicine	*Catharanthus roseus*	1.0	0.3	3.3	Lee-Parsons and Shuler 2000
Anthraquinones	*Morinda citrifolia*	18	2.2	8	Zenk *et al.*, 1975
Berberine	*Coptis japonica*	13	2	3.3	Fujita and Tabata 1987
Caffèic acid	*Vanilla planifolia*	0.02	0.05	4	Knorr *et al.*, 1993
Ginsenoside	*Panax ginseng*	27	4.5	6	Matsubara *et al.*, 1989
Nicotine	*Nicotiana tabacum*	3.4	2.0	1.7	Mantell *et al.*, 1983
Rosmarinic acid	*Coleus blumei*	27	3	9	Petersen and Simmond 2003
Shikonin	*Lithospermum rythrorhizon*	20	1.5	13.5	Kim and Chang 1990
Ubiquinone-10	*Nicotiana tabacum*	0.036	0.003	12	Fujita and Tabata 1987

تولید آن‌ها در گیاه مادری است.

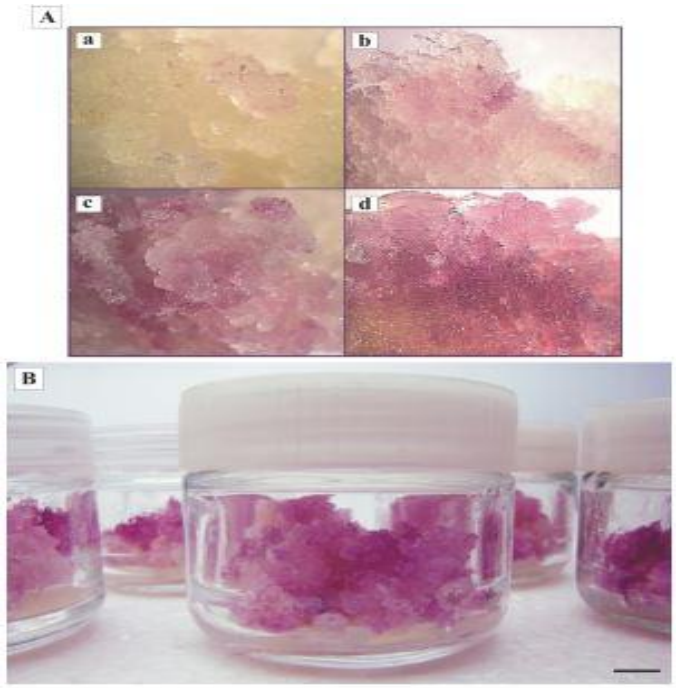
مالیک و همکاران (Malik et al., 2016) در بررسی های خود گزارش کردند که تولید شیکونین از طریق کشت بافت گیاه سنگدانه (*Lithospermum erythrorhizon*) در مقایسه با تولید آن در گیاه مادری، بسیار زیاد بود. نتایج مشابهی توسط پیترسون و سیموندز (Petersen and Simmonds, 2003) در تولید رزمارینیک اسید از طریق کشت بافت گیاه *Coleus bluemei* به دست آمد. همچنین در تحقیقی دیگر، مقادیر زیادی بربرین (berberine) از رشد سلول های گیاه *Coptis japonica* به دست آمده است

(Hara, 2020). این گیاه مقادیر زیادی بربرین در طی شش سال در ریشه های خود ذخیره می کند و غلظت های مشابه آن از طریق کشت بافت می تواند در طی چهار هفته تولید شود. در همین رابطه اسمیتانسکا (Smetanska, 2008) گزارش داد که از سلول های کشت بافت شده گیاه *Coptis japonica* حدود ۱۳ بربرین در ماده خشک آن‌ها به دست آمده است. در این کشت بافت در طی ۱۴ روز، حدود ۱۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر آلکالوئید آنتی باکتریال تولید شد. بررسی ها نشان داده است که تغییر سطوح دمایی و آمونیوم در کشت بافت ریشه در شرایط آزمایشگاهی، بر روی میزان تولید ساپونین تاثیر دارد (Simoes et al., 2012). بنابراین استفاده از فناوری کشت بافت می تواند در تولید بدون توجه به منشا جغرافیایی گیاه موثر باشد. در خصوص کشت بافت لازم به یادآوری است که یک سلول گیاهی می‌تواند به طور کامل بازسازی نموده و سلولی کاملا منحصر به فرد تولید کند و این یکی از اصول کشت بافت است که "پرتوانی" (totipotency) نامیده می شود. بر این اساس، یک گیاه کامل می تواند از سلول های غیر تمایز یافته و سوسپانسیون های سلولی یا از کشت بافت ساقه و یا ریشه تولید شود. از جمله روش های اصلی کشت بافت می توان به کشت سوسپانسیون سلول ها، کشت سلول ها یا کشت بافت ها و اندام های غیرمتحرک اشاره کرد. نوع کشت بافت بر روی رشد و نمو سلول ها تاثیرگذار است (Guillon et al., 2006). کشت بافت یک سازوکار جذاب برای تولید انبوه متابولیت های ثانویه به جای خود گیاه است. توانایی کنترل شرایط فیزیکی و شیمیایی، روش های جدیدی را در افزایش تولید متابولیت های گیاهی و حتی ترکیبات جدید ارائه می دهد که در این مسیر شناخت مسیرهای متابولیکی ترکیبات در تولید انبوه آن‌ها در شرایط آزمایشگاهی اهمیت حیاتی دارد. در این مطالعه، به بررسی اجمالی برخی متابولیت های ثانویه در شرایط کشت بافت پرداخته می‌شود.

تولید آنتوسیانین

آنتوسیانین ها یک گروه بزرگی از رنگیزه ها هستند که مسئول رنگ بسیاری از گل ها و میوه ها می باشند. رنگ آن‌ها با تغییر اسیدیته از آبی تا چهار نوع رنگ مختلف تغییر می کند به طوری که در اسیدیته پایین سرخ رنگ و در اسیدیته بالا به رنگ آبی تبدیل می شوند. آن‌ها عموما در محلول های اسیدی، قرمز شده و در نوشیدنی ها، قنادی ها، مرباها و نانوایی ها استفاده می شوند. قیمت آنتوسیانین خالص برای هر کیلوگرم ۲۰۰۰ دلار است، اما مواد خام آن که از مواد زائد آب میوه و شراب‌سازی و انگور به دست می آید ارزش زیادی ندارد. محققین زیادی تولید آنتوسیانین را با استفاده از کشت بافت از گونه های مختلف گیاهی گزارش کرده‌اند. ابتدا در سال ۱۹۶۰ تولید آنتوسیانین به روش کشت بافت گزارش شد و در ابتدا به صورت ظهور نقطه های رنگی قرمز-صورتی بر روی سطح کالوس مشخص شد که جداسازی مکانیکی و تکرار زیرکشت های آن‌ها سبب شکل‌گیری نقاط و افزایش این پیگمانت ها در کالوس های کشت شده گیاه *Cleome rosea* بود (Simoes et al., 2009) (شکل ۱). در پاسخ

به قرار گرفتن طولانی در معرض نور قرمز و قرمز دور که با میانجی گری فیتوکروم ها همراه است، تجمع آنتوسیانین ها رخ می‌دهد. نور در فعال سازی آنزیم های مختلف درگیر در بیوسنتز آنتوسیانین ها خصوصاً آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز (phenylalanine ammonia-lyase; PAL)، و آنزیم چالکون سینتاز (Chalcone synthase; CHS) که یک آنزیم کلیدی در مسیر بیوسنتز آنتوسیانین است، موثر است. ناکاتسوکا و همکاران (Nakatsuka et al., 2009) ثابت کردند که نور القاء کننده تجمع آنتوسیانین بوده که از طریق فاکتورهای نسخه‌برداری تنظیم می شود. آزمایشات متعددی نشان داده است که استفاده از نور در شرایط کشت بافت سبب تولید آنتوسیانین می شود. تابش های مداوم اشعه ماوراءبنفش منجر به القای موقتی فعالیت های تجزیه ای آنزیم ها و القای تولید رنگیزه ها به عنوان محافظ در مقابل تاثیرات مخرب تابش های این اشعه می‌شود. بررسی ها نشان می دهد که کشت بافت سلول های هویج و قرارگیری آن‌ها در معرض اشعه ماوراءبنفش A سبب افزایش معنی دار آنتوسیانین در آن‌ها شده است (Kodama et al., 2018). دما یک عامل در توسعه کشت بافت مورد توجه قرار داشته و تایید شده است که دما یک عامل مهم محیطی در تولید آنتوسیانین در شرایط کشت بافت است (Simoes et al., 2012). در کشت بافت کالوس گیاه *Cleome rosea* حداکثر تولید پیگمانت ها در دمای ۲±۲۴ درجه سانتی گراد به دست آمد و با افزایش دما، احتمالا به دلیل هیدرولیز باندهای گلوکوزئید به وسیله گلوکوزیدازها، آنتوسیانین تجزیه شده و ترکیبات متراکم قهوه ای رنگ تولید می شود (Simoes et al., 2009). تولید آنتوسیانین وابسته به نوع گیاه، دمای متفاوتی دارد. به عنوان مثال حداکثر تولید آنتوسیانین در گیاه *Daucus carota* در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد حاصل شد (Narayan et al., 2005). تجمع آنتوسیانین در کشت بافت همچنین تحت تاثیر اسیدیته قرار دارد به طوری که بیشترین مقدار آنتوسیانین (۱۴۳ میلی‌گرم در لیتر) در اسیدیته ۸/۷ بعد از نه روز در کشت بافت به دست آمد. با این حال دامنه اسیدیته بین ۳/۷ تا ۸/۷ بوده که به نوع کالوس تهیه شده، بستگی دارد. در بررسی نشان داده شد که سطوح بالای اسیدیته در محیط کشت می تواند فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز را افزایش داده که منجر به افزایش تجمع آنتوسیانین گردد (Simões et al., 2012). از بین مواد قندی لاکتوز، فروکتوز و ساکاروز، در محیط کشتی که حاوی فروکتوز بود به طور معنی‌داری بیشترین مقدار آنتوسیانین در کشت بافت چای ترش (*Hibiscus sabdariffa*) و *Aralia cordata* به دست آمد. با این حال اضافه کردن مانیتول به محیط کشت باعث افزایش آنتوسیانین نیز می گردد. منابع نیتروژنی و نسبت آمونیوم ($^{+}NH_4$) به نیترات ($^{-}NO_3$) که استاندارد آن ۱/۲ است در تولید آنتوسیانین با استفاده از کشت بافت تاثیر دارد. در محیط کشت MS، استفاده از ۷۰ میلی‌مول منبع نیتروژنی سبب حداکثر تولید آنتوسیانین در هویج (*Daucus carota*) و ۶۰ میلی‌مول در انگور (*Vitis vinifera*) و سلول های توت فرنگی شده است (Simões et al., 2012).



شکل ۱. تولید آنتوسیانین در کشت کالوس گیاه *Cleome rosea*. A) افزایش تولید آنتوسیانین در طی a: شش، b: هفت، C: هشت و d: نه ماه در کشت بافت. B) سلول‌های تولیدکننده آنتوسیانین

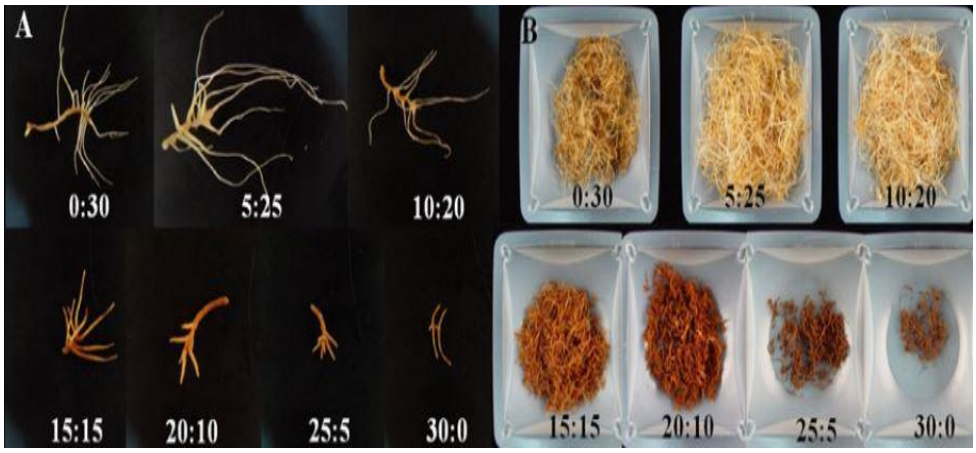
اضافه کردن مقدار فسفات در محیط کشت MS سبب افزایش ۷/۲ درصدی آنتوسیانین شده است. در خصوص تاثیر تنظیم‌کننده های رشد بررسی ها نشان می دهد که استفاده از نفتالین استیک اسید (Naphthaleneacetic acid; NAA) در مقایسه با علف‌کش توفوردی و ایندول استیک اسید (Indole-3- acetic acid,; IAA) سبب افزایش دو برابری آنتوسیانین در گیاه *Glehnia littoralis* شده است. همچنین گزارش شده که استفاده از کینتین (Kinetin) در مقایسه با بنزیل آمینوپورین (benzyl aminopurine; BAP) تاثیر معنی‌داری در تولید آنتوسیانین دارد (Narayan et al., 2005). با این حال برخی محققین اشاره دارند که استفاده از توفوردی تاثیر بازدارنده‌ای در تولید دامنه وسیعی از متابولیت های ثانویه داشته و وجود تنظیم‌کنندگان رشد برای تولید متابولیت های ثانویه ضروری است. البته بایستی متذکر شد که تاثیر متقابل نور و تنظیم‌کنندگان رشد می تواند در افزایش رنگیزه ها در کشت بافت تاثیر داشته باشد. در آزمایشی استفاده از محیط کشت حاوی ۰/۹۰ میکرومول توفوردی، ۷۰ گرم در لیتر ساکارز و $^{-}NH_4^{+}/NO_3$ به نسبت ۱/۴، سبب افزایش ۱۵۰ درصدی آنتوسیانین در کشت بافت گیاه Cleome rosea شد (Simoes et al., 2009).

علیرغم وجود ارزش‌های غیرقابل انکار در گیاهان که به عنوان منبع موادی با ارزش تجاری بسیار بالا هستند، تولید متابولیت‌های ثانویه از طریق کشت‌های آزمایشگاهی هنوز با محدودیت‌های زیادی مواجه است که عمدتاً به خاطر کاهش عملکرد آن‌ها است می‌باشد. با

این حال تلاش‌های قابل توجهی جهت افزایش کاربرد تجاری کشت بافت انجام شده است. تنها در اثر کشت بافت گیاه *Lithospermum erythrorthizon* ، گیاه *Rubia akane* و سرخدار (*Taxus sp.*)، به ترتیب تولید تولید رنگدانه شیکونین، تولید رنگدانه آنتراکینون (Anthraquinone) و تولید تاکسول (از انواع ترپنوئید) با موفقیت به صورت صنعتی انجام و کاربرد تجاری آن‌ها نیز صورت گرفته است. یکی از ابزارهای مفیدی که برای تولید متابولیت های ثانویه در محیط آزمایشگاه مورد استفاه قرار گرفته است، الیسیتورها یا محرک‌ها (Elicitor) هستند. این‌ها مواد شیمیایی یا بیوفاکتورهایی هستند که می توانند با هدف قرار دادن پاسخ موجود زنده، منجر به تولید متابولیت های ثانویه در آن‌ها شوند. الیسیتورها ممکن است عوامل غیرزنده مانند یون‌های فلزی، ترکیبات غیرعالی و تشعشعات ماوراء بنفش یا مواد زنده که از قارچ ها، باکتری ها و یا ویروس ها به دست می آیند، باشند. در تولید آنتوسیانین‌ها از الیسیتورها استفاده می شود. الیسیتورهایی که غالبا در کشت بافت و استخراج عصاره سلول مورد استفاده قرار می گیرند شامل متیل جاسموات، جاسمونیک اسید، سالیسیلیک اسید و یون های غیرعالی هستند. کارایی فرایند استخراج، به مواد گیاهی، زمان تماس و غلظت الیسیتور بستگی دارد (Tiwari and Rana, 2015). در مجموع، علیرغم تعداد زیادی مطالعه که در خصوص تولید آنتوسیانین از کشت بافت صورت پذیرفته است، بهره‌برداری تجاری از تولید آنتوسیانین در شرایط کشت بافت نیاز به فائق آمدن بر مسائلی از قبیل تولید در مقیاس زیاد و نگهداری آن می باشد. تولید تجاری آنتوسیانین‌ها با استفاده از کشت سلول، بافت و یا اندام گیاهی در صورتی که در مقیاس وسیع باشد و در جهت کاهش هزینه‌های آن باشد، می‌تواند مورد توجه قرار گیرد. در هیمن رابطه بیورکتورهایی طراحی همین شده‌اند و مواد بیواکتیوی نیز قابل دسترس هستند (Eibl and Eibl, 2008).

تولید فلاونوئیدها

فلاونوئیدها دسته ای از ترکیباتی ثانویه هستند که حدود ۴۰۰۰ ترکیب با منشا فنولی را شامل می‌شوند. این ترکیبات عموما در تمام غذاها با منشاء گیاهی یافت می شوند. فلاونوئیدها در ابتدا به عنوان رنگدانه های مسئول رنگ برگ ها خصوصا در پاییز شناخته شده بودند. این ترکیبات به طور وسیعی در میوه ها، بخش های رویشی، هسته ها، دانه ها، ساقه ها، گل ها، چای و شراب قرمز یافت می شوند. فلاونوئیدها در بسیاری از جنبه های فیزیولوژی گیاه از جمله تولید رنگدانه، بقای هاگدانه، تداخلات باکتری-گیاه، و حفاظت گیاه در مقابل اشعه ماوراءبنفش نقش دارند. آن‌ها از جنبه دارویی و غذایی در زندگی انسان با اهمیت هستند (Agrawal, 2011). وجود فلاونوئیدها در گیاهانی مانند گل راعی (*Hypericum perforatum*) به آن خاصیت آنتی اکسیدانی و ضد افسردگی داده است. بنابراین کشت بافت آن امروزه به منظور استفاده در صنایع داروسازی مورد توجه قرار گرفته است (Pagare et al., 2015). حتی اخیراً در آمریکای شمالی این گیاه به عنوان یکی از پرفروش‌ترین داروهای گیاهی در درمان بسیاری از بیماری ها



شکل ۲. تاثیر غلظت های مختلف NH_4^+/NO_3^- (برحسب میلی مولار) بر مورفولوژی ریشه (A) و تولید بیومس (B) در گل راعی در طی پنج هفته در محیط کشت.

به شمار می‌رود. به واسطه وجود خواص بسیار مفید دارویی در گل راعی، کشت بافت این گیاه به عنوان یک منبع پایدار متابولیت های ثانویه در نظر گرفته شده است. نتایج بررسی کوی و همکاران (Cui et al., 2010) نشان داد که با استفاده از محیط کشت MS و ریشه های جانبی گل راعی و تغییر سطوح مختلف آمونیوم به نیترات، بیشترین مقدار ترکیبات فنولی از نسبت پنج به بیست و پنج آمونیوم: نیترات حاصل شد که در همین دامنه نیز بیشترین مقدار بیومس و فعالیت های آنتی‌اکسیدانی دیده شد (شکل ۲).

در مطالعه‌ای دیگر توسط دانووا و همکاران (Danova et al., 2010) بر روی گیاه *Hypericum rumeliacum* به منظور تولید متابولیت های ثانویه در شرایط کشت بافت، نشان داده شد که کل ترکیبات فنولی و فلاونوئید این گیاه که از رویشگاه طبیعی آن و در زمان گل‌دهی جمع آوری شده بود به ترتیب ۴۵/۲۶ و ۵۷۹/۱ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک بود، در صورتی که کل فلاونوئید اندازه گیری شده از ساقه های کشت بافت در محیط MS بعد از ۱۲ هفته ۳۵/۴۶ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک بود. آن‌ها نتیجه گرفتند که اضافه کردن ترکیباتی مانند توفوردی و بنزیل آمینوپورین هرچند سبب افزایش و تکثیر ساقه در محیط کشت می شود اما سبب کاهش ترکیبات فنولی استخراج شده از آن‌ها شده است.

با این حال به منظور رسیدن به حداکثر ترکیبات فنولی در محیط کشت بایستی طول ساقه ها به ۱۰ الی ۱۲ سانتی‌متر برسد. شایان ذکر است که سطوح بالای ترکیبات فنلی و فلاونوئیدها که از کشت بافت در محیط MS این گیاه به دست آمده است، ارزشی معادل آن‌هایی که از بخش‌های هوایی گیاهان در زمان گل‌دهی و از رویشگاه‌های طبیعی جمع‌آوری شده است، داشت. در یک بررسی دیگر نتایج نشان داده شد که درخت توت هندی (*Morinda citrifolia*) که به طور وسیعی در برخی اقلیم

ها مانند هند، فرانسه، کاستاریکا و ... کشت می شود، حاوی متابولیت های ثانویه بسیار سودمندی از قبیل ترپنوئیدها، پتاسیم، ویتامین C، آنتراکینون، لینولئیک اسید، آلکالوئیدها، ویتامین A و کاروتن است که در بین آن‌ها پلی‌فنل ها و آلکالوئیدها و در بین ترکیبات فنولی نیز آنتراکینون بسیار مشهور بوده و مورد نیاز داورسازی در درمان بیماری ها است. این ماده از ریشه استخراج می شود و برای استخراج آن نیاز به دوسال زراعت گیاه در دما و رطوبت بالا است (Ahmad et al., 2008). از طرفی این گیاه مستعد به حمله طیف وسیعی از آفات و بیماری ها است به طوری که در برخی مناطق سبب از بین رفتن گیاه مادری شده است. برای فائق آمدن بر این موضوع، کشت بافت آن مورد توجه زیادی قرار گرفته است. در مطالعه‌ای دیگر، با استفاده از محیط کشت MS به همراه پنج میلی‌گرم در لیتر ایندول بوتریک اسید (Indole-3-butyric acid; IBA) و یک درصد ساکارز و هم‌زدن آن به مدت چهار هفته در شرایط تاریکی، تولید آنتراکینون، ترکیبات فنولی و فلاونوئید به حداکثر رسید (Baque et al., 2012).

یافته‌های ترویجی

به منظور تولید انبوه متابولیت های ثانویه، می‌توان از کشت بافت استفاده کرد. با کشت گیاهان دارویی می‌توان ترکیبات دارویی مانند ترکیب فنولی انتراکینون استخراج کرد، ولی این کار به زمان زیادی (دو سال) نیاز داشته و هزینه‌های تولید نیز بالاست. با این حال با استفاده از کشت بافت، می‌توان در طی یک ماه حداکثر آنتراکینون، ترکیبات فنولی و فلاونوئید تولید کرد. با توجه به تقاضای زیاد برای مصرف این مواد و نیز عدم دسترسی آسان به منابع طبیعی آن، می‌توان برای تولید بیش‌تر متابولیت‌های ثانویه در مدت زمانی کمتر، از کشت بافت استفاده کرد.

References:

Agrawal, A.D. 2011. Pharmacological activity of flavonoids: a review. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology, 4: 1394-1398.

Ahmad, P., Sarwat, M. and Sharma, S. 2008. Reactive oxygen species, antioxidants and signaling in plants. Journal of Plant Biology, 51: 167–173.

Baque, M.A., Elgirban, A., Lee, E.J. and Paek, K.Y. 2011. Sucrose regulated enhanced induction of anthraquinone, phenolics, flavonoids biosynthesis and activities of antioxidant enzymes in adventitious root suspension cultures of *Morinda citrifolia* (L.). Acta Physiologiae Plantarum, 34: 405–415.

Chen, S., Zhang, L., Cai, X., Li, X., Bian, L., Luo, Z., Li, Z., Chen, Z. and Xin, Z. 2020. (E)-Nerolidol is a volatile signal that induces defenses against insects and pathogens in tea plants. Horticulture Research, 7: 52.

Cui, X.H., Chakrabarty, D., Lee, E.J. and Paek, K.Y. 2010. Production of adventitious roots and secondary metabolites by *Hypericum perforatum* L. in a bioreactor. Bioresource Technology, 101: 4708– 4716.

Danova, K., Cellarova, E., Mackova, A., Daxnerova, Z. and Kapchina-Toteva, V. 2010. *In vitro* culture of *Hypericum rumeliacum* Boiss. and production of phenolics and flavonoids. In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant, 46: 422-429.

Eibl, R. and Eibl, D. 2008. Design of bioreactors suitable for plant cell and tissue cultures. Phytochemistry Reviews. 7: 593-598.

Farah, A., and Donangelo, C.M. 2006. Phenolic compounds in coffee. Brazilian Journal of Plant Physiology, 18: 23-36.

Fujita, Y. and Tabata, M. 1987. Secondary metabolites from plant cells: pharmaceutical applications and progress in commercial production. 169-185. In: Green, C.E., Somers, D.A., Hackett, W.P. and Biesboer, D.D., (eds.). Plant Tissue and Cell Culture. Alan R. Liss, New York. 490.

Guillon, S., Trémouillaux-Guiller, J., Pati, P.K., Rideau, M. and Gantet, P. 2006. Hairy root research: recent scenario and exciting prospects. Current Opinion in Plant Biology, 9: 341-346.

Hara, Y. 2020. Research on the production of useful compounds by plant cell cultures in Japan. 184-201. In: Dicosmo, F. and Misawa, M., (eds.). Plant cell culture secondary metabolism toward industrial application. CRC press. 240.

Kodama, M., Brinch-Pedersen, H., Sharma, S., Holme, I.B., Joernsgaard, B., Dzhanfezova, T., Amby, D.B., Vieira, F.G., Liu. S. and Gilbert, M.T. 2018. Identification of transcription factor genes involved in anthocyanin biosynthesis in

carrot (*Daucus carota L.) using RNA-Seq. BMC Genomic, 19: 811.*

Kim, D.J. and Chang, H.N. 1990. Enhanced shikonin production from *Lithospermum erythrorhizon* by in situ extraction and calcium alginate immobilization. Biotechnology and Bioengineering, 36: 460–466.

Knorr, D., Caster, C., Dornenburg, H., Dorn, R., Gräf, S., Hawkin-Frenkel, D., Podstolski, A. and Werrmann, U. 1993. Biosynthesis and yield improvement of food ingredients from plant cell and tissue cultures. Food Technology, 47: 57–63.

Lee-Parsons, C.W.T. and Shuler, M.L. 2000. The effect of inoculum density and conditioned medium on the production of ajmalicine and catharanthine from immobilized *Catharanthus roseus* cells. Biotechnology and Bioengineering, 67: 61-71.

Malik, S., Bhushan, Sh., Sharma, M. and Ahuja, P.S. 2016. Biotechnological approaches to the production of shikonins: a critical review with recent updates. Critical Reviews in Biotechnology, 36: 327-340.

Mantell, S.H., Pearson, D.W., Hazell, L.P. and Smith, H. 1983. The effect of initial phosphate and sucrose levels on nicotine accumulation in batch suspension cultures of *Nicotiana tabacum* L. Plant Cell Reports, 2: 73-83.

Matsubara, K., Shigekazu, K., Yoshioka, T., Fujita, Y. and Yamada, Y. 1989. High density culture of *Coptis japonica* cell increases berberine production. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 46: 61-69.

Nakatsuka, A., Yamagishi, M., Nakano, M., Tasaki, K. and Kobayashi, N. 2009. Light-induced expression of basic helix-loop-helix genes involved in anthocyanin biosynthesis in flowers and leaves of Asiatic hybrid lily. Scientia Horticulturae, 121: 84-91.

Narayan, M.S., Thimmaraju, R. and Bhagyalakshmi, B. 2005. Interplay of growth regulators during solid-state and liquid-state batch cultivation of anthocyanin producing cell line of *Daucus carota*. Process Biochemistry, 40: 351-358.

Pagare, S., Bhatia, M., Tripathi, N., Pagare, S. and Bansal, Y.K. 2015. Secondary metabolites of plants and their role: Overview. Current Trends in Biotechnology and Pharmacy, 9: 293-304

Petersen, M. and Simmonds, M.S.J. 2003. Rosmarinic acid. Phytochemistry 62: 121–125.

Praveen, N. and Murthy, H.N. 2011. Effects of macroelements and nitrogen source on biomass accumulation and withanolide-A production from cell suspension cultures of *Withania somnifera* (L.) Dunal. Plant Cell, Tissue and Organ Culture,

104:119–124

Simões, C., Bizarri, C.H.B., Cordeiro, L.S., Carvalho de Castro, T., Machado Coutada, L.C., Ribeiro da Silva, A.J., Albarello, N. and Mansur, E. 2009. Anthocyanin production in callus cultures of *Cleome rosea: modulation by culture conditions and characterization of pigments by means of HPLC-DAD/ESIMS. Plant Physiol Biochem 2009; 47: 895-903.*

Simões, C., Albarello, N., Carvalho de Castro, T. and Mansur, E. 2012. Production of anthocyanins by plant cell and tissue culture strategies. 67-86. In: Orhan, I.E., (ed.). Biotechnological production of plant secondary metabolites. Bentham Science Publisher. 252.

Slipa, P., Roopa, K. and Thomas,T.D. 2018. Production of plant secondary metabolites: current status and future prospects. 3-25. In: Kumar, M., (ed.). Biotechnological approaches for medicinal and aromatic plants. Springer Singapore. 665.

Smetanska, I. 2008. Production of secondary metabolites using plant cell cultures. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, 111: 187–228.

Tiwari, R. and Rana, C.S. 2015. Plant secondary metabolites: a review. International Journal of Engineering Research and General Science, 3: 661-670.

Zenk, M.H., El-Shagi, H. and Schulte, U. 1975. Anthraquinone production by cell suspension cultures of *Morinda citrifolia.* Planta Media, 28: 79-101.

Evaluation of tissue culture technology in the production of some secondary metabolites in plants

Seyyed Fazel Fazeli Kakhki[1], Nasser Beikzadeh[1*]

1. Assistant Professor, Khorasan Razavi Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Mashhad, Iran. . (Corresponding author)

Received: November 2022 Accepted: January 2023 - DOI: 10.22092/mpt.2022.360743.1116

Abstract

S., F., Fazeli Kakhki. N., Beikzadeh. Evaluation of tissue culture technology in the production of some secondary metabolites in plants
Iranian Medicinal Plants Technology, Vol 4, No. 2, 2020-21 14-15: 96-107(in Persian)

Abstract

Plants produce compounds through several metabolic pathways that can quickly and effectively react to biotic and abiotic stress factors. Some of these compounds meet the ever-increasing human needs for substances such as drugs, nutrients, and agricultural chemicals. Obtaining valuable plant compounds through agricultural operations is very difficult and time-consuming, and the synthesis of plant-derived compounds is often not economical due to their complex molecular structure and properties. Therefore, the production of secondary metabolites in plants through tissue culture is an attractive solution for their production. One of the ways to produce secondary metabolites is to use elicitors or stimulants. Elicitors include chemicals or biofactors that can stimulate the production of secondary metabolites in living organisms. In order to produce the phenolic compound anthraquinone, special conditions and two years of time are needed, but by using tissue culture, the maximum production of this compound can be achieved within four weeks.

Email address of the corresponding author: beiczadeh@gmail.com

In other cases, the production of Shikonin and Taxol through tissue culture has been successfully carried out industrially and its commercial application has also been made. Therefore, the use of tissue culture technology can be effective in the production of secondary metabolites regardless of the geographical origin of the plant.

Key: Anthocyanin, Elicitor, Flavonoid, Medium