بسم الله الرحمن الرحیم

آشنایی با فن آوری گیاهان

مولفان :

صادق آتشی - جواد ستوده

راحله میراکبری- بهروز آذر لی

منا بیرجندی راد

انتشارات ارسطو
(چاپ و نشر ایران)
۱۴۰۲

عنوان و نام پدیدآور : آشنایی با فن‌آوری گیاهان/ مولفان صادق آتشی...[و دیگران].
مشخصات نشر : ارسطو (سامانه اطلاع رسانی چاپ و نشر ایران) ، ۱۴۰۲..
مشخصات ظاهری : ۴۰۹ص.: مصور، جدول، نمودار.
شابک : ۵-۱۲۵-۳۳۹-۶۲۲-۹۷۸
وضعیت فهرست نویسی : فیپا
یادداشت : مولفان صادق آتشی، جواد ستوده، راحله میراکبری، بهروز آذرلی، منا بیرجندی‌راد.
یادداشت : کتابنامه.
موضوع : فراورده‌های گیاهی Plant products
تکنولوژی زیستی گیاهی Plant biotechnology
فراورده‌های کشاورزی Farm produce
کشاورزی -- مهندسی Agricultural engineering
شناسه افزوده : آتشی، صادق، ۱۳۶۴-
رده بندی کنگره : SB۱۳۰
رده بندی دیویی : ۶۳۱/۵۶
شماره کتابشناسی ملی : ۹۲۶۷۷۳۴
اطلاعات رکورد کتابشناسی : فیپا

نام کتاب : آشنایی با فن‌آوری گیاهان
مولفان : صادق آتشی - جواد ستوده - راحله میراکبری
بهروز آذر لی - منا بیرجندی راد
ناشر : ارسطو (سامانه اطلاع رسانی چاپ و نشر ایران)
صفحه آرایی، تنظیم و طرح جلد: پروانه مهاجر
تیراژ : ۱۰۰۰ جلد
نوبت چاپ : اول - ۱۴۰۲
چاپ : زبرجد
قیمت : ۳۲۸۰۰۰ تومان
فروش نسخه الکترونیکی - کتاب‌رسان :
https://chaponashr.ir/ketabresan
شابک : ۵-۱۲۵-۳۳۹-۶۲۲-۹۷۸
تلفن مرکز پخش : ۰۹۱۲۰۲۳۹۲۵۵
www. chaponashr. ir

انتشارات ارسطو
چاپ و نشر ایران
Chaponashr.ir

فهرست مطالب

فصل ۱: کشت‌های سلول گیاه: تولید متابولیسم‌های ثانویه مهم بیولوژیکی از گیاهان دارویی تایوان ۱۵

خلاصه ۱۶

۱.۱ مقدمه ۱۶

۱.۲ رسوم کشت سلول برای متابولیت‌های ثانویه مهم و بیولوژیکی ۱۹

۱.۲.۱ تولید ایمپراتورین از آنجلیکا داهوریکا واریته فورموزانی ۲۲

۱.۲.۲ استخراج و تجزیه کوریدالین و تتراهیدرو پالماتین از گیاه کوریدالیس یانهوسو ۲۵

۱.۲.۴ تولید دیوسگنین از گیاه دیوسکورآ دوریوفورا به وسیله کشت‌های تعلیق سلولی ۳۰

۱.۲.۵ تشکیل کشت‌های تعلیق سلول جنتیانا داویدی واریته فورموزانا (هیاتا) T.N.Ho ۳۱

۱.۲.۶ آنالیز کمی آنتراکوئینونز امودین و فایشن تشکیل شده در ریشه‌ها و نهال‌های گیاه پلی گونوم مولتی فلوروم که در محیط درون شیشه ازدیاد یافته‌اند ۳۳

۱.۲.۷ تولید کریپتوتانشینون از بافت‌های کالوس سالویا میلتیوریزا بانگ ۳۶

۱.۲.۸ تولید هارپاگوسید در گیاهان اسکروفولاریا یوشیمورا یامازاکی که از طریق ریزازدیادی ازدیاد یافته‌اند ۳۸

۱.۲.۹ تولید آنتوسیانین در کشت‌های پینه بادمجان ۴۱

۱.۲.۱۰ سنتز تاکسول در کشت‌های سوسپانسیون تاکسوز میری ۴۱

۱.۳ نتیجه‌گیری و چشم اندازهای آینده ۴۳

فصل ۲: اکتشاف و دست‌یابی به بیوسنتز محصول طبیعی گیاه در میزبان‌های ساخته شده با میکروب ۴۹

۲.۱ مقدمه ۵۰
۲.۲ سیمای نامتجانس ژن‌ها و راههای تولیدشده به صورت طبیعی در گیاهان ۵۲
۲.۳ آلکالوئیدها ۵۵
۲.۳.۱ آلکالوئیدهای ایندول مونوترپنوئید ۵۶
۲.۳.۲ آلکالوئیدهای بنزوایزوکوئینولین ۶۵
۲.۴ ایزوپرنوئیدها ۶۷
۲.۴.۱ سسکوئی ترپن‌ها و دی ترپن‌ها ۷۰
۲.۴.۲ تاکسول ۷۴
۲.۴.۳ آرتمیزینین ۷۷
۲.۴.۴ کاروتنوئیدها ۷۸
۲.۵ فلاونوئیدها ۸۳
۲.۶ نتیجه‌گیری ۸۹

فصل ۳: تولید آنتی بادی‌های معالج در گیاهان ۹۱
مقدمه ۹۲
۳.۲ سیر تکاملی تکنولوژی آنتی بادی ترکیبی ۹۵
۳.۲.۱ اهمیت آنتی بادی‌های ترکیبی ۹۵
۳.۲.۲ ساختار آنتی بادی‌های تولید شده به صورت طبیعی ۹۶
۳.۲.۳ مشتقات آنتی بادی ۹۷
۳.۲.۴ آنتی بادی‌های واجد شرایط انسانی شدن ۹۸
۳.۳ تولید آنتی بادی‌های ترکیبی در گیاهان ۹۹
۳.۳.۱ سیستم‌های ظهور قدیمی ۹۹
۳.۳.۲ مزایای گیاهان ۱۰۰
۳.۳.۳ محدودیت‌هایی که احتیاج است تا نظارت شود ۱۰۲
۳.۴ اهداف متداول در زمین ۱۰۳

۳.۴.۱ ملاحظات اقتصادی..... ۱۰۳
۳.۴.۲ انتخاب گونه‌های گیاهی و قطعه زمین برای تولید آنتی بادی..... ۱۰۵
۳.۴.۳ تولید محصولات: فنون افزون بروز ترانس ژن‌ها و ذخیره پرتئین ۱۱۳
۳.۴.۴ پیچ خوردگی، جمع شدن و گلایکوزیلیشن پروتئین ۱۱۶
۳.۴.۵ نگرانی‌های سلامتی زیستی..... ۱۲۰
۳.۵ آنتی بادی‌های مشتق شده از گیاهان در آزمایشات بالینی ۱۲۴
۳.۶ مراعات‌های تنظیمی..... ۱۲۷
۳.۶.۱ پردازش در حال انجام ۱۲۷
۳.۶.۲ تنظیم تولید بر پایه گیاه..... ۱۲۸
۳.۷ خلاصه ۱۲۹

فصل ٤: گلیکوزیلیشن پروتئین‌های ترکیبی در گیاهان..... ۱۳۱
۴.۱ مقدمه ۱۳۲
۴.۲ یک لغت راجع به نام‌ها..... ۱۳۳
۴.۳ وجوه کلی گلایکوزیلیشن ۱۳۵
۴.۳.۱ الیگوساکاریدهای متصل شده با Asn (N-Glycans)..... ۱۳۵
۴.۳.۲ نوع موسین و دیگر گلایکان‌های پیوندیافته به O (O-گلایکان ها)..... ۱۴۶
۴.۳.۳ الیگوساکاریدهای پیوندیافته به هیدروکسی پرولین (گلایکان‌های Hyp-O-).. ۱۴۷
۴.۴ چرا آنتی بادی‌ها؟ ۱۵۲
۴.۵ انسان پروری N-گلایکان‌ها در گیاهان ۱۵۵
۴.۵.۱ گلایکوزیلیشن معتبر یا شبه بشر به عنوان نشان (محک)..... ۱۵۵
۴.۵.۲ درباره یک N-گلایکوزیلیشن انسانی شده در گیاهان ۱۶۰
۴.۵.۳ پیشرفت آنتی بادی‌ها به وسیله گلایکوانجیرینگ..... ۱۶۶
۴.۶ اعتماد خوب است، کنترل بهتر است: یک آنالیز ساختاری..... ۱۶۸
۴.۷ نتیجه و دورنما ۱۷۳

فصل ۵: مرزهایی در تحقیق گیاهان دارویی ترانس ژنیک ۱۷۵
۵.۱ مقدمه ۱۷۶
۵.۱.۱ بیوسنتز: اصول (حقایق) معلوم در گیاهان دارویی ۱۸۲
۵.۱.۲ شناسائی مسیرهای بیوسنتتیک ۱۸۴
۵.۲ منابع ژن‌های کلیدی که بر بیوسنتز محصولات طبیعی گیاهی تأثیر می‌گذارد ۱۸۶
۵.۳ راههای ژنومی که برای تحقیق گیاهان دارویی به کاربرده شده‌اند ۱۹۲
۵.۴ تولید گیاهان دارویی ترانس ژنیک ۱۹۶
۵.۵ گیاهان دارویی که به صورت متابولیکی مهندسی شده‌اند ۱۹۹
۵.۵.۱ آلکالوئیدها ۱۹۹
۵.۵.۱.۱ آمینوآلکالوئیدها ۱۹۹
۵.۵.۱.۲ آلکالوئیدهای ایندول ترپنوئید ۲۰۰
۵.۵.۱.۳ آلکالوئیدهای تروپان: هیوسیامین و اسکوپولامین ۲۰۱
۵.۵.۱.۴ آلکالوئیدهای ایزوکوئینولین: مورفین، کدئین و تبائین ۲۰۱
۵.۵.۲ مهندسی متابولیک مسیر ترپنوئید ۲۰۲
۵.۵.۲.۱ مونوترپن‌ها ۲۰۲
۵.۵.۲.۲. سسکوئی ترپن‌ها ۲۰۴
۵.۵.۳ کانوبینوئیدها ۲۰۵
۵.۶ نتیجه‌گیری ۲۰۶

فصل ٦: حمایت مالی عقلانی از بیوتکنولوژی گیاهی ۲۰۸
۶.۱ مقدمه ۲۰۹
۶.۱.۱ امتیارنامه‌های جانشین ۲۱۰
۱۷.۱.۲ وجوه مرتبط با تجارت از حقوق مالی عقلانی ۲۱۲
۶.۱.۳ حفاظت‌گونه گیاهی ۲۱۳
۶.۱.۴ منابع ژنتیکی ۲۱۶

۶.۲ حفاظت از بیوتکنولوژی گیاهی در اروپا ۲۱۸
۶.۲.۱ حمایت امتیازنامه: پیمان نامه امتیاز اروپایی (EPC) ۲۱۹
۶.۲.۲ رهنمود بیوتکنولوژی ۲۲۴
۶.۲.۳ اصول اخلاق در امتیازدهی بیوتکنولوژی گیاهی ۲۲۷
۶.۳ آمریکای شمالی ۲۲۹
۶.۳.۱ امتیازنامه گیاهی آمریکا ۲۲۹
۶.۳.۲ امتیازنامه‌های جایگزین ۲۳۱
۶.۳.۲.۱ آمریکا ۲۳۱
۶.۳.۲.۲ کانادا ۲۳۱
۶.۴ نتیجه‌گیری ۲۳۷

فصل ۷: پرورش گیاهان دارویی ۲۳۸
۷.۱ مقدمه ۲۳۹
۷.۲ مطالبات بر کولتیوارهای MAP ۲۴۰
۷.۳ مشخصات تولید مثل MAP ۲۴۲
۷.۴ منابع ژنتیکی ۲۴۳
۷.۵ روش‌های پرورش ۲۴۴
۷.۵.۱ استفاده از تنوع طبیعی موجود ۲۴۵
۷.۵.۲ تولید تغییرپذیری جدید ۲۴۶
۷.۵.۲.۱ ترکیب تولید مثل به وسیله تلاقی ۲۴۷
۷.۵.۲.۲ پرورش هیبرید ۲۵۰
۷.۵.۲.۳ کولتیوارهای سنتتیک ۲۵۲
۷.۵.۲.۴ جهش تحریک شده ۲۵۴
۷.۵.۲.۵ تغییرپذیری سوماکلونال ۲۵۶
۷.۵.۲.۶ پیوندزنی سوماتیکی (آمیزش پروتوپلاست) ۲۵۶

۷.۵.۲.۷ انتقال ژن مولکولی ۲۵۷
۷.۵.۳ انتخاب ۲۵۹
۷.۵.۳.۱ انتخاب توده‌ای مثبت و منفی ۲۵۹
۷.۵.۳.۲ انتخاب بازگشت‌کننده ۲۶۰
۷.۵.۳.۳ انتخاب منحصر به فرد با آزمایش فرزندان ۲۶۱
۷.۵.۳.۴ تولید در آپومیکس‌ها ۲۶۲
۷.۵.۳.۲ تولیدمثل غیرجنسی ۲۶۶
۷.۶ پیشرفت در واکنش به انتخاب به وسیله تکنیک‌های ویژه ۲۶۸
۷.۶.۱ تسریع در وراثت نسل‌ها ۲۶۹
۷.۶.۲ انتخاب اولیه ۲۷۳
۷.۶.۳ هاپلوئیدهای دوبل ۲۷۴
۷.۶.۴ تعیین مشخصات ۲۷۵
۷.۶.۴.۱ مارکرها ۲۷۵
۷.۶.۴.۲ روش‌های تجزیه‌ای سریع ۲۷۷
۷.۶.۴.۳ سنجش رنگ اسپکتروفوتومتریک ۲۸۰
۷.۶.۴.۴ تولید مثل برای مقاومت به آفات و بیماری‌ها ۲۸۱
۷.۶.۴.۵ بیواسی ۲۸۶
۷.۷ دورنما ۲۸۶

فصل ۸: تولید کمپتوسسین در کشت‌های سلولی گونه‌های افیوریزا ۲۸۹
۸.۱ مقدمه ۲۹۰
۸.۲ کشت‌های بافت ۲۹۲
۸.۲.۱ تأسیس کشت‌های بافت ۲۹۲
۸.۲.۱.۱ گونه‌های ضدعفونی شده ۲۹۳
۸.۲.۱.۲ ریشه‌های موئی ۲۹۵

۸.۲.۲ تولید کمپتوسسین و نیمرخ‌های متابولیتی ۲۹۶
۸.۲.۳ دفع کمپتوسسین در محیط کشت پرورش ۳۰۱
۸.۲.۴ تولید کمپتوسسین در بیوراکتورها ۳۰۱
۸.۲.۵ باززائی گیاهان تغییرشکل یافته از ریشه‌های موئی ۳۰۴
۸.۳ مطالعات بیوسنتز کمپتوسسین با ریشه موئی O. pumila ۳۰۶
۸.۳.۱ ژن‌های بیوسنتتیک کمپتوسسین ۳۰۶
۸.۳.۱.۱ استریکتوزیدین سنتاز (OpSTR) ۳۰۷
۸.۳.۱.۲ تریپتوفان دکربوکسیلاز (OpTDC) ۳۰۸
۸.۳.۱.۳ NADPH: سیتوکروم P450 رداکتاز (OpCPR) ۳۰۸
۸.۳.۲ مطالعه ردیاب این سیلیکو و درون شیشه از گلوکز [$1_{-13}C$] ۳۰۸
۸.۴ خلاصه و نتیجه‌گیری ۳۰۹

فصل ۹: زیست شیمی گیاهی و بیوتکنولوژی ترکیبات معطر و روغن‌های ضروری ۳۱۳

۹.۱ مقدمه ۳۱۴
۹.۲ بیوسنتز روغن‌های معطر/ضروری ۳۱۷
۹.۲.۱ ترپنوئیدها ۳۱۷
۹.۲.۱.۱ مونوترپن‌ها ۳۲۱
۹.۲.۱.۲ سسکوئی ترپن‌ها ۳۲۴
۹.۲.۲ فنیل پروپانوئیدها ۳۲۶
۹.۳ تنظیم ذخیره روغن ضروری ۳۲۹
۹.۴ کاربردهای عملی ۳۳۲
۹.۵ مهندسی متابولیک ۳۳۶
۹.۶ نتایج ۳۴۰

فصل ۱۰: جینکوی چینی و تولید متابولیت‌ها ثانویه..... ۳۴۳
۱۰.۱ مقدمه ۳۴۴
۱۰.۱.۱ درخت جینکوی چینی..... ۳۴۵
۱۰.۱.۲ ترپن‌ها و فلاونوئیدها ۳۴۶
۱۰.۲ بیوسنتز و ذخیره جینگکولیدها و بیلوبالید..... ۳۵۰
۱۰.۲.۱ مقدار ترپن و موضعی کردن بیوسنتز ۳۵۰
۱۰.۲.۲ مسیر بیوسنتتیک ۳۵۳
۱۰.۳ بیوسنتز فلاونوئیدها ۳۵۶
۱۰.۳.۱ تغییرات در مقدار فلاونوئید ۳۵۷
۱۰.۳.۲ مسیر متابولیکی فلاونوئید..... ۳۵۷
۱۰.۴ انتخاب گیاهان برای مقدار و تکثیر ترپن ۳۵۸
۱۰.۴.۱ انتخاب..... ۳۵۸
۱۰.۴.۲ تکنیک‌های ریزازدیادی ۳۶۰
۱۰.۴.۳ جنین زایی سوماتیکی ۳۶۱
۱۰.۵ کشت‌های بافت ۳۶۱
۱۰.۵.۱ بیوسنتز و ذخیره ترپن ۳۶۲
۱۰.۵.۲ بیوسنتز و ذخیره فلاونوئیدها ۳۶۵
۱۰.۵.۳ بیوسنتز و ذخیره ۴–O- متیل پیریدوکسین (جینکگوتوکسین)..... ۳۶۶
۱۰.۵.۴ تغییر زیستی..... ۳۶۶
۱۰.۵.۵ نگهداری سرمایی مواد سلولی گیاهی ۳۶۷
۱۰.۶ تغییر ژنتیکی و کشت‌های اندام ۳۶۷
۱۰.۷ نتیجه‌گیری ۳۶۸

فصل ۱۱: تولید پاکلی تاکسل در کشت‌های سلولی گیاهی ۳۷۱
خلاصه ۳۷۲

۱۱.۱ مقدمه ۳۷۳
۱۱.۲ تکنولوژی کشت سلول گیاهی برای تولید پاکلی تاکسل ۳۷۵
۱۱.۳ مسیر بیوسنتیک پاکلی تاکسل و ژن‌های مرتبط..... ۳۷۶
۱۱.۴ تغییر ژنتیکی سلول‌های سرخدار..... ۳۸۴
۱۱.۵ تکنولوژی بعدی برای تولید ترکیبات مفید ۳۸۶

فصل ۱۲: تولید بیولوژیکی آرتمیزینین برای درمان مالاریا ۳۹۱
۱۲.۱ مقدمه ۳۹۲
۱۲.۲ بیوسنتز آرتمیزین ۳۹۴
۱۲.۳ تولید بیولوژیکی آرتمیزینین ۳۹۶
۱۲.۳.۱ تولید آرتمیزینین به وسیله گیاهان ۳۹۶
۱۲.۳.۲ تولید آرتمیزینین به وسیله میکروارگانیزم ها..... ۴۰۲
۱۲.۳.۳ تولید آرتمیزینین در بیوراکتورها ۴۰۴
۱۲.۳.۳.۱ تولید آرتمیزینین از شاخه‌های A. annua L. در یک بیوراکتور میست مغذی ۴۰۷
۱۲.۴ چشم انداز ۴۰۹

فصل ۱:

کشت‌های سلول گیاه: تولید متابولیسم‌های ثانویه مهم بیولوژیکی از گیاهان دارویی تایوان

خلاصه

گیاهان قادر به سنتز یک نوع حل شونده از ترکیبات آلی که به نام متابولیسم‌های ثانویه نامیده می‌شوند، می‌باشند که معمولاً ساختارهای مختلط و یا واحد دارند. استنتاج اهمیت تجاری متابولیسم‌های ثانویه در طی سالهای اخیر در نتیجه منفعت بالای متابولیسم ثانویه و به ویژه در احتمال تغییر تولید متابولیسم‌های گیاه بیواکتیو[1] به وسیله ابزار تکنولوژی کشت سلول حاصل شد. پیشرفت‌ها در بیوتکنولوژی و به طور جالب توجه در روش‌های کشت سلول و بافت‌های گیاه در راههای جدید تولید تجاری گیاهان کمیاب و ترکیبات بیواکتیوی که آنها تولید می‌کنند، نتیجه داده است. مزیت عمده این روش این است که این روش ممکن است یک منبع قابل اطمنان مداوم از داروهای گیاهی را فراهم آورد و همچنین می‌تواند برای کشت با مقیاس بالا از سلول‌های گیاهی از متابولیت هایی که می‌توانند عصاره گیری شوند، مورد استفاده قرار گیرد. فنون متفاوت استفاده از سیستم‌های درون شیشه به طور گسترده‌ای جهت بهبود تولید متابولیت‌های ثانویه فعال و بیولوژیکی مطالعه شده است. این فصل بر کاربرد کشت‌های سلول گیاهی در تولید متابولیت‌های ثانویه بیواکتیو متمرکز شده است به علاوه بعضی روش‌های کشت سلولی گیاه برای تولید متابولیت‌های ثانویه مهم از گیاهان دارویی تایوان شرح داده شده است.

۱.۱ مقدمه

قلمرو گیاهی تنوع زیادی از تولیدات طبیعی با ساختارهای شیمیایی گوناگون آرایش عظیمی از فعالیت‌های بیولوژیکی را فراهم می‌کند. سالها پیش، کاربردهای بسیاری از این ترکیبات در علم سلامت تا به امروز بنیاد نهاده شده بودند. گیاهان دارویی در اقتصاد جهان

[1]. Bioactive

بسیار مهم می‌باشند. تقریباً ۸۵٪ از تهیه داروی سنتی مستلزم استفاده از گیاه یا عصاره‌های گیاهی می‌باشد. بیشتر صنعت حفظ سلامت سنتی به طور زیادی به جمعیت طبیعی جهت تهیه و تدارک مواد خام برای عصاره گیری ترکیبات مهم دارویی وابسته است.گاهی اوقات جداسازی ترکیبات فعال برای گیاهان به دلیل غلظت بسیار پایین آن بسیار سخت است. گذشته از این، وقتی که مواد خام کمیاب هستند و یا تولید شیمیایی بسیار پایین است، صنعت –درحال حاضر– فاقد روش‌های بادوام برای تولید گیاه مورد درخواست و ترکیبات فعال قابل اشتقاق می‌باشد. به علاوه بعضی ترکیبات فعال، فقط در گیاهان بومی یا گیاهان بسیار کمیاب وجود دارند. بنابراین سود بالایی در راههای توسعه تولید متابولیت‌های ثانویه بیواکتیو از لحاظ اهمیت تجاری وجود دارد. راههای بیوتکنولوژی مثل کشت‌های سلولی گیاه، راههای سریع و ضروری برای تولید این ترکیبات دارویی باارزش در سلول‌های کشت شده را پیشنهاد می‌کند.

کشت بافت گیاهی می‌تواند به عنوان پروسه‌ای معرفی شود که به وسیله آن تکه‌های کوچک از نمونه‌های بافت‌های زنده از ترکیب یک موجود زنده جدا می‌شوند و به صورت ضدعفونی شده روی یک محیط کشت مغذی تحت شرایط کنترل شده رشد کرده‌اند. پتانسیل تکنیک‌های کشت بافت گیاهی برای تولید متابولیت‌های ثانویه مفید، مخصوصاً برای توسعه دارو، برای اولین بار در طی اواخر دهه ۱۹۶۰ دیده شد. مزیت‌های عمده سیستم‌های کشت سلول، متجاوز از کشت مرسوم از تمام گیاه به شرح ذیل می‌باشند:

- ترکیبات مفید می‌توانند تحت شرایط کنرل شده و به طور غیروابسته به تغییرات آب و هوایی یا شرایط خاک، تولید شوند.
- سلول‌های کشت شده فاقد میکروبها و حشرات خواهند بود.
- سلول‌های هر گیاهی، چه گرمسیری چه کوهستانی به راحتی می‌توانند جهت به دست آورد متابولیت‌های خاصشان ترکیب شوند.

- کنترل اتوماتیکی رشد سلول و تنظیم منطقی پروسه‌های متابولیتی در کاهش هزینه‌های کارگری و پیشرفت فرآوری، شرکت خواهد داشت.
- ماده‌های آلی به راحتی از کشت‌های پینه قابل استخراج هستند.

دسترسی به سنتز طیف وسیعی از متابولیت‌های ثانویه با ساختارهای شیمیایی مخلوط با استفاده از تکنولوژی کشت بافت گیاهی، باید امکان پذیر شود به علاوه ترکیبات جدید که قبلاً در گیاهان پیدا نشده‌اند، نیز می‌توانند به وسیله کشت‌های سلول ساخته شوند. در این رابطه بسیاری از گروههای پژوهشگر، توانایی‌های متابولیکی برجسته کشت‌های سلول گیاهی را شرح داده‌اند و تغییرپذیری ظرفیت بیوسنتیک سلول گیاه را روشن کرده‌اند. علاوه بر این، این تغییرپذیری می‌تواند برای تشخیص کشت‌های باقدرت حاصلخیزی بالا برای استفاده روی یک مقیاس صنعتی بهره برداری شود. تحقیق درحال پیشرفت در کشت سلول گیاه به طور وسیعی بر روی تشخیص مراحل با سرعت محدود در راههای بیوسنتیک متمرکز شده است، درحالی که راههای دیگر مثل استخراج، تغذیه ماده متشکله جسم جدید، عدم تحرک سلول، تغییر محل فرآورده از محل طبیعی و طراحی بیوراکتور به تولید افزایشی منجر شده است. تقاضای درحال افزایش برای تولیدات طبیعی و قابل تجدید، توجه را دوباره بر تکنیک‌های کشت درون سلول به عنوان مسیرهای بالقوه برای تولید متابولیت‌های ثانویه فعال بیولوژیکی متمرکز کرده است. در حقیقت، پیشرفت‌های اخیر در بیولوژی مولکولی و تکنولوزی آنزیم شناسی و تخمیر در کشت‌های سلول گیاهی پیشنهاد کرده است که این سیستم‌ها یک منبع قابل دوام از متابولیت‌های ثانویه مهم، خواهند شد.

در طی دهه گذشته، بسیاری از تحقیقات به سوی قابلیت بیوسنتیک کشت‌های سلولی متنوع، به وسیله گیاهشناسان و میکروبشناسان در سراسر جهان هدایت شده‌اند. در حال حاضر، پیشرفت در کشت بافت مثل پیشرفت در مهندسی زنتیک (به ویژه تکنولوژی تغییر

شکل)[1] راههای جدیدی را به سمت تولید حجم بالایی از مواد وابسته به داروسازی، یا مواد ممانعت‌کننده از بیماری یا دیگر مواد باز کرده است. این فصل بر اهمیت‌روش‌های کشت سلول در تولید بعضی از این متابولیت‌های ثانویه فعال و بیولوژیکی متمرکز خواهد شد. به علاوه بعضی از آداب کشت سلولی جالب توجه که برای تولید متابولیت‌های ثانویه مهم و بیولوژیکی از گیاهان دارویی تایوان استفاده شده‌اند، به شکل اجمالی آورده شده‌اند.

۱.۲ رسوم کشت سلول برای متابولیت‌های ثانویه مهم و بیولوژیکی

کشت سلول‌ها برای پروسه‌های تولید با مقیاس بالا ترجیح داده می‌شوند که بیشتربه دلیل سیکل‌ها رشد سریع سلولی می‌باد که اجازه تولید مقدار بالایی از سلول‌ها را می‌دهد و سپس برای تجزیه کمی یا کیفی واکنش‌های رشد و متابولیسم مواد شیمیایی جدید به هم می‌پیوندند. مطالعات بر روی رشد، توسعه و متابولیسم سلول‌های گیاهی، فهم بهتری از بیولوژی سلولی گیاه و فیزیولوژی بافت را فراهم کرده – و به فراهم آوردن ادامه می‌دهد– و در این چرخش، انگیزه طراحی پروسه بیولوژیکی را به وجود می‌آورد. اهداف اصلی توسعه پروسه سلول گیاه، دستری به غلظت بالای تولید، حاصلخیزی بالا و محصول تولیدی بالا با استفاده از راه‌های بیوستتیک جدید می‌باشد. در نتیجه در طی سال‌های اخیر شمار یالایی از تحقیقات پژوهشگرانه کاربردی، در جهت پیشرفت کاربردهای تجاری تکنیک‌های کشت سلول گیاه هدایت شده‌اند.

در طی توقف طولانی[2]، مثال‌های خوب از تولیدات متنوع تجاری متابولیت‌ها ثانویه در کشت سلول شامل تولید شیکونین[3] به وسیله کشت‌های سوسپانسیون سلولی گیاه لیتوسپرموم

---

1. transformation
2. The longstanding
3. shikonin

اریتروریزون[۱]، تولید بربرین [۲] به وسیله کشت‌های سلولی گیاه کاپتیس جاپونیکا[۳]، تولیداسید رزمارینیک[٤] به وسیله کشت‌های سلول گیاه کولئوس بلومئی[٥] و جینسنوسیدهایی[٦] از گیاه پنکس جینسنگ[۷] بوده است. اخیراً گروههای پژوهشگر توسعه فنون جدید برای جاری شدن پروسه‌های بیولوژیکی بحرانی جهت تولید ترکیبات ضدسرطان مثل پاکلیتاکسل (تکسل)[۸] از گونه‌های تکسز[۹]،

پادوفایلوتوکسین[۱۰] از گیاه پادوفایلوم پلتاتوم[۱۱]، کامتوسین[۱۲] از گیاه کامتوسا آکیومیناتا[۱۳] و وین پلاستین و وین کریستین[۱٤] از گیاه کاتارانتوس روزئوس[۱٥] را مورد هدف قرار داده‌اند. اخیراً کشت‌های سلول گیاه، به صورت نقطه مرکزی روش‌های تولید متابولیت‌های ثانویه بیواکتیو و سودآور از گیاهان دارویی تایوان شده است. تایوان کشوری است که در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری واقع شده است اما به دلیل سیستم‌های اکولوژیکی کوههای برافراشته آن، دارای مناطق معتدله نیز می‌باشد. منابع گیاهشناسی فراوان در تایوان، کشور مشهوری را به عنوان باغ گیاهشناسی طبیعی به وجود آورده است. درحقیقت بررسی‌ها نشان داده‌اند که تقریباً ۷۰۰۰ گونه از گیاهان آوندی در تایوان رشد می‌کنند که شامل حداقل ۴۴۷۷ گونه اهلی و تقریباً ۲۵۰۰ گونه معرفی شده، می‌باشند.

---

1. *Lithospermum erythrorhizon*
2. berberin
3. *Coptis japonica*
4. rosmarininc acid
5. *Coleus bluemii*
6. ginsenosides
7. *Panax ginseng*
8. paclitaxel (Taxol)
9. *Taxus* species
10. podophyllotoxin
11. *Podophyllum peltatum*
12. camptothecin
13. *Camptotheca acuminata*
14. vinblastine and vincristine
15. *Catharanthus roseus*

اهمیت بیشتر این است که بیشتر این گیاهان استفاده دارویی دارند. بر مبنای یافته‌های مهیج و اولیه برای تولید ترکیبات دارویی با استفاده از کشت‌های سلولی، صفوف تحقیقات پژوهشگرانه در مناطق کشت‌های سلول گیاه، بافت و اندام جهت تولید ترکیبات دارویی ارزشمند از مجموعه گیاهان دارویی سنتی در تایوان تحت انجام بوده است. به عنوان جزئی از این برنامه، ما به طور موفقیت آمیز، روش‌های کشت سلول را جهت تولید ایمپراتیون[۱] از آنجلیکا داهوریکا[۲]، کوریدالین و تتراهییدروپالماتین[۳] از تکمه‌های رشدکرده در درون شیشه‌ای گیاه وریدالیس یانهوسو[۴]، آلکیل فرولتس[۵] از دندروبیوم توسینس[۶]، دایوسگنین[۷] از دایوسکورآ دوریوفورا[۸]، جنتیپیکروساید[۹] و سوئرتیامارین[۱۰] از جنتیانا[۱۱]، آنتراکوئینونز[۱۲] از پلی گونوم مواتی فلوروم[۱۳]، کریپتوتانشینون[۱۴] از سالویا میلتیوریزا[۱۵]، هارپاگوساید[۱۶] از اسکروفولاریا یوشیمورا[۱۷]، آنتوسینانیز[۱۸] از سولانوم ملونجلا[۱۹] و پاکلیتاکسل[۲۰] از تکسس مایریی[۲۱] برپا کردیم.

---

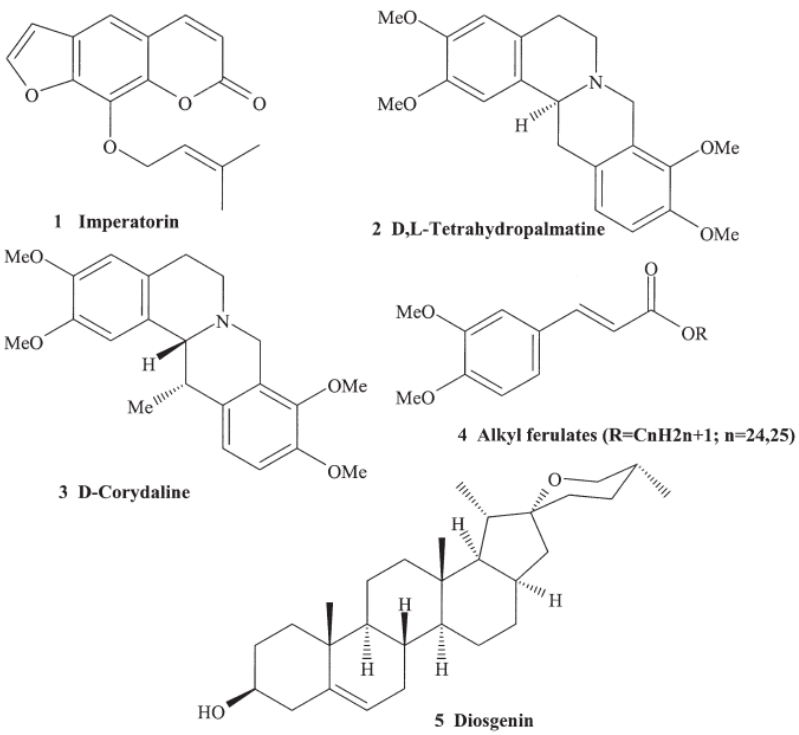
1. imperatorin
2. *Angelica dahurica*
3. corydaline and tetrahydropalmatine
4. *Corydalis yanhusuo*
5. alkyl ferulates
6. *Dendrobium tosaense*
7. diosgenin
8. *Dioscorea doryophora*
9. gentipicro side
10. swertiamarin
11. *Gentiana*
12. anthraquinones
13. *Polygonum multiflorum*
14. cryptotanshinone
15. *Salvia miltiorrhiza*
16. harpagoside
17. *Scrophularia yoshimurae*
18. anthocynanins
19. *Solanum melongena*
20. paclitaxel
21. *Taxus mairei*

۱.۲.۱ تولید ایمپراتورین[1] از آنجلیکا داهوریکا[2] واریته فورموزانی[3]

آنجلیکا داهوریکا واریته فورموزانی که معمولاً با اسم بای زی[4] در چین معروف می‌باشد، یک گیاه علفی دارویی و ارزشمند است که در چین جهت درمان سردرد و پوریازیس[5] استفاده می شده است. ایمپراتورین سازنده، جزء فعال و عمده برای درمان بیماری پوست می‌باشد. آنجلیکا داهوریکا یک گیاه دائمی و بومی در تایوان می‌باشد اما با استفاده از روش‌های کشت مرسوم برای تولید درخور نیاز و در مقادیر کافی، قابل رشد نمی‌باشد. نتجتا روش‌های کشت توده سلول برای تولید ایمپراتورین به صورت امری ضروری شد. جهت ایجاد رشد سریع و پراکندن باظرافت در کشت توده سلول، بهترین ترکیب محیط کشت، محیط کشت MS نیمه قوی (کامل) بود که با ۱ میلی گرم در لیتر ۲ و ۴ دیکلروفنوکسی استیک اسید (2,4-D)، ۰/۱ میلی گرم در لیتر کینتین و ۳٪ ساکارز تهیه شده بود. همه کشت‌ها به صورت روزمره در طی ۱۴ روز کشت مجدد شدند.

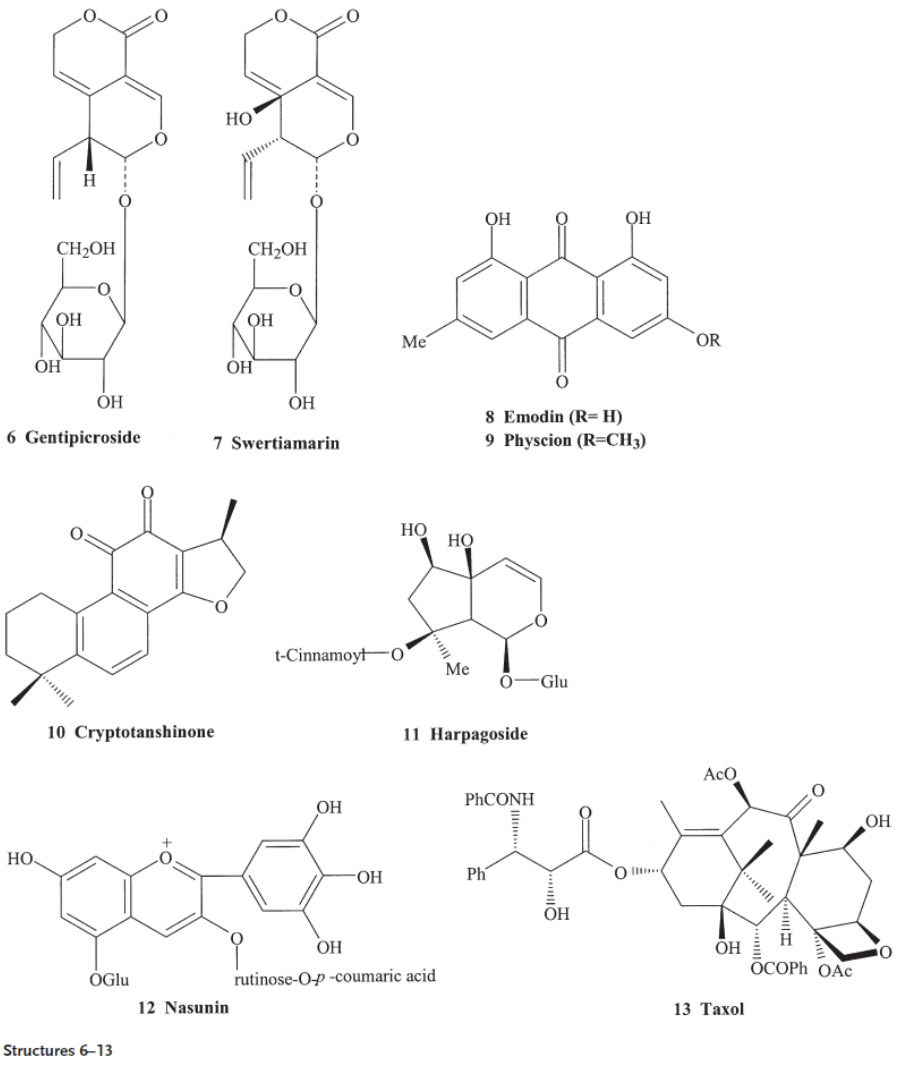
---

1. Imperatorin
2. *Angelica dahurica*
3. *formosana*
4. Bai-Zhi
5. psoriasis



Structures 1–5

در چرخه رشد سلول‌های سوسپانسیون، تولید ایمپراتورین حداکثر ۱۰ تا ۱۴ روز بود. شرایط رشد نیز به ویژه با نگاه بهفاکتورهای تغذیه‌ای ایده آل برای تولید ایمپراتورین مورد بررسی قرار گرفت. محیط رشد پایه MS جهت تولید بهترین رشد سلولی کشف شد در حاله که حذف اکسین از محیط کشت، تولید ایمپراتورین را بهبو بخشید. همچنین افزودن بنزیل آدنین (BA) (۰/۵ تا ۱ میلی گرم بر لیتر) سنتز ایمپراتورین را در کشت سلول افزایش داد.



Structures 6–13

نیترات نقره مناسب: نسبت نیترات (۲:۱) در محیط کشت، همانطور که در افزایش غلظت فسفات (از ۱ تا ۲ میلی مولار) اتفاق افتاد، منجر به افزایش تولید ایمپراتورین شد. گلوکز نیز به عنوان یک منبع کربن بهتر نسبت به سوکروز یا فروکتوز در طی دوره تولید ایمپراتورین، شناخته شد. در زمان مطالعه احتمال تأثیرات محرک استخراج‌کننده‌ها بر سنتز

ایمپراتورن، سولفات وانادیل که به کشت‌های سوسپانسیون سلول اضافه شده بود (۳۰ میلی گرم بر لیتر در روز دهم) منجر به رشد معنی‌دار در تولید ایمپراتورین شد اما این تاحدی به مرحله رشد سلول‌ها وابسته بود. افزودن جاذب آمبرلیت XAD-1 (۲۰ گرم بر لیتر) به سلول‌های سوسپانسیون در روز دهم منجر به افزایش سریع و مؤثر (۱۴۰ تا در مقایسه با کشت شاهد، ۴۶۰ میکروگرم بر گرم وزن خشک) در سنتز ایمپراتورین شد. بنابراین سلول‌های کشت شده به طور واضح دارای پتانسیل بیوسنتیک گیاهان سالم از گیاهان استنتاج شده، بودند. علاوه بر این، این پتانسیل می‌تواند در آینده به وسیله افزودن محرکها در محیط کشت تسهیل شود.

۱.۲.۲ استخراج و تجزیه کوریدالین[1] و تتراهیدرو پالماتین[2] از گیاه کوریدالیس یانهوسو[3]

جنس کوردالیس (فوماریاسه یا پاپاوراسه[4]) شامل تقریباً ۳۲۰ گونه است و با وسعت زیادی در نیمکره شمالی گسترش یافته است. در بین این گونه‌ها، حدود ۷۰ گونه به صورت داروهای گیاهی سنتی در چین، ژاپن و کره استفاده می‌شده است. تکمه‌های خشک و پودرشده گیاه کوریدالیس نیز که به عنوان وریدالیس ریزومی یا یان هو سو[5] معروف است، منبع غنی‌ای از چند آلکالوئید مهم داروئی است. اینها در طب سنتی چینی برای درمان زخم معده و زخم اثنی عشر، نامنظم بودن ضربان نبض، رماتیسم و قاعدگی دردناک استفاده می‌شده است. کوردیالیس یک گیاه علفی کندرشد است که مستعد بیماری‌های قارچی بوده که درنتیجه کاهش شدید محصول را به دنبال داشته و نیز بر روی کیفیت تکمه‌ها مؤثر

---

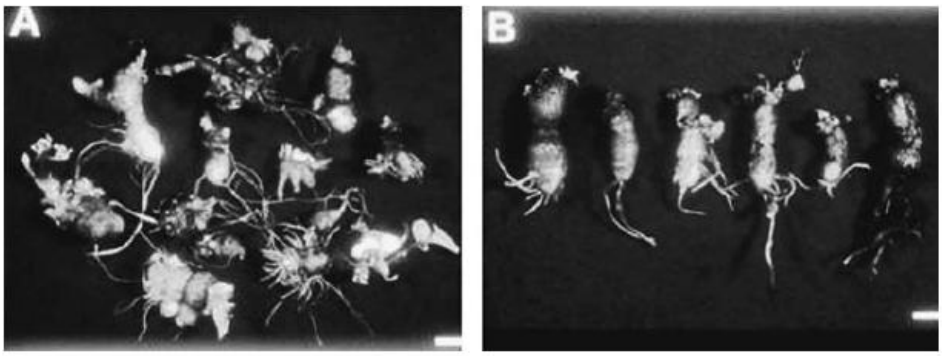
1. Corydaline
2. Tetrahydropalmatine
3. *Corydalis yanhusuo*
4. Fumariaceae or Papaveraceae
5. yan-hu-suo

خواهد بود. جهت دسترسی به تولید بالا، یکنواختی و نیز کیفیت بالای تکمه ها، بدست آوردن مواد عاری از پاتوژن جهت کشت لازم می‌باشد. واضح است که باززایی گیاهان از طریق کشت درون شیشه گیاه کوردیالیس جهت تولید انبوه این گیاه دارویی مهم در طی یک دوره کوتاه بسیار مفید خواهد بود.

روش باززایی کامل گیاه از طریق جنین زایی سوماتیکی از بافت کالوس ناشی از تکمه و تولید جسم مرکب زنده و فعال مثل D و l تتراهیدرو پالماتین و D کوریدالین از تکمه‌های گیاهان ناشی از جنین سوماتیکی در آزمایشگاه ما متعارف شده است. بافت‌های پینه اولیه به وسیله کاشت تکمه‌های بالغ بر روی محیط کشتی که با ۰/۲ میلی گرم بر لیتر بنزیل آدنین و ۰/۵ میلی گرم بر لیتر α نفتالین استیک اسید در تاریکی تهیه شده بود، القاء شدند. جنین‌های سوماتیکی تبدیل شده از گیاه کوردیالیس برای یک ماه بر روی تیمارهای گوناگون (تنظیم‌کننده‌های رشد) جهت افزایش و ترفیع تکمه‌ها و برای ارزیابی اثر آنها بر ذخیره آلکالوئیدهای پروتوبر برین[1] کشت شدند. گیاهان با جنین‌های سوماتیکی استخراج شده نیز به صورت جداگانه بر ۰/۱ میلی گرم بر لیتر اسیدجیبرلیک و ۰/۵ میلی گرم بر لیتر پاکلروبوترازول به مدت ۶ ماه جهت تعیین اثر سن بر ذخیره آلکالوئید، نگهداری شدند. تصویر ۱-۱۲ نشان می‌دهد که تکمه‌های خوب رشدکرده بعد از ۶ ماه، روی محیط رشد شامل ۰/۱ میلی گرم بر لیتر اسیدجیبرلیک (شکل ۱۲/۱A) و ۰/۵ میلی گرم بر لیتر پاکلروبوترازول (شکل ۱۲/۱B) شکل گرفتند. بعد از یک ماه و نیز شش ماه از کشت در تیمارهای مختلف، محتوای آلکالوئید تکمه‌ها با استفاده از کروموتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) مورد آنالیز قرار گرفت. جنین‌های سوماتیکی که بر روی محیط کشت با ۰/۱ میلی گرم اسیدجیبرلیک برای ۶ ماه کشت شده بودند، حاوی بالاترین غلظت D,L

[1]. protoberberine

تتراهیدروپالماتین و D کوریدالین در تکمه‌ها بودند. بیشترین مقدار کوریدالین در .ca[1] ۳/۸ میلی گرم بر گرم وزن خشک، بعد از ۶ ماه کشت در تیمار ۰/۵ میلی گرم بر لیتر پاکلروبوترازول بوده است. فراهم کردن یک ماده متشکله از آمینواسید مثل تیروزین به محیط کشت نیز می‌تواند محتوای این ترکیبات را بهتر کند.



شکل ۱.۱ تکمه‌های مشتق شده از جنین‌های سوماتیکی گیاه کوریدالیس که بعد از ٦ ماه کشت در: (A) محیط کشت نیمه قوی MS که با ۰/۱ میلی گرم بر لیتر GA3 فراهم شده بود و (B) محیط کشت نیمه قوی MS که با ۰/۵۱ میلی گرم بر لیتر پاکلروبوترازول فراهم شده بود، شکل گرفته‌اند. (واحد مقیاس: A =۱۷/۹ میلی متر؛ B= ٦/۳۱)
نکته: نسخه رنگی این تصویر در بخش صفحه رنگی قابل دسترسی می‌باشد.

شناسایی فرولیت[2] الکل در گیاهان دندروبیوم توسینس[3] که از طریق ریزازدیادی افزایش یافته‌اند.

دندروبیوم دومین جنس بزرگ در خانواده کامل ارکیداسه می‌باشد و گوناگونی بسیاری را در ویژگی‌های رویشی و زایشی از خود نشان داده است. این جنس به طور زیادی از

1. ca
2. Ferulate
3. *Dendrobium tosaense*

طریق توزیع جغرافیایی وسیع و نیز ارزش بالای هیبریدهای آن به عنوان جنس مناسب گلکاری، جلب توجه کرده است. ساقه‌های گونه‌های دندروبیوم که به عنوان شی هو[1] (در ژاپن: سکوکو و در انگلیسی: ساقه دندروبیوم) شناخته شده‌اند، در طب سنتی چین به عنوان یک عامل قوی جهت بهتر شدن هضم و نیز بهبود

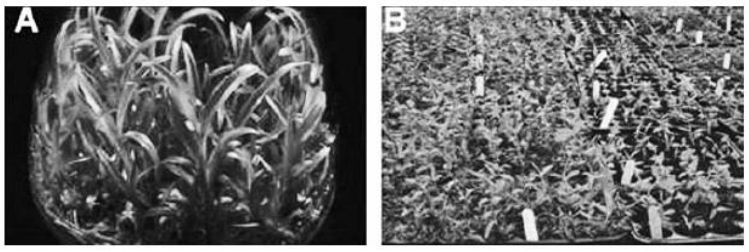
تولید مایع بدن[2]، مقوی یین[3] و حذف حرارت‌های مضر مورد استفاده قرار گرفته است. شین[4] به معنی صخره است در حالی که هو[5] به معنی زندگی کردن است. این دلالت می‌کند بر زندگی گیاه برروی صخره و اشاره به عادت رشدی صخره زی بودن گونه‌ها دارد. دندروبیوم اولین بار در شن نانک بن کوجینک[6] (اولین کتاب گیاهان دارویی چینی که بیش از ۱۹۰۰سال پیش چاپ شده است) تحت طبقه درجه دوم (فرعی) چاپ شد و نیز به طور پیاپی در سلسله‌های بعدی Pen-ts'aos ثبت شده است.

به علت تخریب زیستگاه بومی، فعالیت‌های برداشت ویرانگر و برداشت‌های بیش از حد برای اهداف تجاری در کشورهای گرمسیری، جمعیت ارکیدها به طور مداوم رو به زوال گذاشته است. امروزه روش‌های درون شیشه جهت نگهداری و تکثیر این ارکیدهای مهم و دارویی مورد استفاده قرار گرفته است. نویسندگان حاضر یک روش مؤثر را برای ازدیاد گیاهان دندروبیوم توسینس[7] از طریق جوانه زنی اسیمبیوتیک[8] بذرهای گرده افشانی شده که بعد از کشت بر محیط کشت قوی یا نیمه قوی MS فاقد تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی و حاوی ۳٪ ساکارز جوانه زده بودند، تأسیس کردند. نهال‌های جوانه زده بعد از انتقال به

---

1. Shih-hu
2. body fluid
3. nourishing "yin"
4. Shih
5. hu
6. Shen-Nung-Ben-Cao-Jing
7. *Dendrobium tosaense*
8. asymbiotic

محیط کشت MS با ۱/۵ ٪ ساکارز و ۸٪ ماده همگن موز یا سیب زمینی یا آب نارگیل و ۸ هفته دوره نهفتگی، در ظروف کشت سالم پرورش یافتند (شکل ۱۲.۲A). این ظروف خوب توسعه داده شده، به محیط خزه یا خزه به همراه سرخس درختی و یا تنها سرخس درختی که به عنوان لایه‌ای در کف سینی‌های پلاستیکی بودند، منتقل شدند و پس از آن برای مقاوم سازی به محیط گلخانه منتقل شدند (شکل ۱۲.۲B). گیاهان رشد کرده در گلخانه در طی یک دوره ۶ ماهه با متانول عصاره گیری شدند و فعالیت آنتی اکسیدانی آنها با استفاده از روش بنیان ۱ و ۱ دیفنیل ۲ پیکریل هیدرازیل (DPPH) مورد سنجش قرار گرفت. دندروبیوم تویسنس DPPH ۹۵/۹٪ را در غلظت ۰/۴ میلی گرم بر لیتر جدا کرد. بعد از این مرحله عصاره متانول تجزیه شد و همه اجزاء جهت فعالیت‌های آنتی اکسیدانی ارزیابی شدند؛ سپس اجزاء از طریق تخلیص بیولوژیکی با استفاده از کروموتوگرافی پایه خالص سازی شدند که منجر به شناسایی ترکیبات آنت اکسیدانی فرولیت‌های الکیل[1] از دندروبیوم تویسینس شد.



تصویر ۱.۲: جوانه زنی دانه اسیمبیوتیک و استقرار گیاهان دندروبیوم تویسینس در محیط خارج از شیشه. (A). رشد ایده آل نهال‌ها بعد از ۵ ماه در محیط کشت پایه MS + ۸٪ ماده همگن موز + ۱/۵٪ ساکارز. (B). گیاهان مقاوم شده بعد از ٦ ماه در گلخانه (واحد مقیاس: A: ۰/۸۲ سانتی متر؛ B: ٦ سانتی متر).

نکته: نسخه رنگی این تصویر در بخش صفحه رنگی قابل دسترسی می‌باشد.

[1]. alkyl ferulates

۱.۲.٤ تولید دیوسگنین[1] از گیاه دیوسکورآ دوریوفورا[2] به وسیله کشت‌های تعلیق سلولی

دیوسکورآ (دیوسکورآسه) مکررا به عنوان گیاه نیروبخش در طب سنتی چین استفاده می‌شده است. تکمه‌های گیاه دیوسکورآ دوریوفورا بسیار مورد تقاضا می‌باشد زیرا آنها نه فقط به عنوان داروی خام استفاده می‌شوند بلکه به عنوان غذا نیز استفاده می‌شوند. بیشترین عضو فعال که در تکمه‌ها یافت شد، دیوسگنین می‌باشد که می‌تواند به عنوان ماده متشکله بسیاری از استروئیدهای دارویی مثل پردنیزولون[3]، دگزامتازون[4]، نورتیسترون[5] و متنولون[6] مورد استفاده قرار گیرد.

جهت افزایش محصول دیوسگنین و جهت تسهیل پروسه خالص سازی، ما یک کشت تعلیق سلول را برای گیاه دندروبیوم دوریوفورا بنا نهادیم. کشت‌های تعلیق سلول از تکمه‌های کوچک و پینه‌های مشتق شده از گره ساقه در محیط کشت مایع با ۰/۱ میلی گرم در لیتر 2.4.D و ۳٪ ساکارز و قرار گرفتن بر شیکر روتاری با دور ۱۲۰ rpm بدست آمد. اگرچه ساکارز ۶٪ برای رشد ایده آل کشت تعلیق سلول، تشخیص داده شد، سلول‌های کشت شده در محیط کشت حاوی ساکارز ۳٪ سطوح بالاتری از دیو سگنین را تولید کردند. آنالیز به وسیله HPLC نشان داد که هم سوسپانسیون مشتق شده از گره ساقه و هم سوسپانسیون مشتق شده از دکمه‌های کوچک، حاوی دیوسگنین بود. مقدار کشت تعلیق سلول مشتق شده از تکمه‌های کوچک حاوی ۳/۲٪ دیوسگنسن در هر گرم وزن خشک بود در حالی که کشت‌های تعلیق مشتق شده از گره ساقه حاوی تنها ۰/۳٪ دیوسگنین بود. نظر به اینکه مقدار دیوسگنین که از کشت تعلیق سلول تکمه به دست آمد، بیشتر بوده و نیز قابل مقایسه با دکمه سالم بود، کشت تعلیق سلول می‌تواند برای تولید دیوسگنین استفاده شود.

---

[1] Diosgenin
[2] *Dioscorea doryophora*
[3]. prednisolone
[4]. dexamethasone
[5]. norethisterone
[6]. metenolone

۱.۲.۵ تشکیل کشت‌های تعلیق سلول جنتیانا داویدی[1] واریته فورموزانا (هیاتا)[2] T.N.Ho

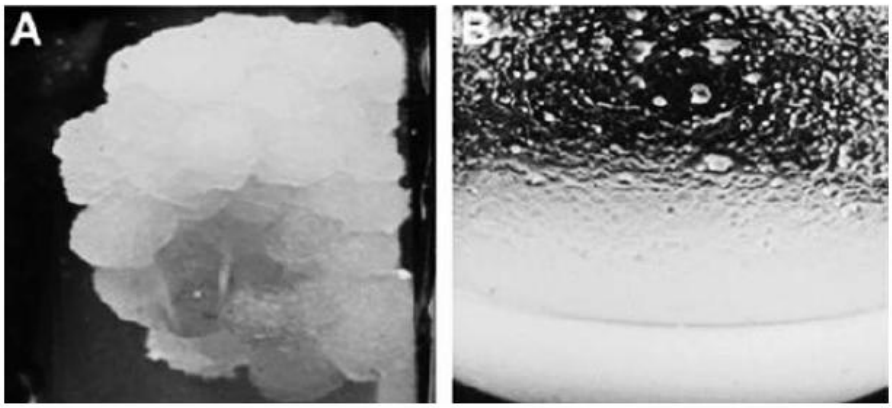
جنس جنتیانا (جنتیاناسه) شامل حدود ۴۰۰ گونه است که در کل جهان پخش شده‌اند. منابع تلخ تر[3] جنتیاناسه، بسیاری از ترکیبات دارویی مهم را تشکیل داده است که استفاده از بسیاری از گونه‌های این خانواده را در طب سنتی و یا برای ازدیاد مواد نیروبخش تلخ‌تر توجیه کرده است. در تایوان ۱۱ گونه و ۲ واریته از جنس جنتیانا تشخیص داده شد. درمیان گونه‌ها در تایوان، جنتیانا داویدی واریته فورموزانا بیشترین گسترش را داشته است به طوری که از ارتفاع پایین تا ارتفاع بالای سراسر کوه مرکزی جزیره عبور کرده است. تمام علف خشک که از زیستگاه وحشی جمع آوری شده است، به عنوان گیاه دارویی خام در طب سنتی تایوان استفاده می‌شود. اما تمام گیاه از لحاظ قانونی در تایوان مورد حمایت است و جمع آوری گیاهان از زیستگاه طبیعی غیر قانونی است. علیرغم اهمیت آن، هنوز روش جامعی برای کشت تجاری جنتیانا داویدی گزارش نشده است. کشت تعلیق سلول ممکن است یک راه مناسب تری را در صنعت داروسازی جهت به دست آوردن ترکیبات بیواکتیو مهم نشان دهد.

ما شرایط را برای تأسیس کشت‌های تعلیقی سلول جنتیانا داویدی برای تولید دو ترکیب مهم داروسازی یعنی جنتیپیکروساید[4] و سوئریتامارین[5] بهینه کردیم. تأثیر فاکتورهایی مثل افزایش تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، سرعت تکثیر، شدت نور، PH محیط کشت و دوره استقرار بر رشد سلول‌های جنتیانا داویدی در کشت‌های تعلیقی نیز مطالعه شد. کشت‌های پینه با کشت نمونه میان گره ساقه در تاریکی به مدت ۶ هفته با دمای ۱± ۲۵ درجه سانتی‌گراد در محیط کشت پایه MS حاوی ۰/۲ میلی گرم بر لیتر کینتین و ۰/۱ میلی گرم بر

---

1. *Gentiana davidii*
2. formosana (Hayata)
3. bitter
4. gentipicroside
5. swertiamarin

لیتر NAA آغاز شد (شکل ۱۲.۳A). کشت‌های تعلیق سلول بر اساس استفاده از پینه‌های استخراج شده از ساقه، بنا نهاده شد (شکل ۱۲.۳ B). در میان غلظت‌های متفاوت 2.4.D، NAA، ایندل استیک اسیدβ (IAA) و کینتین که مورد آزمایش قرار گرفت، رشد ایده آل سلول زمانی به دست آمد که کشت پینه در ۲۵ میلی لیتر محیط کشت پایه MS و در حالت مایع که با ۰/۲ میلی گرم بر لیتر کینتین و ۰/۳ ساکارز تکمیل شده بود، حاصل شد. کشت‌ها با ۱۰۰-۸۰ rpm در دمای ۱± ۲۵ درجه سانتی گراد و شدت نور پایین ۲/۳۳ μE m-2 s-1[1] چرخیده می‌شدند. زمانی که کشت‌ها زیر سرعت ۶۰rpm می‌چرخیدند، سایز سلول‌ها افزایش یافت و به سمت قهوه‌ای شدن گرائیدند و وقتی که سرعت شیکر ۱۲۰ rpm بود، اندازه‌های سلول کوچک شد.



شکل ۱.۳ (A) القاء پینه جنتیانا از بخش‌های ساقه که در محیط کشت پایه با ۳٪ ساکارز، ۱ میلی‌گرم بر لیتر α نفتالین استیک اسید (NAA) و ۰/۲ میلی گرم بر لیتر کینتین برای ۸ هفته کشت شده بود. (B) کشت‌های تعلیق برقرار شده از سلول‌های مشتق شده از ساقه
نکته: نسخه رنگی این تصویر در بخش صفحه رنگی قابل دسترسی می‌باشد.

[1]. μE m-2 s-1

کشت‌های نگه داشته شده در شرایط با شدت نور بالا و یا تاریکی، سرعت رشد پایین تری را نشان دادند. رشد سلولی ایده آل از پینه‌های کشت شده در ۲۵ میلی لیتر محیط کشت پایه MS در حالت مایع که با ۰/۲ میلی گرم بر لیتر کینتین و ۳٪ ساکارز، PH ۵/۲-۴/۲، نگهداری شده در نور ۲/۳۳ $\mu E\ m^{-2}\ s^{-1}$، دمای ۱± ۲۵ درجه سانتی گراد و سرعت شیکر ۱۰۰-۸۰ rpm به دست آمد. در کشت‌های تعلیقی حداکثر محتوای جنتیوپیکروساید در کشت‌های ۲۴ روزه مشاهده شد در حالی که بیشترین محتوای سوئرتیامایرین در کشت‌های ۱۲ روزه حاصل شد. روش توسعه یافته نهایی، کمک در مطالعه تأثیرات تغذیه ماده متشکله جسم جدید بر مقدار منابع فعال خواهد بود.

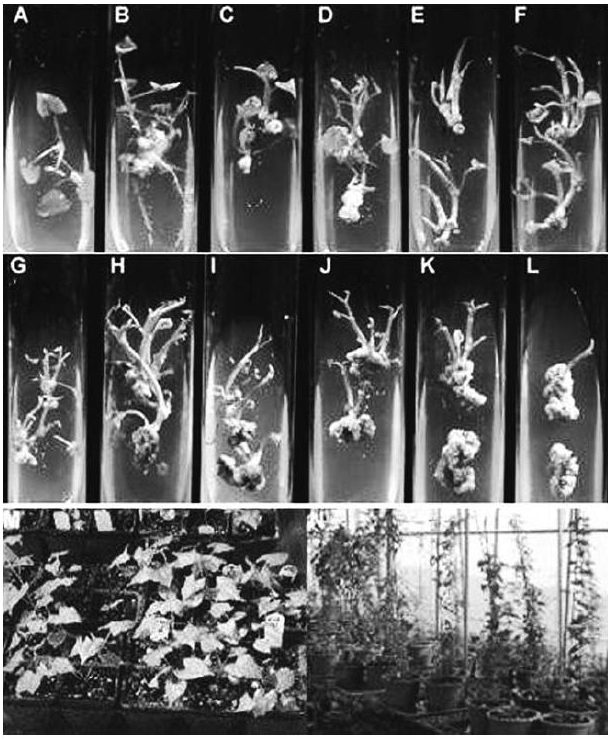
۱.۲.٦ آنالیز کمی آنتراکوئینونز امودین[1] و فایشن[2] تشکیل شده در ریشه‌ها و نهال‌های گیاه پلی گونوم مولتی فلوروم[3] که در محیط درون شیشه ازدیاد یافته‌اند

پلی گونوم مولتی فلوروم یک گیاه دائمی شبه مو است که یکی از مهمترین و پرمصرف‌ترین گیاهان داروئی چینی از خانواده پلی گناسه است. پیچک آن به نام یه جیائو و تکمه‌های ریشه با نام هوشو وو معروف هستند که به عنوان نیروبخش و در بسیاری از داروهای چینی استفاده می‌شوند. از لحاظ داروشناسی، این گیاه برای کم خونی، ضعف اعصاب و کلسترول بالا اثربخش است و از لحاظ بالینی برای بیماری انسداد شرایین قلب، چربی بالا، اختلال روانی و دیگر بیماری‌ها که با سالخوردگی همراه است، مورد استفاده قرار می گیرد.

---

1. Anthraquinones Emodin
2. Physcion
3. *Polygonum multiflorum*

یک شیوه کارآمد و سریع برای القاء درون شیشه و باززایی گیاه کامل از پلی گونوم مولتی فلوروم ایجاد شده است. نمونه‌های گره‌ای در محیط پایه MS حاوی غلظت‌های متفاوت NAA و BA رشد کردند. حداکثر تکثیر شاخه‌ها (۹۷٪) بعد از ۶ ماه از کشت در محیط کشتی که با ۰/۲ میلی گرم بر لیتر NAA و ۲ میلی گرم بر لیتر BA تهیه شده بودند، حاصل شد (شکل A-L ۱۲.۴). اما بین ۸۸٪ تا ۱۰۰٪ شاخه‌ها (با طول ۱ سانتی متر) بلند شدند (۴/۲۸-۳/۰۲ سانتی متر) و در محیط کشت پایه MS که با NAA یا ایندول بوتریک اسید (IBA) تهیه شده بود، ریشه زدند.



شکل ۱.٤: القاء و تکثیر شاخه‌های متعدد در نمونه‌های گره گیاه پلی گنوم مولتی فلوروم تانب. نمونه‌های گره به مدت ٦ هفته در محیط پایه MS با ۳٪ ساکارز، ۱٪ آگار دیفکو[1] بدون تنظیم‌کننده‌های رشد کشت شد. (A): با ۰/۲ نانوگرم بر لیتر α نفتالین استیک اسید (NAA). (B) : ۰/۲ نانوگرم بر لیتر NAA و ۰/۵ میلی گرم بر لیتر بنزیل آدنین(BA) (C) : ۰/۲ نانوگرم بر لیتر NAA و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آدنین(BA) (D): ۰/۲ نانوگرم بر لیتر NAA و ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آدنین(BA) (E) ۰/۲ نانوگرم بر لیتر NAA و ۰/٤ میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آدنین(BA) (f) ۰/۲ نانوگرم بر لیتر NAA و ۰/۸ میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آدنین(BA) (G) ۰/۵ نانوگرم بر لیتر NAA و ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آدنین(BA) (H) ۱/۰ نانوگرم بر لیتر NAA و ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آدنین(BA) (I) ۲/۰ نانوگرم بر لیتر NAA و ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آدنین(BA)

(J) ٤/۰ نانوگرم بر لیتر NAA و ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آدنین (BA)

(K) ۸/۰ نانوگرم بر لیتر NAA و ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آدنین (BA)

(L) گیاهچه‌های ازدیاد یافته در محیط درون شیشه به محیط خاک اتوکلاو شده منتقل شدند و رشد تحت شرایط گلخانه با رطوبت بالا بعد از ۲ هفته (M) و بعد از سه ماه (N) رشد کردند.

نکته: نسخه رنگی این تصویر در بخش صفحه رنگی قابل دسترسی می‌باشد.

[1]. Difco

همه شاخه‌های ریشه‌دار شده به محیط گلدان حاوی خاک اتوکلاو شده، ورمیکولایت و پیت ماس (۱:۱:۱) منتقل شدند. گیاهچه‌ها قبل از انتقال به زمین با موفقیت به شرایط گلخانه با رطوبت بالا خو گرفتند (تصویر M,N ۱۲/۴). حضور آنتراکوئینونر[۱]، امودین[۲] و فیشن[۳] در شاخه‌های رشد کرده در گلخانه با استفاده از HPLC مشخص شد. تجزیه نشان داد که غلظت ترکیبات دارویی عمده (امودین و فیشن) در شاخه‌های رشد کرده در محیط شیشه به مدت ۶ هفته و سه ماهه که از طریق درون شیشه افزایش یافته و در محیط گلخانه رشد کردند، بیشتر از داروی خام در بازار بوده است. (در قسمت‌های زیرزمینی یا قسمت‌های ساقه پلی گنوم مولتی فلوروم تهیه شدند). این نتایج نشان می‌دهد که تحت شرایط کشت معین، تولید شاخه‌ها با محتوای امودین و فیشن بالا در دوره کوتاه (۶ هفته) امکان پذیر می‌باشد و این ترکیبات می‌تواند برای سنجش دارویی مورد استفاده قرار گیرد.

۱.۲.۷ تولید کریپتوتانشینون از بافت‌های کالوس سالویا میلتیوریزا بانگ[۴]

سالویا یک جنس مهم شامل تقریباً ۹۰۰ گونه در خانواده لامیاسه[۵] می‌باشد. بعضی از گونه‌های سالویا در سطح جهان برای استفاده دارویی مردم کاشت می‌شده است. برای مثال دان سن[۶]، ریشه‌های خشک سالویا میلتیوریزا بانگ، یک داروی بسیار محبوب چینی است که به طور وسیعی جهت افزایش جریان خون، از بین بردن گرفتگی (سکون) خون، کاهش تب و حالت تحریک، تقویت (تغذیه خون)، آرام کردن فکر و خنک کردن خون برای

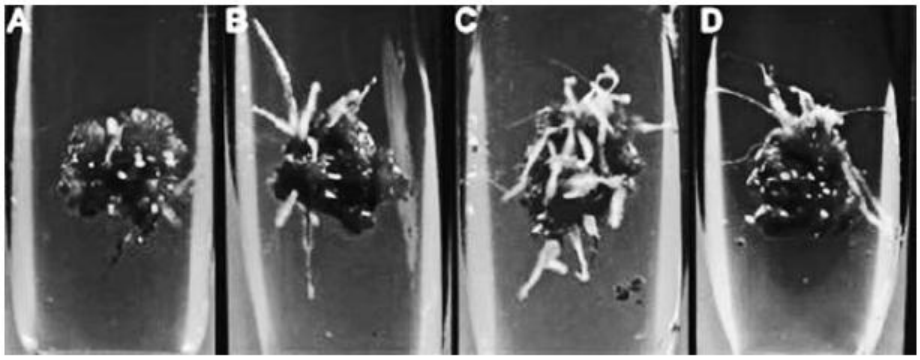
1. anthraquinones
2. emodin
3. physcion
4. *Salvia miltiorrhiza Bunge*
5. Lamiaceae
6. Dan-shen

تکسنین کاربونکلس[1] استفاده می‌شده است. منبع معلوم و اصلی عصاره گیری آلی از دان شن، تانشینونز و کوینونددیترپنز[2] هستند. از زمانی که تولیدهای دان شن یک اساسی را برای فعالیت تجاری مهم تشکیل داد، یک علاقه ممتدی در تولید بر پایه بیوتکنولوژی تانشیننز تأسیس کرد. در تحقیقات مداوم ما در استفاده از کشت‌های بافت از گیاهان جهت تولید متابولیت‌های ثانویه بیواکتیو، ما یک روش جهت تولید کریپتوتانشینون[3] از سالویا میلتیوریزا از طریق کشت‌های کالوس ایجاد کردیم.

تأثیر بنزیل آدنین بر تشکیل کریپتوتانشینون به وسیله سالویا میلتیوریزا با استفاده از کالوس‌های اولیه امتحان شد. این به وسیله کشت‌های نمونه‌های برگ بر محیط کشت پایه MS که با ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر 2.4.D در تاریکی فراهم شده بود، القاء شد. کالوس‌ها بعدا در محیط کشت پایه MS حاوی ۱ میلی گرم بر لیتر 2.4.D و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BA توسعه داده شد و سپس (به وسیله تجزیه با HPLC) به دلیل در برداشتن مقادیر کم (۰/۰۵±۰/۲۶ میلی گرم بر گرم در وزن خشک) کریپتوتانشینون تشخیص داده شد. حذف 2.4.D از محیط کشت در نمونه‌های نشان‌دار، سبب افزایش محتوای کریپتوتانشینون در کالوس ها شد. در طی دوره کشت، کالوس یک رنگ قرمز عمیق پیدا کرد. تجزیه با HPLC نشان داد که محتوای کریپتوتانشینون کالوس‌هایی که در محیط کشت پایه MS که با ۰/۱، ۰/۲، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی گرم بر لیتر BA تکمیل شده بودند، به طور معنی داری بالاتر از داروهای خام بازاری بوده است (از بخش‌های زیرزمینی سالویا میلتیوریزا تهیه شده بود). حداکثر محصول کریپتوتانشینون (۰/۰۹±۴/۵۹ میلی گرم بر گرم وزن خشک) در کالوس هایی که در محیط کشت پایه MS که با ۰/۲ میلی گرم بر لیتر BA به مدت ۶۰ روز قرار گرفته بودند، دیده شد.

---

1. carbuncles
2. tanshinones, the quinoid diterpenes
3. cryptotanshinone



تصویر ۱۲.۵: بافت کالوس سالویا که در محیط کشت پایه MS که با ۰/۲ میلی گرم بر لیتر بنزیل آدنین برای دوره‌های (A) ۸ روز؛ (B) ۱۶ روز؛ (C) ۲۴ روز و (D) ۶۰ روز فراهم شده بود.
نکته: نسخه رنگی این تصویر در بخش صفحه رنگی قابل دسترسی می‌باشد.

۱.۲.۸ تولید هارپاگوسید[1] در گیاهان اسکروفولاریا یوشیمورا یامازاکی[2] که از طریق ریزازدیادی ازدیاد یافته‌اند

اسکروفولاریا یوشیمورا یامازاکی (**اسکروفولاریاسه**)[3] یک گیاه دائمی طبیعی در تایوان است و یک گیاه جانشین برای اسکروفولاریا ناینپوئنسیس در طب سنتی چین است. ریشه‌های اسکروفولاریا ناینپوئنسیس جهت درمان التهاب، التهاب حنجره، ورم لوزه، آبسه کاربونکلس[4] و یبوست مورد استفاده قرار می‌گرفته است. به علاوه این گیاه می‌تواند فشار خون و سطوح قند خون را پایین بیاورد، اثرات آنتی باکتریایی و آنتی اکسیدانی دارد و معمولاً در ترکیب با دیگر گیاهان به عنوان عامل مغذی و تقویت‌کننده سلامتی مورد استفاده قرار می‌گیرد. ریشه‌ها حاوی گلیکوزیدهای ایریدوید[5] (عامل‌های فعال) به علاوه

---

1. Harpagoside
2. *Scrophularia yoshimurae* Yamazaki
3. Scrophulariaceae
4. carbuncle
5. iridoid

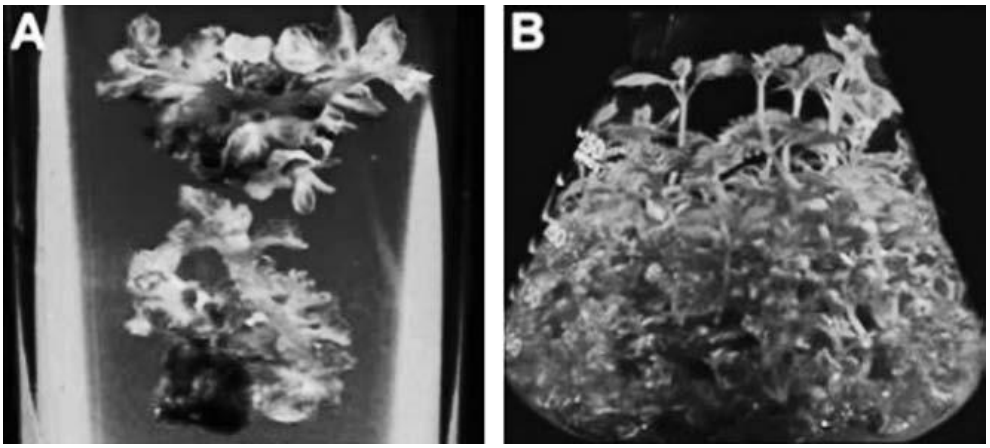
مقدار کمی از روغن‌های ضروری، آلکالوئیدها، فلاونوئیدها و اسید *p*متوکسینامیک[1] می‌باشند. برای داروی خام اولیه، ریشه‌های اسکروفولاریا یاشیمورا، از گیاهان طبیعی رشد کرده در کوههای تایوان جمع آوری شد. کشت صحیح گیاه لازم می‌باشد. جهت فراهم کردن آن، مواجه شدن با نیاز داروی محلی کافی نمی‌باشد. جهت کمک به کشت تجاری و نگهداری منشأ این گونه‌های مهم گیاهی، یک سیستم ازدیاد درون شیشه پرسرعت برای اسکروفولاریا یاشیمورا توسعه داده شد. در این باره ما روش کشت بافت اسکروفولاریا یاشیمورا که در آزمایشگاه ما سنجیده و متعارف شد، شرح می‌دهیم.

جهت به دست آوردن نمونه‌های سالم برای اندام زایی درون شیشه ای، گیاهان از محیط رشد طبیعی جمع آوری شدند و تحت شرایط بهداشتی کنترل شده، رشد کردند. نمونه‌های مختلف مثل نوک شاخه، ته برگ، گره و میان گره که از شاخه‌های در حال رشد فعال این گیاهان گرفته شد، جهت القاء واکنش مرفولوژیک مورد امتحان قرار گرفتند. شاخه‌های گوناگون نه فقط از مریستم‌های موجود در نوک شاخه و نمونه‌های گره ساقه القاء شدند بلکه همچنین به طور مستقیم از انتهای بریده شده نمونه‌های میان گره و ته برگ بدون در میان آمدن مرحله پینه در طی یک ماه کشت بافت بر روی محیط کشت پایه MS که با ۴/۴۴μM بنزیل آدنین و ۰/۰۷ μM NAA تهیه شده بودند، القاء شد. همه نمونه‌های گره ساقه و نوک شاخه، شاخه‌های متعدد القاء کردند در حالی که نمونه‌های ته برگ در حداقل واکنش بودند. شکل ۱۲.۶A شاخه‌های متعدد از نمونه‌های میان گره اسکروفولاریا یاشیمورا را نشان می‌دهد.

شاخه‌های القاء شده بعدا به وسیله کشت مجدد آنها در محیط کشت تازه با ترکیبات مشابه کشت شدند (تصویر ۱۲.۶B). شاخه‌های تولید شده از طریق ریزازدیادی بلند شدند و به وسیله کشت مجدد در محیط رشد پایه MS بدون تنظیم‌کننده رشد، ریشه‌دار شدند.

[1]. *p*-methoxycinnamic

گیاهان به محیط خاک منتقل شدند و تحت شرایط رطوبت بالا به اتاقک رشد عادت داده شدند. کشت‌ها می‌توانستند برای بیش از ۲ سال بدون از دست دادن پتانسیل مرفوژنتیکشان باقی بمانند. محتوای هارپاگوسید و کمیت گلوکوزید ایریدوییید غالب در مواد گیاهی متفاوت به وسیله HPLC تعیین شد. آنالیز نشان داد که محتوای هارپاگوسید در قسمت‌های هوایی و زیرزمینی اسکروفولاریا یوشیمورا به طور معنی داری بالاتر از داروی خام در بازار می‌باشد. جهت عصاره گیری متابولیت‌های ثانویه و اداره کردن مطالعات داروشناسی، داشتن گیاهان با کیفیت بالا و مقدار یکسان از منابع مولد، لازم می‌باشد. عموما گیاهان مشابه (همگن) با مقدار یکسان از متابولیت‌های ثانویه می‌توانند به وسیله ازدیاد درون شیشه گیاهان منتخب و گلچین به دست بیایند. گیاهان گونه‌های بسیاری که از طریق درون شیشه ازدیاد یافته‌اند، تنوع پایینی در مقدار متابولیت‌های ثانویه نسبت به گیاهان مشابه وحشی نشان دادند. روشی که به دست آمد همچنین می‌تواند برای ریزازدیادی سریع، کشت تجاری و نگهداری ژرم پلاست این گیاهان دارویی مورد استفاده قرار گیرد.



شکل ۱.٦: (A) القاء شاخه‌های گوناگون از نمونه‌های میان گره اسکروفولاریا یوشیمورا. (B) ازدیاد شاخه از نمونه‌های گره

نکته: نسخه رنگی این تصویر در بخش صفحه رنگی قابل دسترسی می‌باشد.