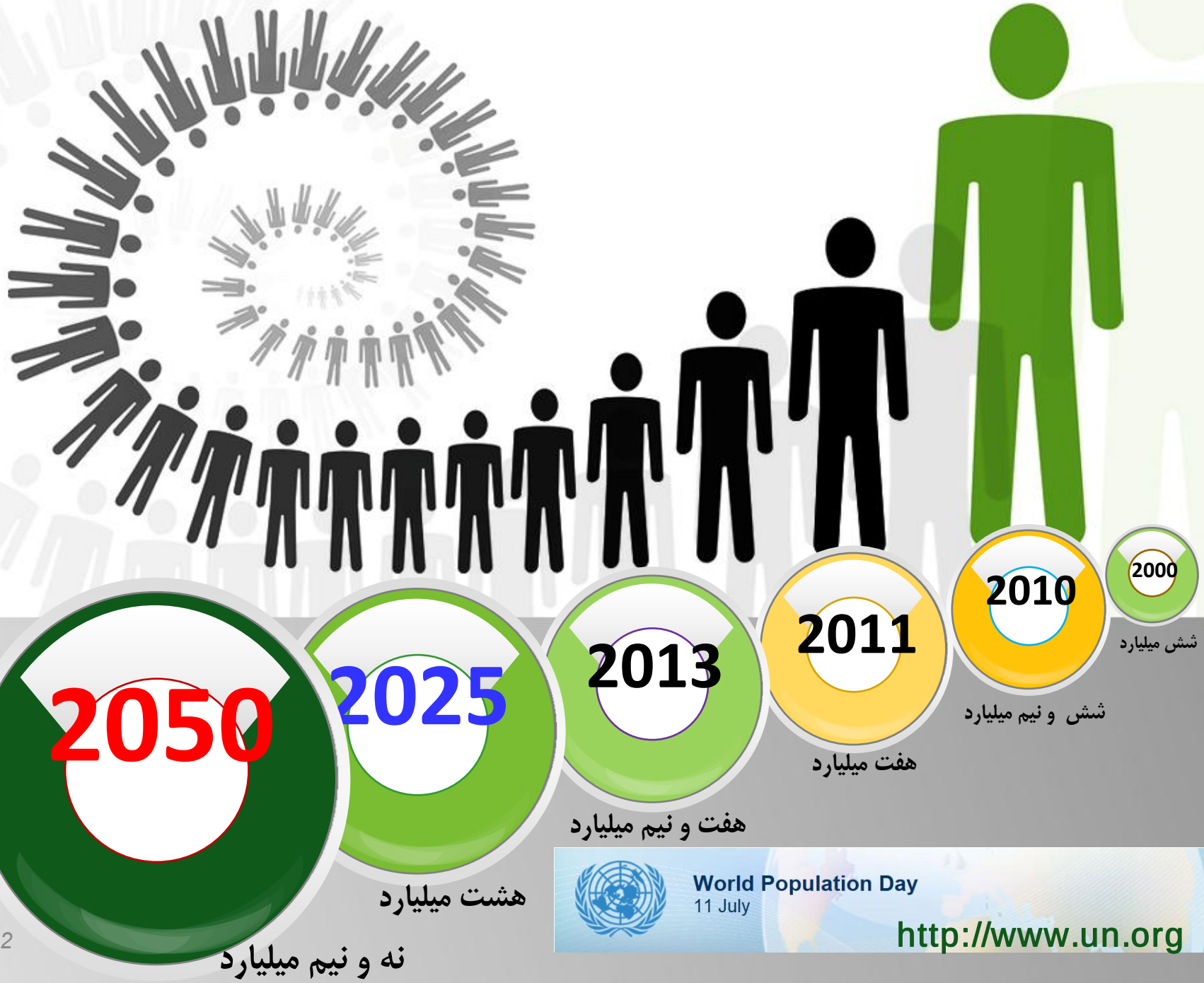
پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی
گروه کشاورزی

شبکه ملی پژوهش و فناوری گیاهان دارویی

کارگاه آموزشی و عملی

تولید متابولیت های ثانویه از طریق کشت های سوسپانسیون سلولی و ریشه های مویینه

مدرس: دکتر محمد حسین میر جلیلی
استادیار فیزیولوژی و اصلاح گیاهان دارویی


2000
شش میلیارد
2010
شش و نیم میلیارد
2011
هفت میلیارد
2013
هفت و نیم میلیارد
2025
هشت میلیارد
2050
نه و نیم میلیارد
World Population Day
11 July
http://www.un.org

مقدمه

درصد رشد تقریبی سالانه جمعیت جهان

قاره	۱۶۵۰-۱۷۵۰	۱۶۵۰-۱۸۵۰	۱۸۵۰-۱۹۵۰	۱۹۵۰-۱۹۹۰	۱۹۹۰-۲۰۰۰	۲۰۰۰-۲۰۵۰
اروپا	۰/۳۴	۰/۶۴	۰/۷۲	۰/۶۹	۰/۰۷	-۰/۱۸
آسیا	۰/۳۷	۰/۴۵	۰/۶۲	۲/۰۴	۱/۴۹	۰/۷۵
آمریکای لاتین	-۰/۰۹	۱/۱	۱/۶۲	۲/۴۲	۱/۶۵	۰/۸۴
آمریکای شمالی	۰	۳/۲۶	۱/۸۹	۱/۲۴	۱/۰۴	۰/۷۶
اقیانوسیه	۰	۰	۱/۸۷	۱/۷۳	۱/۷۶	۱/۹۶
آفریقا	-۰/۰۵	۰	۰/۸۴	۲/۵۷	۲/۴۹	۱/۷۲
جهان	۰/۲۹	۰/۴۷	۰/۷۷	۱/۸۴	۱/۴۲	۰/۸۴

✓ اهمیت حفظ امنیت غذایی و سلامت

طب سنتی

قرص کد
ریحان
چای مکه
کشنیز
ترشح شیر مادر. ضد نفخ نوزاد. تقویت نوزاد
ترص روغن ماهی
اسفرزه
چای سبز

استفاده از متابولیت‌های ثانویه بسیار ارزشمند در گیاهان

محصولات دارویی

Menta piperita

Menthol

آفت کش طبیعی

Azadirachta indica

Azadirachtin

رنگها و طعم دهنده های طبیعی

Vanilla planifolia

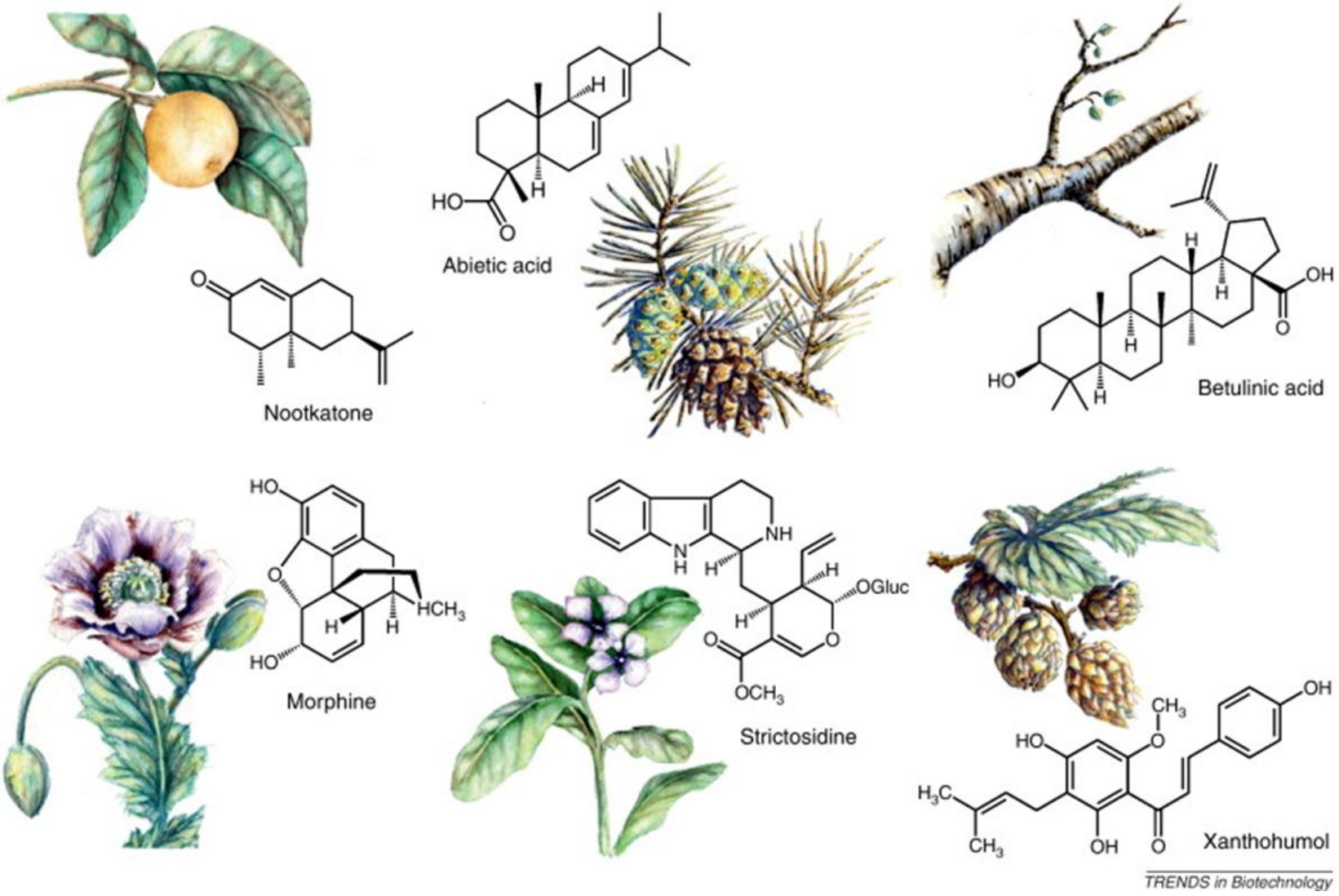
Crocus sativus

اسانس ها و مواد بهداشتی

Citrus limon

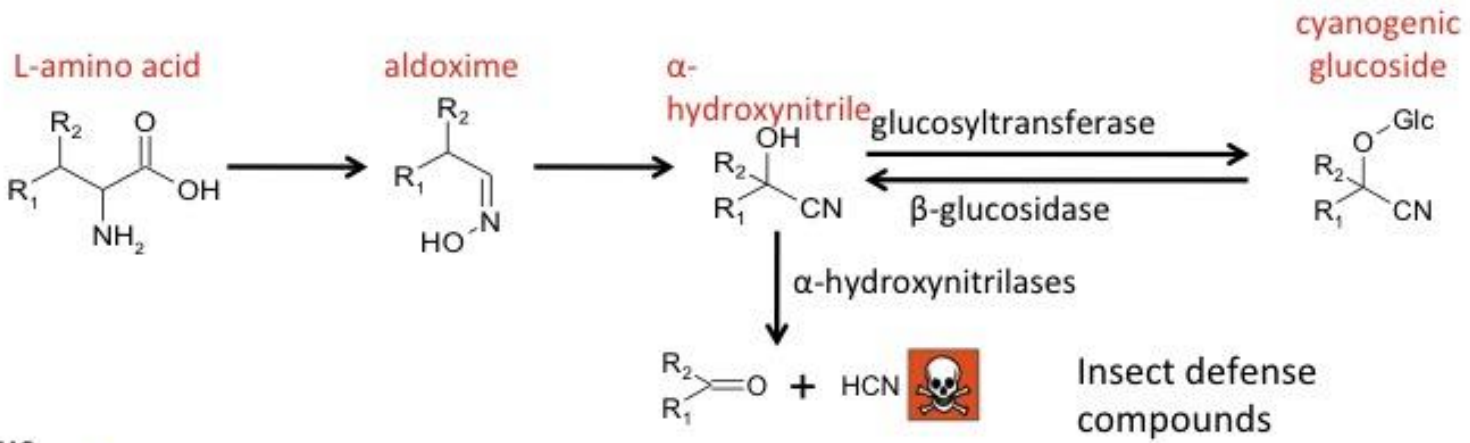
Rosmarinus officinalis

متابولیت‌های ثانویه



متابولیت‌های ثانویه

Cyanogenic Glucosides

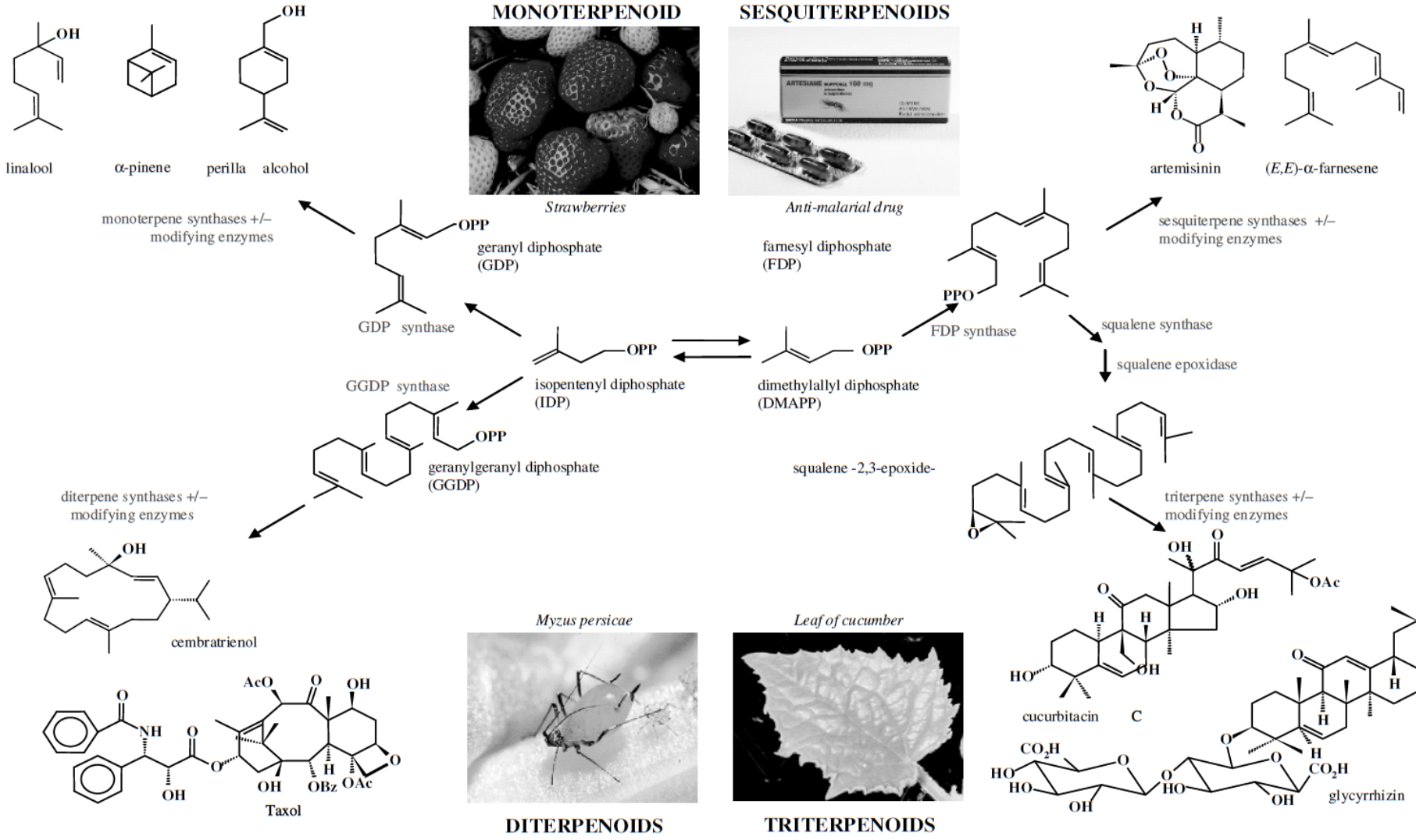


Lotus

Sorghum

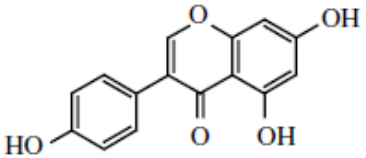
Almonds

Cassava

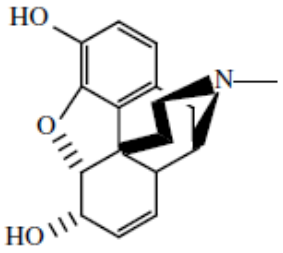

MONOTERPENOID
SESQUITERPENOIDS
linalool
α-pinene
perilla alcohol
Strawberries
Anti-malarial drug
artemisinin
(E,E)-α-farnesene
monoterpene synthases +/–
modifying enzymes
geranyl diphosphate
(GDP)
GDP synthase
farnesyl diphosphate
(FDP)
FDP synthase
sesquiterpene synthases +/–
modifying enzymes
squalene synthase
squalene epoxidase
isopentenyl diphosphate
(IDP)
dimethylallyl diphosphate
(DMAPP)
GGDP synthase
geranylgeranyl diphosphate
(GGDP)
squalene -2,3-epoxide-
diterpene synthases +/–
modifying enzymes
triterpene synthases +/–
modifying enzymes
cembratrienol
Taxol
Myzus persicae
Leaf of cucumber
cucurbitacin C
glycyrrhizin
DITERPENOIDS
TRITERPENOIDS

محصولات دارویی از مسیرهای متابولیتی

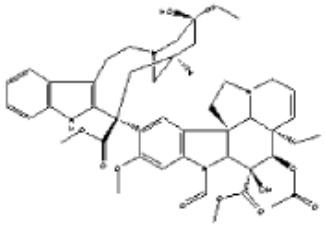
Medicinal Products from Secondary Metabolite Pathways



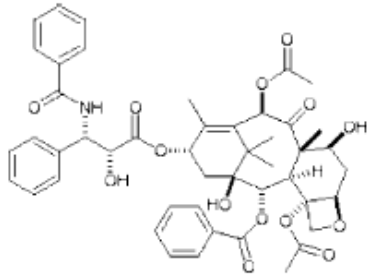
Genistein
Phytoestrogens



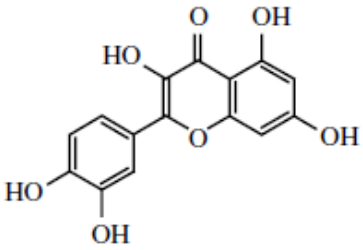
Morphine
Analgesics



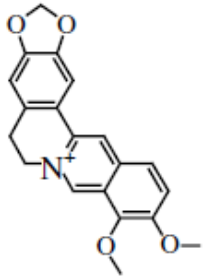
Vincristine
Antineoplastic



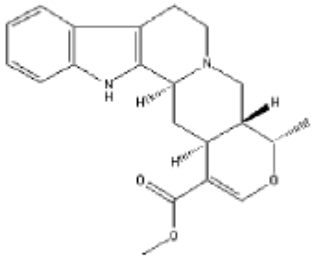
Paclitaxel
Antineoplastic



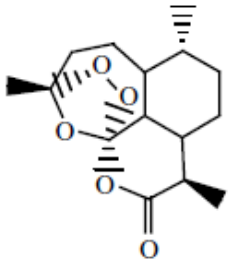
Quercetin
Anticancer



Berberine
Antibacterial



Ajmalicine
Antihypertensive



Artemisinin
Antimalarial

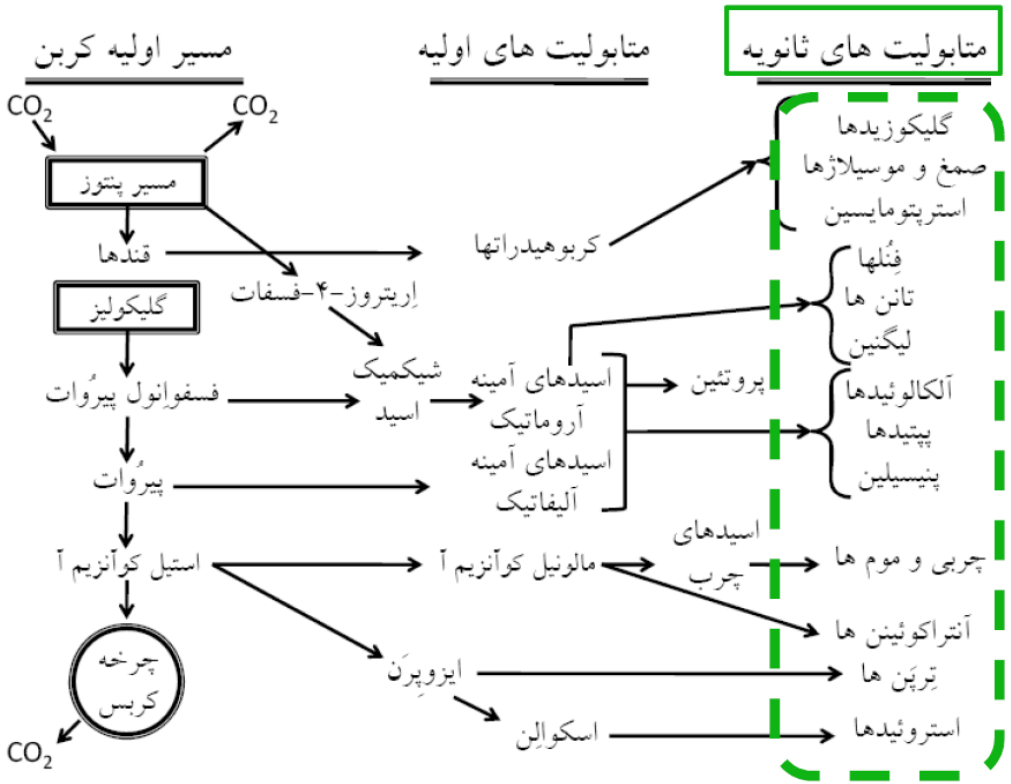
واکنش ها

متابولیت های اولیه

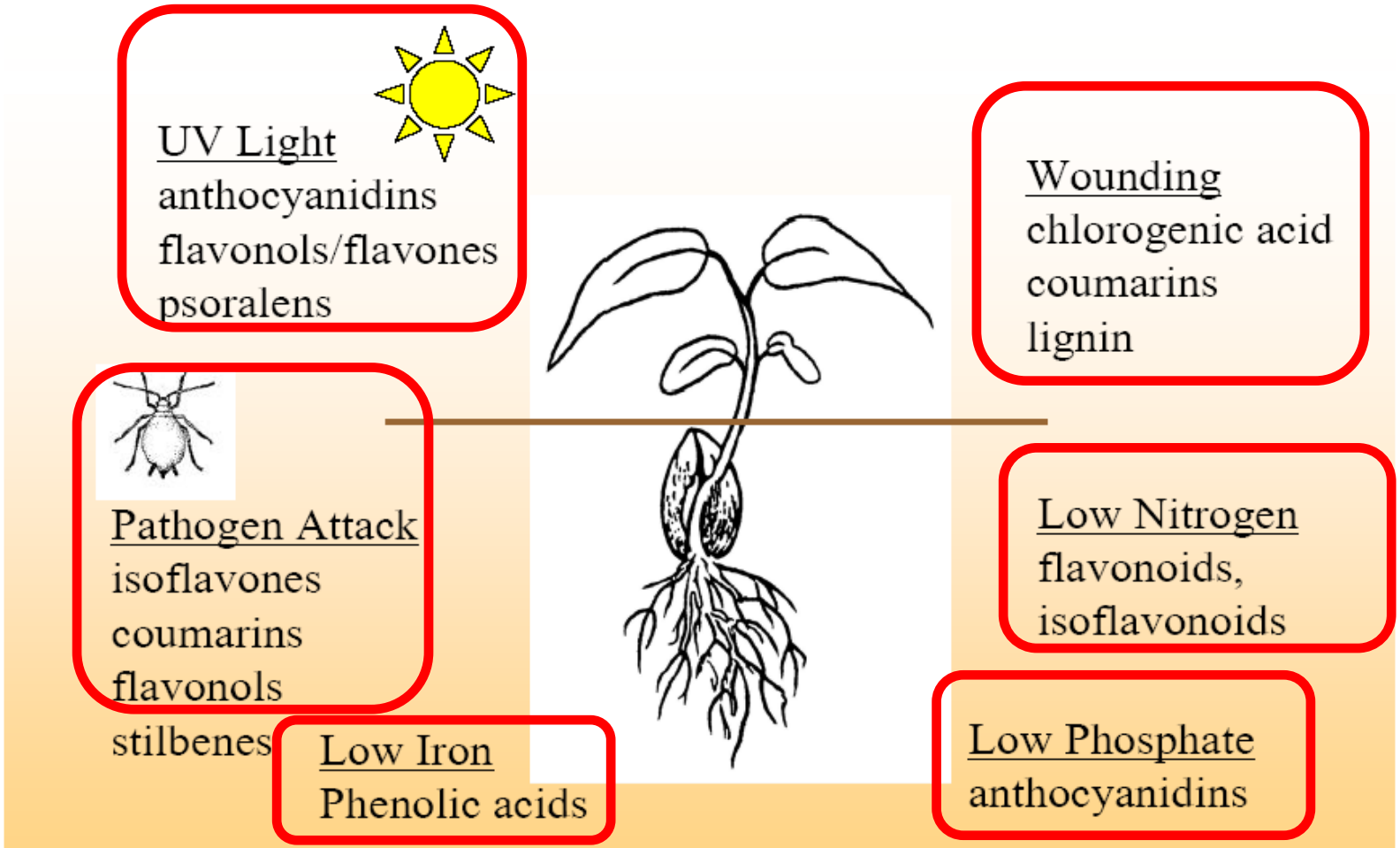
- ✓ واکنش شیمیایی با واسطه آنزیمی (متابولیسم)
- ✓ سنتز مولکول‌های: قند، اسید آمینه، اسید چرب، نوکلئوتید و ...

متابولیت‌های ثانویه

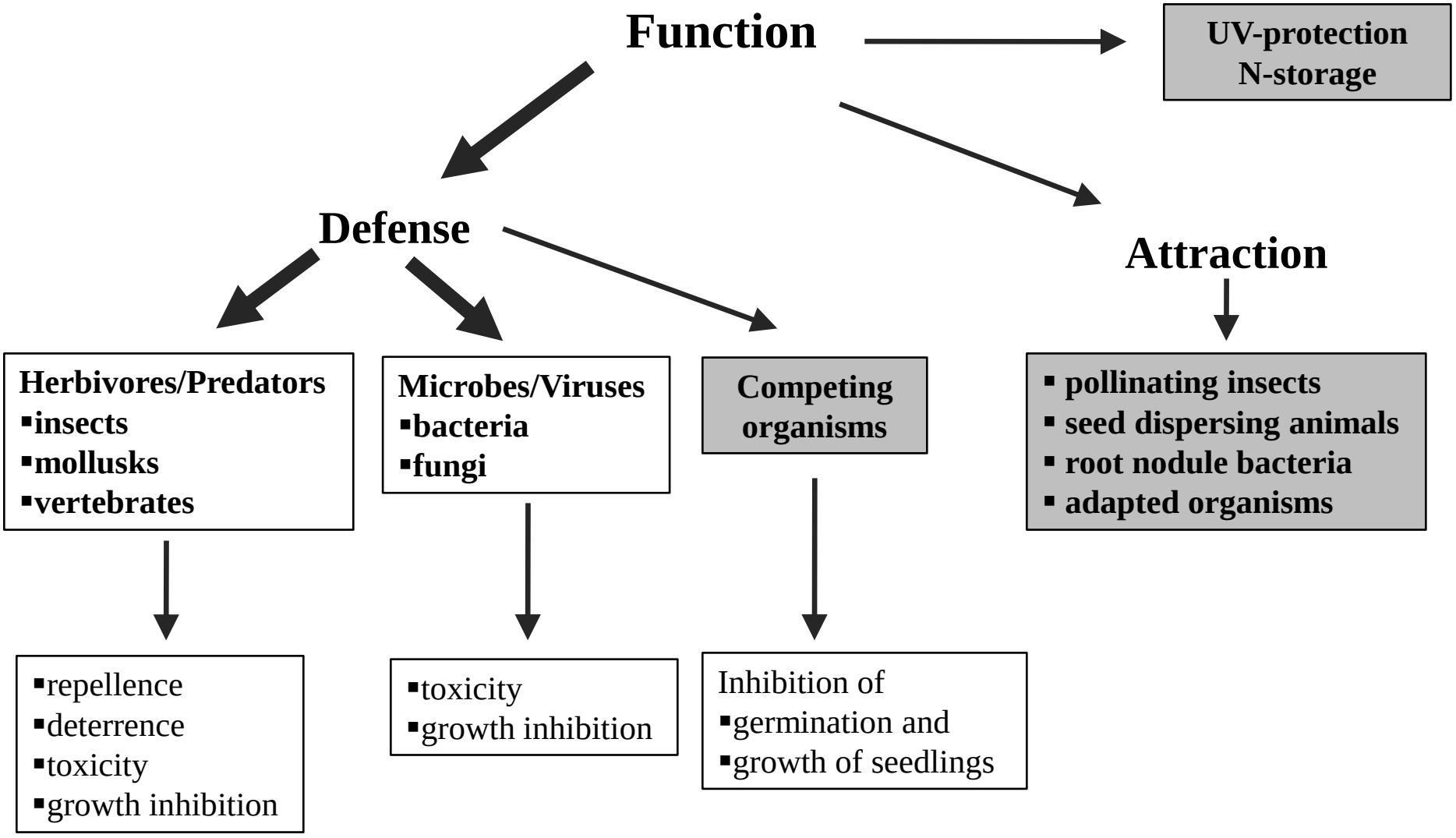
- ✓ مسیر متابولیکی ثانوی
- ✓ ترکیباتی با وزن مولکولی پایین
- ✓ نقش غیرضروری در بقا و حیات گیاه



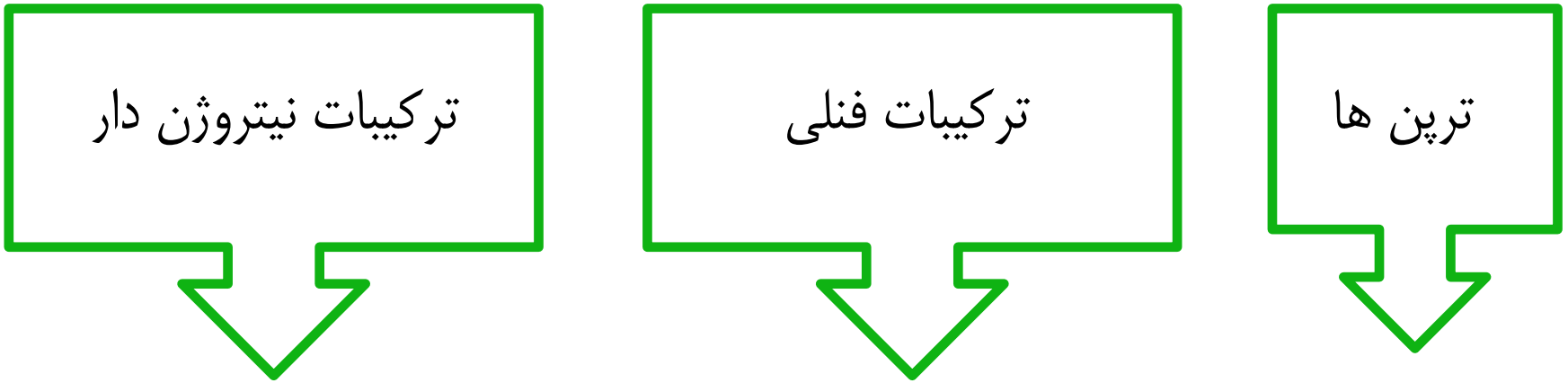
بروز متابولیت های ثانویه در گیاهان



R.A., Dixon and N. L. Paiva, Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism. The Plant Cell, 1995, 7; 1085-97


Function
UV-protection
N-storage
Defense
Attraction
Herbivores/Predators
▪insects
▪mollusks
▪vertebrates
Microbes/Viruses
▪bacteria
▪fungi
Competing organisms
▪ pollinating insects
▪ seed dispersing animals
▪ root nodule bacteria
▪ adapted organisms
▪repellence
▪deterrence
▪toxicity
▪growth inhibition
▪toxicity
▪growth inhibition
Inhibition of
▪germination and
▪growth of seedlings

گروه های عمده متابولیت های ثانویه



Thymol
Carvacrol
Citral
Ursolic acid
Betulinic acid
Taxol

Flavonoids
Phenolic acid derivatives
Rosmarinic acid
Anthocyanins

Alkaloids
Morphine
Codeine
Vincristine
Vinblastine
Galantamine
Camptothecine

Compound	Use	Plant species	Cost US $/Kg
Quinine	Antimalarial	*Cinchona ledgeriana*	500
Berberine	Intestinal ailment	*Coptis japonica*	3,250
Shikonin	Antibacterial	*Lithospermum erythrorhizon*	4,500
Sangunarine	Antiplaque	*Sanguinaria candensis*	4,800
Codeine	Sedative	*Papaver somniferum*	17,000
Ajmalicine	Antihypertensive	*Catharanthus roseus*	37,000
Ellipticine	Antitumour	*Orchrosia elliptica*	240,000
Morphine	Sedative	*Papaver somniferum*	340,000
Camptothecine	Antitumour	*Camptotheca acuminata*	432,000
Taxol	Anticancer	*Taxus brevifolia*	2000,000
Vinblastine	Antileukemic	*Catharanthus roseus*	2,000,000
Vincristine	Antileukemic	*Catharanthus roseus*	4,000,000

تامین گیاهان دارویی (برداشت از طبیعت)

ضرورت حفاظت از گونه های دارویی در خطر نابودی (چگونه؟)

- ✓ مهر سلیمان
- ✓ کرفس کوهی
- ✓ آنقوزه
- ✓ مهرخوش
- ✓ چویل
- ✓ زرین گیاه
- ✓ و . . .

تامین گیاهان دارویی (کشت و تولید در سیستم های زراعی)

✓ اهمیت بیوتکنولوژی در بهره‌برداری مؤثر و پایدار از عرصه‌های زراعی و تأمین نیازهای غذایی و دارویی

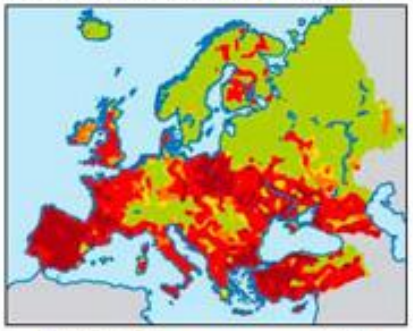
محدودیت زمین‌های زراعی و منابع آب

WORLDWIDE
For the more than 15% of the world's population that depends on the seasonal melt of high elevation snow and ice for fresh water, the melting of glaciers and ice caps (see p.98) represents a serious threat.

Serious negative impacts
On balance, the negative impacts of changing precipitation patterns outweigh the benefits. For example, the increases in annual rainfall and runoff in some regions are offset by the negative impacts of increased precipitation variability, including diminished water supply, decreased water quality, and greater flood risks. There is hope, however, that in some cases adaptations (e.g., the expansion of reservoirs) may offset some of the negative impacts of shifting patterns of water availability (see p.150).

SOUTHERN EUROPE AND THE MEDITERRANEAN
Many arid and semi-arid regions, such as the Mediterranean and parts of southern Europe, southern Africa, and much of Australia, are likely to suffer from increased drought. Electricity production potential at hydropower stations may decrease by more than 25% by 2070.

MORE FREQUENT EXTREME DROUGHT EVENTS



SIMULATED RETURN PERIOD (TYPICAL NUMBER OF YEARS BETWEEN CONSECUTIVE DROUGHTS) FOR EXTREME DROUGHT (I.E., DROUGHT WITH A MAGNITUDE EQUAL TO WHAT IS CURRENTLY CONSIDERED A 100-YEAR DROUGHT) BY LATE 21ST CENTURY (2070–2099).

Climate model simulations predict that the spacing between consecutive extreme drought events (defined as once-in-a-hundred-years events) will decrease sharply by the 2070s for the "middle of the road" emissions scenario (see p.86).

US
A steady increase in the population of cities such as Phoenix and Las Vegas is occuring at precisely the same time that drought conditions are worsening. In the Pacific Northwest, streamflow may have decreased so much by 2020 that the 2007 level of water demand will not be able to be met, and salmon habitat will be lost (see p.48).

FUTURE CLIMATE CHANGE IMPACTS ON WATER

BANGLADESH
Areas with increased rainfall and runoff will suffer from an enhanced risk of flooding. The impacts are likely to be especially harsh for regions like Bangladesh, which is already facing the pressures of rising sea level (see p.98).

AFRICA
The spread of disease will increase due to more heavy precipitation events in areas with poor water supplies and an overtaxed sanitation infrastructure.

SOUTH AMERICA
Aquifers will be depleted 75% by 2050.

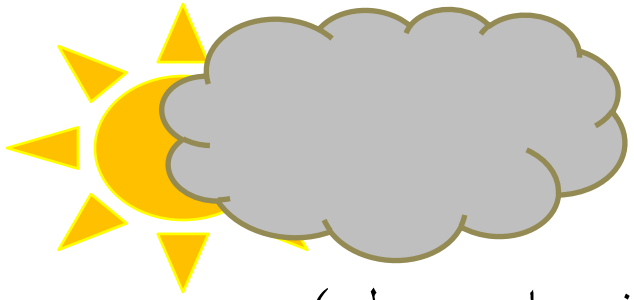
INDIA
In many coastal regions there will be plenty of water, but it will be the wrong kind! A sea level rise of 0.1 m by 2040–2080 will threaten the fresh water supply.

< -50 -30 -20 -10 -5 0 5 10 20 30 50 >
MEAN CHANGE OF ANNUAL RUNOFF, IN PERCENT, BETWEEN THE PRESENT (1981–2000) AND 2081–2100 (SRES A1B)

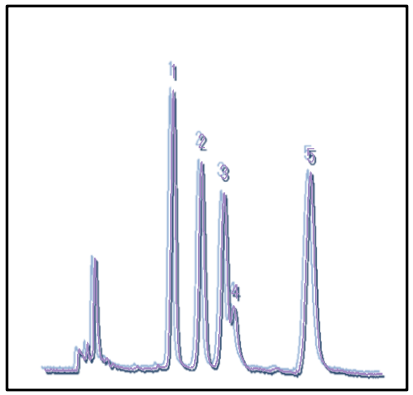
Water resources will shift, but not in society's favor.

https://www.e-education.psu.edu/meteo469/node/167

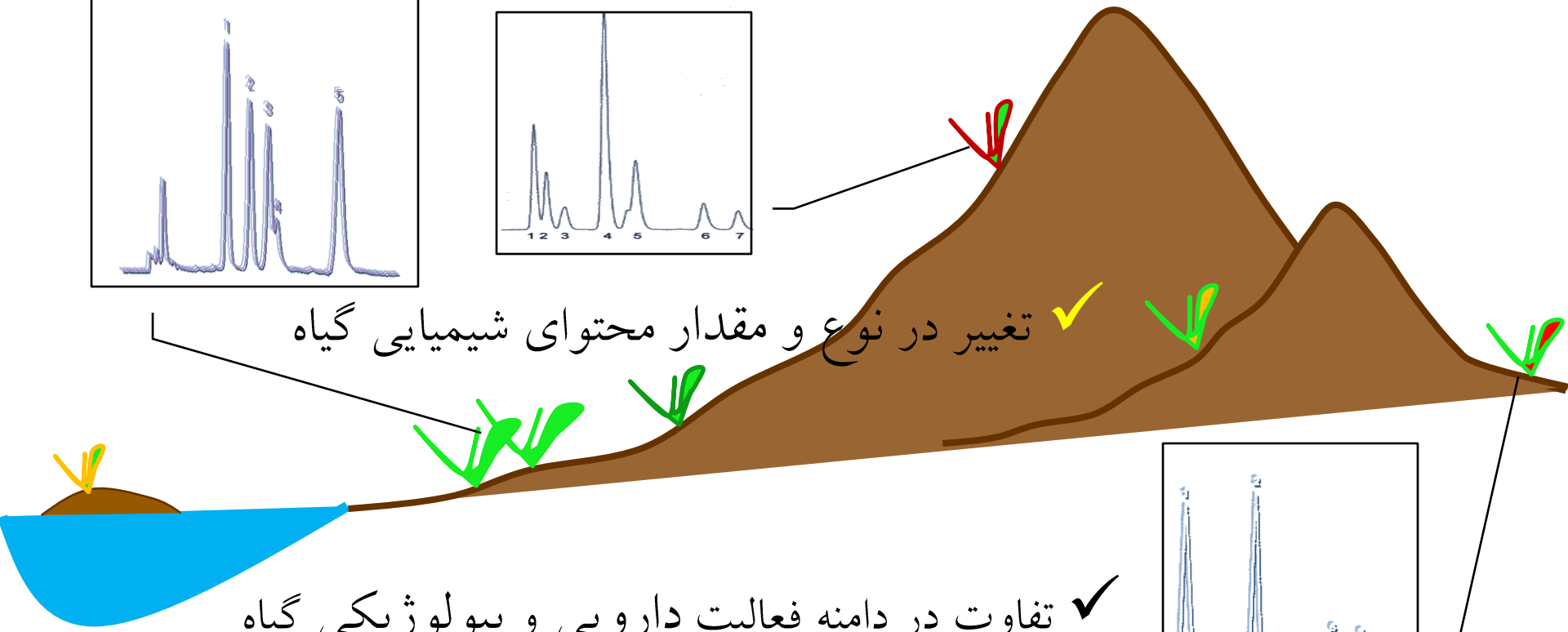
بيان موضوع (دليل انتخاب روش هاي بيوتكنولوژي براي توليد مواد دارويي)

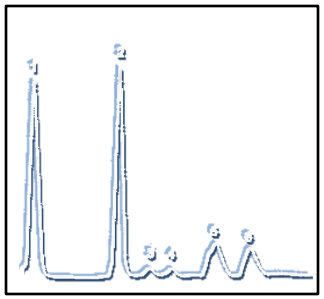


✓ شرایط اکولوژیکی مختلف (تنش های محیطی)



✓ تغییر در نوع و مقدار محتوای شیمیایی گیاه





✓ تفاوت در دامنه فعالیت دارویی و بیولوژیکی گیاه

بیان موضوع (انتخاب روش هاي بيوتكنولوژي براي توليد مواد دارويي)

تردید در بهره برداری از تودهٔ برتر در عرصه های طبیعی و کشت و صنعت

الگوهای رفتاری این توده ها به تغییرات محیطی

محتوای کم برخی از متابولیتهای دارویی با ارزش در مواد گیاهی

محدودیت منابع گیاهی (خطر نابودی ذخایر ژنتیکی)

پر هزینه بودن سنتز ترکیبات طبیعی

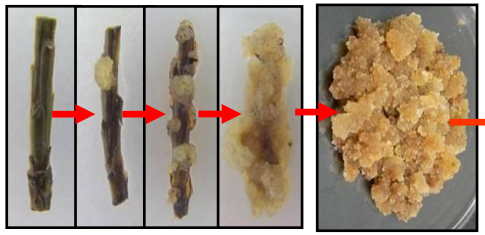
طی دو دهۀ گذشته

انتخاب روش های بیوتکنولوژی برای تولید مواد دارویی

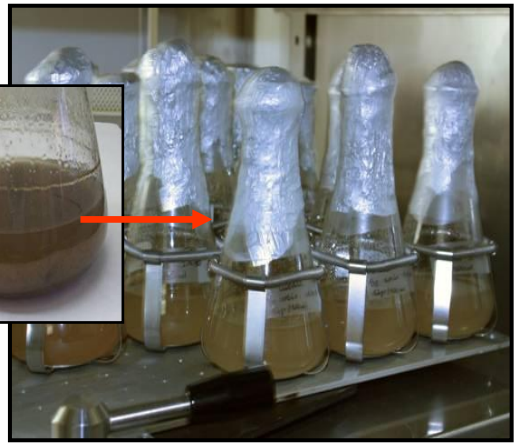
کشت سلول، بافت یا اندام گیاهان (شاخساره و ریشه) در شرایط درون شیشه ای

زراعت مولکولی (Molecular farming)، مهندسی متابولیک (Metabolic engineering)

Ramachandra Rao and Ravishankar (2002); Palazón et al. (2008)

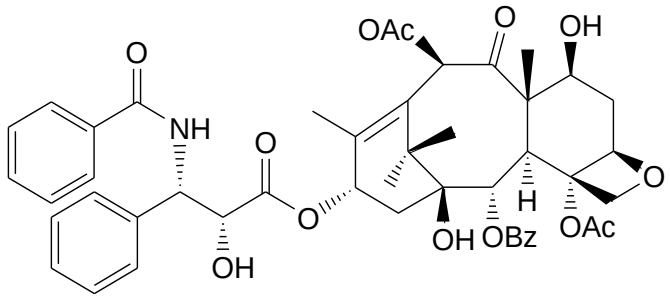


کشت سوسپانسیون سلولی

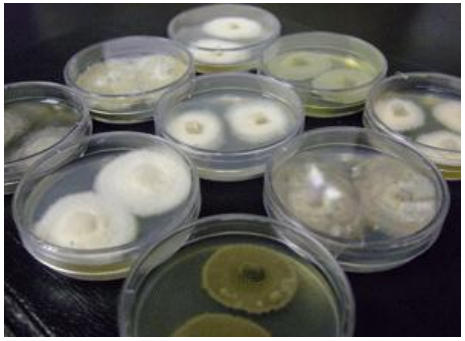


سنتز شیمیایی

برداشت درخت سرخدار از طبیعت



تاکسول (ترکیب ضد سرطان)



قارچ های اندوفیت درخت سرخدار

انتخاب یک روش بیوتکنولوژی

Micropropagation of medicinal plants

Endangered plants

High-yielding varieties

Plant cell tissue and organ culture

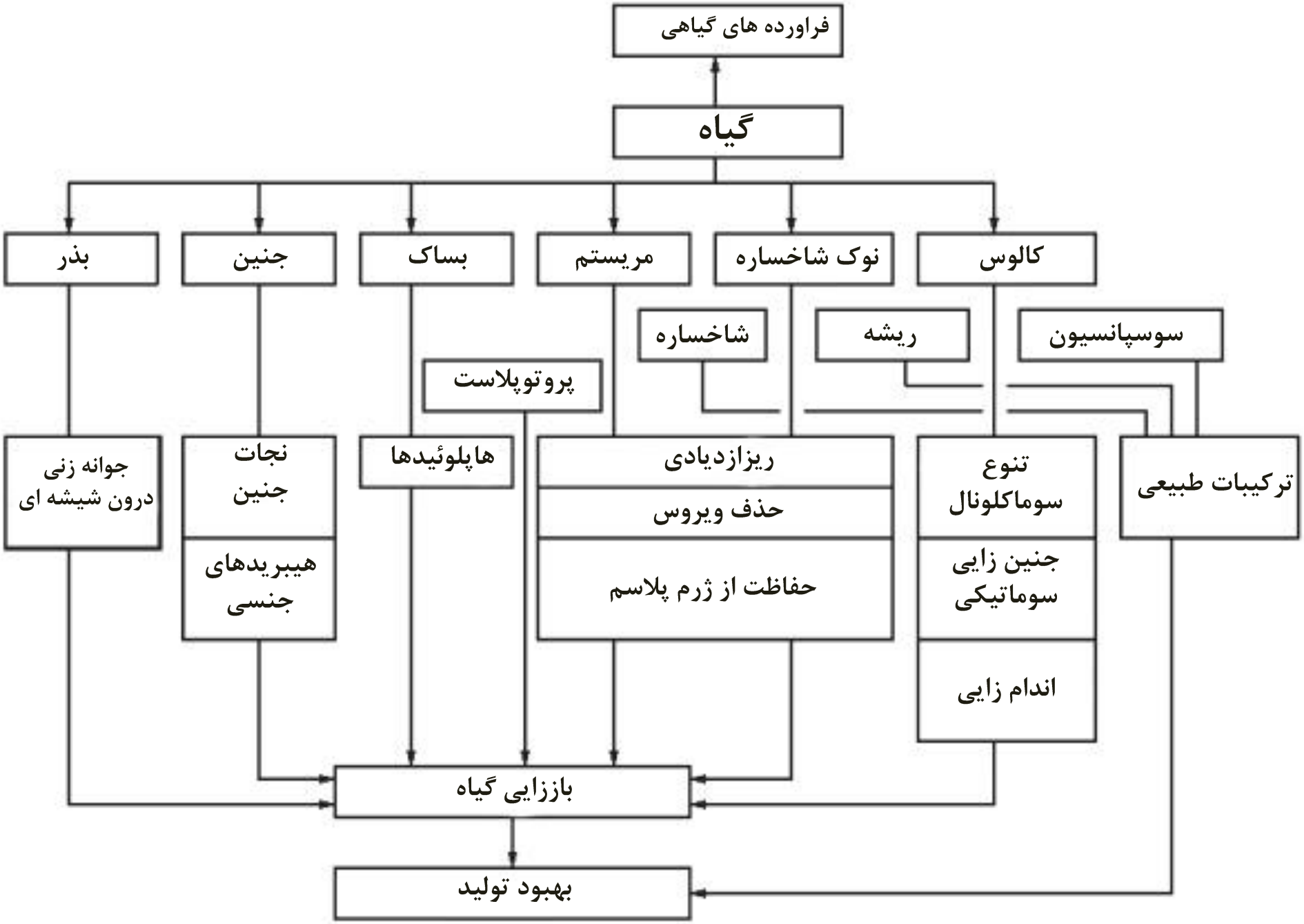
Cell culture

Hairy root culture

Transgenic plant/organism

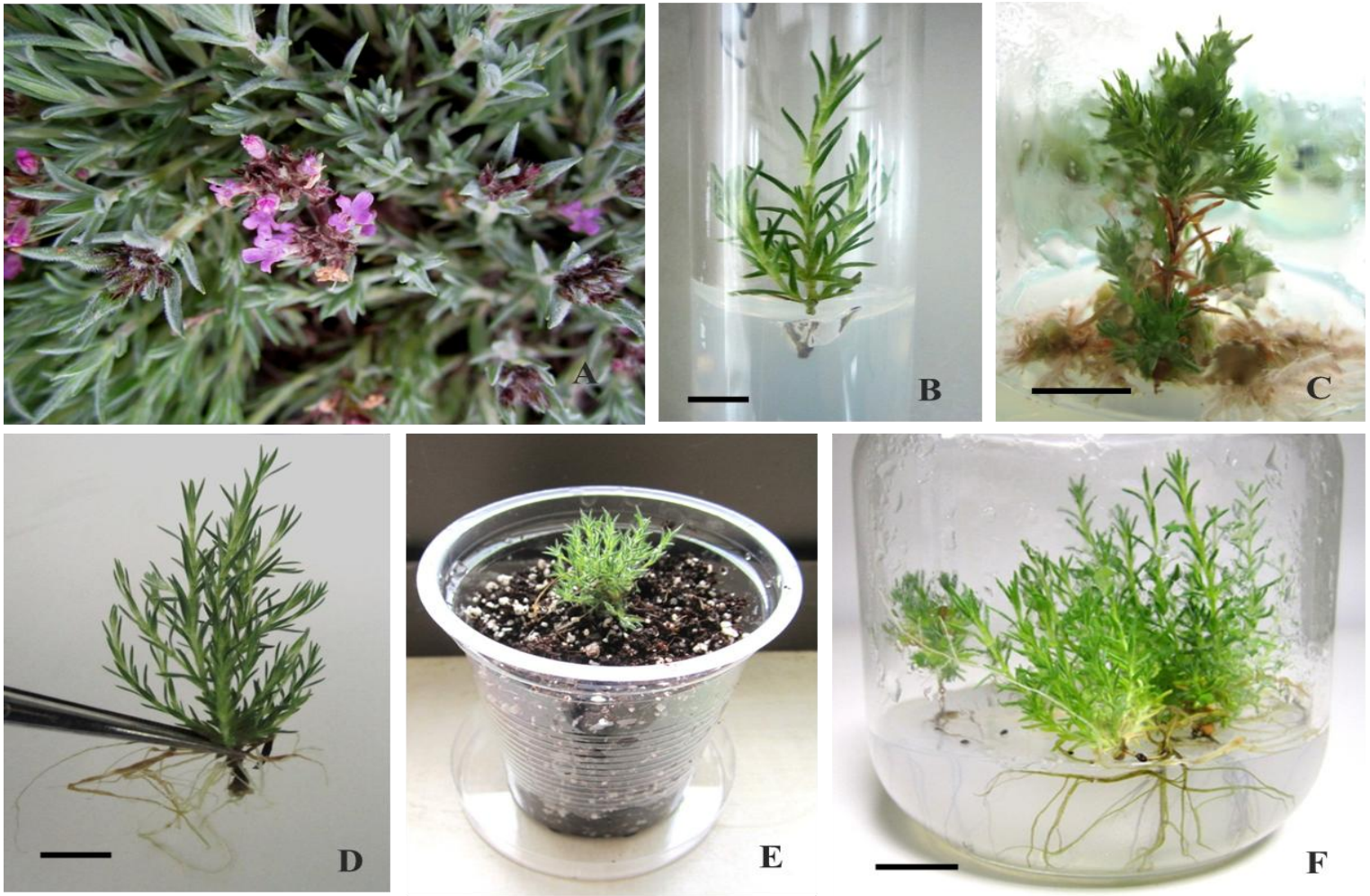
Metabolic engineering

Molecular farming


فراورده های گیاهی
گیاه
بذر
جنین
بساک
مریستم
نوک شاخساره
کالوس
شاخساره
ریشه
سوسپانسیون
پروتوپلاست
جوانه زنی درون شیشه ای
نجات جنین
هاپلوئیدها
ریزازدیادی
تنوع سوماکلونال
ترکیبات طبیعی
حذف ویروس
هیبریدهای جنسی
حفاظت از ژرم پلاسم
جنین زایی سوماتیکی
اندام زایی
باززایی گیاه
بهبود تولید

Micropropagation of medicinal plants

Endangered plants



Micropropagation of *Thymus persicus* - an endangered and potent natural source of anticancer pentacyclic triterpenoids from Iran

Micropropagation of medicinal plants

High-yielding varieties

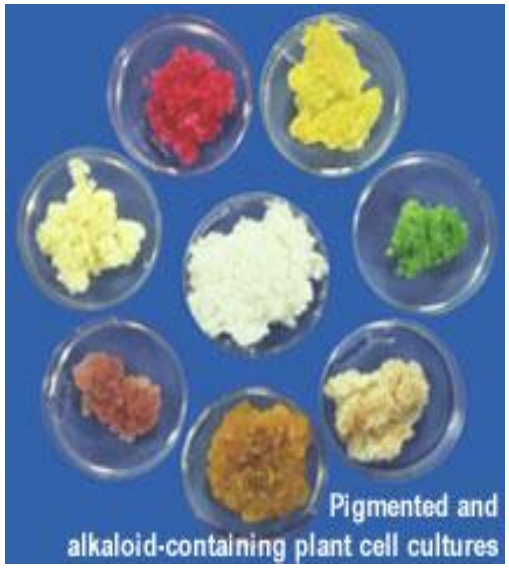
رقم آویشن دنایی با بیش از 5 درصد اسانس و با محتوای 80 درصد تیمول و 10 درصد کارواکرول

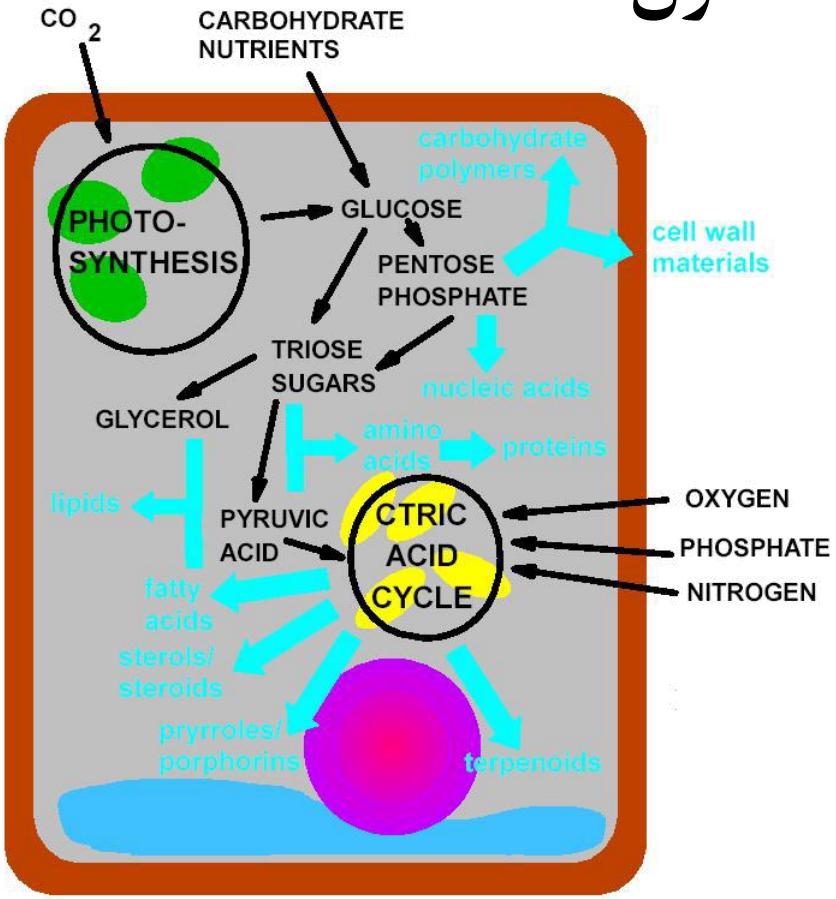
***In vitro* cloning of *Thymus daenensis* Celak subsp. *daenensis* – an important and endemic medicinal plant from Iran**

کشت سلول گیاهی (Plant cell culture)

ویژگي Totipotency سلول

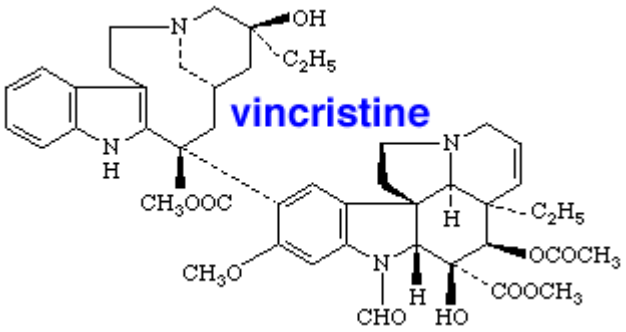
توانایی تولید دامنه وسیعی از متابولیتهای ثانویه گیاهان والد



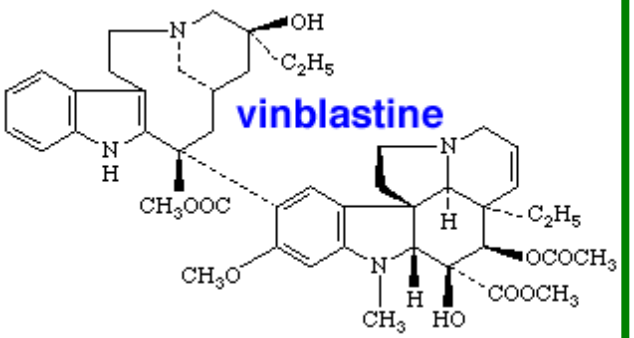


انتخاب کشت سوسپانسیون سلولي

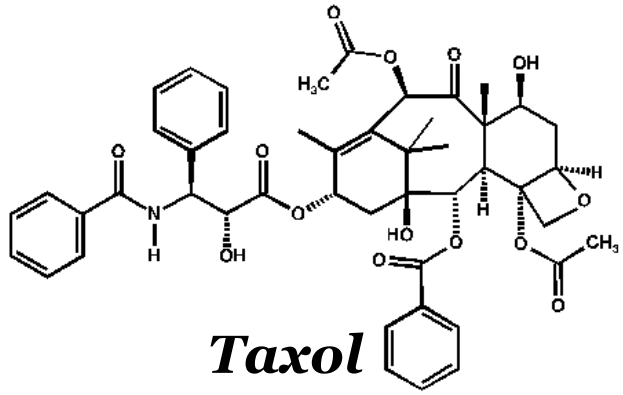
1. مستقل از تغییرات فصلی، جغرافیایی و فاکتورهای محیطی
2. وجود سیستم تولید مشخص برای تولید مداوم با کیفیت و عملکرد یکسان
3. امکان القاء جهش و نوآوری در تولید متابولیتهای جدید
4. امکان تکثیر سلول گیاهی برای تولید متابولیت ویژه
5. افزایش کیفیت پایدار ترکیبهای ثانویه با استفاده از لاینهای سلولی مشخص
6. تسهیل فراوری و بازیافت متابولیتها در محیط شیمیایی کنترل شده
7. تولید و باززایی مواد با سرعت بالا و هزینه کمتر
8. امکان مطالعه بیوترانسفورماسیون متابولیتهای ثانویه
9. وجود قابلیت زیست استحصالی مواد اولیه کم ارزش به ماده ای ارزشمند



Catharanthus roseus



- از گروه ایندول آلکالوئیدها
- شیمی درمانی سرطان خون
- در اندام هوایی و ریشه های گیاه پروانش (0/0005 درصد)
- سنتز مصنوعی بسیار طولانی و پرهزینه
- اولین گزارش کشت سوسپانسیون توسط Carew *et al.* (1966)
- تولید 2/8 mg/l در شرایط آزمایشگاهی (Smart *et al.* 1986)
- Fugita *et al.* (1990) تولید 230 mg/l در هفته را گزارش کردند
- شرکت Matsui ژاپن
- قیمت هر کیلوگرم بین 1 تا 3/5 میلیون یورو

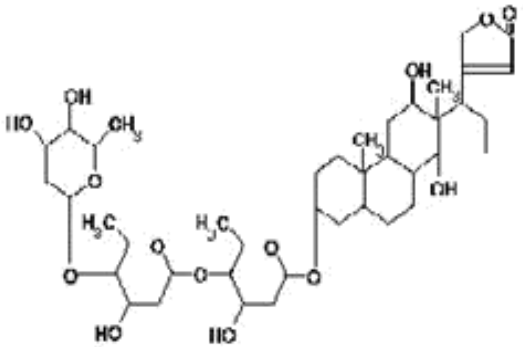


Taxol

Taxus baccata

- Wani *et al.* (1969)
- **تایید اثرات بالینی توسط سازمان غذا و داروی آمریکا** (1983)
- **در پوست شاخه های درخت سرخدار** (0/001 **درصد**)
- **سنتز مصنوعی** 20 **مرحله ای**
- **اولین گزارش کشت سوسپانسیون توسط** Christen *et al.* (1989)
- **تولید** 1/5 mg/l **از گونه** *Taxus baccata* (Srinivasan *et al.* 1995)
- Ketchum and Gibson (1996) **تولید** 14/8 mg/l **را گزارش کردند**
- Mulabaghal *et al.* (2004) **تولید** 200 mg/l **طی** 6 **هفته از کشت سلولی گونه** *T. maieri* **گزارش نمودند**

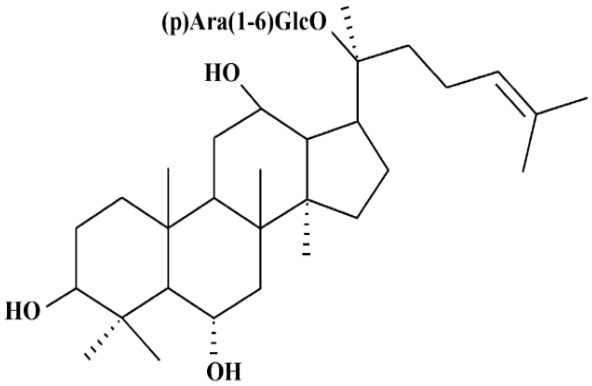
قیمت هر کیلوگرم 600 **هزار دلار**



Digoxin

Digitalis lanata

- گلیکوزید قلبی (کاردینولید ها)
- در اندام هوایی گیاه (0/4درصد)
- مصرف سالیانه حدود 6 تن به ارزش 50 میلیون دلار
- اولین گزارش کشت سوسپانسیون توسط Hildebrant *et al.* (1959)
- تولید 2/5 mg/l از گونه *Digitalis lanata* (Hagimori *et al.* 1990)
- Reinhard *et al.* (1996) تولید 0/8 g/l را از طریق بیوترانسفورماسیون گزارش کردند



Ginsenoside

Panax ginseng

- Shibata *et al.* (1965)
- نوعی ساپونین با ساختار گلیکوزیدی
- در ریشه های گیاه (0/7درصد)
- تاثیر بر روی سیستم عصبی و افزایش نیرو و کارایی
- اولین گزارش کشت سوسپانسیون توسط Kim *et al.* (1980)
- انتخاب لاین سلولی (KGC) توسط Choi et al. (1994)
- تولید 5/3 g/l طی سه هفته

گروهی از متابولیتهای ثانویه تولید شده از طریق کشت سوسپانسیون سلولی گیاهان

Phenylpropanoids	Alkaloids	Terpenoids	Quinones
Anthocyanins	Acridines	Carotenes	Antraquinones
Cumarins	Betalaines	Monoterpenes	Benzoquinones
Flavonoids	Quinolizidines	Sesquiterpenes	Naphtaquinones
Lignans	Isoqunolines	Diterpenes	
Phenolenones	Tropan alkaloids	Triterpenes	
Stilbenes	Purines		
Tanins	Indoles		

برخی از شرکت های خارجی پیشرو در تولید صنعتی متابولیت های ثانویه از طریق کشت های سوسپانسیون سلولی

Industrial production in plant cell cultures		
Company	**Product**	**Plant source**
Japan tobaco and Salt Pu. Co.	Ubiquinone 10	*Nicotiana tabacum*
Svoda Co., Moscú	Ginsenoside	*Panax ginseng*
Mitsui Petrochemical Ind. Ltd.	Shikonine	*Lithospermum erythorrizon*
Yamaguchi Co.	Berberine	*Coptis japonica*
Nattermann, RFA	Rosmarinic acid	*Coleus blumei*
Nitto Denko Corp.	Ginsenoside	*Panax ginseng*
Mitsui Petrochemical Ind. Ltd.	Purpurine	*Rubia akanae*
Mitsui Petrochemical Ind. Ltd.	Taxol®	*Taxus media*
Phyton Inc.	Taxol®	*Taxus brevifolia*
Nitto Electric Ind. Co. Ltd.	Anthocyanins	*Ipomea batata*
Nippon Paint Co. Ltd.	Anthocyanins	*Euphorbia milii*
Shiseido Co. Ltd.	Pigment	*Corydalis ambiqua*
Mitsui Chemicals Ind.	Berberine	*Coptis japonica*
Mitsui Chemicals Ind	Arbutine	*Datura inoxia*

انتخاب نمونه گیاهی برتر

(غربالگری جمعیتهای مختلف بر اساس کمیت و کیفیت متابولیت ثانویه)

گزینش لاین سلولی برتر

(کالوس زایی و غربالگری کلونی های سلولی مختلف بر اساس متابولیت ثانویه)

بهینه سازی شرایط کشت درون شیشه ای

(نوع محیط کشت، ترکیب پیش ماده های غذایی، ویتامینها، تنظیم کننده های رشد و کلیمای کشت)

افزایش راندمان تولید وطراحی بیوراکتور

(انگیزش، غیرمتحرک سازی، بیوترانسفورماسیون و مهندسی متابولیک)

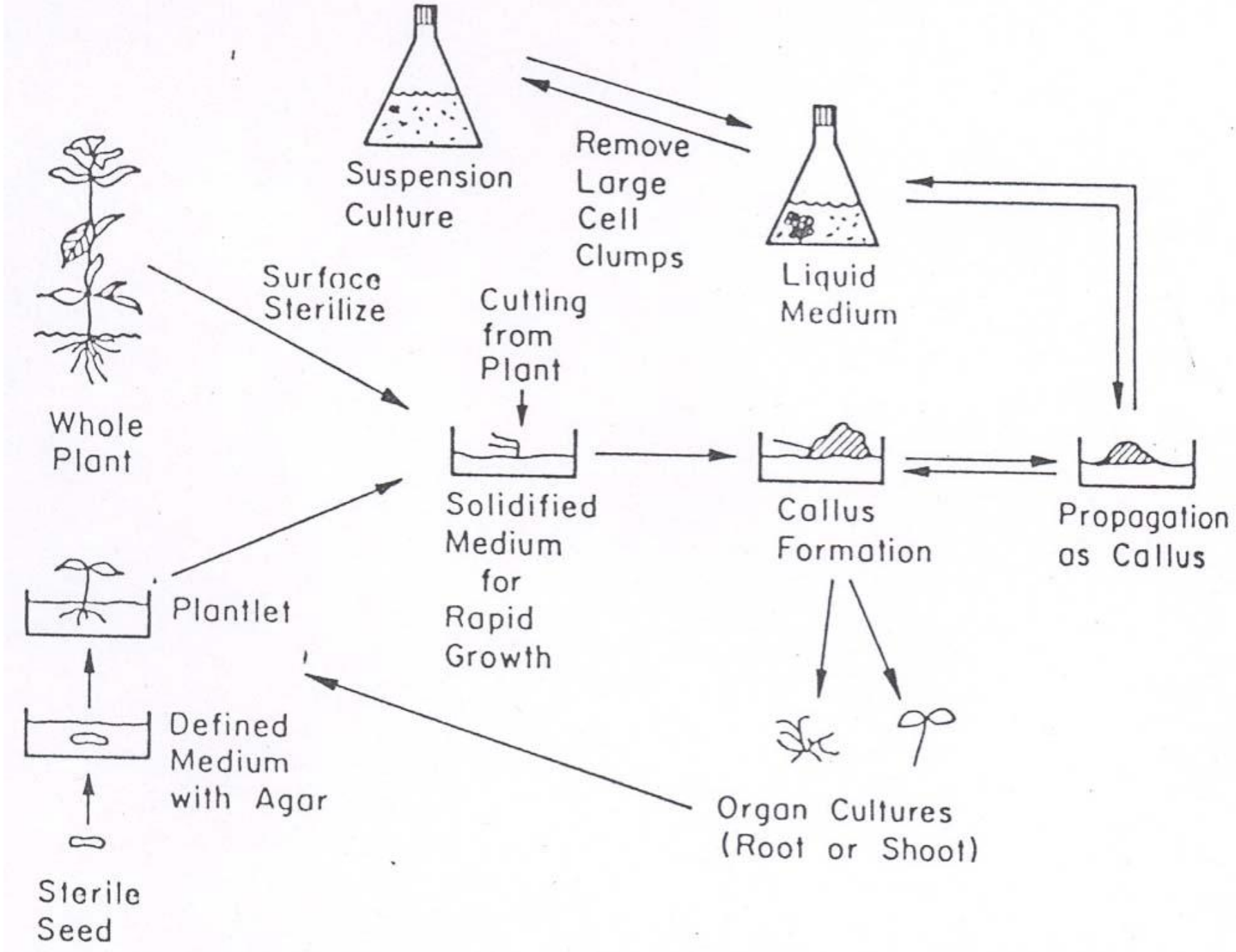
Optimization of the culture system:

- **Selection** of cell lines with high production
- **Optimization** of growth and production media
- Addition of biosynthetic **precursors**
- Induction of secondary plant metabolic pathways using **elicitors**.
- Increasing the release of secondary compounds from cells

Two examples comparing the metabolite content and productivity between the plant and the cell suspension culture

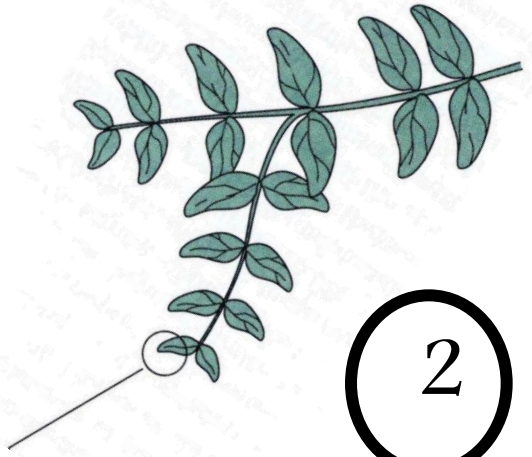
Species	Compound	Culture	Age (Weeks)	Content %	Content improved	Productivity mg/g/week	Improved productivity
Coptis japonica	**Berberine**	Plant	260	3	x 4,4	0,083	530
		CS	2	13,2		44	
Lithospermum erythrorhizon	**Shikonin**	Plant	312	1,53	x 8	0,048	1250
		CS	2	12		60	

CS: Cell Suspension


Suspension Culture
Remove Large Cell Clumps
Liquid Medium
Surface Sterilize
Cutting from Plant
Whole Plant
Solidified Medium for Rapid Growth
Callus Formation
Propagation as Callus
Plantlet
Defined Medium with Agar
Organ Cultures (Root or Shoot)
Sterile Seed

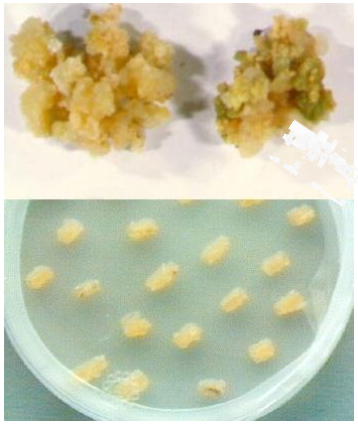
1

انتخاب نمونه گیاهی برتر



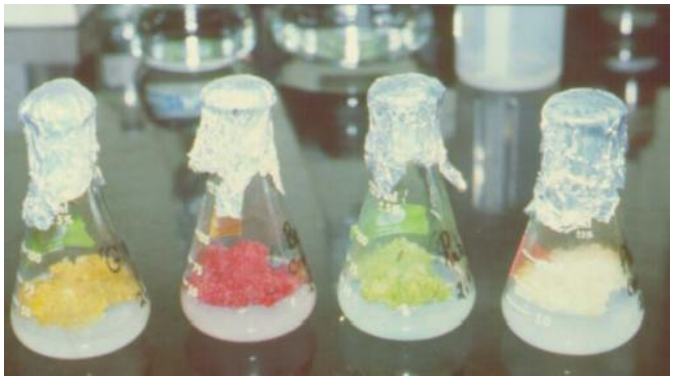
2

کالوس زایی و غربالگری کلونیهای سلولی



3

بهینه سازی شرایط کشت سوسپانسیون



4

طراحی بیوراکتور (تولید انبوه)

تهیه ریزنمونه گیاهی

(شستشو و ضد عفونی سطحی با استفاده از انواع مواد ضدعفونی کننده)

بهینه سازی شرایط القای کالوس

(بسته به گونه گیاهی باید انواع محیط های کشت و تنظیم کننده های رشد استفاده شود)

بهینه سازی شرایط رشد و نگهداری توده سلولی

(نوع محیط کشت، ترکیب پیش ماده های غذایی، ویتامینها، تنظیم کننده های رشد و کلیمای کشت)

ارزیابی تولید بیوماس و الگوی تولید متابولیت ثانویه

(نوع محیط کشت، ترکیب پیش ماده های غذایی، ویتامینها، تنظیم کننده های رشد و کلیمای کشت)

مطالعه و انتخاب بهترین شرایط تولید متابولیت ثانویه

(انگیزش، غیرمتحرک سازی، بیوترانسفورماسیون ، مهندسی متابولیک و افزایش حجم کشت)

ردیف	ماده استریل کننده	غلظت مورد نیاز (٪)	مدت زمان تیمار (دقیقه)	میزان تاثیر
1	هیپوکلریت کلسیم	9-10	5-30	خیلی خوب
2	هیپوکلریت سدیم	0/5-5	5-30	خیلی خوب
3	پراکسید هیدروژن	3-12	5-15	خوب
4	نیترات نقره	1	5-30	خوب
5	کلرید جیوه	0/1-1	2-10	عالی
6	آب برم	1-2	2-10	خیلی خوب
7	الکل اتیلیک	70-95	از چند ثانیه تا چند دقیقه	خوب

ردیف	مواد گیاهی	مدت زمان تیمار (دقیقه)	غلظت مورد نیاز (٪)
1	ساقه های چوبی	30	1
2	ساقه های علفی	20	1
3	برگهای فلس دار	15	1
4	برگهای علفی	10	1
5	جوانه های گل باز شده	15	1
6	جوانه های گل باز نشده	20	2
7	پیاز ها و غده ها	15	1
8	بذور	30	1

کشت بافت و سلول گیاهی (مراحل تهیه محیط کشت)

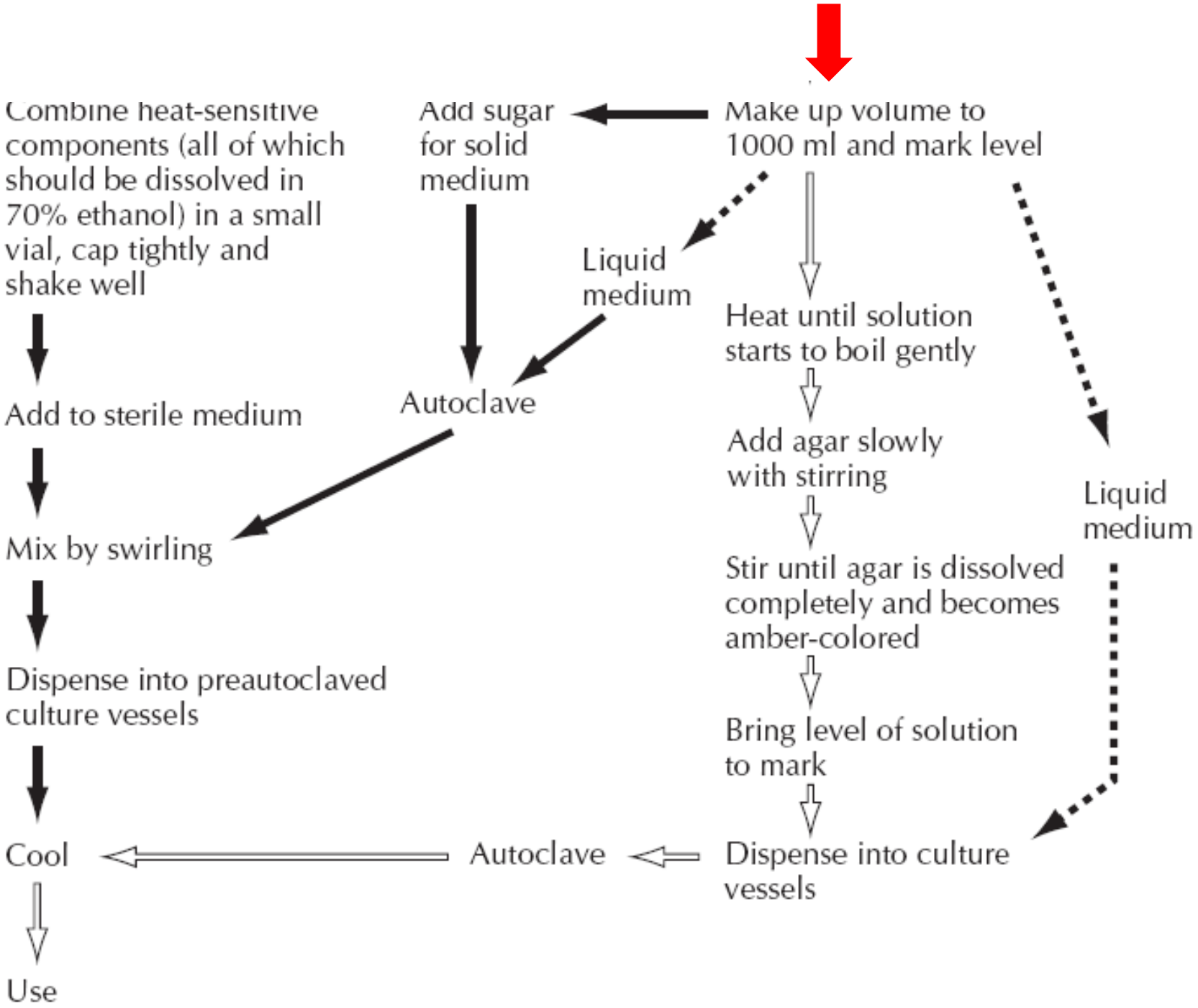
1 Pour 250 ml distilled water into a 2 l beaker

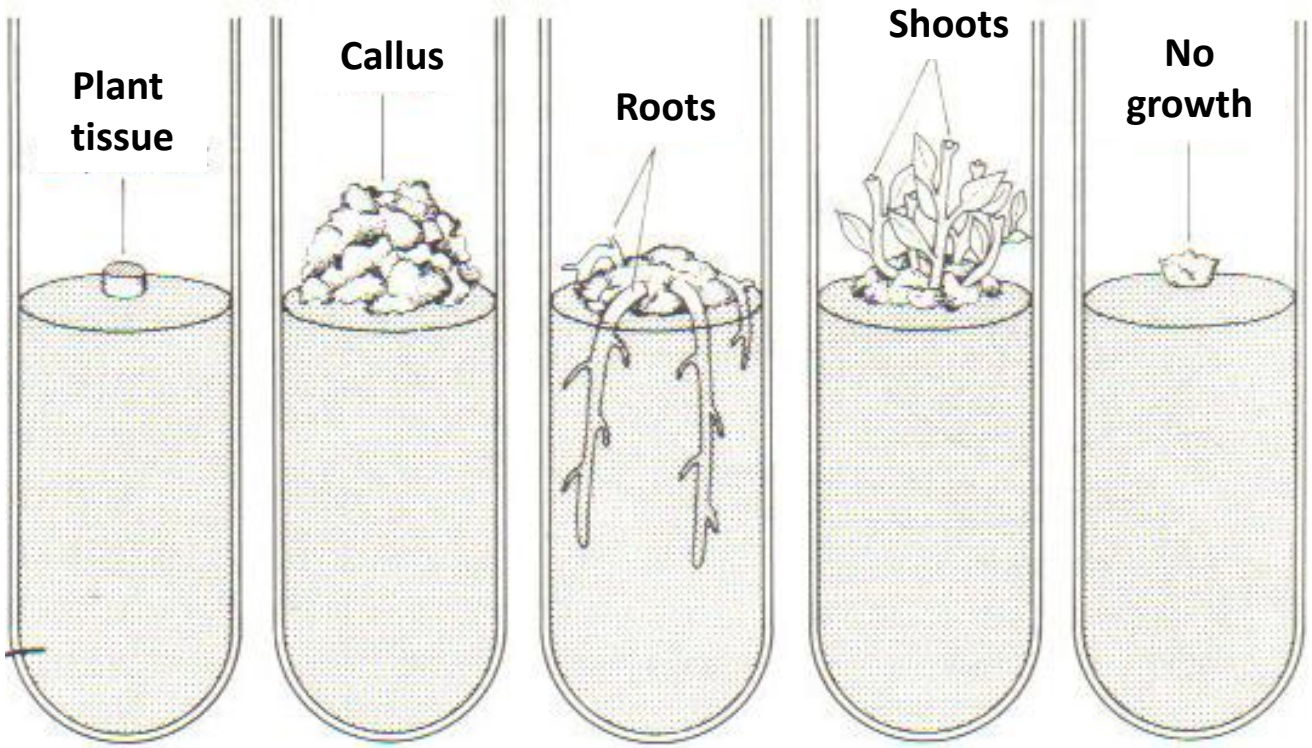
2 Add all heat-stable components (use stock solutions for efficiency, accuracy, and convenience)

3 Bring total volume to 900 ml

4 Measure and adjust pH

5 Add sugar


Make up volume to 1000 ml and mark level
Add sugar for solid medium
Liquid medium
Heat until solution starts to boil gently
Add agar slowly with stirring
Stir until agar is dissolved completely and becomes amber-colored
Bring level of solution to mark
Dispense into culture vessels
Liquid medium
Autoclave
Cool
Use
Combine heat-sensitive components (all of which should be dissolved in 70% ethanol) in a small vial, cap tightly and shake well
Add to sterile medium
Mix by swirling
Dispense into preautoclaved culture vessels



Nutrient agar					
Auxin	[mg·l^{-1}]:	3	3	0.003	—
Kinetin	[mg·l^{-1}]:	0.2	0.02	1	0.2
		0.003	**150**	**15**	**Ratio:**

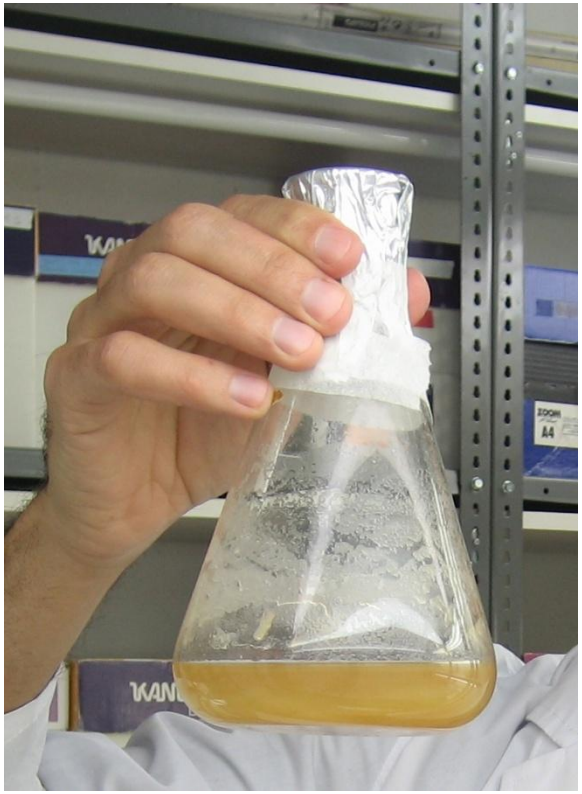
High auxin:cytokinin ratio: root **Low auxin/cytokinin ratio:** shoot

Intermediate levels: callus

ردیف	نام هورمون	علامت اختصاری	غلظت مورد استفاده (میکرو مولار)	روش استریل کردن
1	کلروفنوکسی استیک اسید	CPA	0/5-50	اتوکلاو
2	2 و 4 دی کلرو فنوکسی استیک اسید	2,4-D	0/5-15	اتوکلاو
3	ایندول 3 استیک اسید	IAA	0/5-15	اتوکلاو/صافی
4	ایندول 3 استیل ال آلانین	IAA-L-Al	0/5-25	صافی
5	ایندول 3 استیل ال آسپاراتیک اسید	IAA-L-As	0/5-25	صافی
6	ایندول 3 استیل گلیسین	IAA-Gl	0/5-25	صافی
7	ایندول 3 استیل ال فنیل آلانین	IAA-Ph	0/5-25	صافی
8	ایندول 3 بوتیریک اسید	IBA	0/5-50	اتوکلاو
9	نفتالن استیک اسید	NAA	0/5-50	اتوکلاو
10	نفتوکسی استیک اسید	NOA	0/5-50	اتوکلاو

ردیف	نام هورمون	علامت اختصاری	غلظت مورد استفاده (میکرو مولار)	روش استریل کردن
1	آدنین	-	250-1250	اتوکلاو
2	آدنین همی سولفات	-	250-1250	اتوکلاو
3	6-بنزیل آمینو پورین	BA	0/5-25	صافی
4	6-بنزیل آدنین	BAP	0/5-25	اتوکلاو
5	6-گاما دی متیل آمینو پورین	2ip	5-150	اتوکلاو
6	کینتین	KI	0/5-25	اتوکلاو
7	کینتین ریبوزاید	-	0/5-25	صافی
8	زآتین	-	0/5-25	صافی

تهیه کشت سوسپانسیون سلولی



راهکارهای افزایش متابولیتهای ثانویه در کشت سوسپانسیون

1. همزمان سازی شرایط سلول ها
2. بهینه سازی شرایط کشت

- نوع محیط کشت (مقدار قند، عناصر غذایی، تنظیم کننده های رشد و pH)
- پیش ماده غذایی
- کلیمای کشت (نوع ظروف کشت، درجه حرارت و نور)

3. انگیزش (Elicitation)
4. نفوذ پذیر کردن سلول ها
5. غیر متحرک سازی (Immobilization) سلول های گیاهی
6. بیوترانسفورماسیون (Biotransformation)

همزمان سازی شرایط کشت سلول ها

یک کشت همزمان (Synchronous culture)، نوعی کشت است که در آن چرخه سلولی و یا یک مرحله خاص از چرخه سلولی اکثر سلول ها همزمان است و اکثر سلول ها مراحل چرخه سلولی خود را بطور همزمان طی می کنند.

- سرما دادن ← محیط کشت به مدت چند روز در دمای 4 درجه سانتی گراد
- گرسنگی دادن ← حذف مواد غذایی ضروری و افزودن مجدد آنها به محیط کشت
- استفاده از بازدارنده ها

بلوکه کردن موقت سنتز DNA

کاربرد مواد غذایی و تنظیم کننده های رشد

- تاثیر سطوح مختلف قند

در محیط کشت ***Coleus blomei*** ساکارز 5/2 و 5/7٪ ← تولید 0/8و 3/3 گرم در لیتر رزمارینیک اسید

بالاترین تجمع ایندول آلکالوئید در گیاه ***Catharanthus roseus*** در محیط کشت حاوی 8٪ ساکارز

- تاثیر سطوح نیتروژن محیط کشت

سطوح مختلف آمونیوم و نیترات در محیطهای سوسپانسیون سلولی تولید متابولیتهای شیکونین، بتاسیانین، اوبیکونین و بربرین را تغییر می دهند

سطوح کم نیتروژن محیط کشت ← تحریک تولید

- کاپسایسین در گیاه ***Capsicum frutescens***
- آنتراکینون در گیاه ***Morinda citrofolia***
- آنتوسیانین در گونه های ***Vitis sp.***

حذف کامل نیتروژن در محیط کشت گیاه ***Chrysanthemum cinerariaefolium*** ← کاهش 2 ٪ پیرترین

- تاثیر سطوح فسفر محیط کشت

مقادیر مختلف فسفر در محیط کشت بر روی رشد سلول ها و تولید متابولیتهای ثانویه موثر است

سطوح کاهش یافته فسفر در محیط کشت ← **کاهش تولید**

- **آجمالایسین در *Catharanthus roseus***
- **پوترسین در *Nicotinia tabacum***
- **بتاسیانین در *Beta vulgaris***

افزایش مقدار فسفر در محیط کشت ← **افزایش تولید**

- **دیجیتوکسین در *Digitalis purpurea***
- **آنتوسیانین در *Chenopodium rubrum***

– تاثیر تنظیم کننده های رشد

یک فاکتور حیاتی در تولید و تجمع متابولیتهای ثانویه در شرایط درون شیشه ای می باشند

نوع و مقدار اکسین و سیتوکینین یا نسبت آنها، تشکیل و تجمع متابولیتهای ثانویه را تغییر می دهد

توفوردی (2,4-D) در بسیاری از موارد از تولید متابولیتهای ثانویه جلوگیری می کند

تحریک مثبت توفوردی در کشت سوسپانسیون سلولی ← **کارتنوئید در *Daucus carota***

آنتوسیانین در *Oxalis linearis*

تحریک مثبت NAA یا IAA در تولید ← **آنتوسیانین در *Daucus carota***

بتاسیانین در *Portulaca sp.*

نیکوتین در *Nicotinia tabacum*

آنتراکینون در *Morinda citrofolia*

هورمونهای GA و ABA تولید برخی از متابولیتهای ثانویه را در کشتهای سوسپانسیون متوقف می کنند

– تاثیر پیش ماده غذایی

فنیل آلانین ← تولید اسید رزمارینیک در *Coleus blumei* و *Salvia officinalis*

پیش ماده ایزوکاپریک ← تولید کاپسایسین در *Capsicum frutescens*
افزایش تولید وانیل

افزودن اسید فرولیک به محیط کشت سوسپانسیون *Vanilla planifolia*

دی هیدرو کوارستین ← افزایش تولید آنتوسیانین در کشت سوسپانسیون هویج

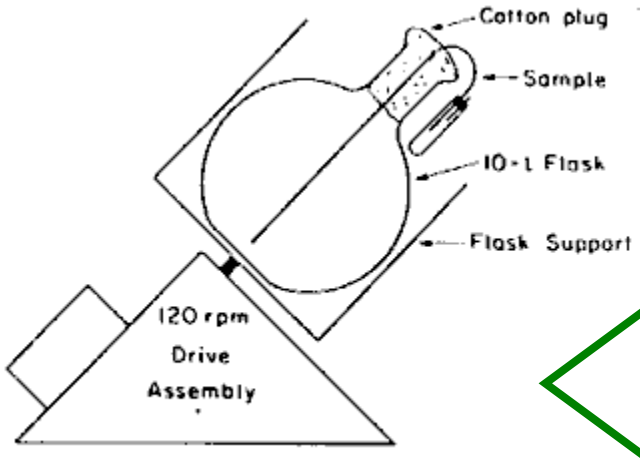
بهینه سازی کلیمای کشت

– نوع و اندازه ظروف کشت

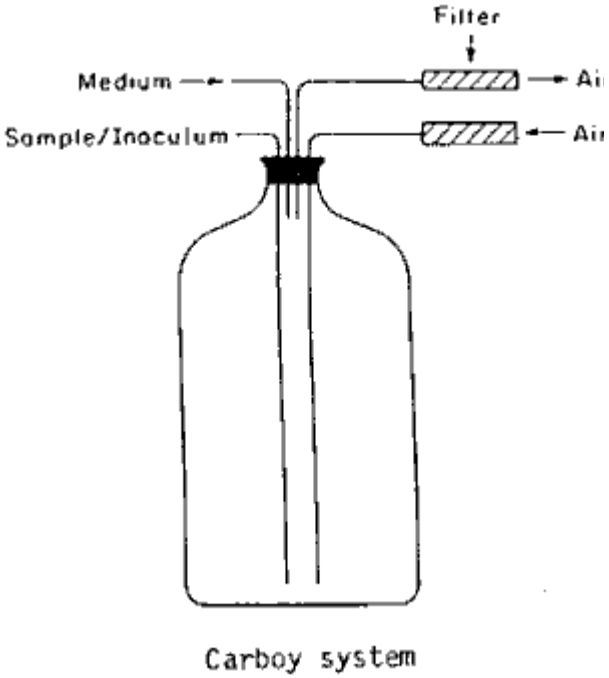
تغییر تولید آنتراکینون در کشت سوسپانسیون

سلولی گیاه *Morinda citrofolia*

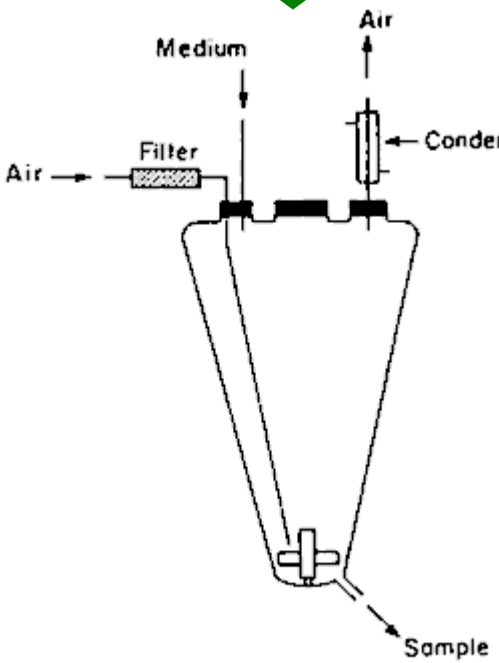
از سال 1950



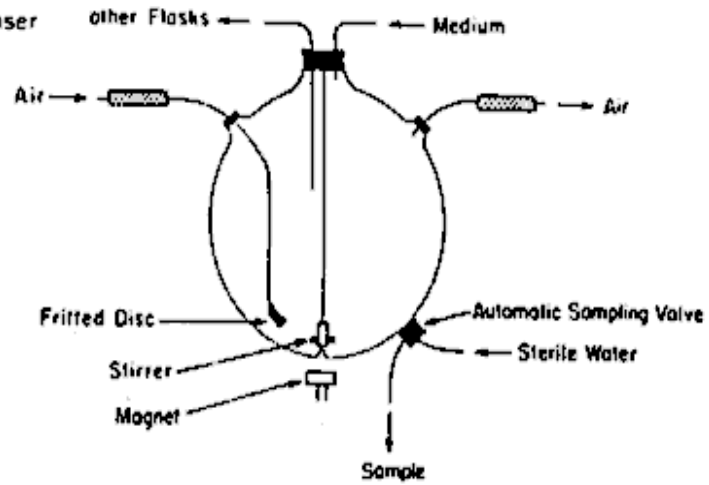
Roller flask system



Carboy system



V-Shape reactor



Continuous fermentor of Miller

درجه حرارت

درجه حرارت مناسب برای هرگونه گیاهی در کشت سوسپانسیون متفاوت است

محدوده دمایی 25-17 درجه سانتی گراد برای القاء بافت کالوس و رشد سلولها مناسب است

کاهش دمای محیط کشت، کل مقدار اسید چرب را در سلول از نظر وزن خشک افزایش می دهد

دمای 19 درجه سانتی گراد باعث ترانسفورماسیون طبیعی دیجیتوکسین به دیگوکسین می شود

در دمای 32 درجه تشکیل پورپورآکلیکوزید A در کشت سلولی گیاه ***Digitalis lanata*** افزایش می یابد

تولید 12 برابری مقدار برخی از آلکالوئیدهای گیاه ***Catharanthus roseus*** در دمای 16 درجه سانتی گراد

– نور

تحریک تجمع آنتوسیانین به مقدار زیادی در کشت سلولی هویج و هیبریدهای انگور

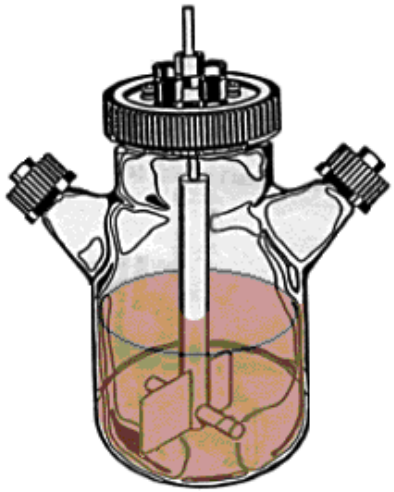
تشکیل سزکوئی ترپنها در کشت کالوس گیاه بابونه (*Matricaria chamomilla*)

فقدان نور در کشت کالوس گیاه *Citrus limon* از تجمع مونوترپنها جلوگیری می کند

– تاثیر هوادهی (بهم زدن) محیط کشت

هوادهی سریع در محیط کشت سوسپانسیون باعث افزایش تولید و تجمع آلکالوئیدهای گیاهی می شود.

دی اکسید کربن ← (تحریک تولید) مونوترپنها بویژه ترکیب لینالول در کشت سوسپانسیون سلولی انگور



این گاز در سطح 2٪ برای جلوگیری از تیره شدن سلولها و همچنین

تولید بربرین در *Thalictrum minus* در بیوراکتور ضروری است

– pH

تغییرات pH محیط کشت سوسپانسیون، pH سیتوزول سلول را تغییر می دهد

کاهش تولید قند در کشت سوسپانسیون سلولی نیشکر با افزایش مقدار pH

تاثیر انگیزش (Elicitation)

تولید متابولیتهای ثانویه گیاهی به عنوان یک مکانیسم دفاعی در برابر حمله عوامل بیماریزاست

ترکیبهایی با منشاء بیماریزایی (Elicitors) به تحریک تولید متابولیتها در کشت سوسپانسیون می انجامد

این مواد (زنده و غیرزنده) سیگنالهایی هستند که باعث تشکیل متابولیتهای ثانویه می شوند

- منشاء قارچی، باکتریایی و مخمری
- نمکهای سنگین (As, Cu, Cd)
- پلی ساکاریدها (زانتان و چیتوزان)، گلیکوپروتئینها و آنزیمها

سوسپانسیون سلولی گیاه ***Papaver somniferum*** میسلیوم قارچ ***Botrytis*** افزایش سن کوئنارین به

میزان بیش از 3% در وزن خشک سلول

تیمار کشت ریشه تاتوره با نمکهای مس و کادمیوم باعث القا تجمع سریع سطوح بالایی از ترکیبات دفاعی سزکویی ترپنوئیدها شده است

نفوذ پذیری سلولها در کشت سوسپانسیون

متابولیتهای ثانویه درون واکوئلها ذخیره می شوند

نفوذ پذیری غشاء پلاسما و تونوپلاست بستگی به ساختار منافذ در سیستمهای غشایی دارد

- حلالهای آلی ایزوپروپانول و دی متیل سولفوکساید (DMSO)

- پلی ساکاریدها (چیتوزان)

- الکتروپوریشن و پالسهای الکتریکی قوی و فشارهای فوق العاده زیاد

غیرمتحرک سازی (Immobilization) سلولها

یک سلول یا یک آنزیم فعال (از لحاظ کاتالیزوری) تحت یک سیستم ثابت محصور شده و از ورود آن به فاز مایع جلوگیری می شود

سلولهای گیاهی غیرمتحرک شده برای بیوترانسفورماسیون یک یا چند پیش ماده به محصولات مورد نظر مورد استفاده قرار می گیرند

- آلجینات کلسیم، آگار، آگارز، ژلاتین، کاراجینان و پلی اکریل آمید

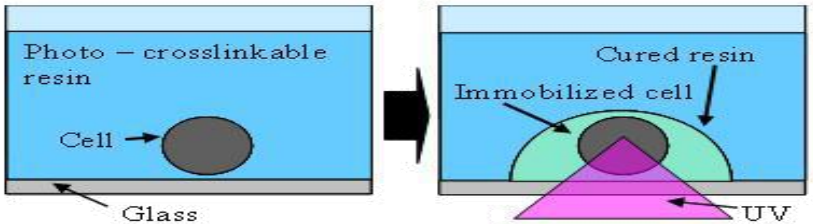


Fig. 1 A schematic of immobilization of cell by local polymerization

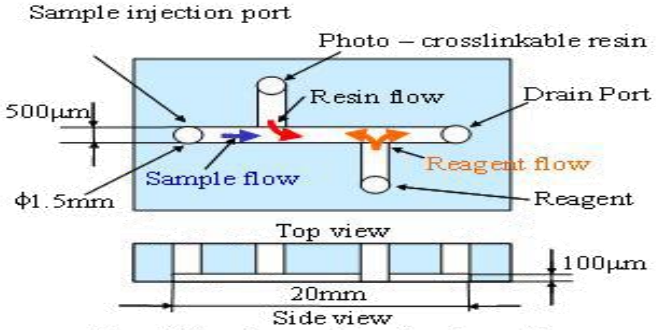
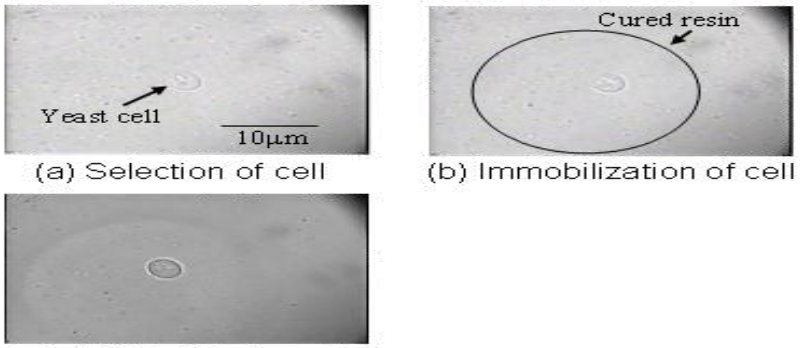
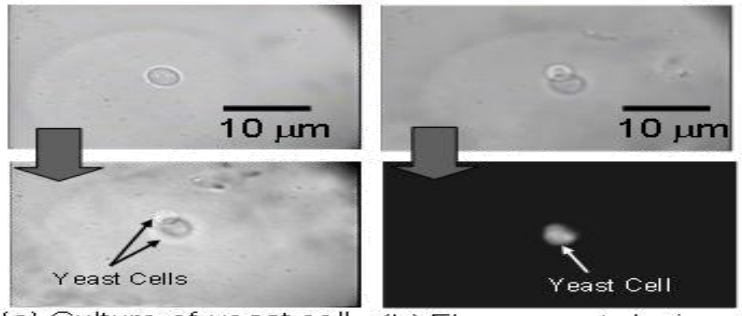


Fig. 2 A schematic of microchip



(a) Selection of cell (b) Immobilization of cell (c) After cleaning

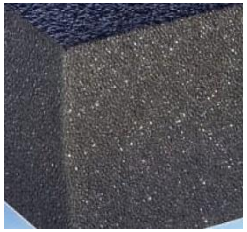
Fig. 3 Experiment result of immobilization of cell



(a) Culture of yeast cell (b) Fluorescent dyeing

Fig. 4 Single cell experiment using immobilized cell

Immobilization systems



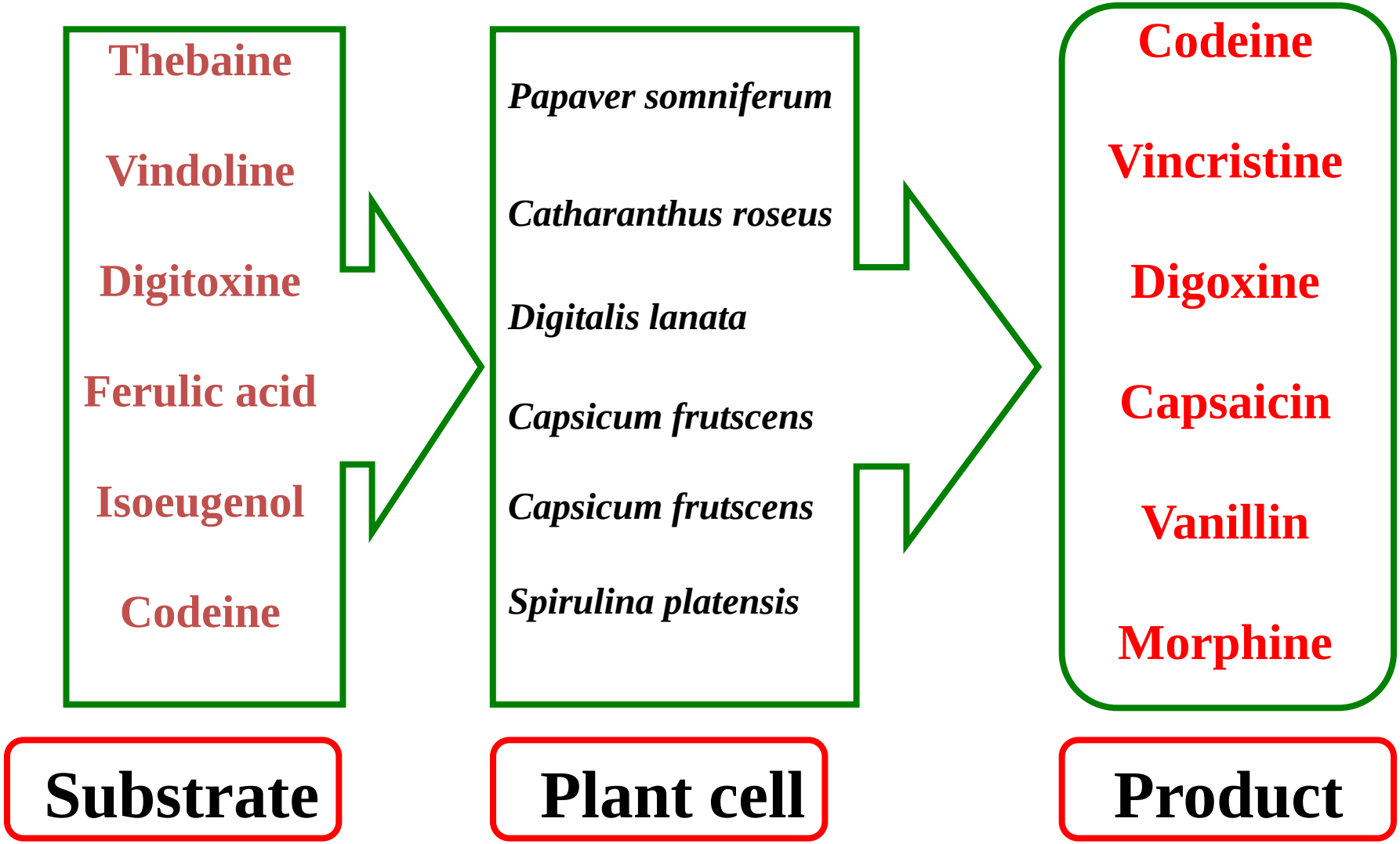
- Inert matrix:
  - Polyurethane
  - Glass fiber

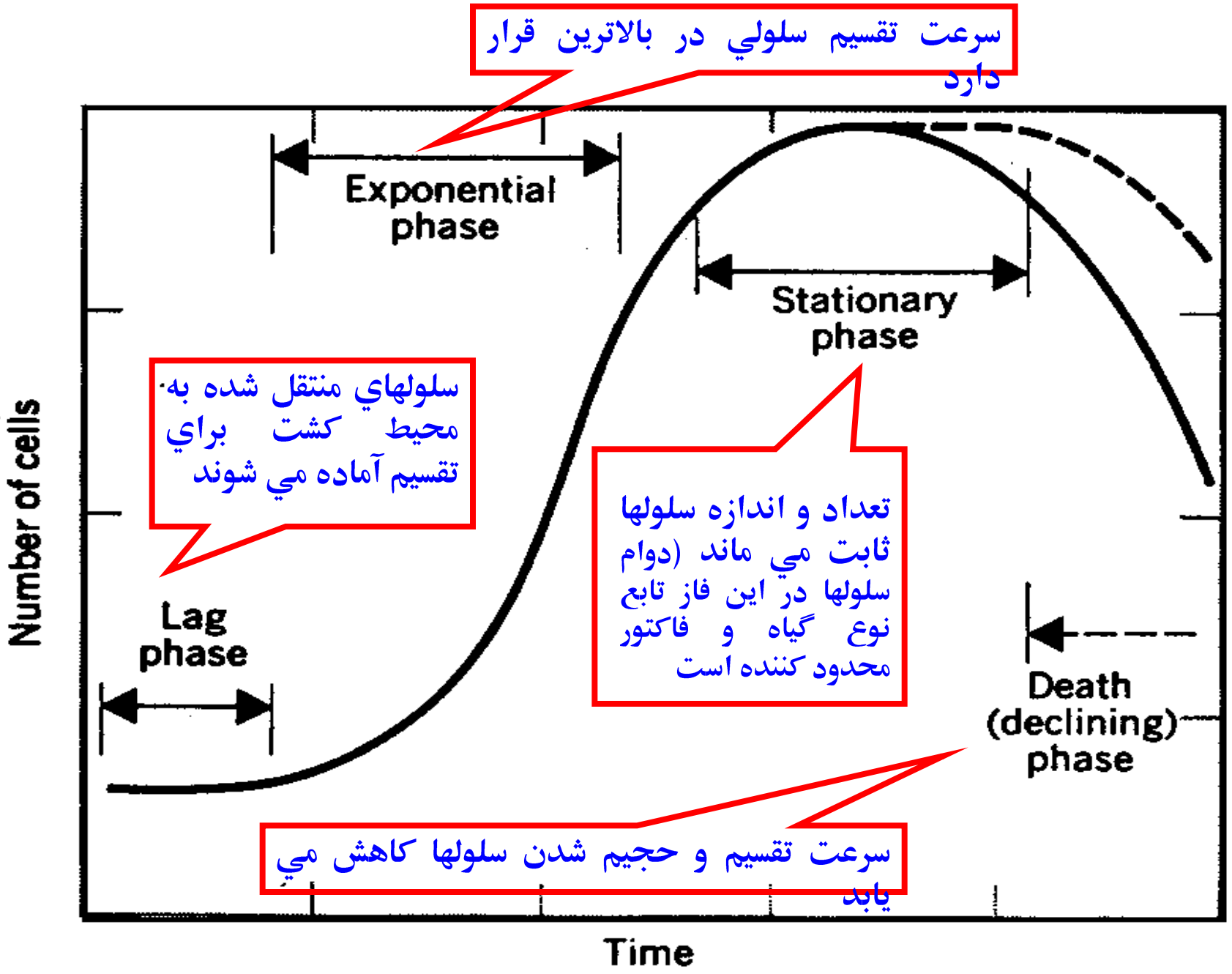
- Gelling agents:
  - Alginate (1-2%)
    Composition: Glucuronic acid+ Mannuronic acid
    Gel with Ca^{2+} (0,2-0,3 M)
  - Carragenins (3%)
    Polyssacharide polysulfonate
    Gel with K^{+} (0,3 M)
  - Agarose (3%) T° gelification 35°C
    Agar (2-5%) T° gelification 45°C

غیرمتحرک سازی (Immobilization) سلولها

Microencapsulation in alginate of a *Taxus baccata* cell culture

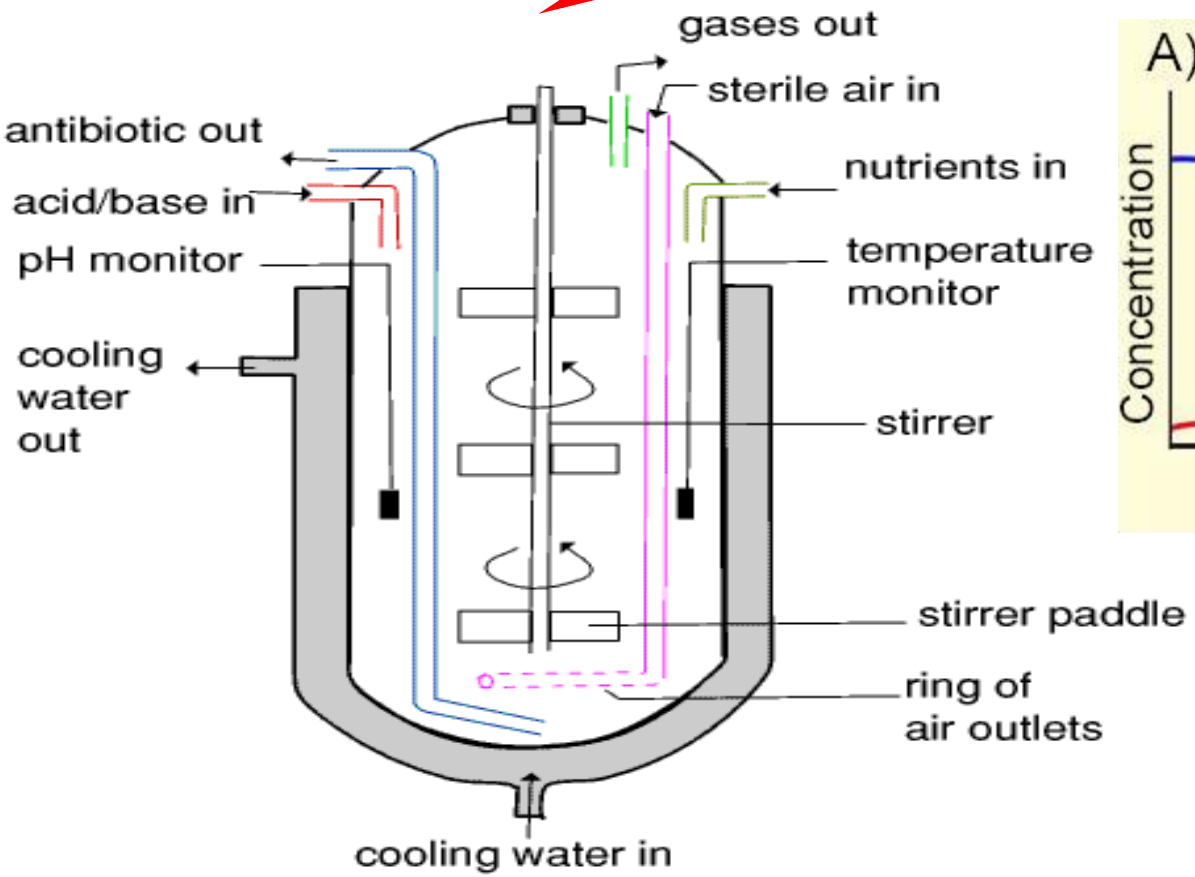
Biotransformation

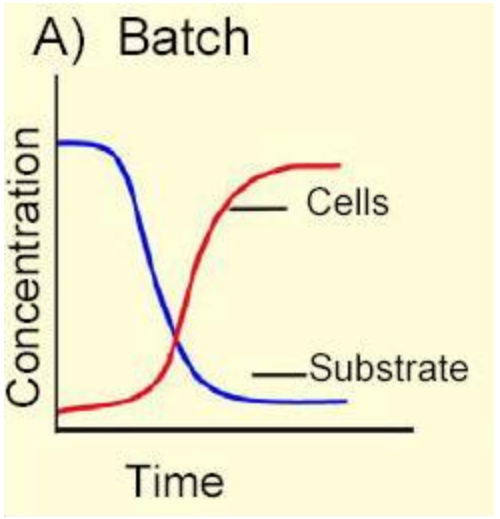



سرعت تقسيم سلولي در بالاترين قرار دارد
Exponential phase
Stationary phase
سلولهاي منتقل شده به محيط كشت براي تقسيم آماده مي شوند
تعداد و اندازه سلولها ثابت مي ماند (دوام سلولها در اين فاز تابع نوع گياه و فاكتور محدود كننده است
Lag phase
Death (declining) phase
سرعت تقسيم و حجيم شدن سلولها كاهش مي يابد
Number of cells
Time

کشت بسته (Batch culture)

- حجم محیط کشت ثابت است
- اکسیژن و مواد غذایی محدود است

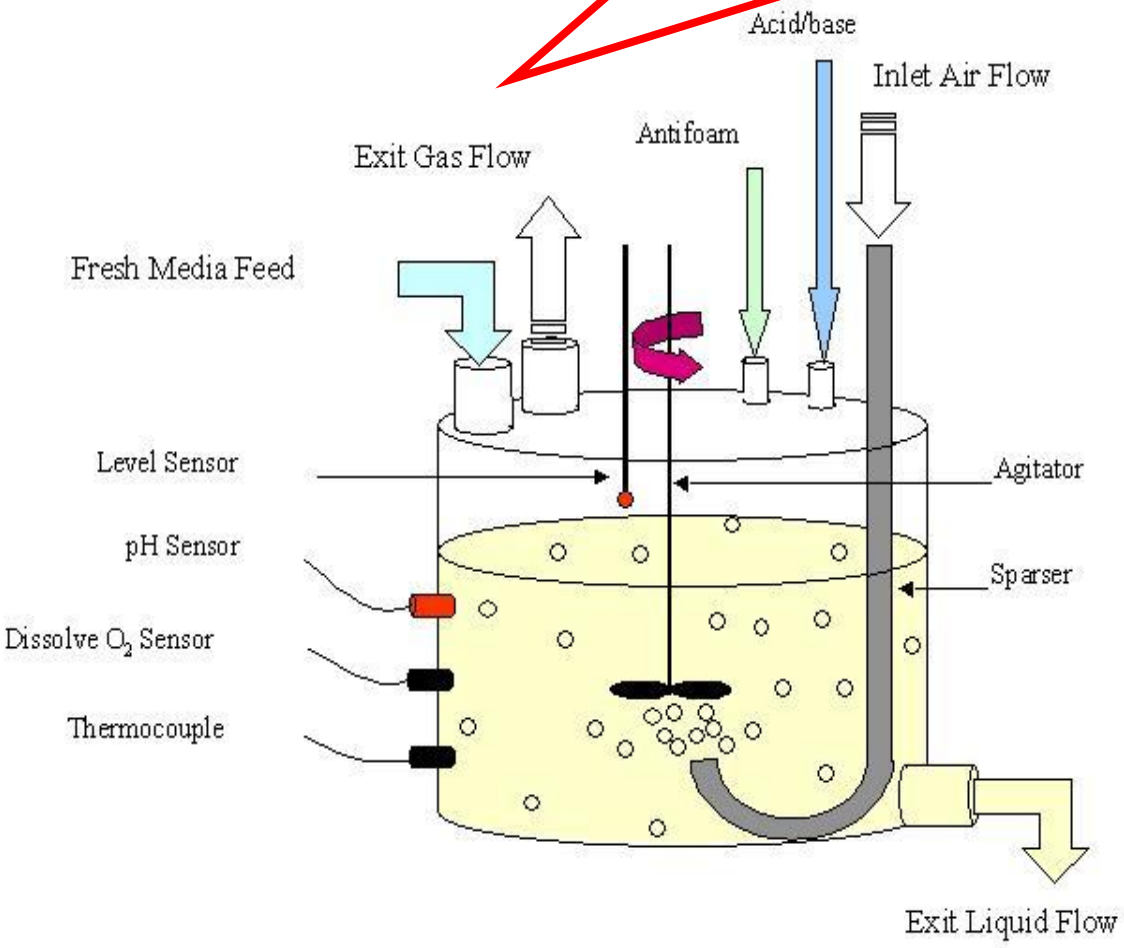


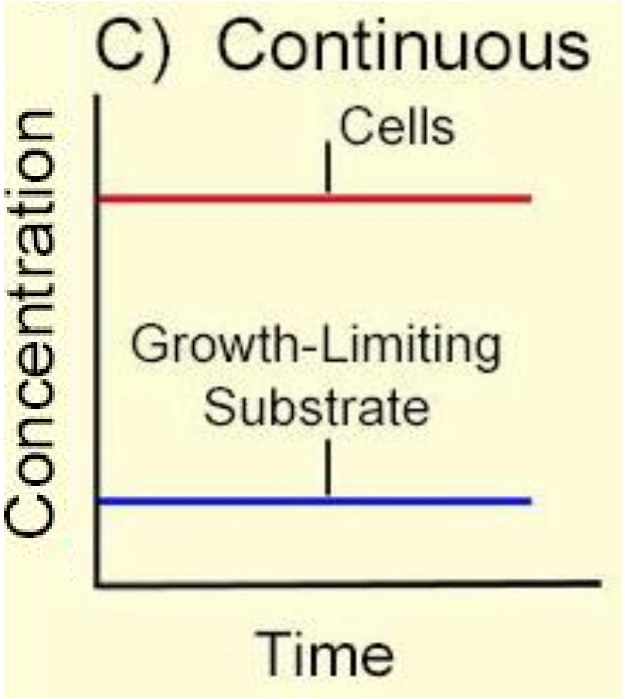


کشت پیوسته (Continuous culture)

– ورود مداوم محیط غذایی تازه

– وجود یک رشد متعادل سلولی (سرعت رشد حداکثر و ثابت)





توليد متابوليتهاي ثانويه گياهي در مقياس انبوه (بيوراكتورهاي صنعتي)

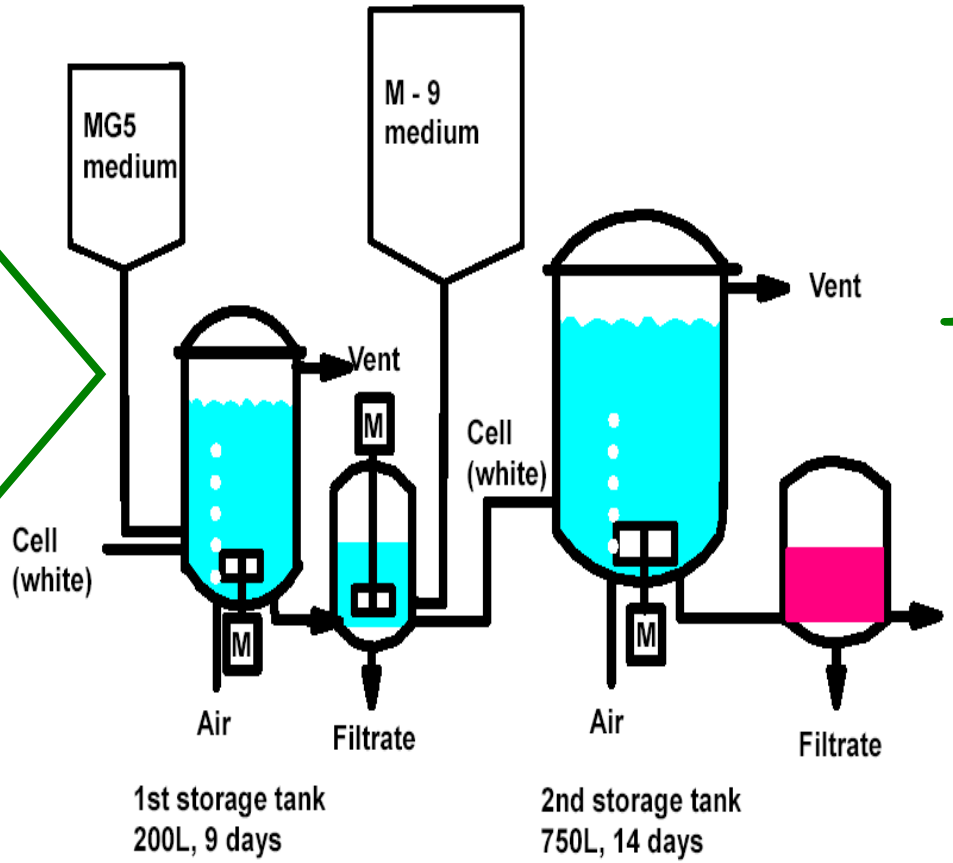
Catharanthus roseus

Coleus blomei

Lithospermum erythrohizon

Panax ginseng

Taxus baccata



Vincristine

Vinblastine

Shikonin

Rosmarinic acid

Saponins

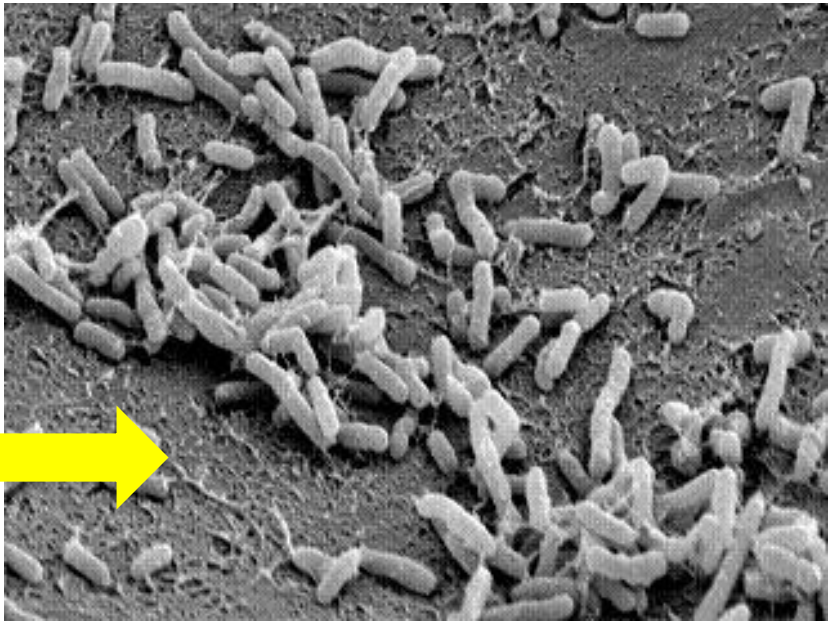
Ginsenoside

Taxol

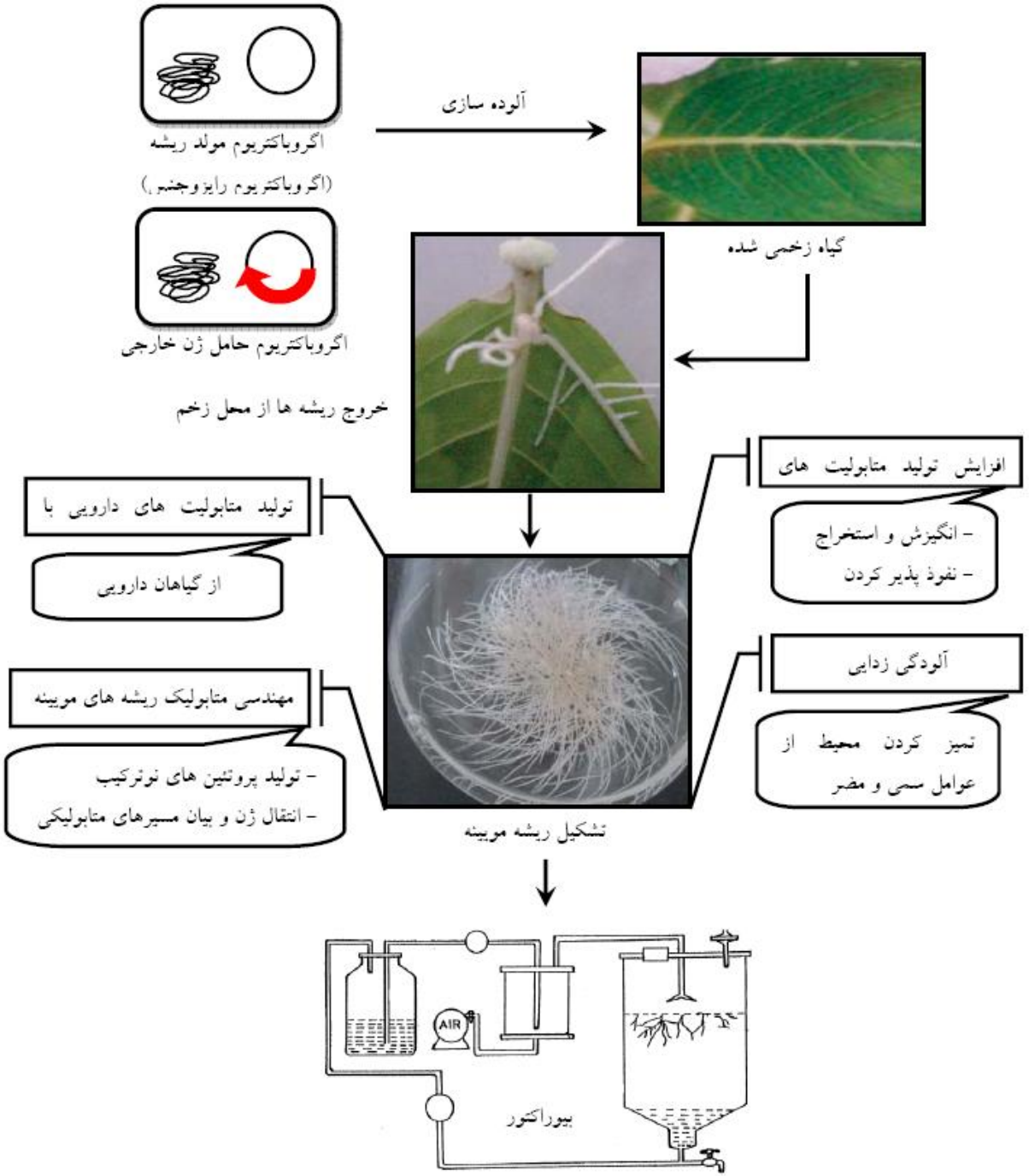
محدوديتهاي توليد متابوليتهاي ثانويه گياهي در كشتهاي سوسپانسيون

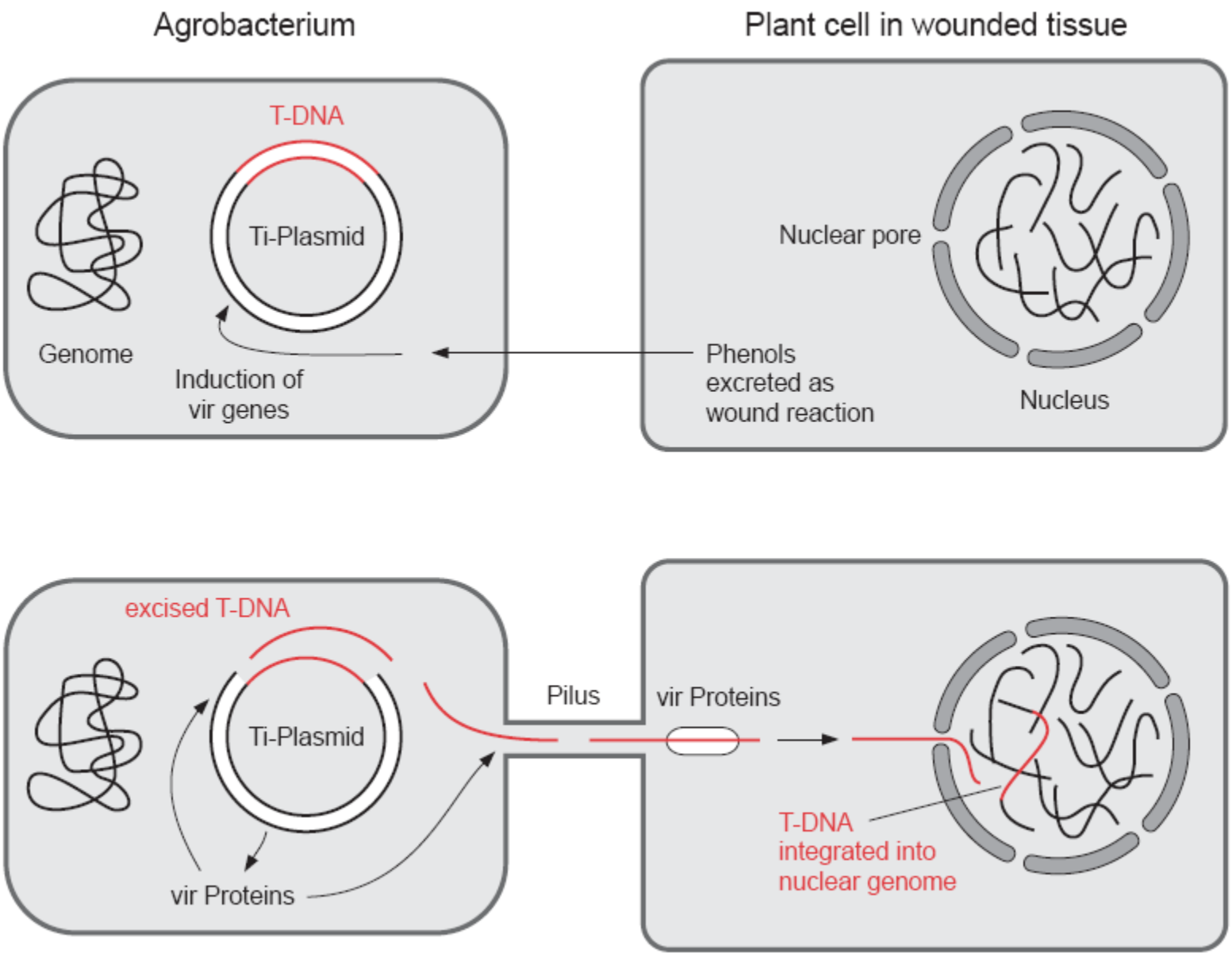
- کاهش راندمان تولید متابولیتهای ثانویه در بافتهای تمایز نیافته
- عدم ثبات ژنتیکی سلول به علت وقوع جهش و تولید ترکیبهای ناخواسته
- صدمه دیدن سلولها به علت تکان دادن مداوم محیط کشت (برای جلوگیری از تشکیل توده سلولی)
- بالا بودن هزینه تولید به علت مصرف زیاد مواد قندی در محیط کشت (تا 5٪ وزنی به حجمی)
- وقوع آلودگی زیاد در محیط کشت (تکثیر سریعتر سلولهای باکتریایی در مقایسه با سلولهای گیاهی)
- انجام تحقیقات بسیار گسترده برای بهینه سازی شرایط تولید در بیوراکتورها و جداسازی فراورده نهایی
- عدم توسعه این روش به علت پیچیدگی فرایند رشد سلولهای گیاهی در بیوراکتورها و فرمانتورها

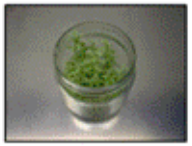
القای ریشه های مویینه



باکتری مولد ریشه (*Agrobacterium rhizogenes*)


اگروباکتریوم مولد ریشه
(اگروباکتریوم رایزوجنز)
آلوده سازی
گیاه زخمی شده
اگروباکتریوم حامل ژن خارجی
خروج ریشه ها از محل زخم
تولید متابولیت های دارویی با
از گیاهان دارویی
افزایش تولید متابولیت های
- انگیزش و استخراج
- نفوذ پذیر کردن
مهندسی متابولیک ریشه های مویینه
- تولید پروتئین های نوترکیب
- انتقال ژن و بیان مسیرهای متابولیکی
آلودگی زدایی
تمیز کردن محیط از
عوامل مسی و مضر
تشکیل ریشه مویینه
AIR
بیوراکتور
تولید صنعتی و تجاری

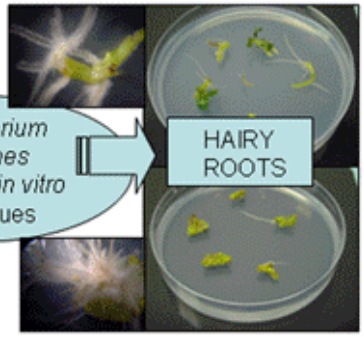

Agrobacterium
Plant cell in wounded tissue
T-DNA
Ti-Plasmid
Genome
Induction of
vir genes
Nuclear pore
Phenols
excreted as
wound reaction
Nucleus
excised T-DNA
Ti-Plasmid
vir Proteins
Pilus
vir Proteins
T-DNA
integrated into
nuclear genome



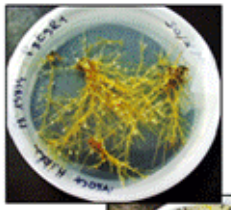
In vitro culture of selected clones

Plant material: selected aromatic and medicinal plants

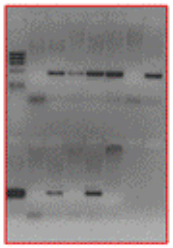
Agrobacterium rhizogenes infection of *in vitro* plant tissues



HAIRY ROOTS

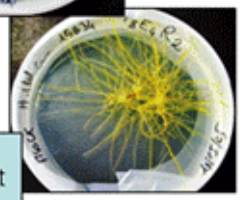


Isolated hairy root lines



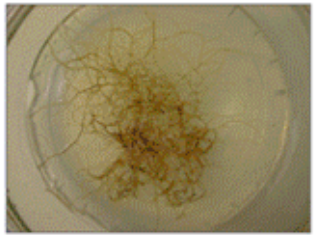
Screening for *rol* genes in the isolated hairy root lines

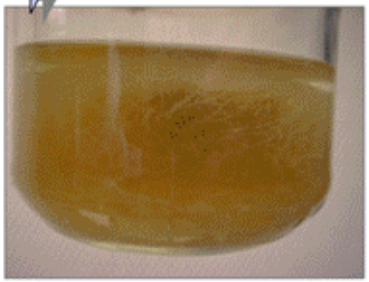
Isolated hairy root lines



Hairy root culture in solid and liquid media

Plant regeneration from hairy roots





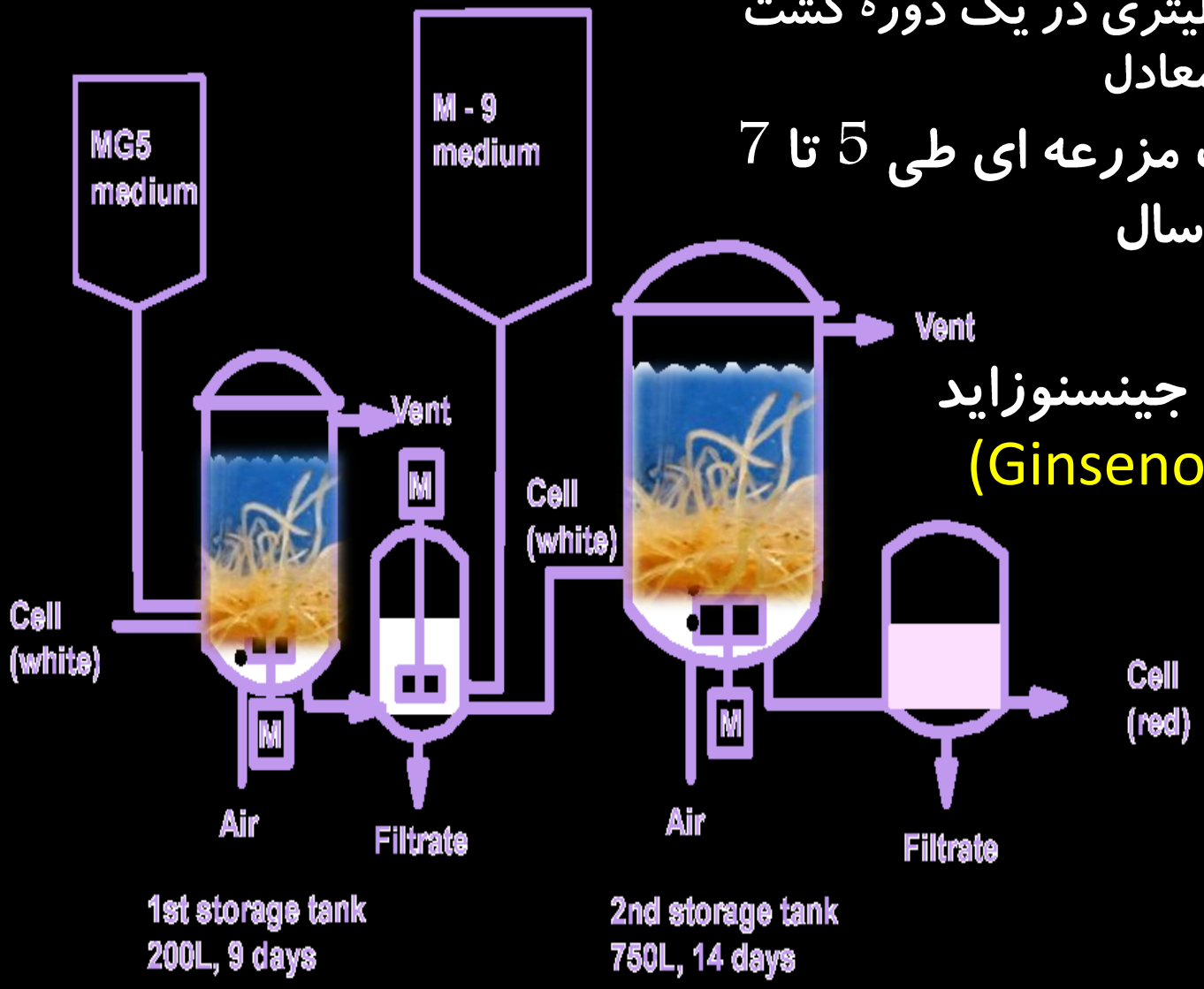
Scale up in bioreactors

جین سنگ (*Panax ginseng*)

بیوراکتور 20 هزار لیتری در یک دورهٔ کشت معادل

600 هکتار کشت مزرعه ای طی 5 تا 7 سال

در تولید جینسنوزاید (Ginsenoside)



Hairy root cultures producing pharmaceutical products of interest

Plant species	Product	Reference
Bidens spp.	Polyacetylenes	McKinely et al. (1993)
Cinchon. ledgeriana	Quinolene alkaloids	Hamill et al. (1987)
Cichorium intybus	Esculetin	Bais et al. (1999)
Datura spp.	Tropane	Rhodes (1989)
Cassia spp.	Anthroquinones	Ko et al. (1988)
Duboisia leichhardtii	Tropane alkaloids	Mano et al. (1989)
Echinacea purpurea	Alkaloids	Trypsteen et al. (1991)
Glycyrrhiza uralensis	Glycyrrhizin	Ko et al. (1989)
Hy. albus	Alkaloids	Shimomura et al. (1991)
Panax ginseng	Saponin	Yoshikawa and Furuya (1987)
Salvia miltorrhiza	Diterpenes	Hu and Alfermann (1993)
Artemi. absynthium	Volatile oil	Kennedy et al. (1993)
L. erythrorhizon	Shikonin	Shimomura et al. (1986)
Ra. serpentina	Ajmaline, serpentine	Benjamin et al. (1994)
Rubia cordifolia	Anthroquinones	Shin and Kim (1996)
Gl. glabra	Isoprenylated flavonoids	Asada et al. (1998)
Panax ginseng	Ginsenoside	Kunshi et al. (1998)
Hy. muticus	Hyoscyamine	Sevon et al. (1998)

Adapted from Ravishankar and Ramachandra Rao (2000).

Biotransformations using hairy root cultures for production of pharmaceuticals

Plant species	Substrate	Product	Reference
Hy. niger	Hyoscyamine	Scopolamine	Hashimoto and Yamada (1983)
Cinchon. ledgeriana	Tryptophan	Quinine	Hay et al. (1986)
Nicotiana spp.	Lysine, cadaverine	Nicotine	Walton and Belshaw (1988)
	Putrescine, agmatine	Anabasine	Walton et al. (1988)
Duboisia myoporoides	Putrescine Spermidine Cadaverine	Scopolamine Hyoscyamine	Yoshioka et al. (1989)
Panax ginseng	2-phenylpropanoic acid	Sugar esters	Furuya et al. (1989)
Panax ginseng	Digitoxigenin	Digitoxin	Kawaguchi et al. (1990)
Atro. belladona	Hyoscyamine	Scopolamine	Subroto et al. (1996)
Dubo. leichhardtii	Hyoscyamine	Scopolamine	Subroto et al. (1996)
Panax ginseng	18β-glycyrrhetinic acid	Glucosides	Asada et al. (1993)
Bidens sulphureus	Butylated hydroxytoluene	Stilbene quinones	Flores et al. (1994)
Panax ginseng	Phenolic acid	Glycosylated phenolic compounds	Ushiyama and Furuya (1989)

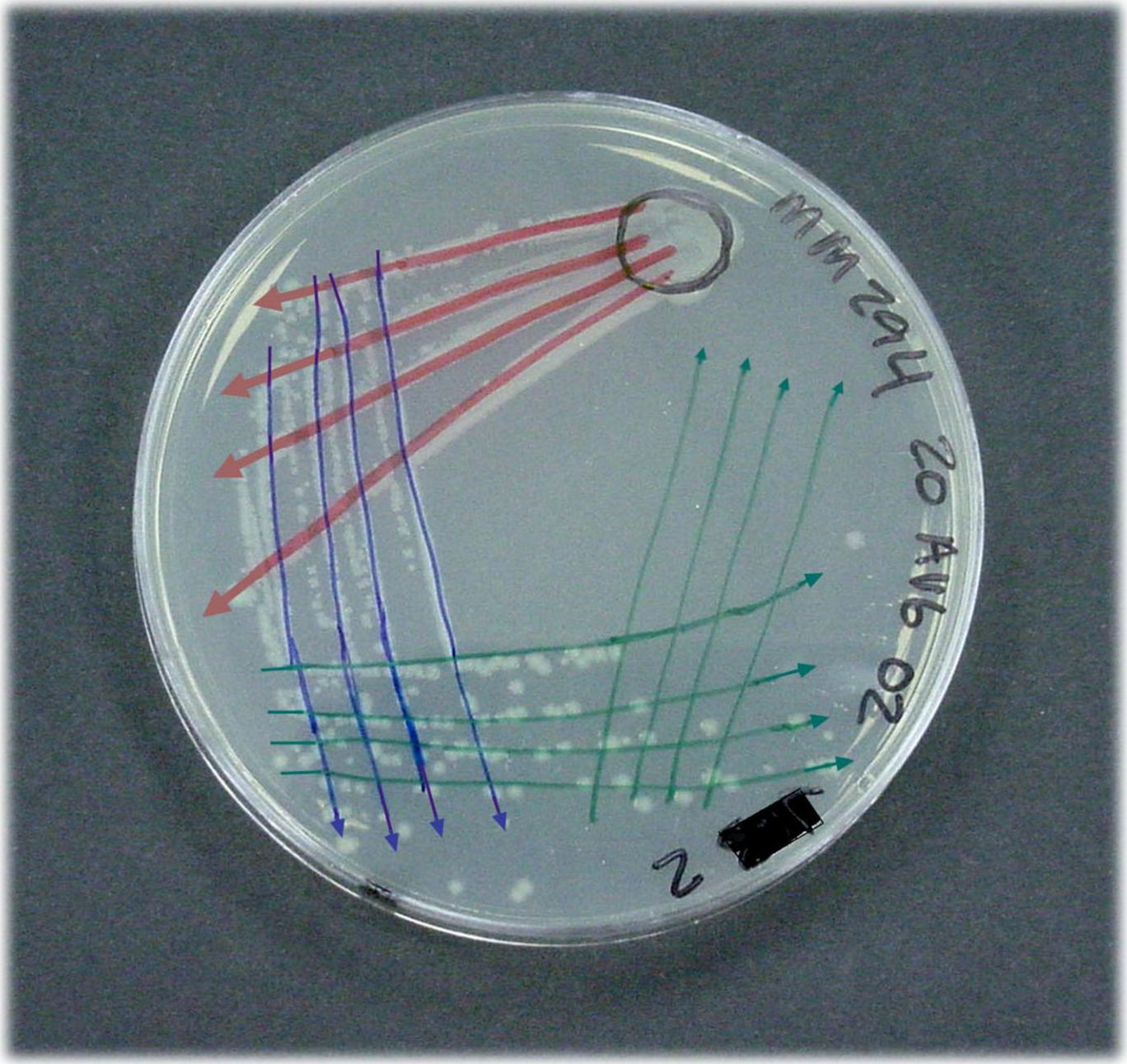
✓مزایای استفاده از سیستم کشت ر

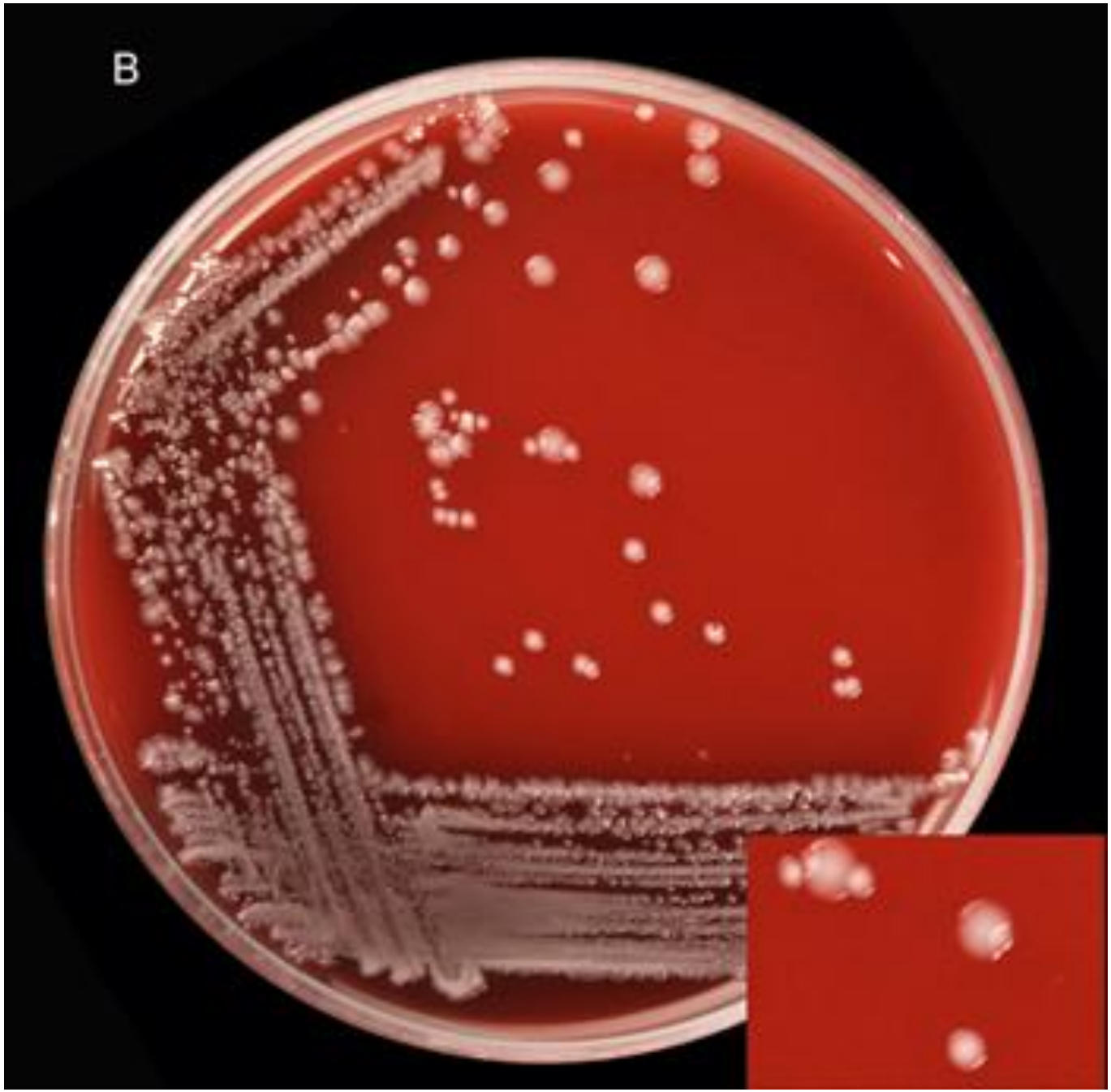
- عدم نیاز به کاربرد اکسین خارجی
- فاقد زمین گرایی (دارای شاخه بندی افق گرا هستند)
- عدم نیاز به تیمار نوری
- سرعت رشد بالا
- دارای ثبات ژنتیکی و بیوشیمیایی در تولید ترکیبات دارویی برای مدت زمان طولانی
- امکان انتقال **ژنهای خارجی** برای بهبود متابولیت ثانویه جدید

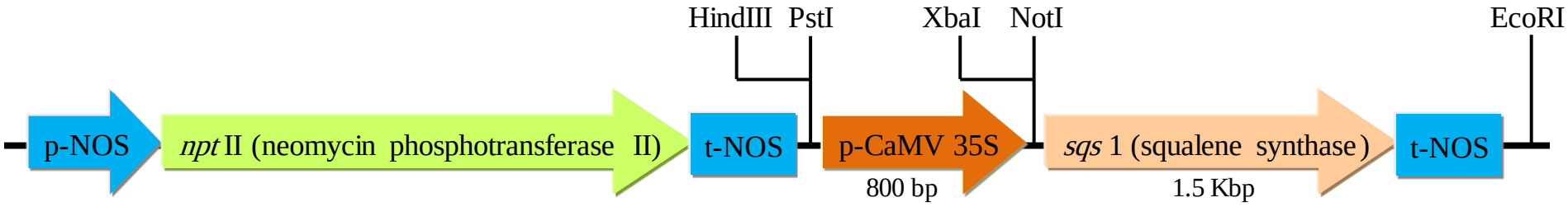
تحقیقات متنوع در ارتباط با کشت ریشهٔ مویینه برای تولید متابولیتهای ثانویه در گیاهان دارویی

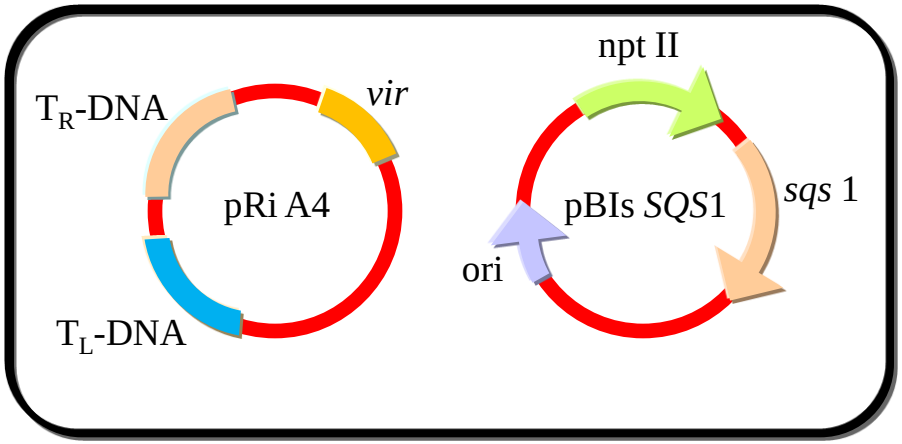
Shimomura et al. (1991); Hashimoto et al. (1993); Rao et al. (1998); Murthy et al (2008)

شماره	ویژگی	کشت ریشه مویینه	کشت سلول
۱	هوادهی	بالا	پایین
۲	زمان دو برابر شدن بیوماس	۲ تا ۷ روز	۰/۷ تا ۱۴ روز
۳	اندازه	۱ تا ۱۰ سانتی متر	۴۰ تا ۲۰۰ میکرومتر
۴	محیط کشت	ساده و فاقد هورمون	پیچیده و نیازمند به هورمون
۵	تراکم مادّهٔ اولیه کشت	۵ تا ۱۰ درصد حجمی به حجمی	۵ تا ۱۰ درصد حجمی به حجمی
۶	مورفولوژی	ساختار اندام مانند اما بیوماس پیچیده با سلول های حساس	مخلوطی از سلول های منفرد یا مجتمع با دیواره سلولی حساس
۷	ثبات ژنتیکی	باثبات-اوپلوئید تا پلی پلوئید هموژن	بی ثبات-آنیوپلوئید هتروژن
۸	تجمع تولید	شبیه گیاه والد در برخی موارد بروز ترکیب جدید	اغلب متفاوت و کمتر از گیاه والد
۹	رها سازی تولید	زیاد	اغلب
۱۰	حداکثر تراکم بیوماس تولیدی	۳۰ گرم ماده خشک در لیتر	۲۰۰ گرم ماده خشک در لیتر
۱۲	حساسیت برداشت	خیلی حساس	حساس
۱۳	اداره کشت مداوم	آسان	مشکل و نیازمند به حمایت
۱۴	جابجایی و انتقال بیوماس	مشکل بدون قابلیت پمپاژ	آسان با قابلیت پمپاژ

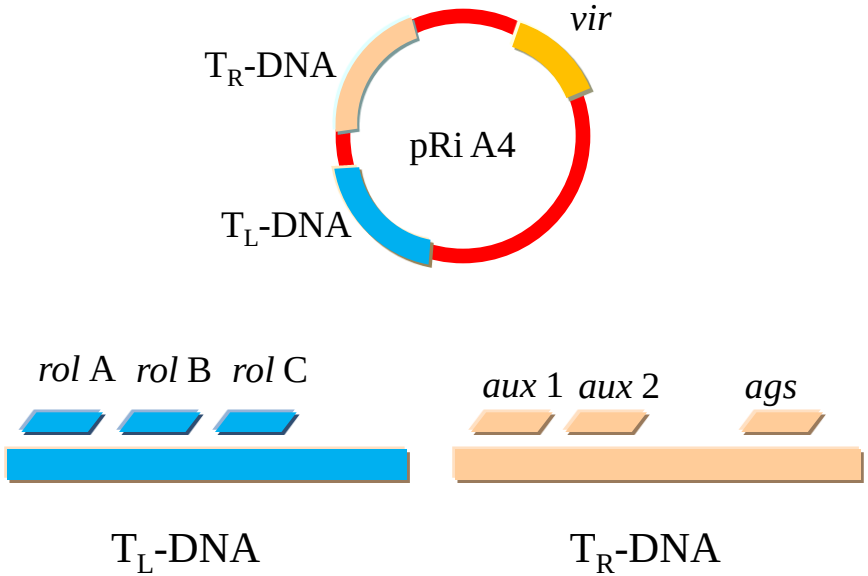

MM294
20 AUG 02
2


B





Agrobacterium tumefaciens
strain C58C1 (pRiA4) (pBIs *SQS* 1)
Kribi et al. (1997)



Agrobacterium tumefaciens
strain C58C1 (pRiA4)
Van Larebek et al. (1974)

مسیر بیوسنتز ویتانولیدها

Acetyl-CoA

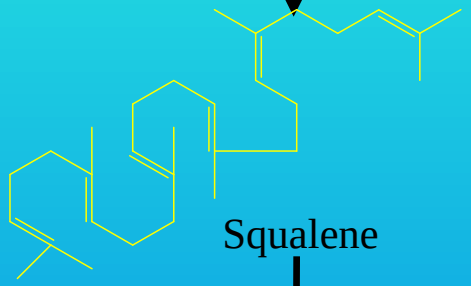
↓

Mevalonic acid (MVA)

↓

Farnesyl pyrophosphate (FPP)

↓ **Squalene synthase *(SQS)***



Squalene

↓

2,3 (S)-Oxidosqualene → Phytosterols: Sitosterol, Stigmasterol

↓

Lanosterol

↓

24-Methylene cholestrol → Campestrol

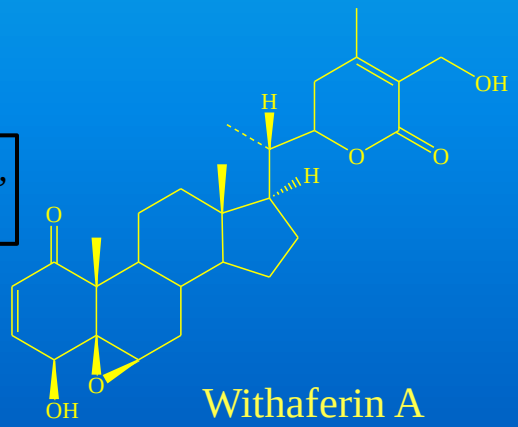
↓ ? ?

C_1 Oxidation (-OH/=O), C_2 Oxidation (-OH), C_{26} Oxidation, C_{22} Hydroxylation, δ-lactonization between C_{22} and C_{26}

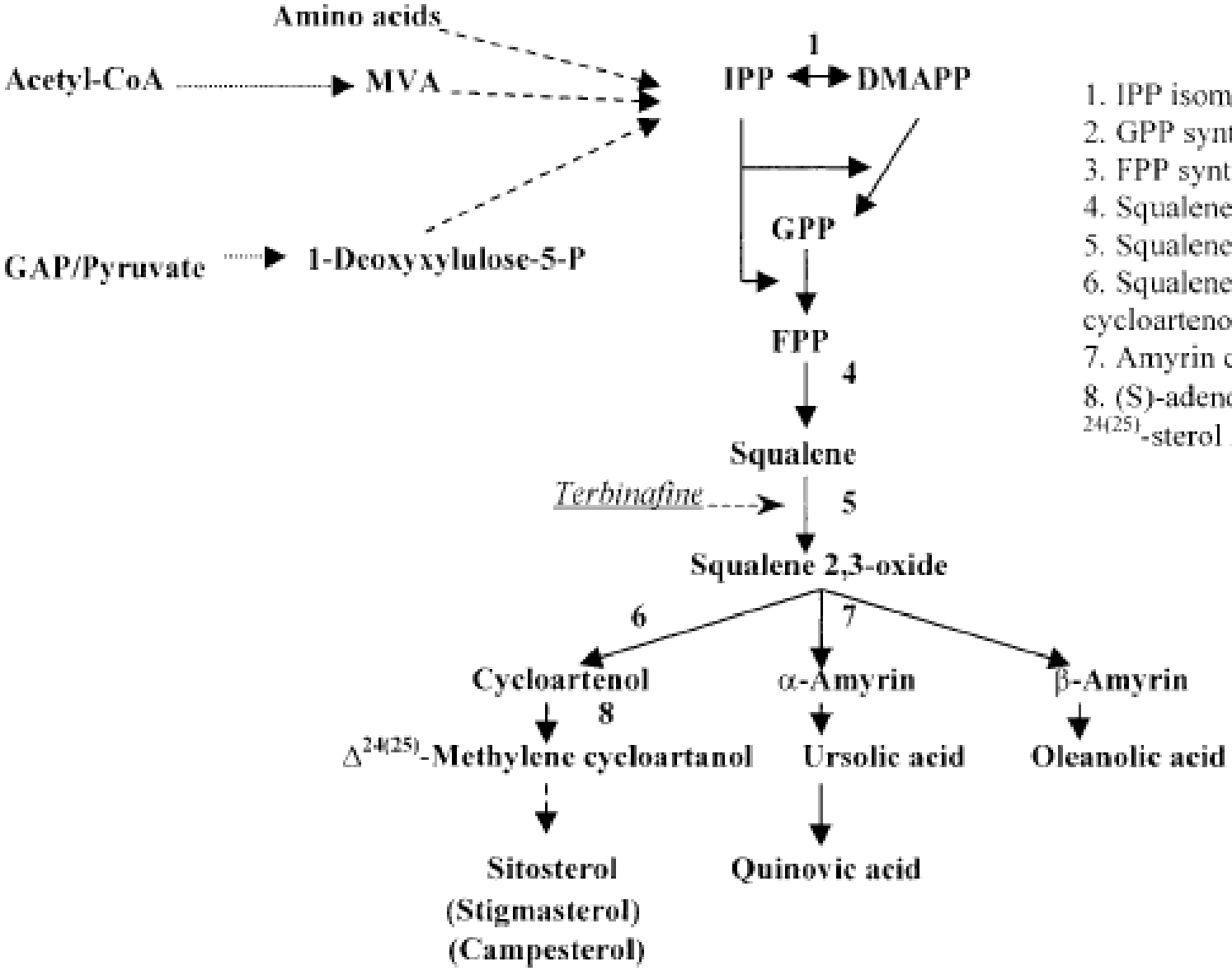
↓

Withanolides

Withanolide A



Withaferin A



1. IPP isomerase
2. GPP synthase
3. FPP synthase
4. Squalene synthase
5. Squalene epoxidase
6. Squalene 2,3-oxide: cycloartenol cyclase
7. Amyrin cyclases
8. (S)-adenosyl-L-methionine :$\Delta^{24(25)}$-sterol methyl transferase

مسئول بیوسنتز مواد شبه هورمونی و تاثیر بر مقدار متابولیتهای ثانوی

(Chiriqui et al. 1996)
(Nillson and Olsen 1997)

rol A *rol* B *rol* C

(Palazón et al. 1998)
T_L-DNA
(Bulgakov et al. 1998)

aux 1 *aux* 2 *ags*

مسئول بیوسنتز

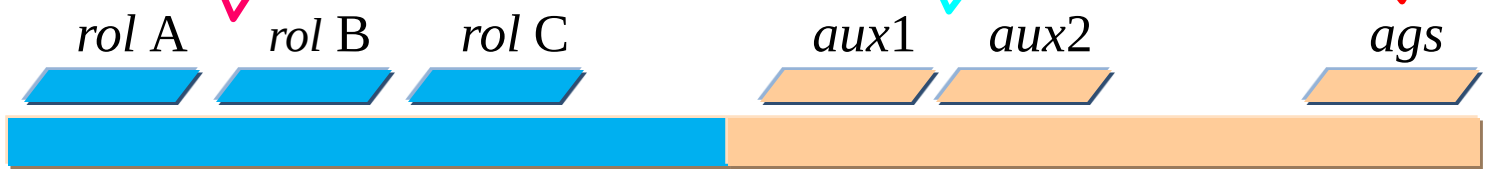
(Palazón et al. 1998)
T_R-DNA
(Nillson and Olsen 1997)

مسئول بیوسنتز آپین ها

(Palazón et al. 1998)
(Nillson and Olsen 1997)

موثر بر روی فنوتیپ

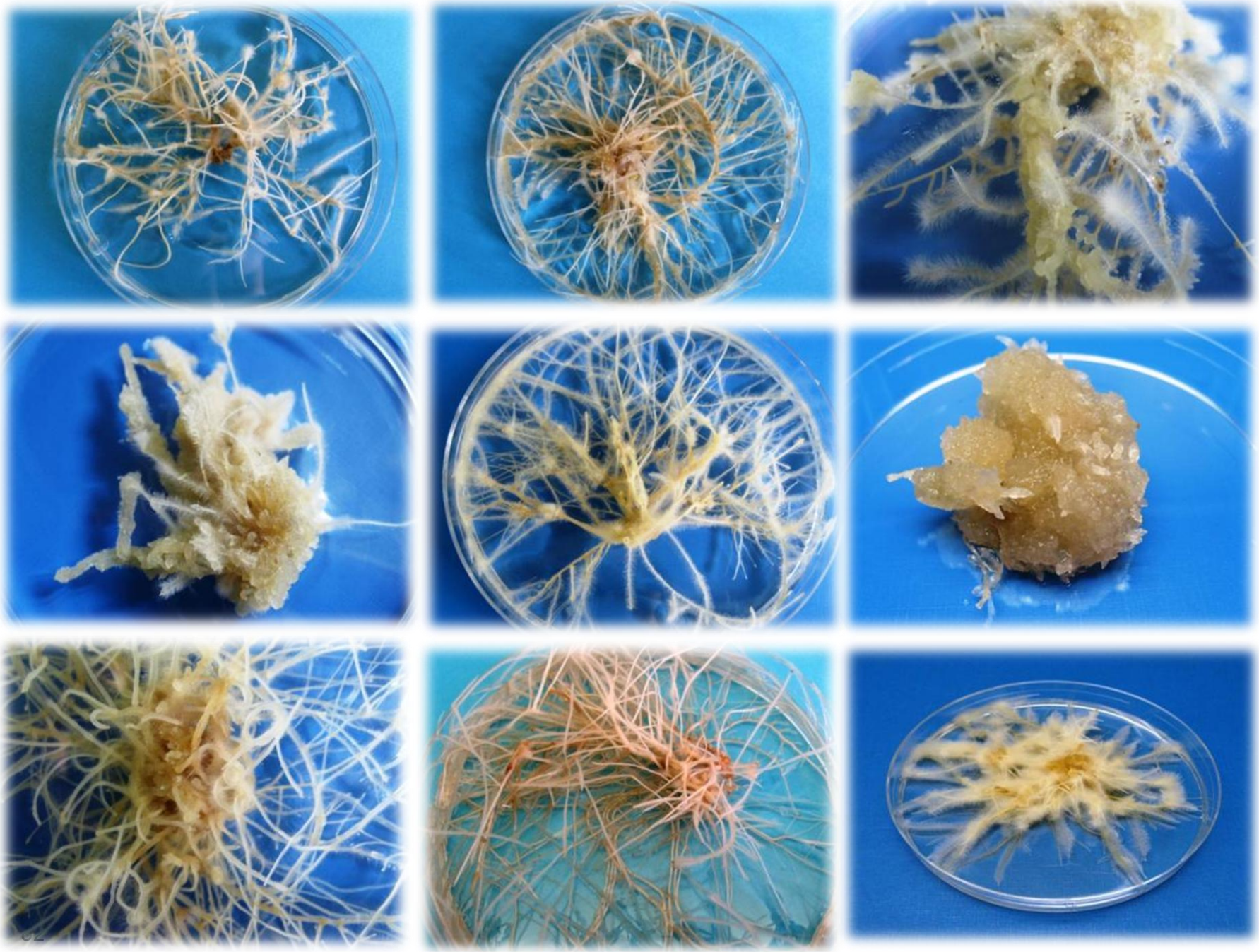
(Martin et al. 1990)

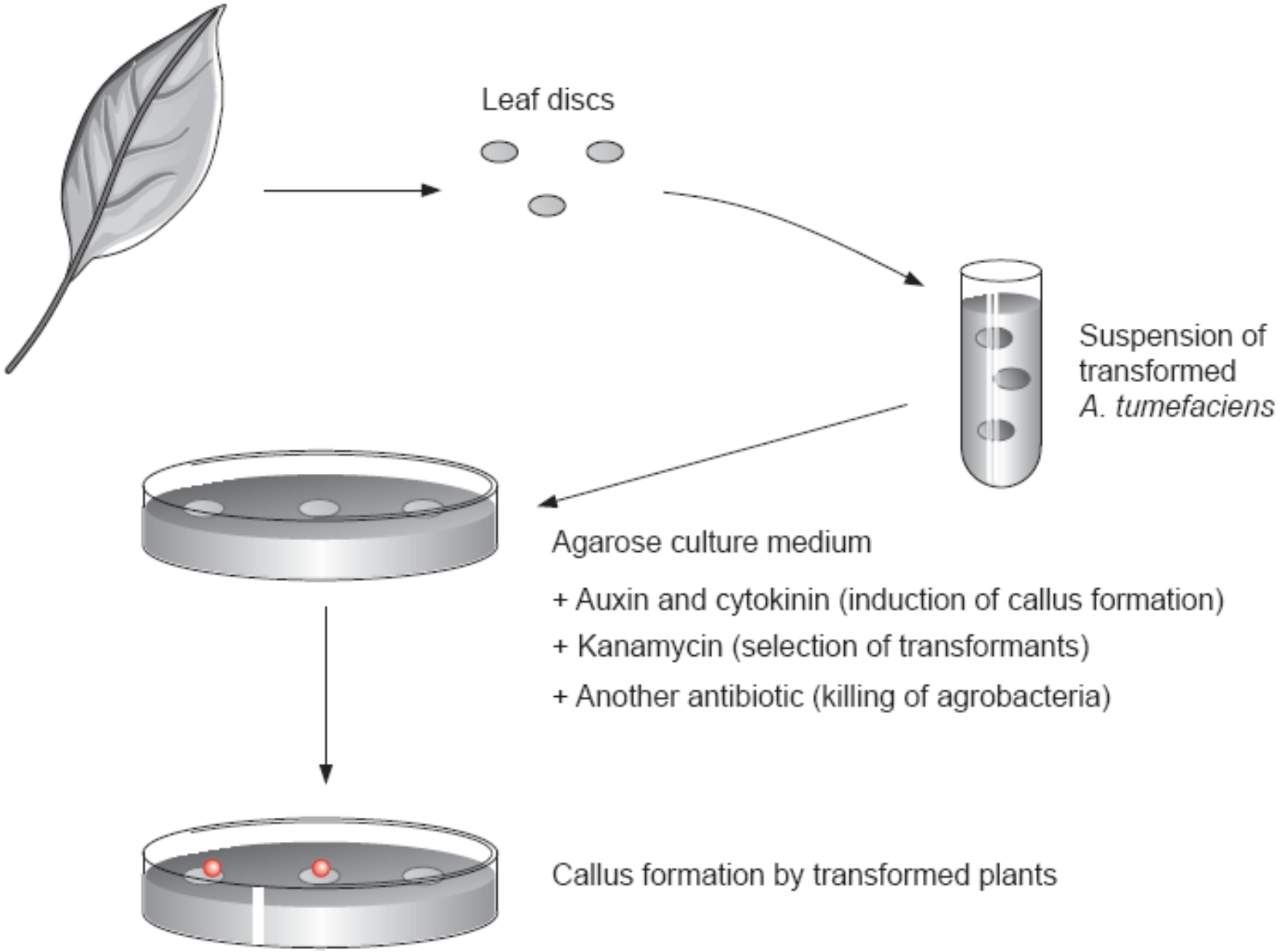


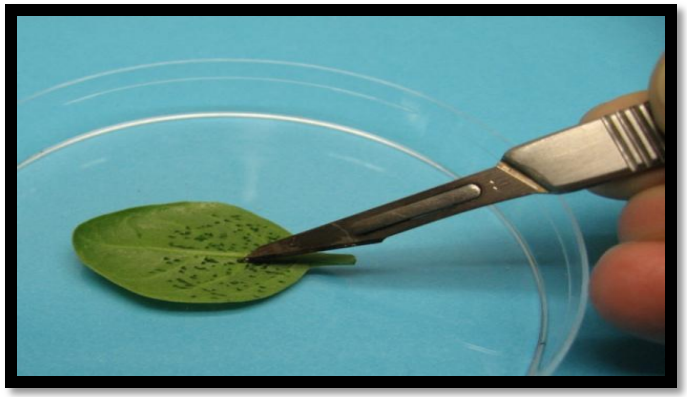
T_L-DNA

سلول گیاه

T_R-DNA

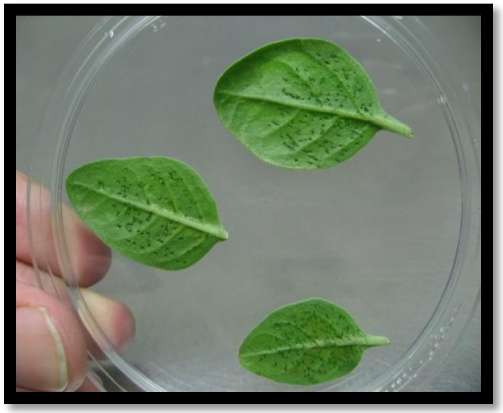



Leaf discs
Suspension of transformed *A. tumefaciens*
Agarose culture medium
+ Auxin and cytokinin (induction of callus formation)
+ Kanamycin (selection of transformants)
+ Another antibiotic (killing of agrobacteria)
Callus formation by transformed plants



1

2



3

4

کشت ریزنمونه های آلوده شده

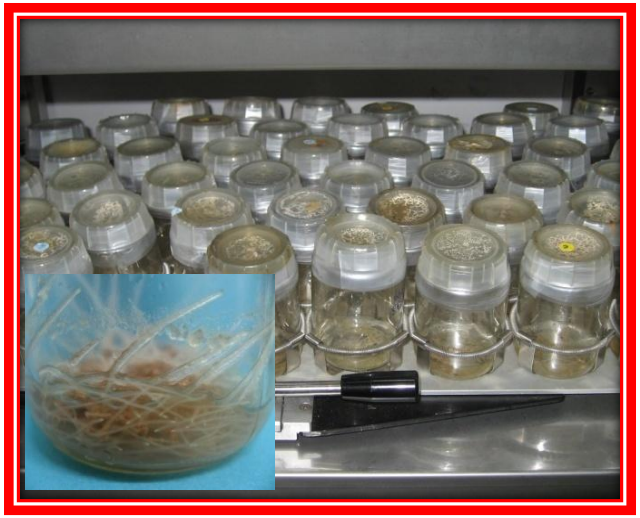
محیط کشت MS فاقد آنتی بیوتیک (72 ساعت) در شرایط تاریک و دمای 25درجه سانتی گراد

کشت بر روی محیط کشت حاوی 500 mg/l سفوتاکسیم

1

3

2



4

واکشت ریزنمونه ها و ریشه ها

هر 3 روز یکبار بر روی محیط کشت حاوی 500 mg/l- 250سفوتاکسیم

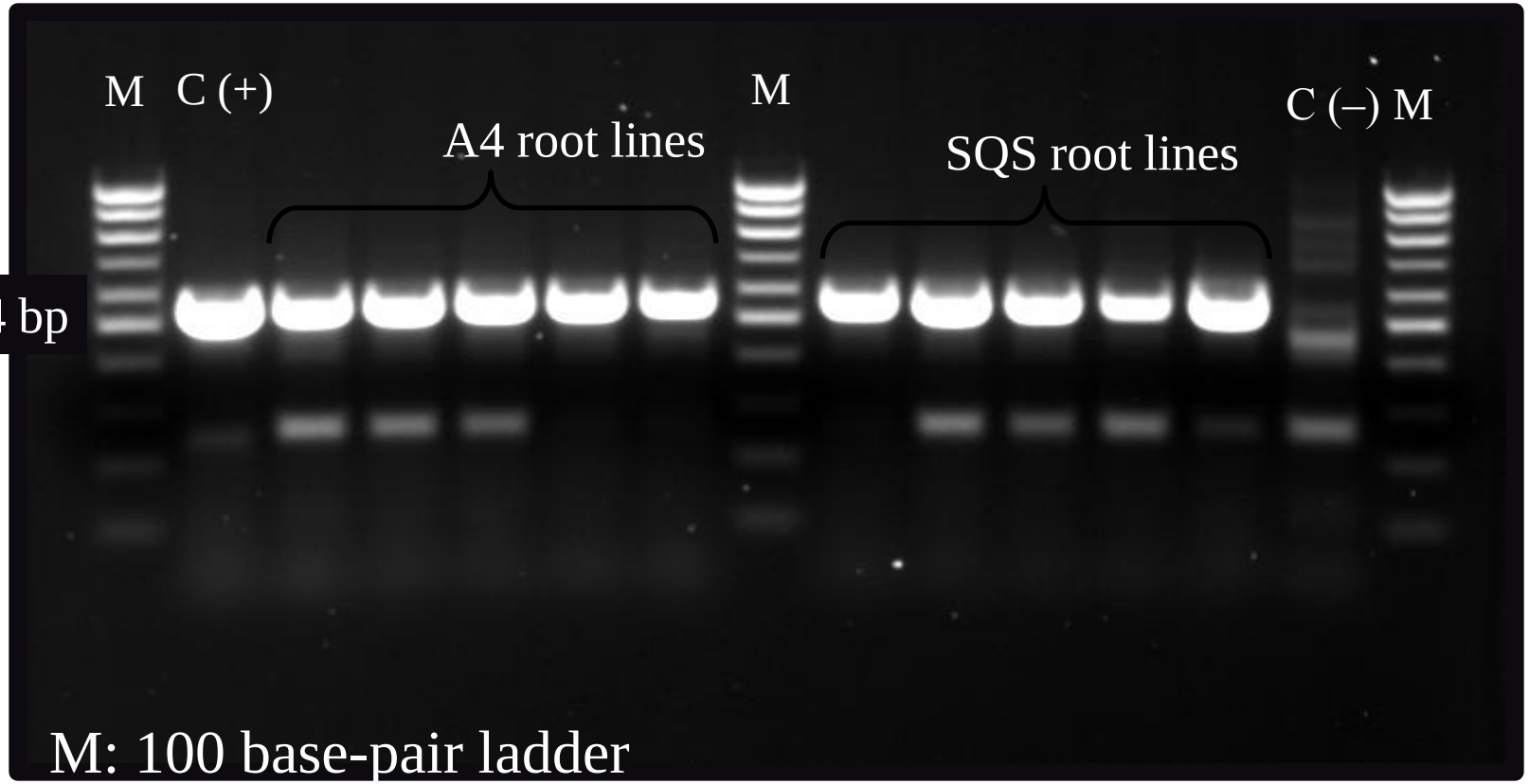
تا حذف کامل اگروباکتریوم پس از 15 بار

0.53
g

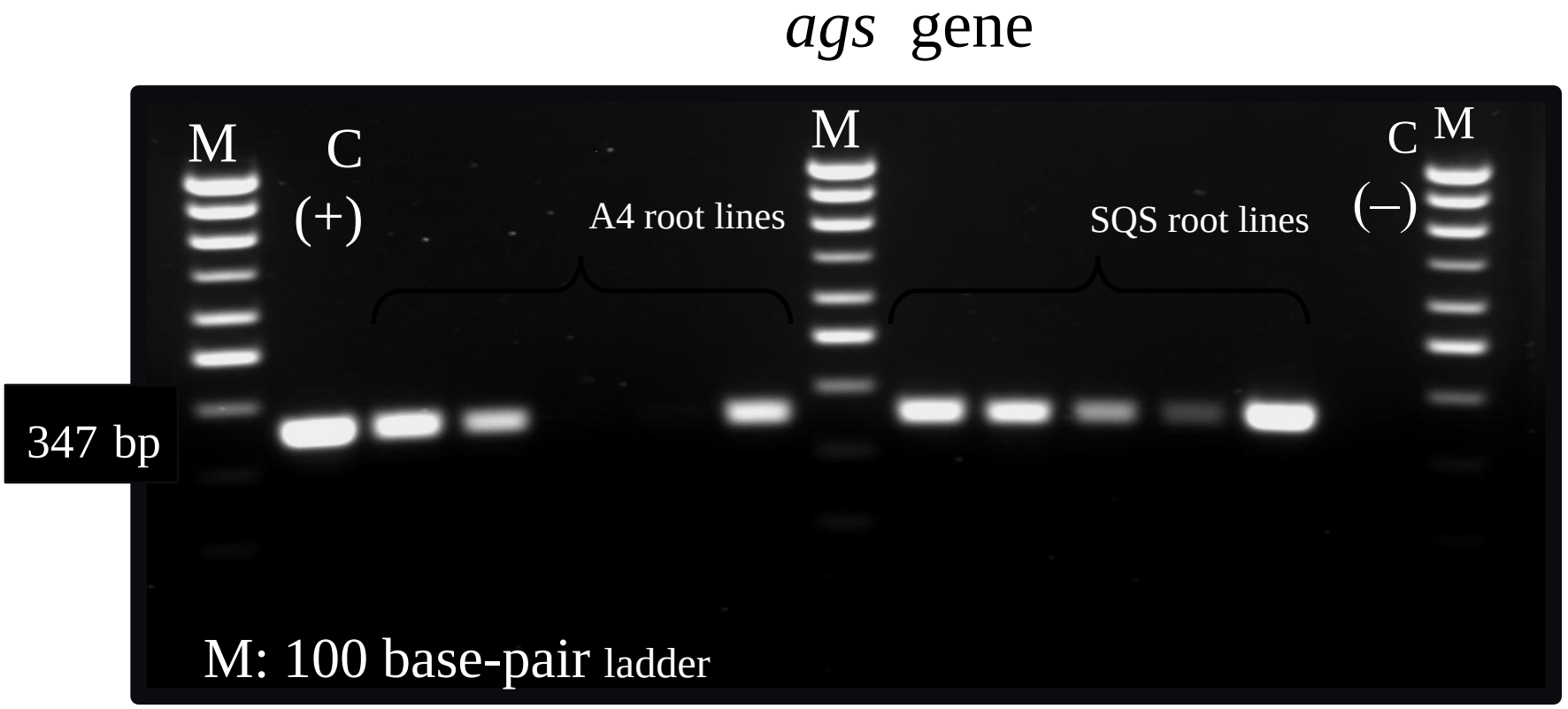
25.0
°C
SOLLWERT
SET VALUE
ADOLF KÜHNER AG SCHWEIZ
100
min-1
SOLLWERT
SET VALUE
START
STOP

ردیابی ژن های وارد شده به نمونه میزبان (انجام واکنش PCR)

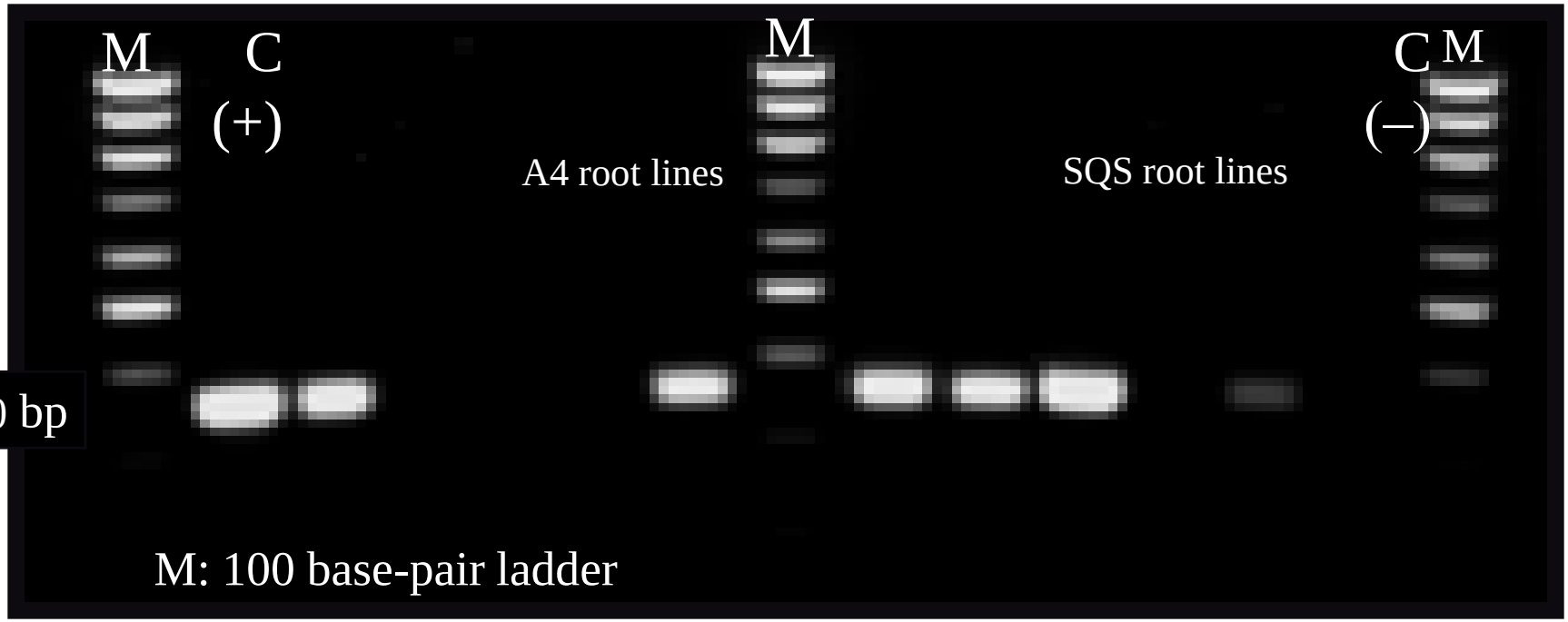
rol C gene



ردیابی ژن های وارد شده به نمونه میزبان (انجام واکنش PCR)

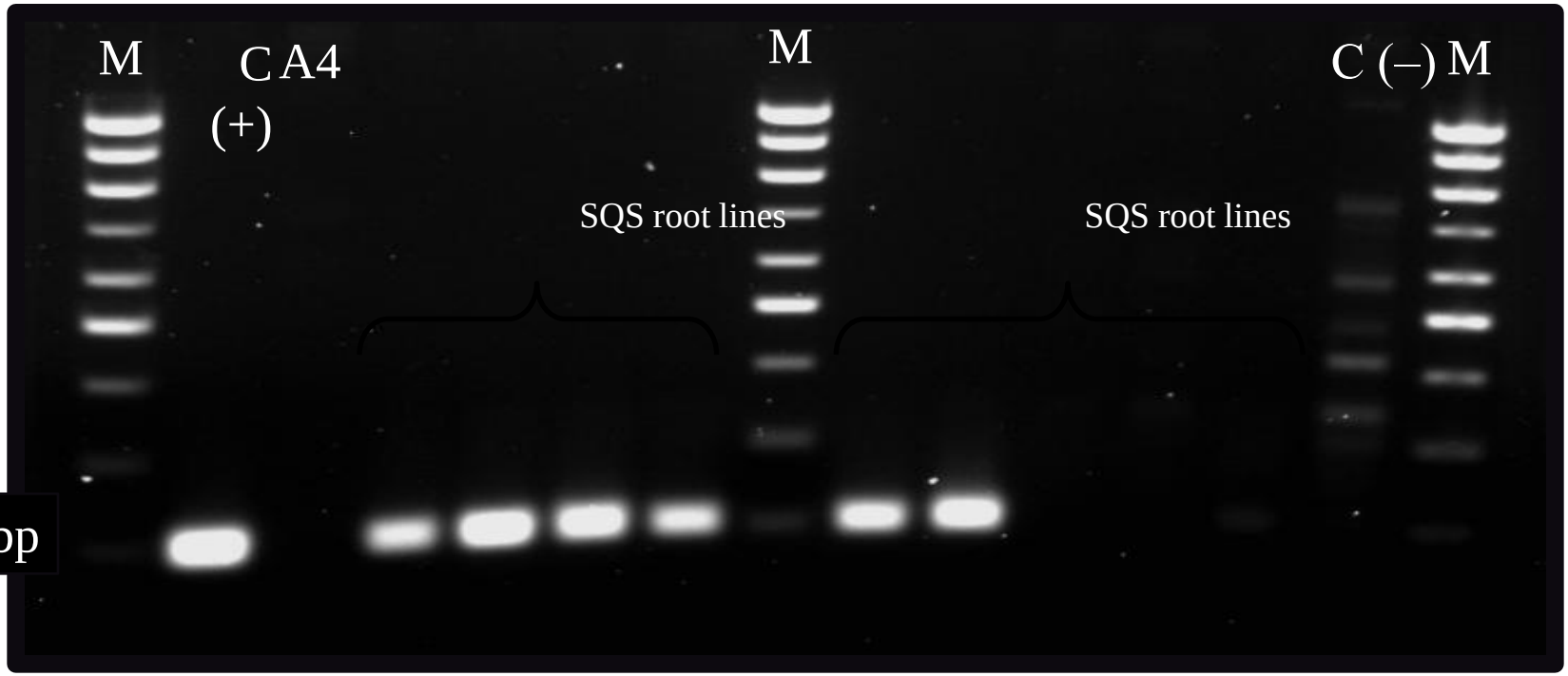


ردیابی ژن های وارد شده به نمونه میزبان (انجام واکنش PCR)



ردیابی ژن های وارد شده به نمونه میزبان (انجام واکنش PCR)

SQS gene



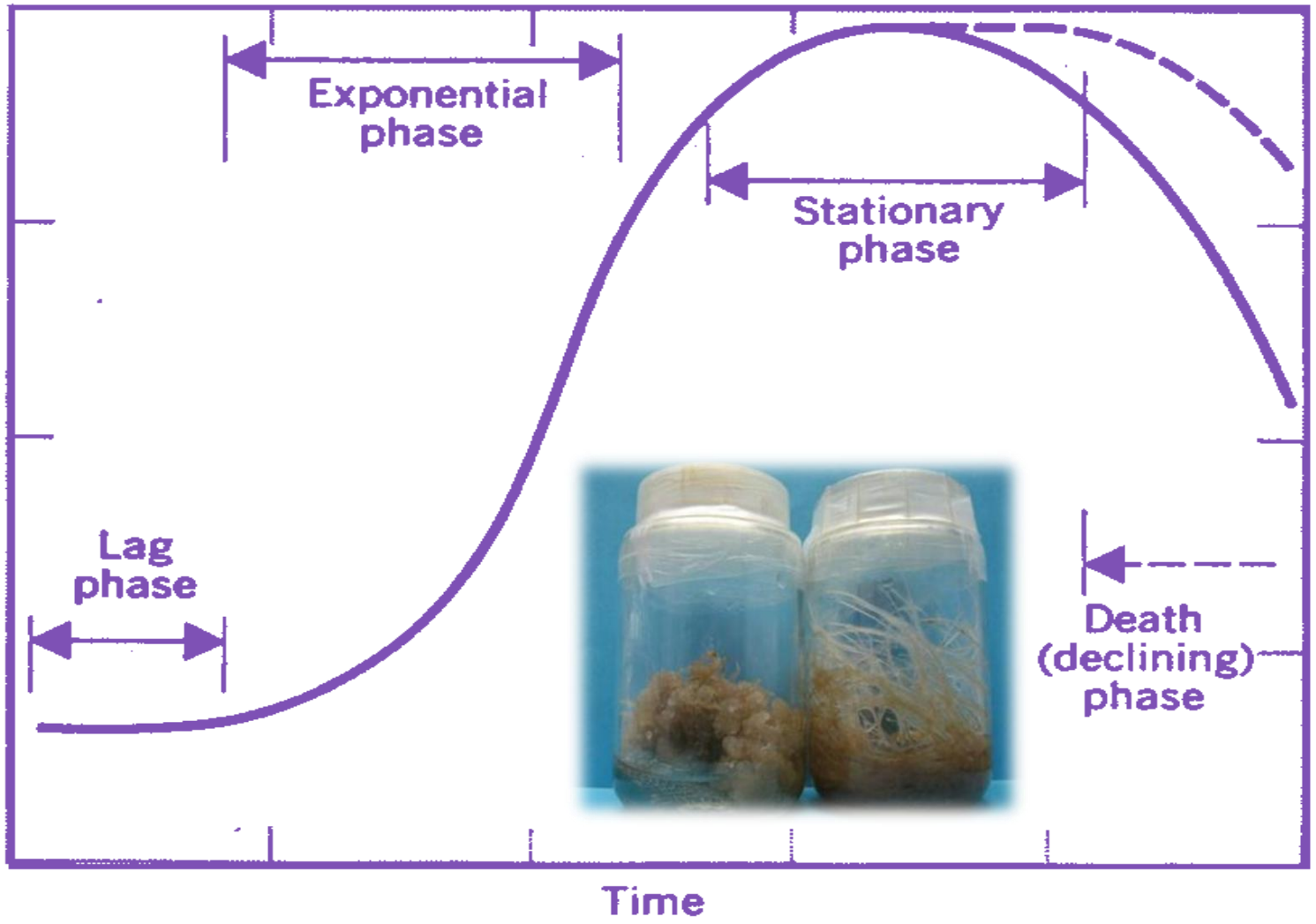
ردیابی ژن های وارد شده به نمونه میزبان (انجام واکنش PCR)

لاین ریشه	مورفولوژی	ژن های وارد شده به ریشه های تراریخت			
		rol C	*aux*	*sqs*	*ags*
A4L26	کالوس شکل	+	+	–	+
A4L30	خیلی کالوس شکل	+	+	–	+
A4L39	مویینه شکل	+	–	–	+
A4L61	خیلی کالوس شکل	+	+	–	+
A4L112	مویینه شکل	+	–	–	–
A4L115	مویینه شکل	+	–	–	–
A4L144	مویینه شکل	+	–	–	+
SQSL27	خیلی کالوس شکل	+	+	+	+
SQSL48	مویینه و کمی کالوس شکل	+	–	+	+
SQSL78	خیلی کالوس شکل	+	+	+	+
SQSL84	کالوس شکل و کمی مویینه	+	+	+	+
SQSL135	کالوس شکل	+	+	+	+
SQSL139	مویینه شکل	+	–	+	+
SQSL143	مویینه شکل	+	–	–	+

ردیابی ژن های وارد شده به نمونه میزبان (انجام واکنش PCR)

نوع لاین ریشه	مورفولوژی	درصد حضور ژن ها در ریشه های تراریخت		
		ags	*aux*	*rol* C
ترانسفورم شده با Ri Plasmid A4	کالوس شکل	٪100	٪100	٪100
	مویینه شکل	٪60	٪12/5	٪100
ترانسفورم شده با نژاد حامل ژن pBIs SQS	کالوس شکل	٪83	٪100	٪100
	مویینه شکل	٪51	٪14/3	٪100

مطالعهٔ الگوي رشد و توليد ويتانوليدهاي ريشه هاي تراريخت



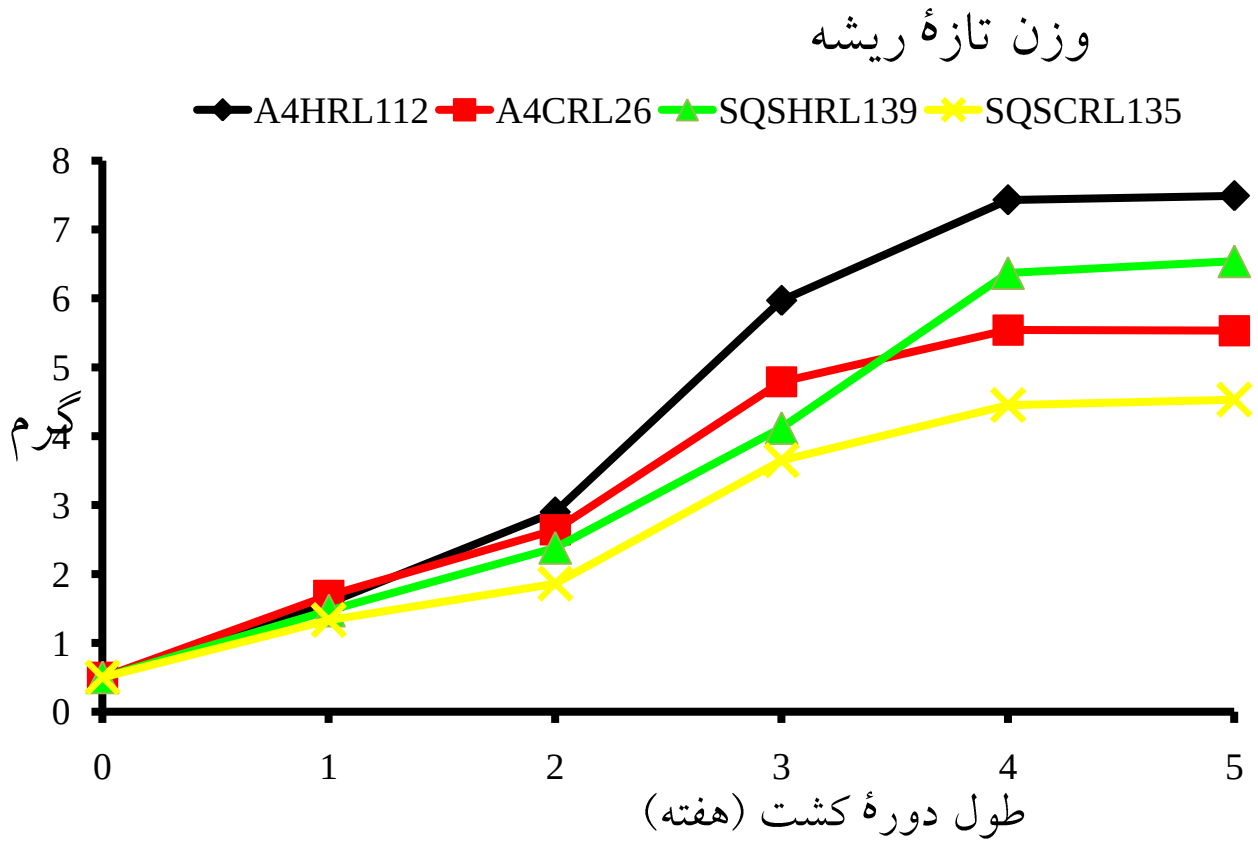
A4HRL112

A4CRL26

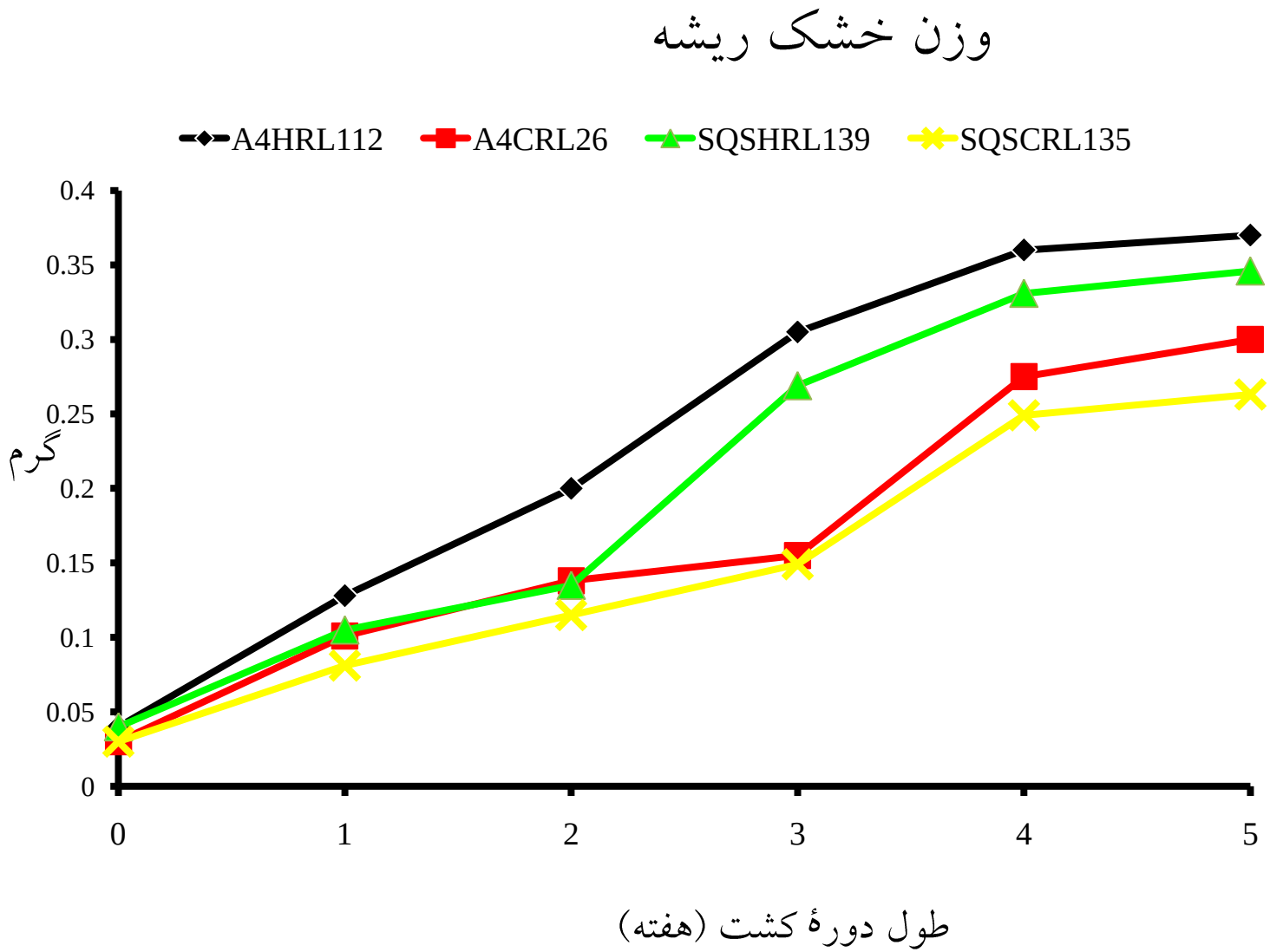
SQSHRL139

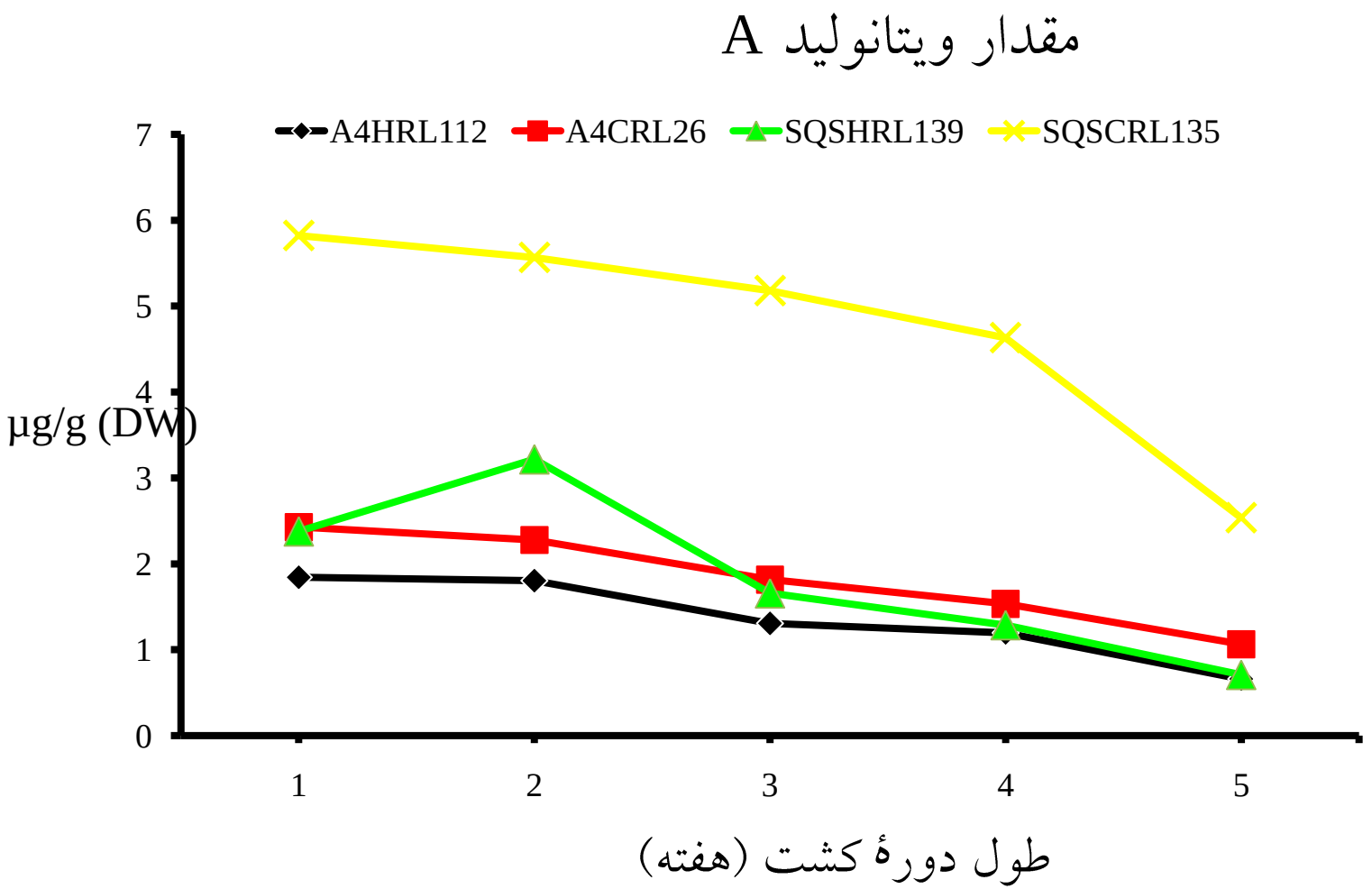
SQSCRL135

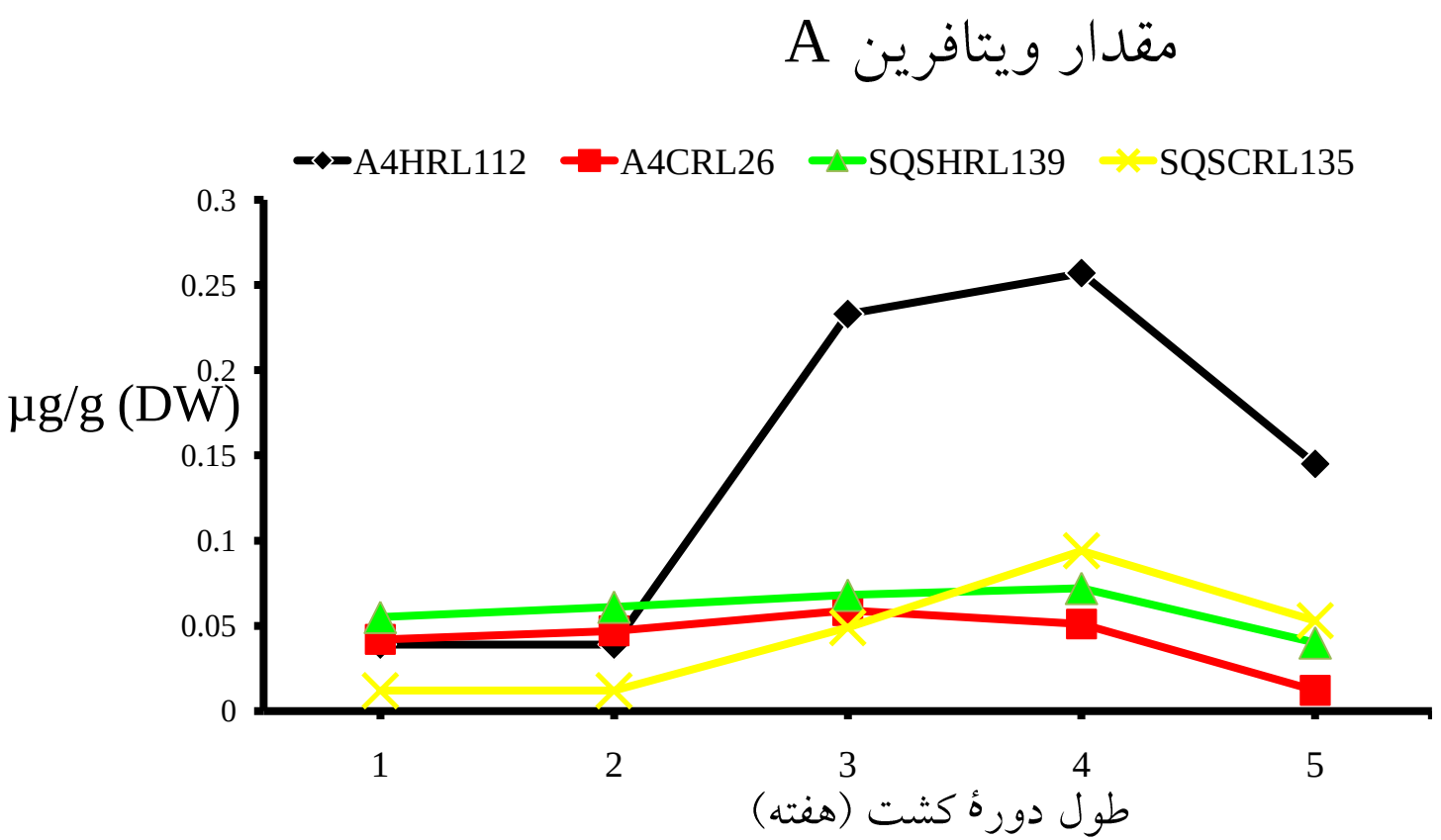
الگوي توليد مادۀ تازه ريشه هاي تراريخت



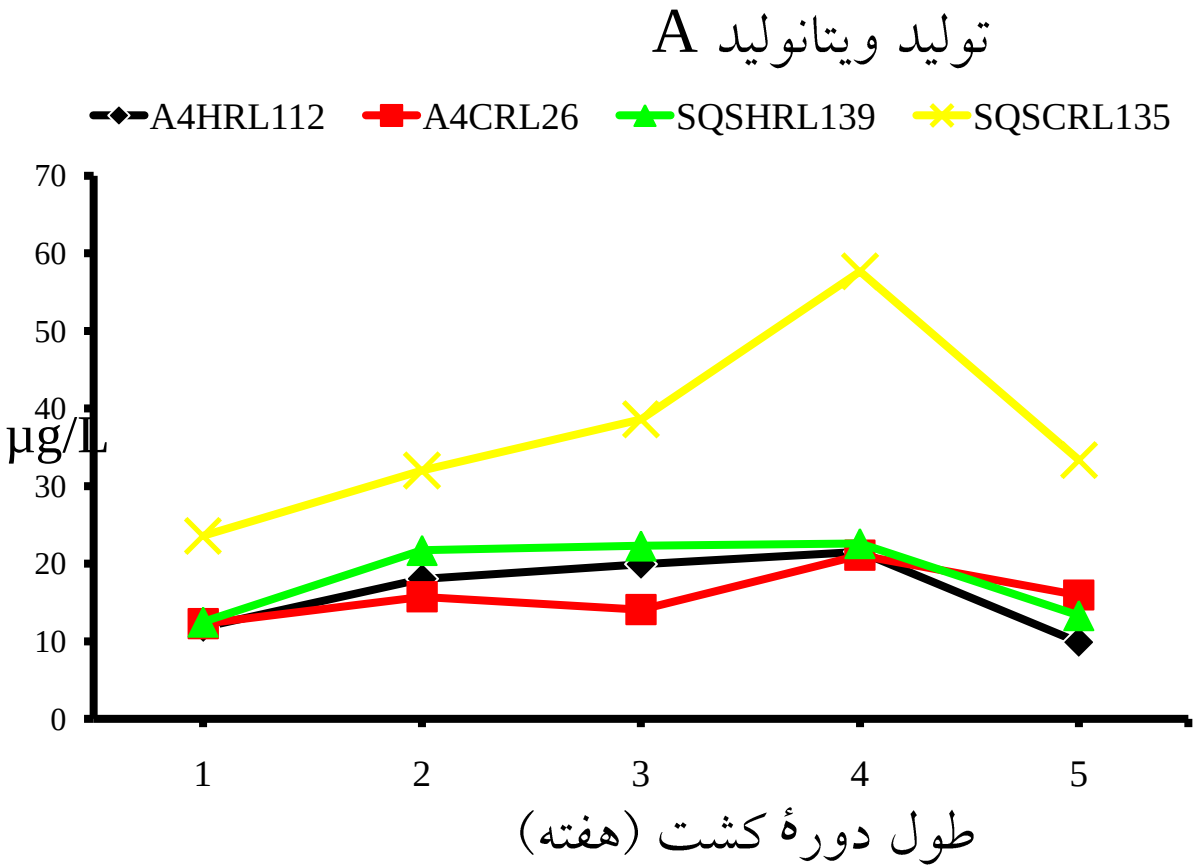
الگوی رشد ریشه های گیاه جین سنگ (Palazón et al. 2003) ریشه های کالوس شکل عدم تفاوت رشد ریشه های تراریخت دوبوئیسیا با نژاد وحشی (Palazón et al. 2003) ویتانیا سومنیفرا (Bandyopadyay et al. 2007) ریشه های مویینه شکل بیش از کالوس شکل


وزن خشک ريشه
A4HRL112
A4CRL26
SQSHRL139
SQSCRL135
0.4
0.35
0.3
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
گرم
0
1
2
3
4
5
طول دورۀ کشت (هفته)


مقدار ويتانوليد A
A4HRL112
A4CRL26
SQSHRL139
SQSCRL135
µg/g (DW)
0
1
2
3
4
5
6
7
1
2
3
4
5
طول دورهٔ کشت (هفته)



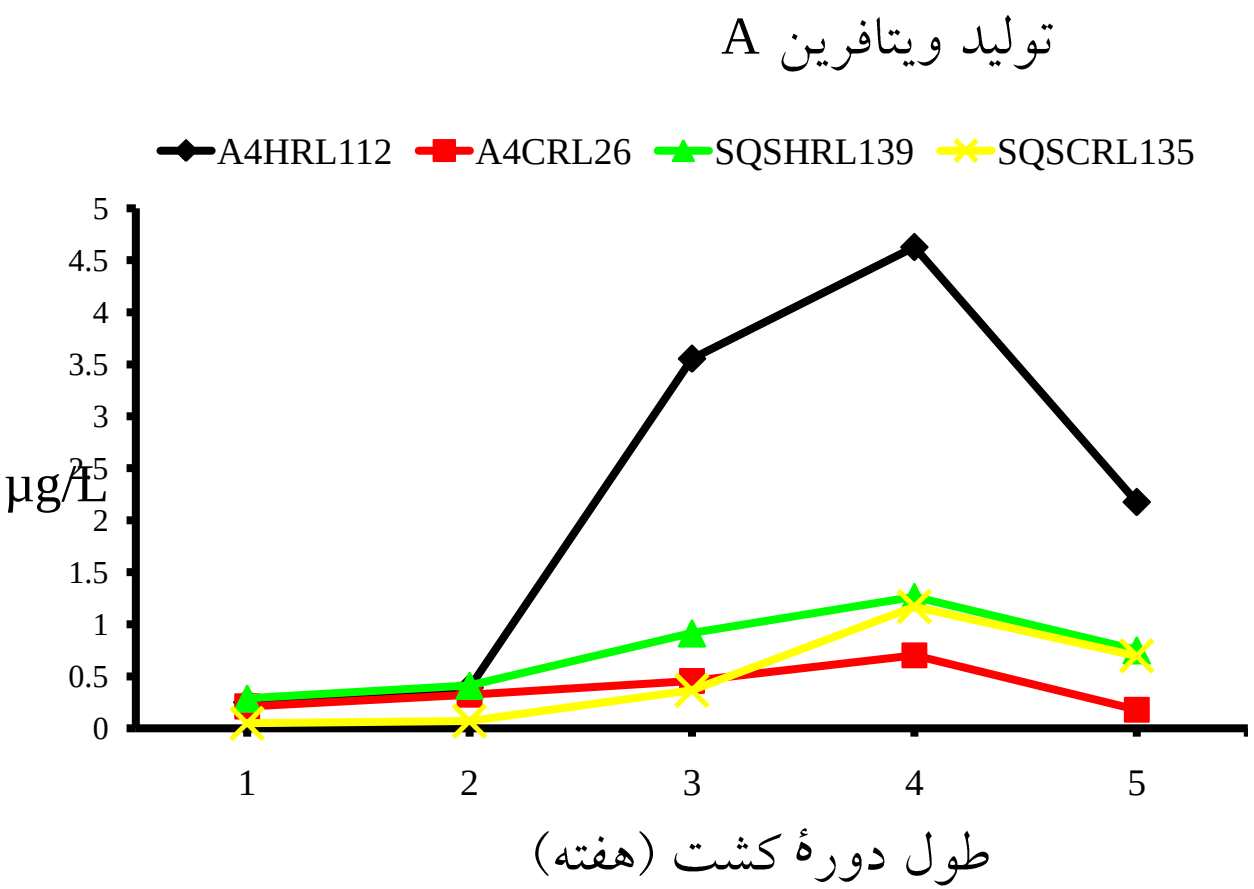
الگوی متفاوت تولید جینسنوزایدهای گیاه جین سنگ (Mallol et al. 2001)
تولید گالفیمین A در گیاه *Galphimia glauca* در طول دورهٔ کشت (Osuna et al. 2002)



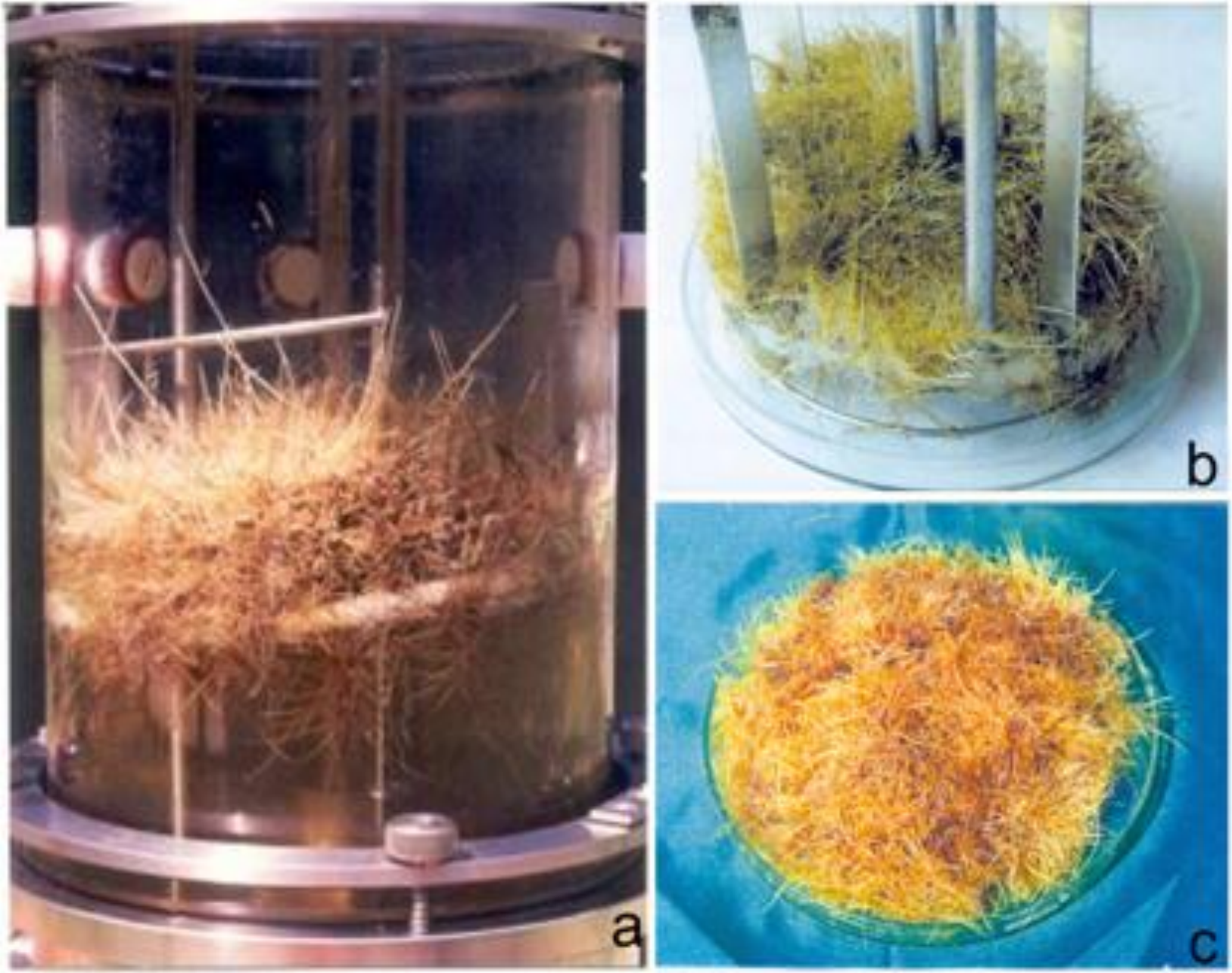
انتقال و بیان ژن اسکوالِن سینتاز

افزایش تا 2/5 برابر تولید گلیسیریزین در ریشه های تراریخت گیاه شیرین بیان (Lu et al. 2008)

تولید تری ترپنوئیدها در ریشه های تراریخت جین سنگ سیبری تا 2 برابر (Seo et al. 2005)



الگوی متفاوت تاثیر ژن پوترسین متیل ترانسفراز (*pmt*) در کشت ریشه های تراریخت گیاه دوبوئیسیا افزایش تولید آلکالوئید اِن متیل پوترسین و عدم تاثیر بر تولید سایر آلکالوئیدها (Moyano et al. 2002)


a
b
c

افزایش تولید **رزمارینیک اسید** تا 3 **برابر** در گیاه ریحان (*Ocimum basilicum*)

(Bais et al. 2002)

افزایش تولید **ساپونین ها** تا 7 **برابر** در گیاه *Solanum chrysotricum*

(Caspeta et al. 2005)

افزایش تولید **ترکیبات فنلی** تا 2/5 **برابر** در گیاه سرخارگل (*Echinacea purpurea*)

(Wang et al. 2006)

افزایش تولید **آزادیراختین** تا 5 **برابر** در گیاه چریش (*Azadirachta indica*)

(Satdive et al. 2006)

انتقال و بیان ژن فارنسیل دی فسفات سینتاز در ریشه های مویینه تراریخت گیاه درمنه افزایش تولید آرتمیزین تا ۴ برابر (Chen et al. 1999)

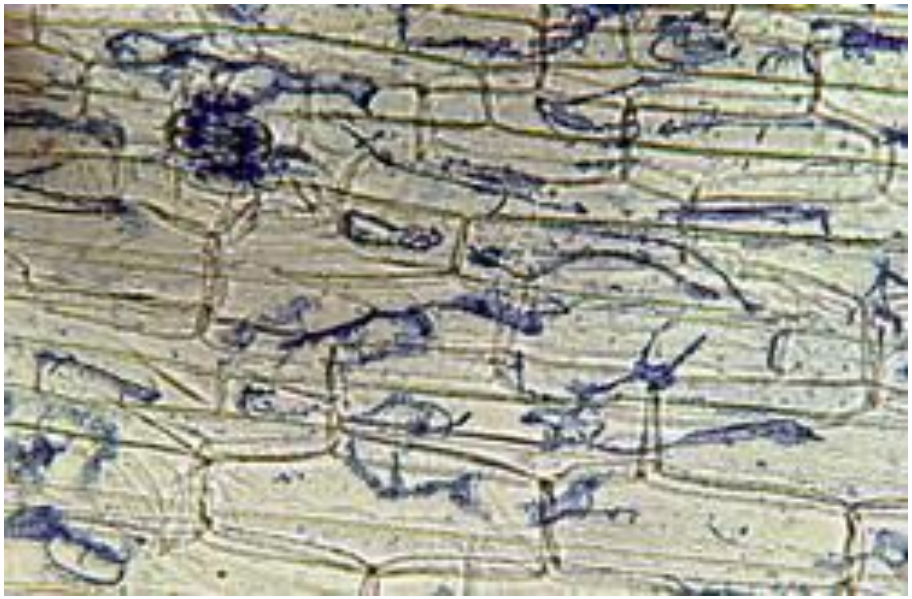
انتقال ژن چالکون ایزومراز به گونه ای از گیاه دارویی مریم گلی (*Salvia involucrata*) افزایش بیوسنتز فلاونوئید آپیجنین تا ۱۲ برابر (Lee et al. 2004)

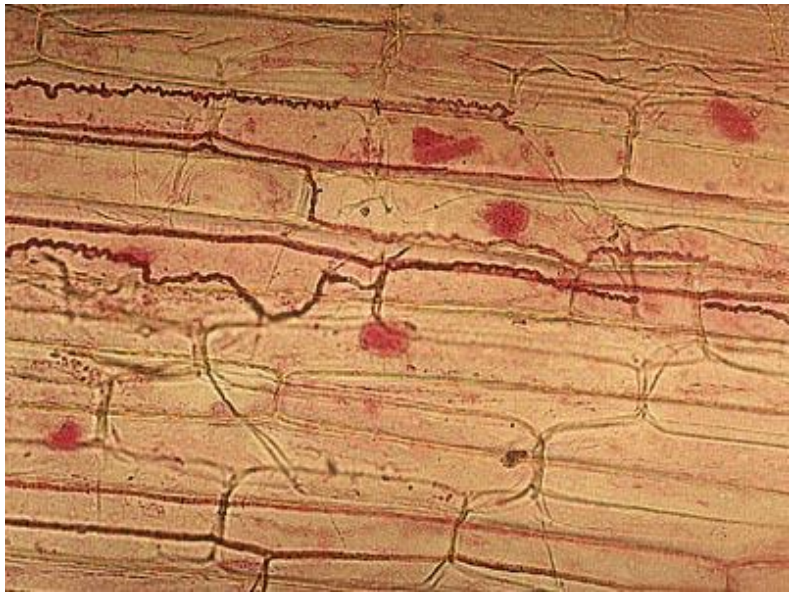
مطالعهٔ بیان ژن اسکوالِن سینتاز در ریشه های تراریخت جین سنگ سیبری افزایش تجمع تری ترپنوئیدها تا ۲/۵ برابر (Seo et al 2005)

انتقال و بیان ژن اسکوالِن سینتاز در ریشه های تراریخت گونه ای از شیرین بیان افزایش تولید گلیسیریزین در ریشه های تراریخت تا ۲/۶ برابر (Lu et al 2008)

Plant-Associated Microorganisms (**Endophytes**) as a New Source of Bioactive Natural Products

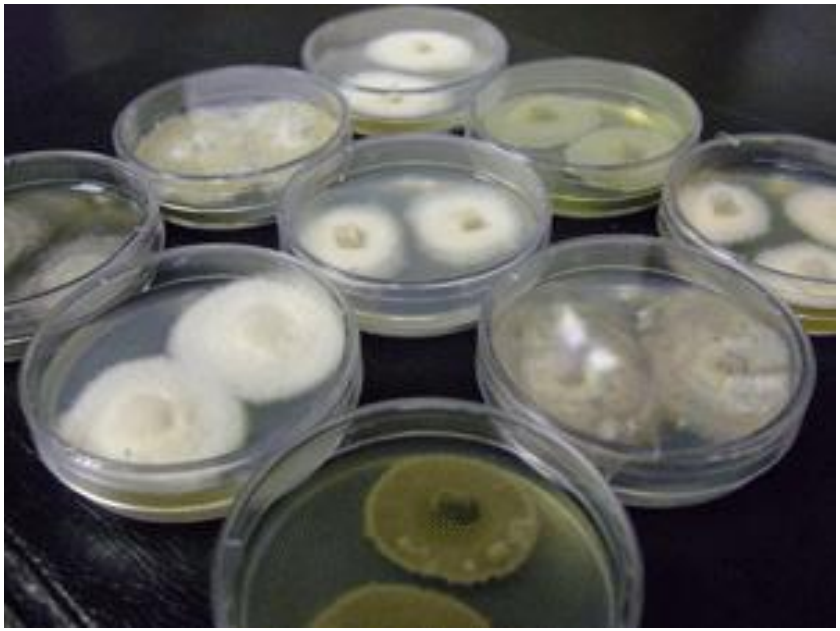
Endophytic microorganisms are to be found in virtually **every higher plant**.





These organisms reside in the **living tissues** of the host plant, and do so in a variety of relationships ranging from **symbiotic** to **pathogenic**.

"*Microbes that colonize living, internal tissues of plants without causing any immediate, overt negative effects*".



Endophytes may contribute to their host plant by producing a plethora of substances that provide **protection** and **survival value** to the plant.

These compounds, once isolated and characterized, may also have potential for use in **modern medicine**.

Novel antibiotics, antimycotics, immunosuppressants, and anticancer compounds.

The potential for the discovery of **new drugs** that may be effective candidates for treating newly developing diseases in humans is vast.

Among the approximately **300 000** higher plant species that exist on the Earth, each individual plant of the billions that exist is most likely a host to **one or more endophytes** .

Novel natural products, and the organisms that create them, offer major opportunities for innovation in **drug discovery**.

مثالی از ترکیبات طبیعی جداسازی شده از اندوفیت ها

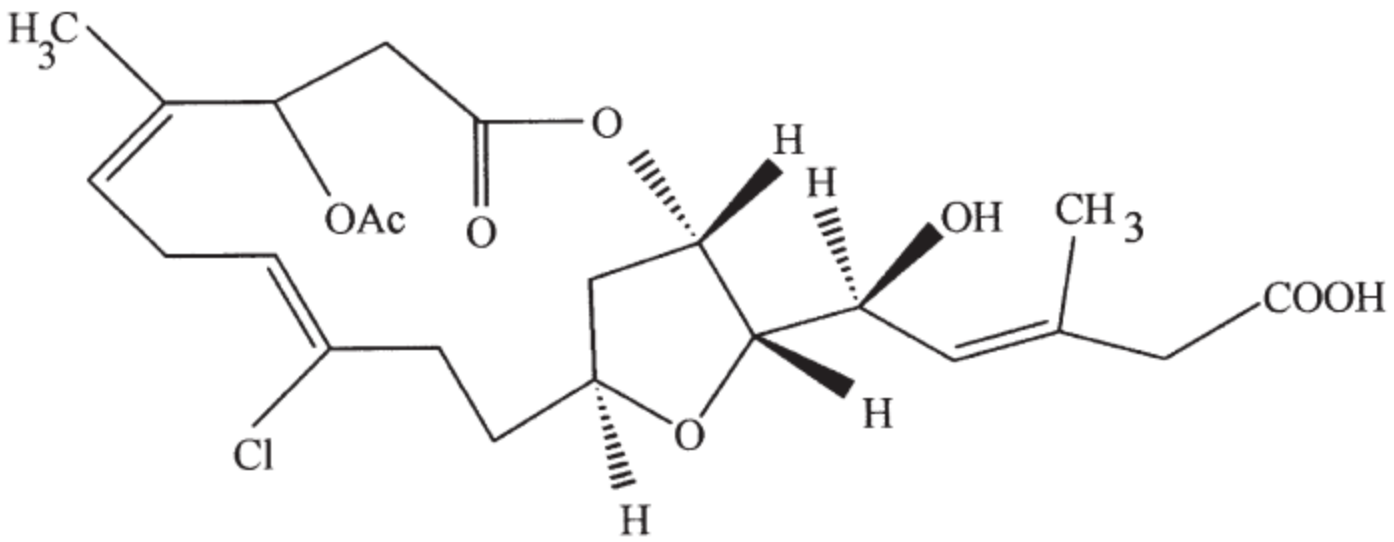


Fig. 4.1 Oocydin A, a chlorinated macrocyclic lactone isolated and characterized from a strain of *Serratia marcescens*, obtained from *Rhyncholacis penicillata* (stereochemistry unknown).

مثالی از ترکیبات طبیعی جداسازی شده از اندوفیت ها

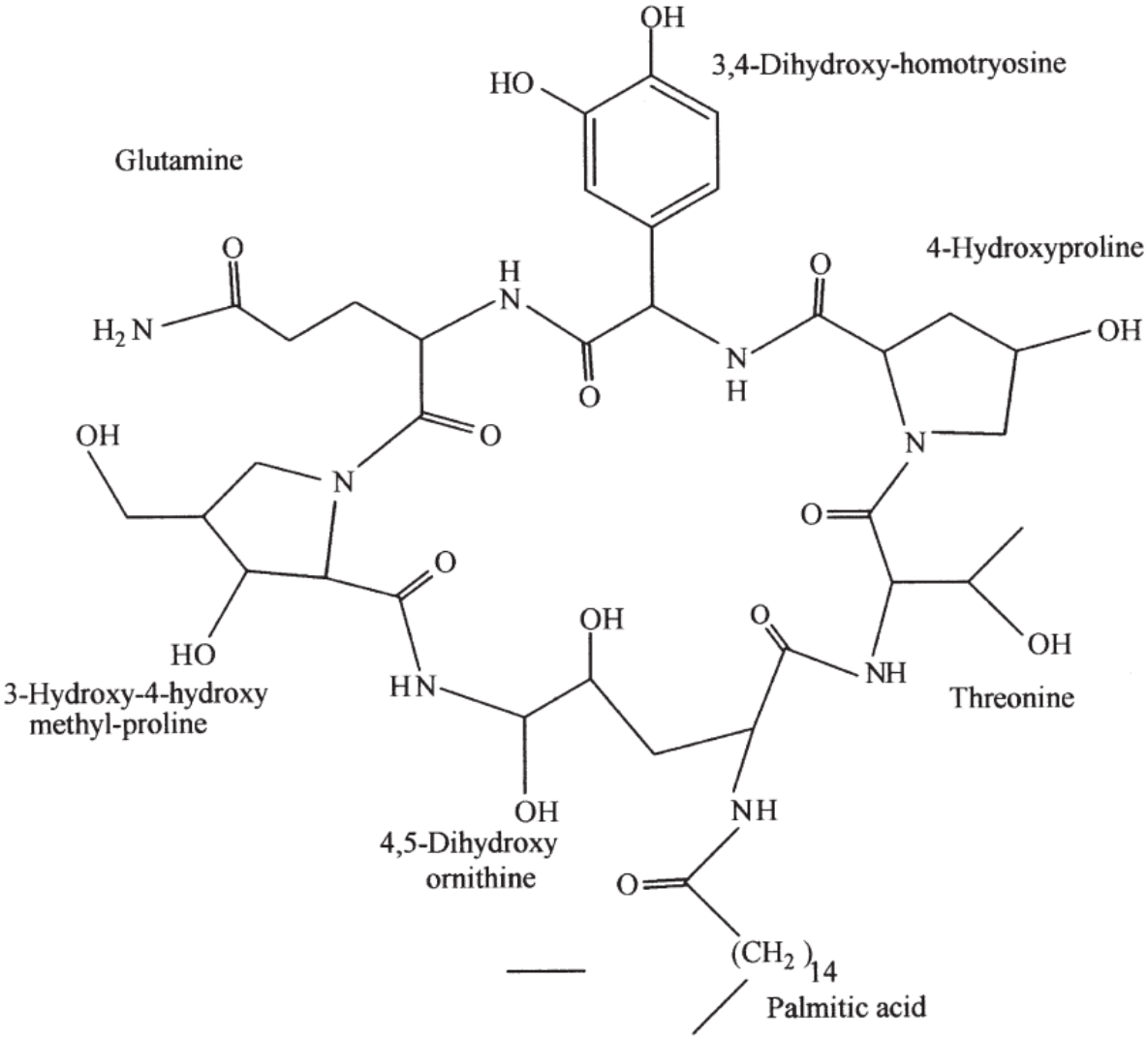


Fig. 4.2 Cryptocandin A, an antifungal lipopeptide obtained from the endophytic fungus, *Cryptosporiopsis* cf. *quercina*. (No stereochemistry is intended.)

مثالی از ترکیبات طبیعی جداسازی شده از اندوفیت ها

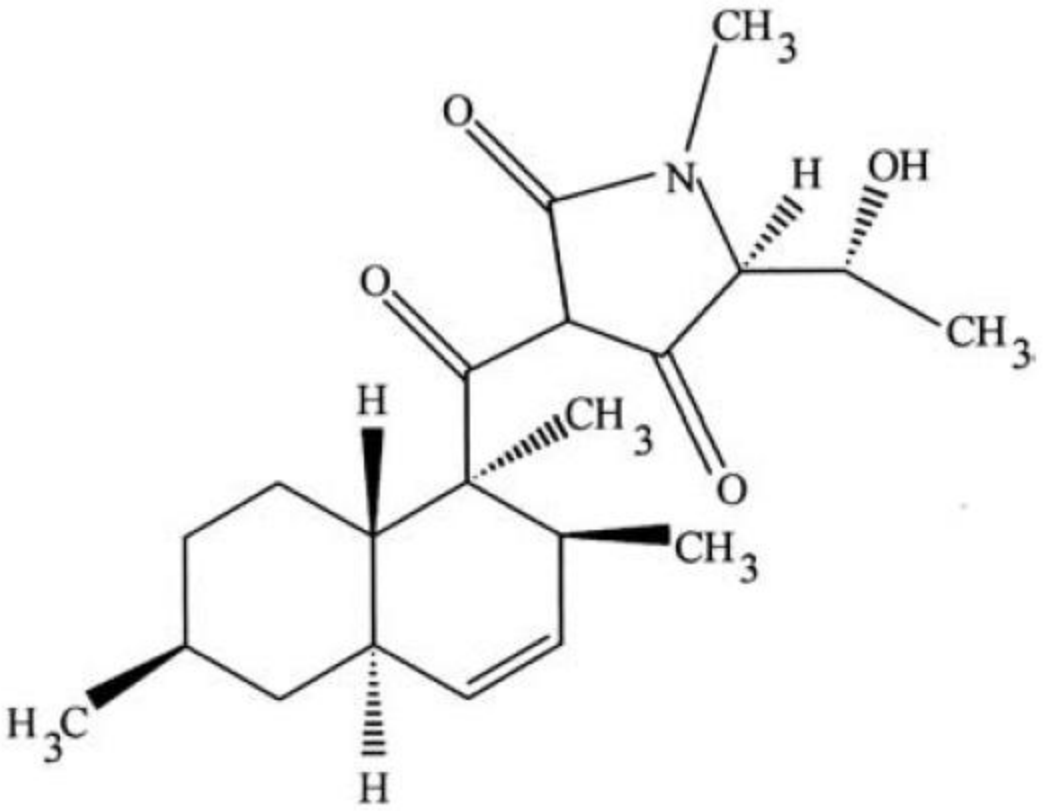


Fig. 4.3 Cryptocin, a tetramic acid antifungal compound found in *Cryptosporiopsis* cf. *quercina*

مثالی از ترکیبات طبیعی جداسازی شده از اندوفیت ها

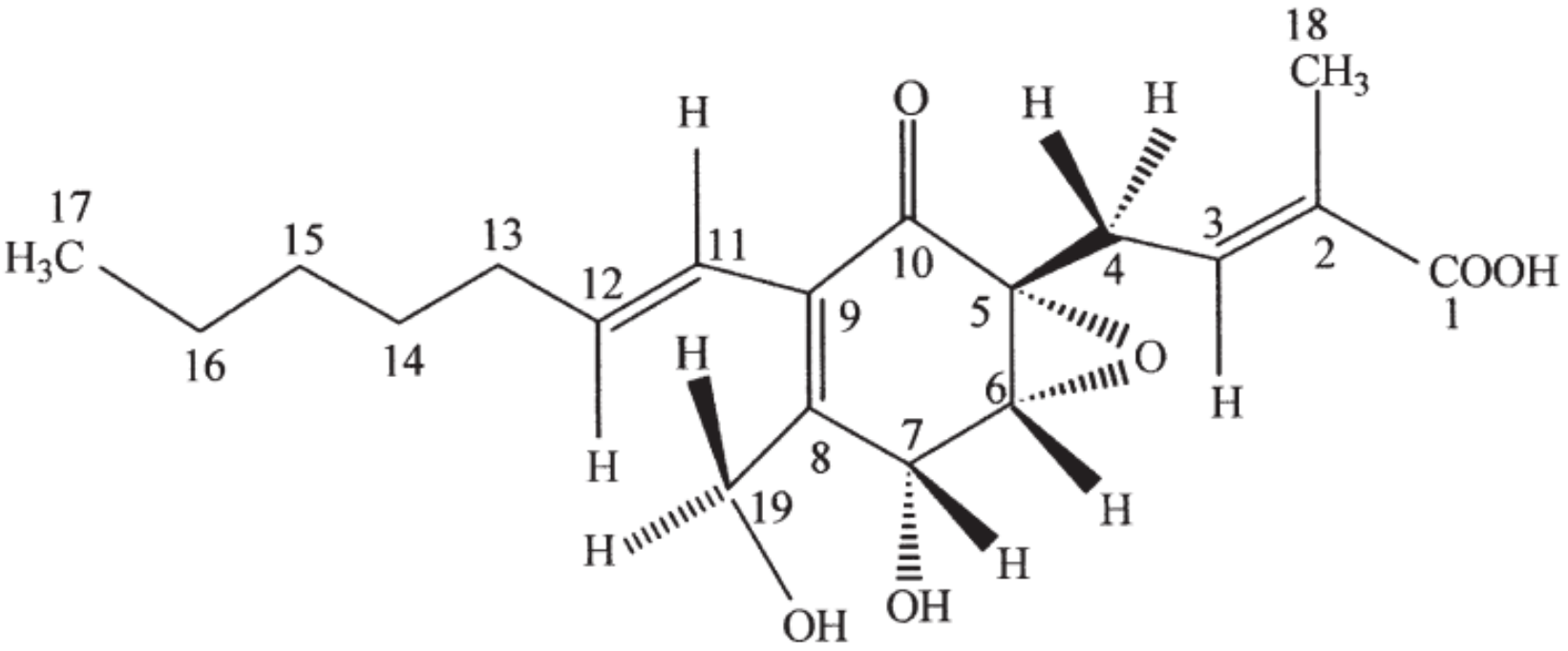


Fig. 4.4 Ambuic acid, a highly functionalized cyclohexenone produced by a number of isolates of *Pestalotiopsis microspora* found in rainforests around the world. This compound possesses antifungal activity and has been used as a model compound for the development of solid-state NMR methods for the structural determination of natural products.

مثالی از ترکیبات طبیعی جداسازی شده از اندوفیت ها

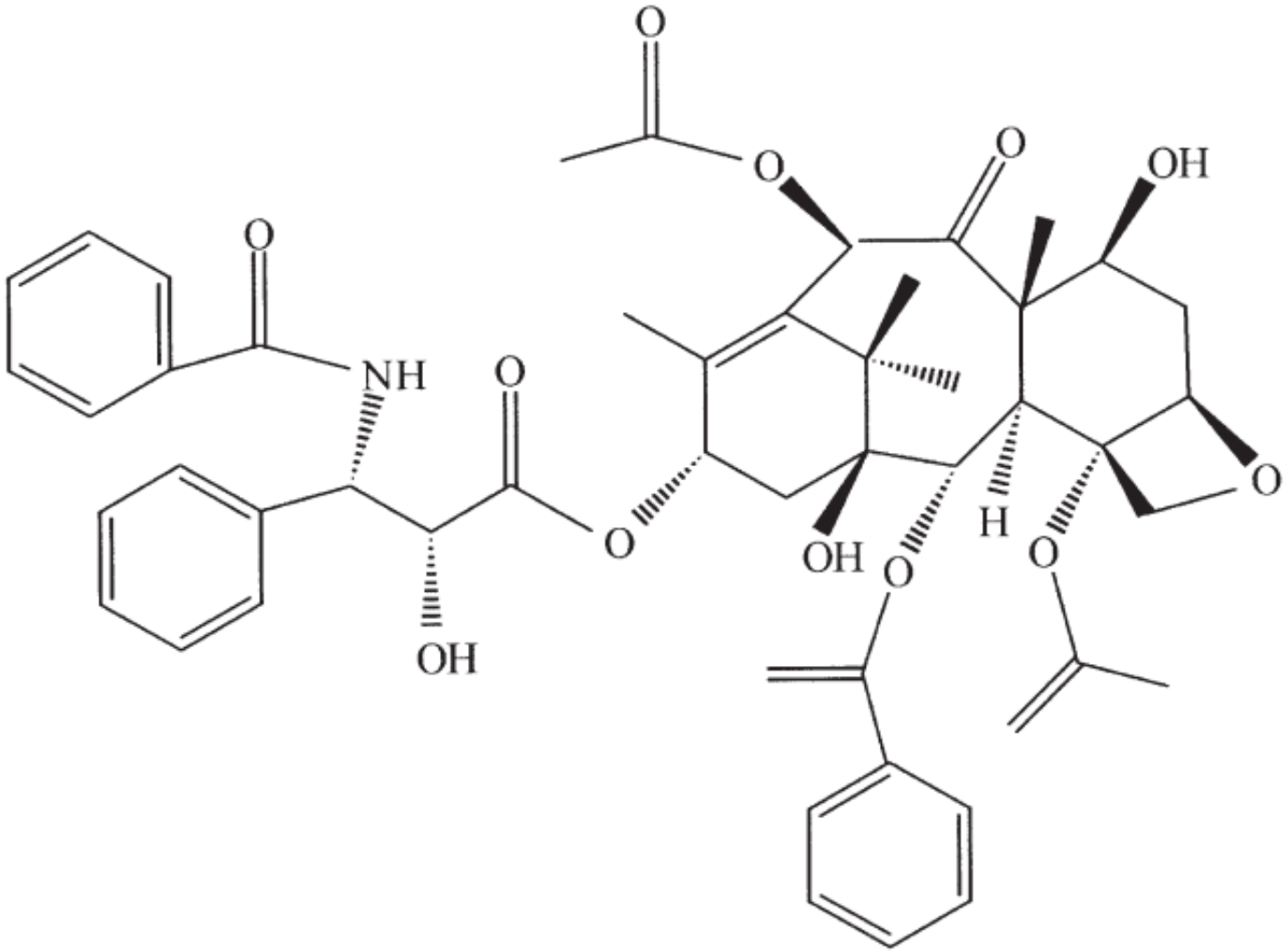


Fig. 4.7 Taxol, the world's first billion-dollar anticancer drug is produced by many endophytic fungi. It too, possesses outstanding antioomycete activity.

اندوفیت ها منبع ترکیبات دارویی ارزشمند

اندوفیت ها منبع ترکیبات دارویی ارزشمند

Gary Strobel

"Mother Nature does not work with single compounds.
It's the family that gets the job done,“

US005322779A

United States Patent [19]

Strobel et al.

[11] **Patent Number: 5,322,779**

[45] **Date of Patent: Jun. 21, 1994**

[54] **TAXOL PRODUCTION BY TAXOMYCES ANDREANAE**

[75] Inventors: **Gary A. Strobel**, Bozeman; **Andrea A. Stierle**; **Donald B. Stierle**, both of Butte, all of Mont.

[73] Assignee: **The Research and Development Institute, Inc. at Montana State University**, Bozeman, Mont.

[21] Appl. No.: **971,508**

[22] Filed: **Nov. 4, 1992**

[58] **Field of Search** 435/123, 117, 132, 147, 435/155, 171, 254.1, 911; 549/510, 511

[56] **References Cited**

U.S. PATENT DOCUMENTS

4,206,221	6/1980	Miller et al.	424/278
4,468,458	8/1984	Sato et al.	435/134
5,019,504	5/1991	Christen et al.	435/123

Primary Examiner—Douglas W. Robinson
Assistant Examiner—L. Blaine Lankford
Attorney, Agent, or Firm—Lowe, Price, LeBlanc & Becker

Journal of Applied Microbiology

Journal of Applied Microbiology ISSN 1364-5072

ORIGINAL ARTICLE

Aspergillus niger var. *taxi*, a new species variant of taxol-producing fungus isolated from *Taxus cuspidata* in China

K. Zhao, W. Ping, Q. Li, S. Hao, L. Zhao, T. Gao and D. Zhou

Key Laboratory of Microbiology, College of Life Science, Heilongjiang University, Harbin, China

Eng. Life Sci. **2008**, *8*, No. 4, 438–446

R. Senthil Kumaran[1]
J. Muthumary[2]
B. K. Hur[1]

[1] Department of Biological Engineering, Inha University, Incheon, South Korea.

[2] Centre for Advanced Studies in Botany, University of Madras, Guindy Campus, Chennai, India.

Communication

Production of Taxol from *Phyllosticta spinarum*, an Endophytic Fungus of *Cupressus* sp.

Taxol production during the cultivation on a modified liquid and potato dextrose broth medium was indicated for the first time to occur in *Phyllosticta spinarum*, an endophytic fungus isolated from the needles of *Cupressus* sp. The presence of taxol in the fungal culture filtrate was confirmed by chromatographic and spectroscopic methods of analysis. The amount of taxol produced by this fungus was quantified by high performance liquid chromatography. The maximum amount of taxol production was obtained in this fungus when grown on M1D medium (235 µg/L) followed by PDB medium (125 µg/L). The results indicate that *P. spinarum* is an excellent candidate for taxol production. The production rate was 4.7×10^3-fold higher than that found in the culture broth of an earlier reported fungus, *Taxomyces andreanae*. The fungal taxol extracted also showed a strong cytotoxic activity in the in vitro culture of human cancer cells tested in an apoptotic assay.

سابقه علمی اندوفیت ها

ELSEVIER

FEMS Microbiology Letters 193 (2000) 249–253

FEMS MICROBIOLOGY Letters

www.fems-microbiology.org

Taxol from *Tubercularia* sp. strain TF5, an endophytic fungus of *Taxus mairei*

Jianfeng Wang, Guiling Li, Huaying Lu, Zhonghui Zheng, Yaojian Huang, Wenjin Su *

The Key Laboratory of Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell, Engineering and School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, PR China

Received 4 May 2000; received in revised form 16 October 2000; accepted 16 October 2000

A New Endophytic Taxane Production Fungus from *Taxus Chinensis*[1]

Z. Miao*, Y. Wang, X. Yu, B. Guo, and K. Tang

Plant Biotechnology Research Center, School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai, 200240, P.R. China

**e-mail: zm46@cornell.edu*

Received June 24, 2007

Abstract—More than 50 kinds of endophytic fungi associated with *Taxus chinensis* were isolated and examined as a potential source of the imposing anticancer drug taxol. Of these, four isolates show ability to produce taxane when measured with the competitive inhibition enzyme immunoassay method. The most promising clone, DA10, identified as *Mucor rouxianus* sp., is the first rouxianus reported as taxol production fungus. The presence of taxol and its important precursors, such as 10-diacetyl baccatinIII (**10-DAB**) and baccatinIII, in the culture of this fungus was confirmed by reactivity with a taxane-specific monoclonal antibody, comparative chromatographic and mass spectrometric behavior, cytotoxity to liver carcinoma 7402, and molecular cloning of kernel fragment of taxadiene synthase gene.

سابقه علمی اندوفیت ها

FEMS MICROBIOLOGY LETTERS

http://mc.manuscriptcentral.com/fems

Isolation and characterization of Stemphylium sedicola SBU-16 as a new endophytic taxol-producing fungus from Taxus baccata grown in Iran

Mirjalili, Mohammad Hossein; Medicinal Plants and Drugs Research Institute, Agriculture
Farzaneh, Mohsen; Medicinal Plants and Drugs Research Institute, Agriculture
Bonfill, Mercedes; Faculty of Pharmacy, Plant physiology and Edaphology
Ghassempour, Alireza; Medicinal Plants and Drugs Research Institute, Phytochemistry

It is **important** to understand that the **methods** and **rationale** used seem to provide the best opportunities to isolate **novel endophytic microorganisms** at the genus, species, or biotype levels.

✓Plants from **unique environmental** settings, especially those with an **unusual biology**, and possessing novel strategies for survival, are seriously considered for study.

✓Plants that have an **ethnobotanical history** (used by indigenous peoples) and are related to the **specific uses** or applications of interest are selected for study.

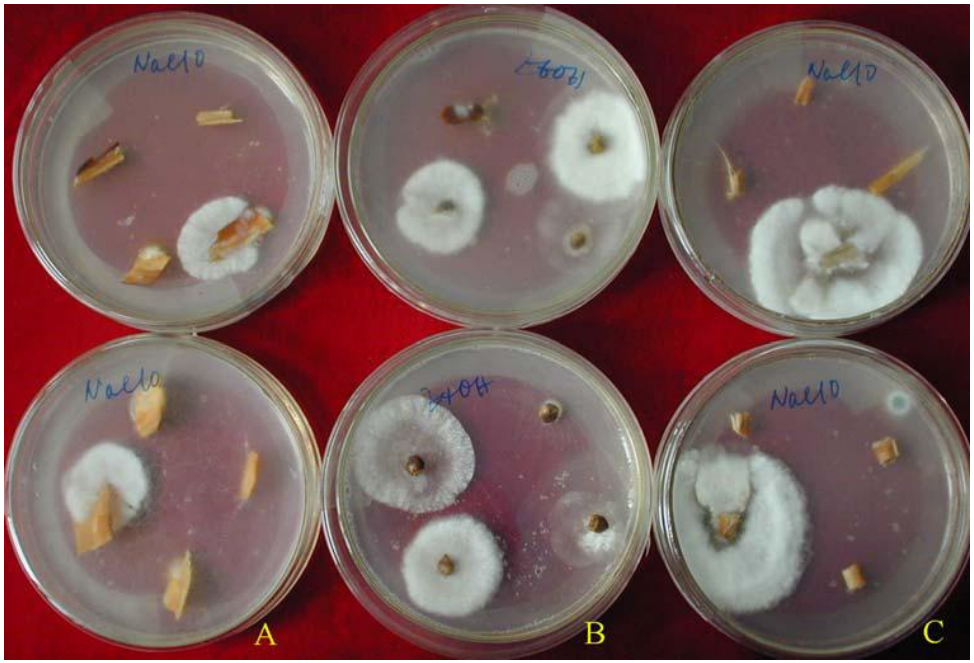
❑These plants are chosen either by direct contact with **local** peoples, or via local literature.

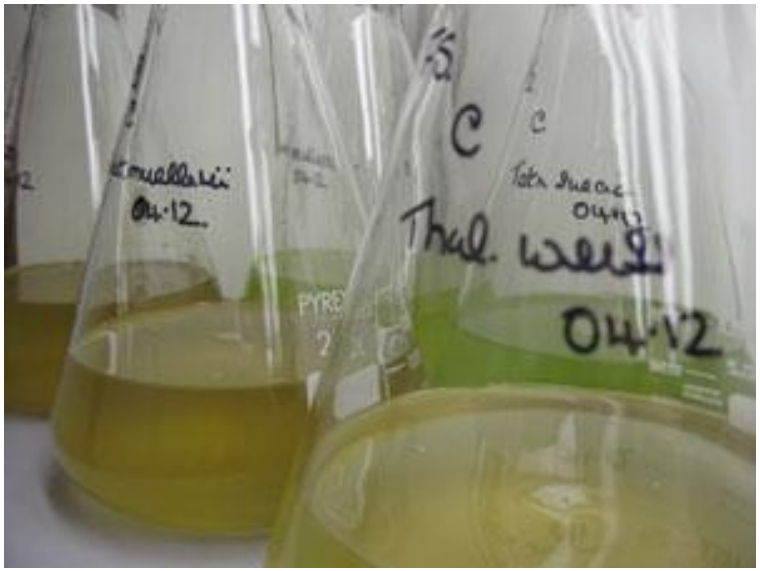
❑Ultimately, it may be learned that the healing powers of the botanical source may in fact not be related to the natural products of the plant, but rather to **the endophyte** inhabiting the plant.

✓Plants that are **endemic**, having an unusual longevity, or have occupied a certain ancient land mass are also more likely to lodge endophytes with active natural products than other plants.

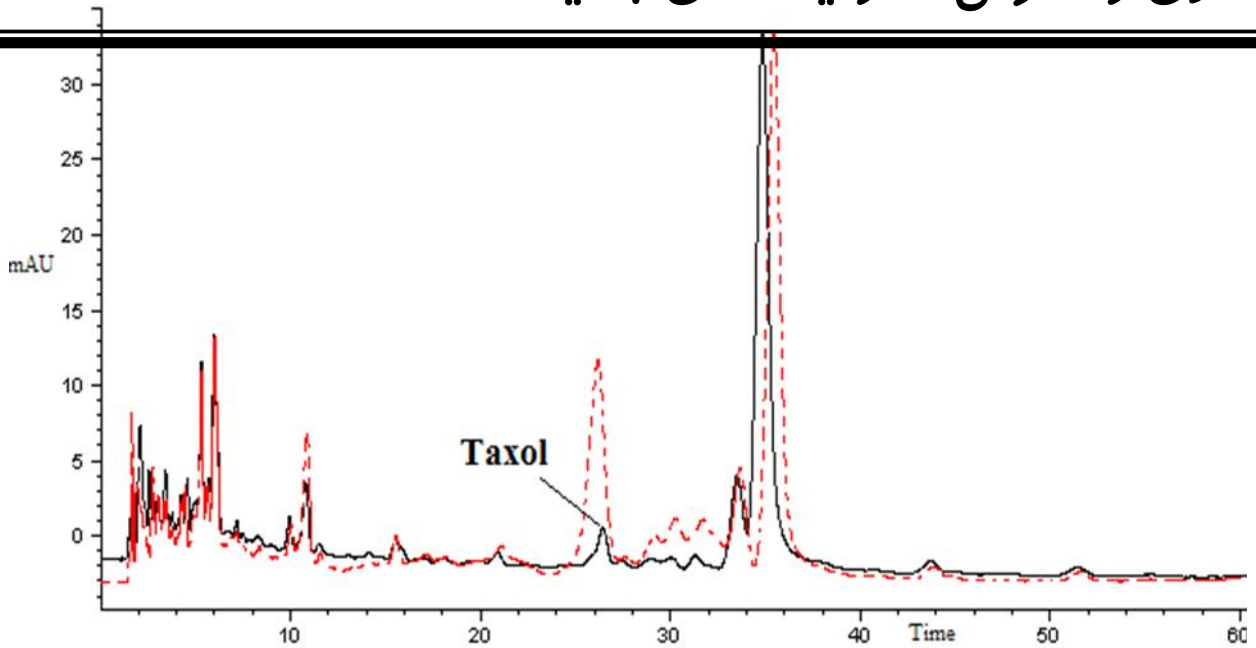
✓Plants growing in areas of **great biodiversity**, it follows, also have the prospect of housing endophytes with great biodiversity.

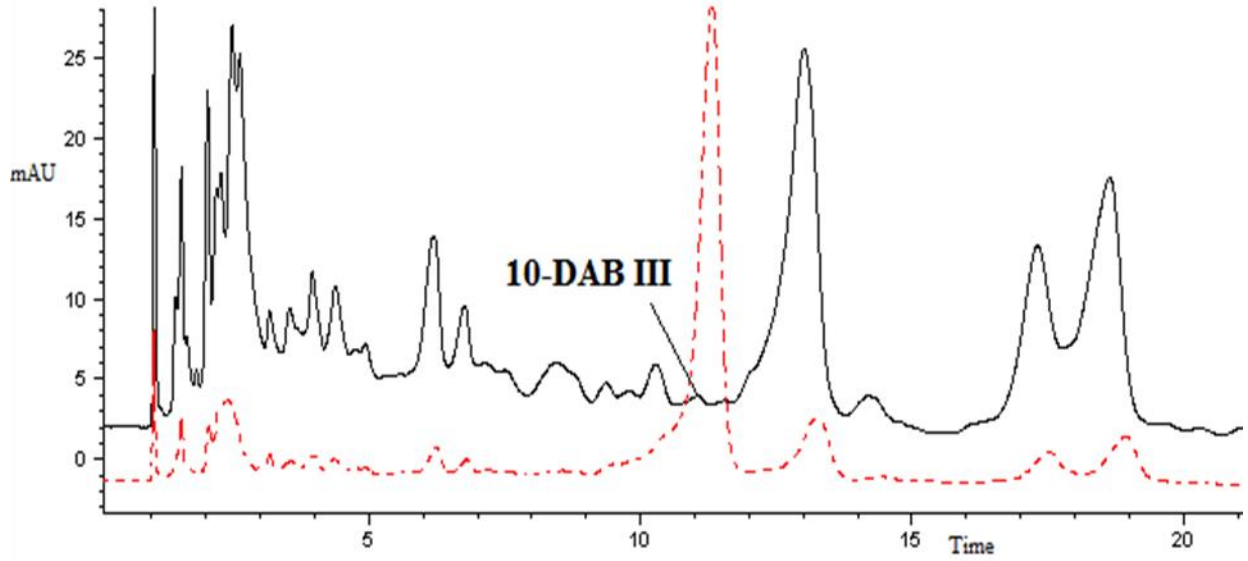
مراحل جداسازی و معرفی اندوفیت های جدید



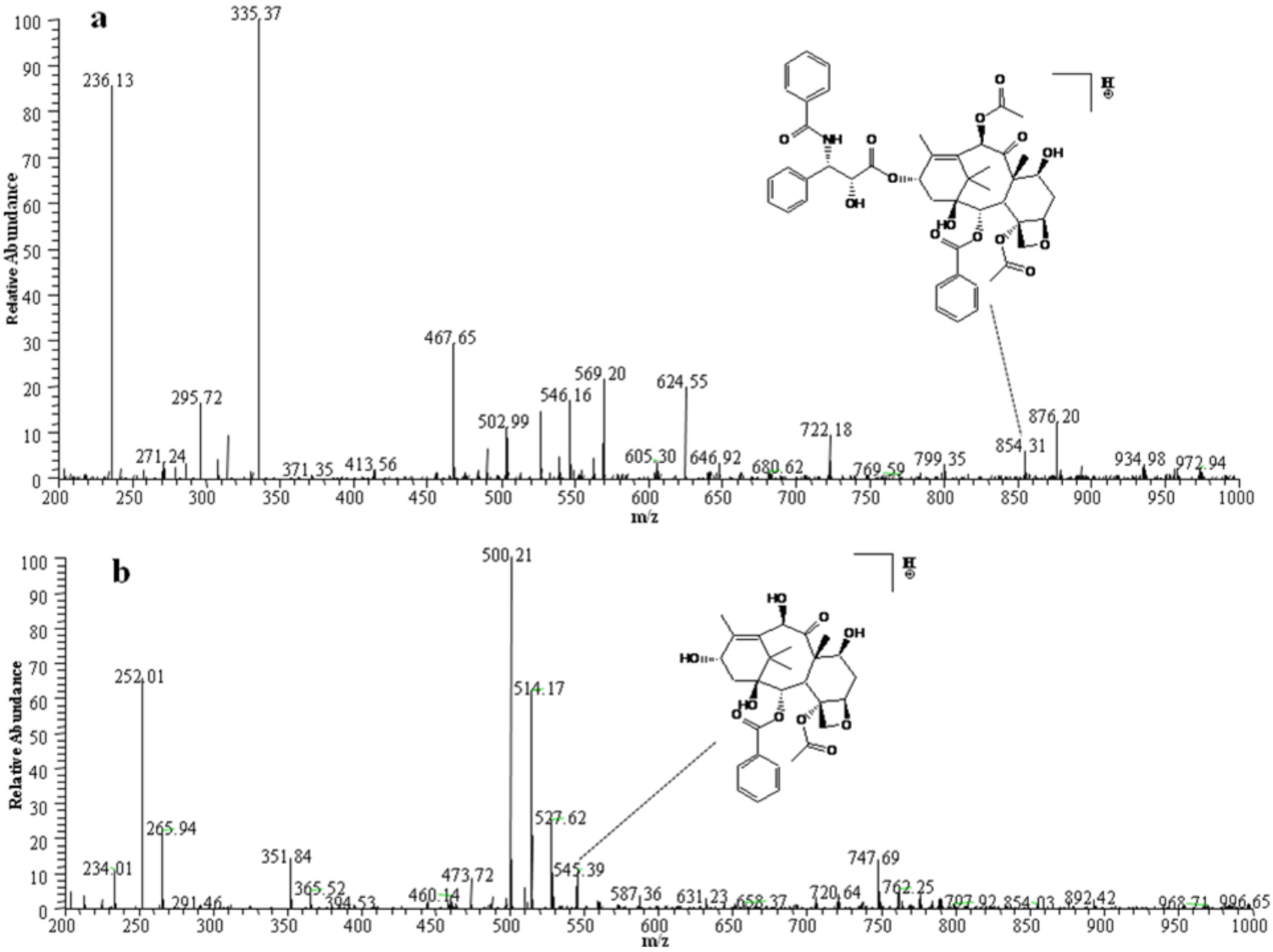


مراحل جداسازی و معرفی اندوفیت های جدید





مراحل جداسازی و معرفی اندوفیت های جدید



مراحل جداسازی و معرفی اندوفیت های جدید

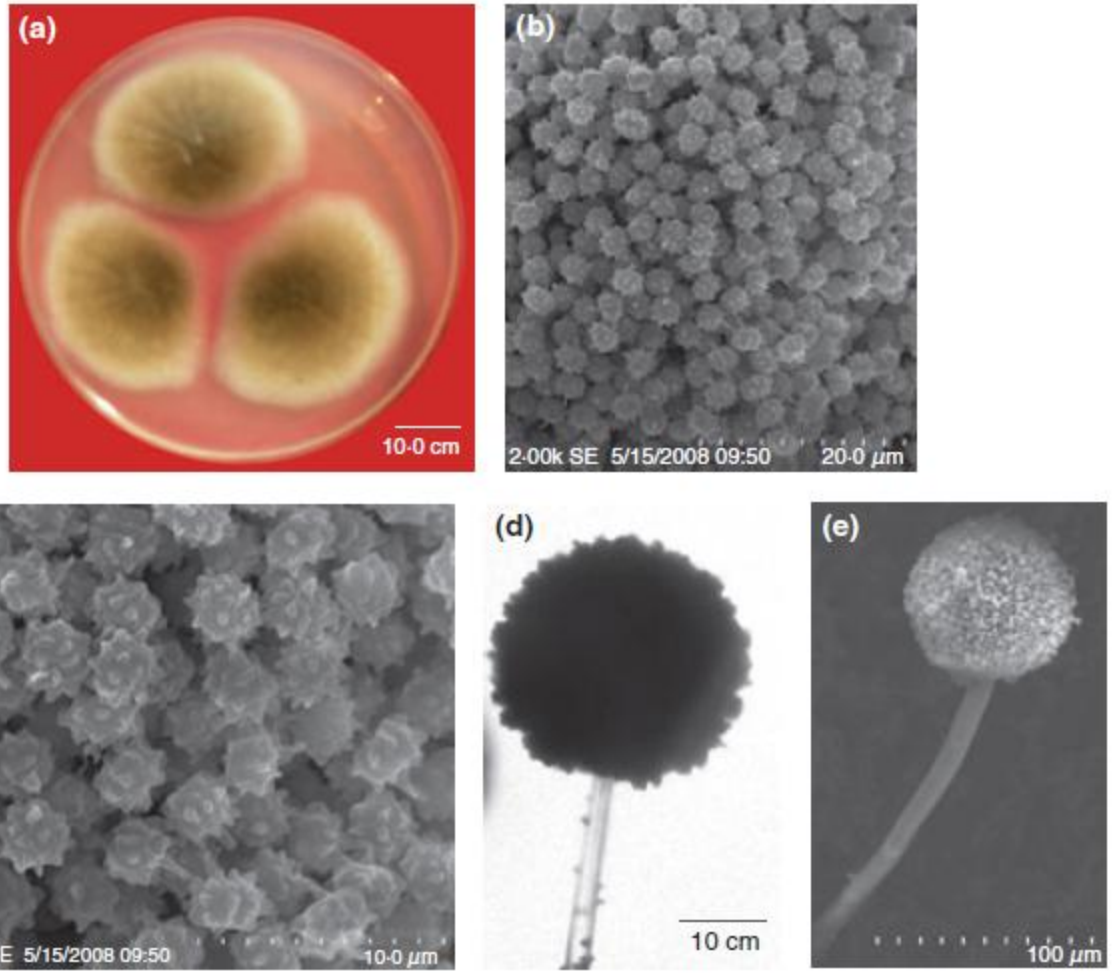
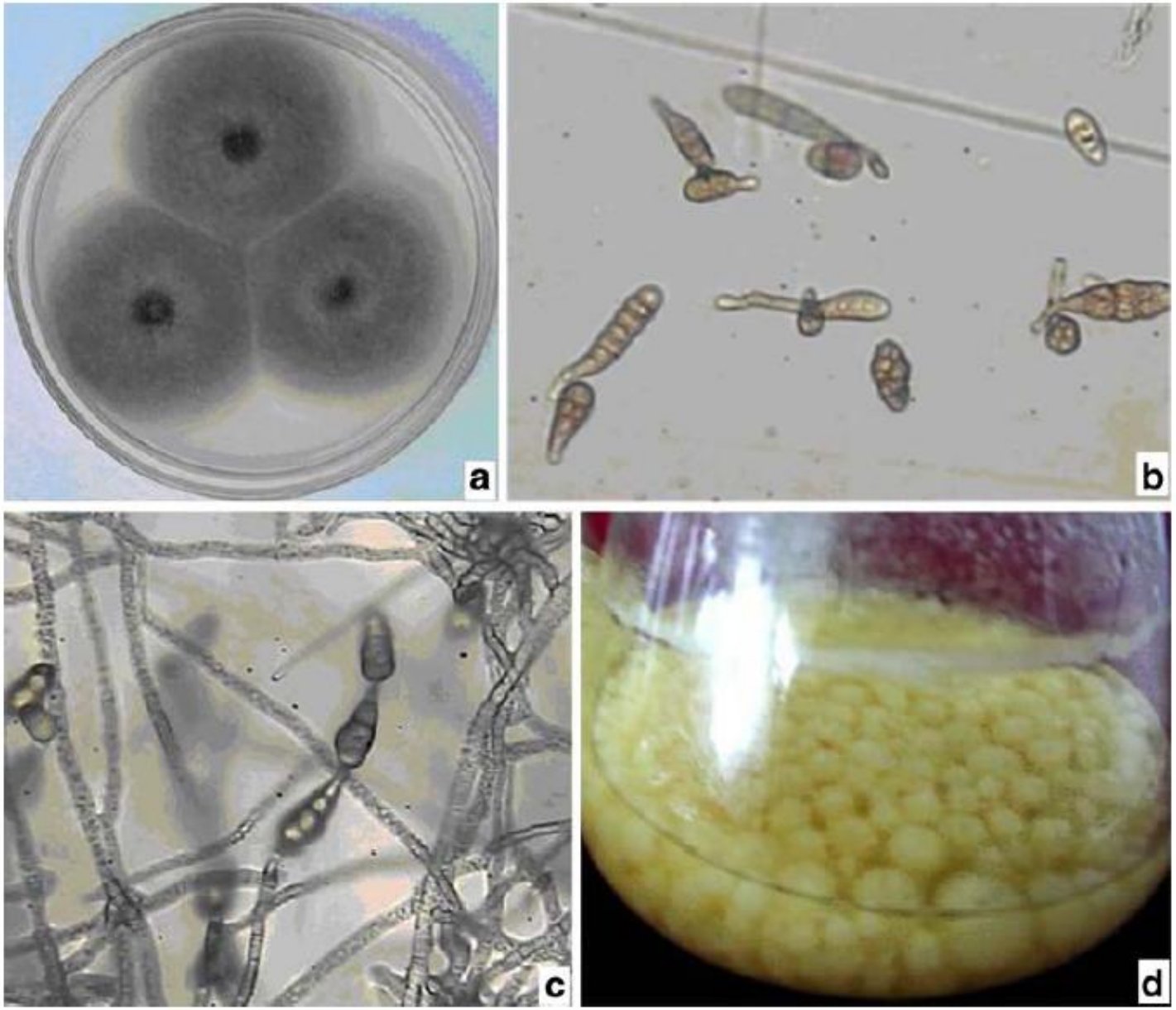
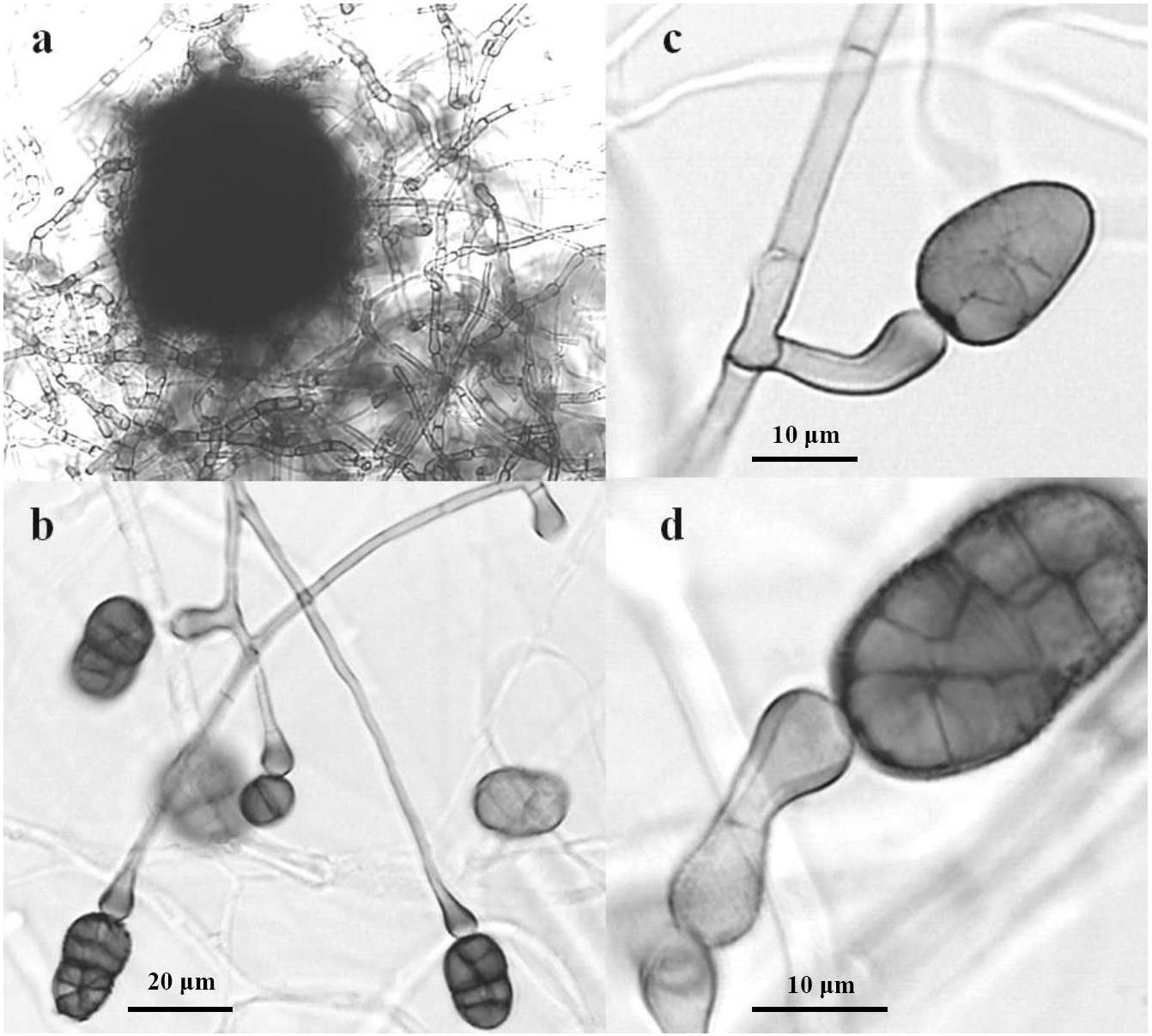


Figure 3 Morphology of taxol-producing endophytic fungus HD86-9. (a) Colony growing on PDA medium at 28°C for 3 days; (b, c) conidia viewed under a scanning electron microscope at the magnitudes of 2000 (b) and 5000 (c); (d, e) conidiophores viewed under a light microscope at the magnitudes of 1000 (d) and 370 (e).

مراحل جداسازی و معرفی اندوفیت های جدید



مراحل جداسازی و معرفی اندوفیت های جدید



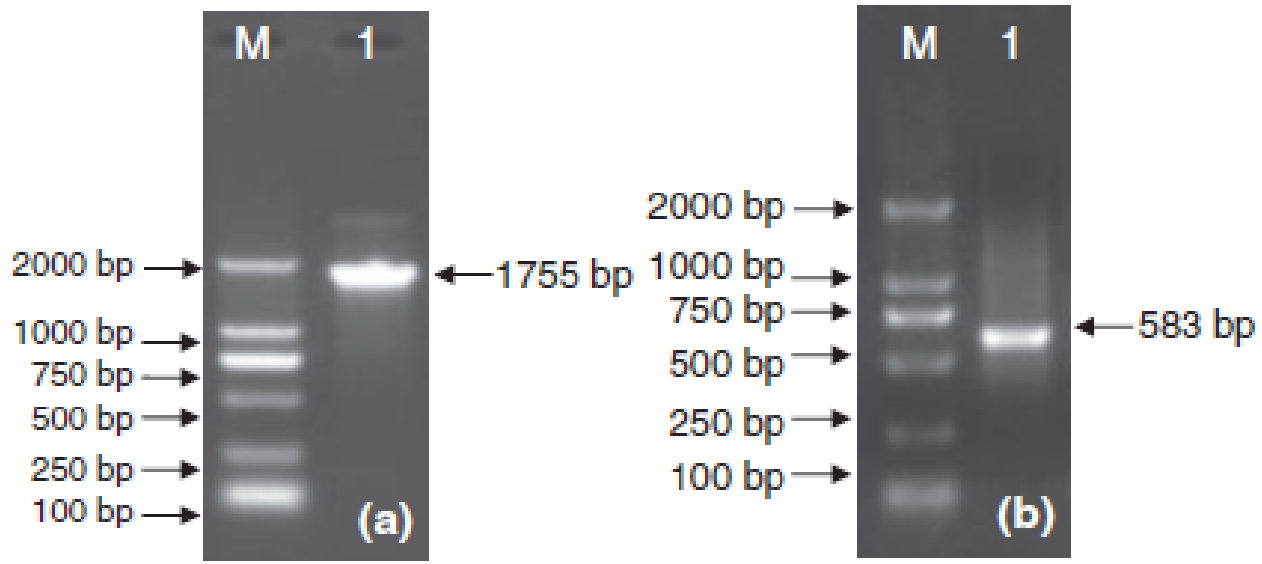


Figure 4 Agarose gel electrophesis for PCR products of the 18S rDNA and ITS region including the 5·8S rDNA amplified from strain HD86-9. (a) The 18S rDNA; (b) The ITS region. Lane M: DNA molecular weight marker DL2000.

مراحل جداسازی و معرفی اندوفیت های جدید

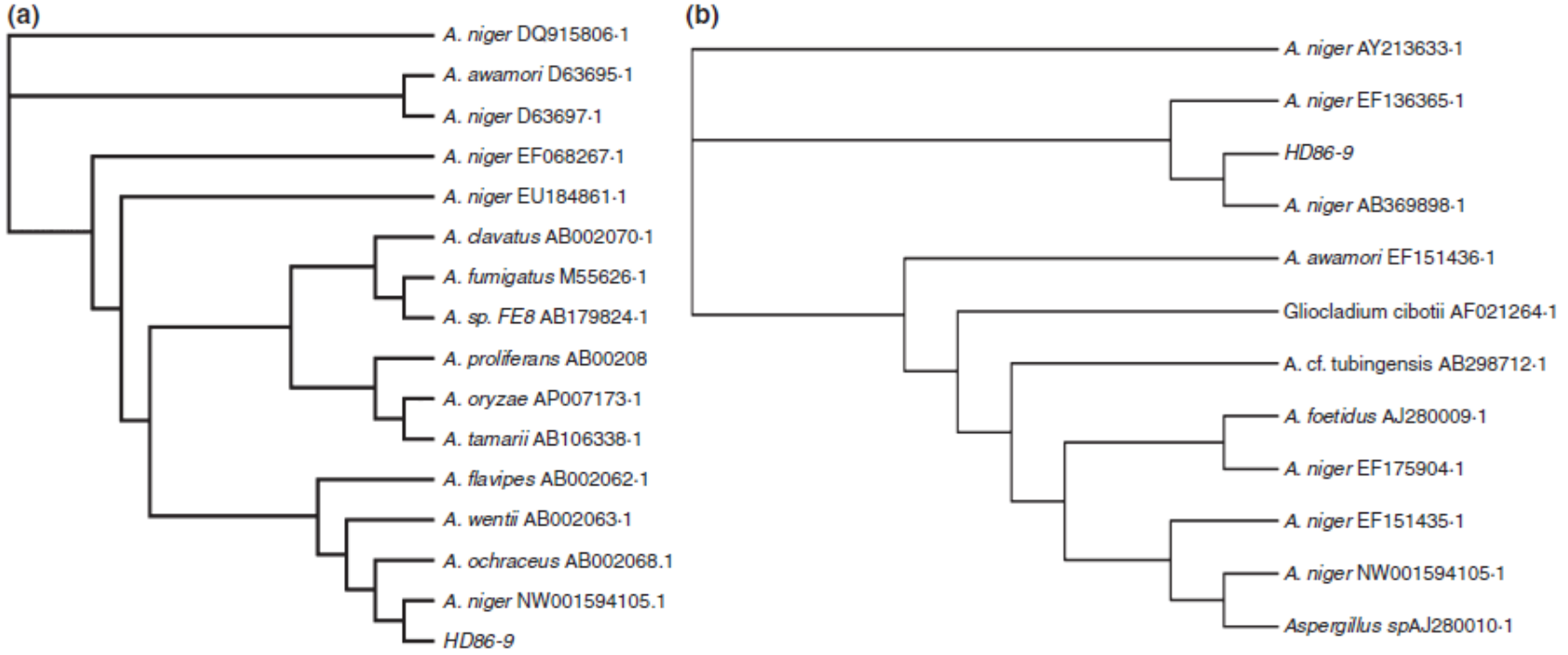
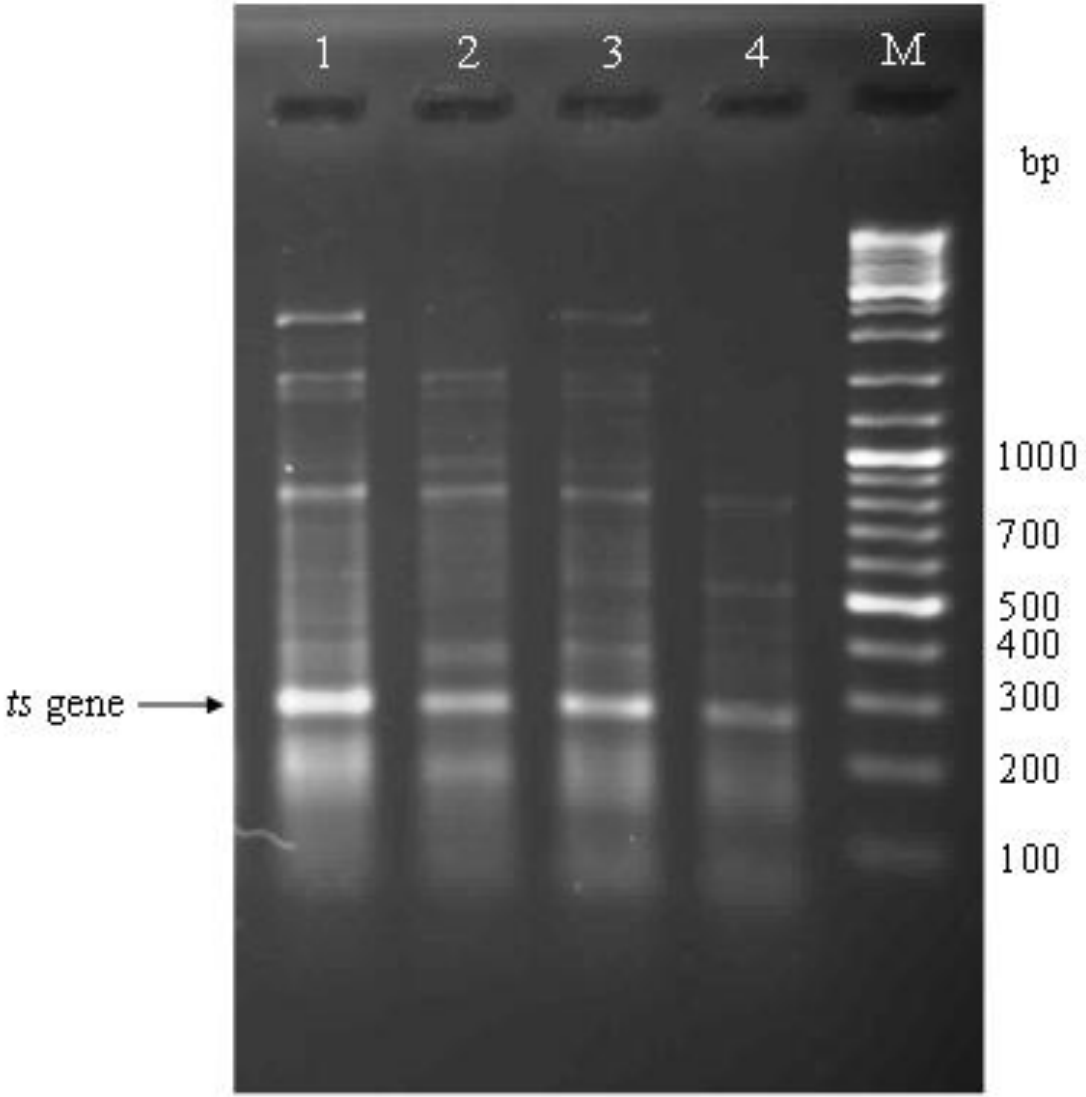
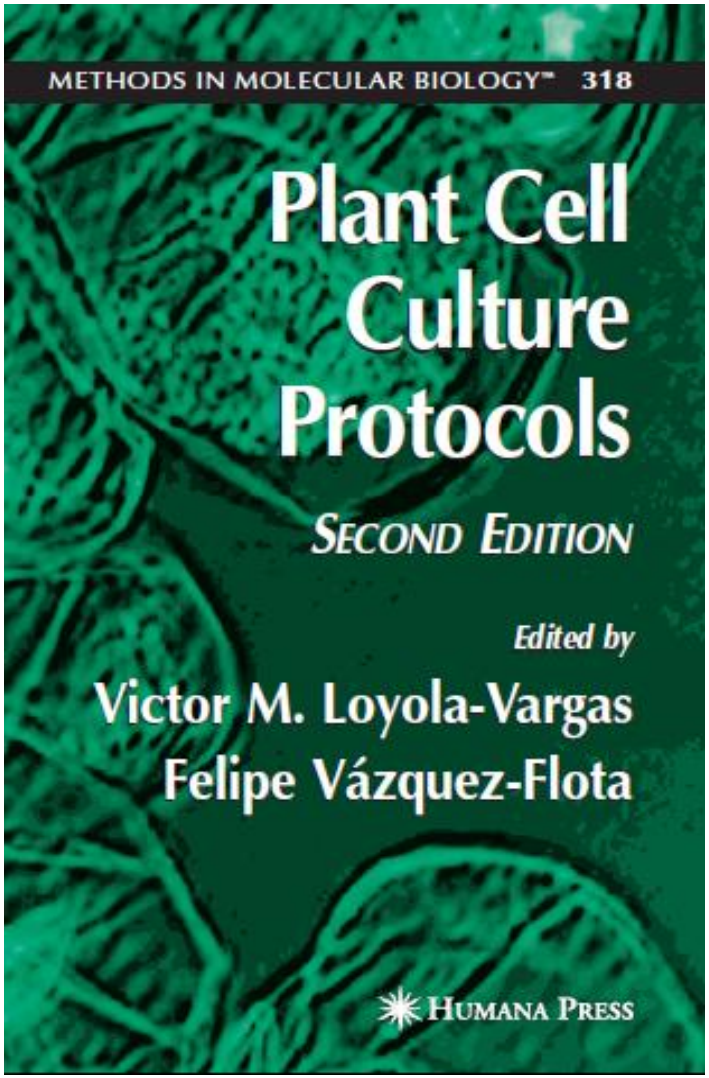
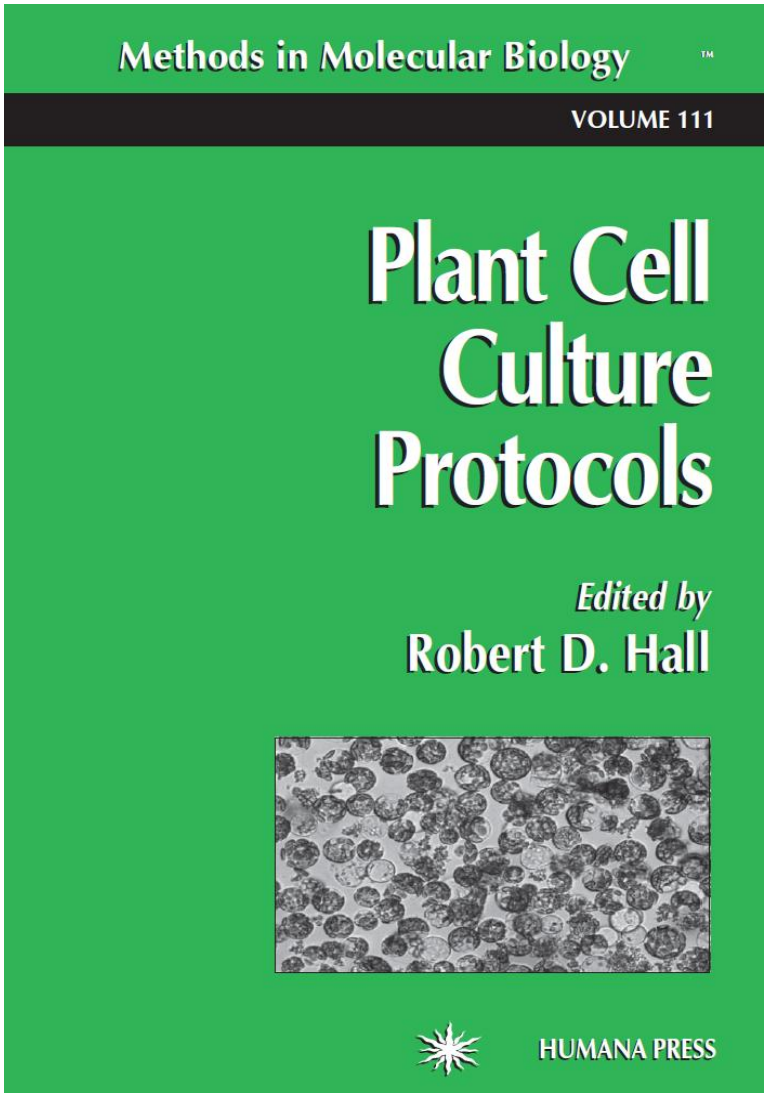


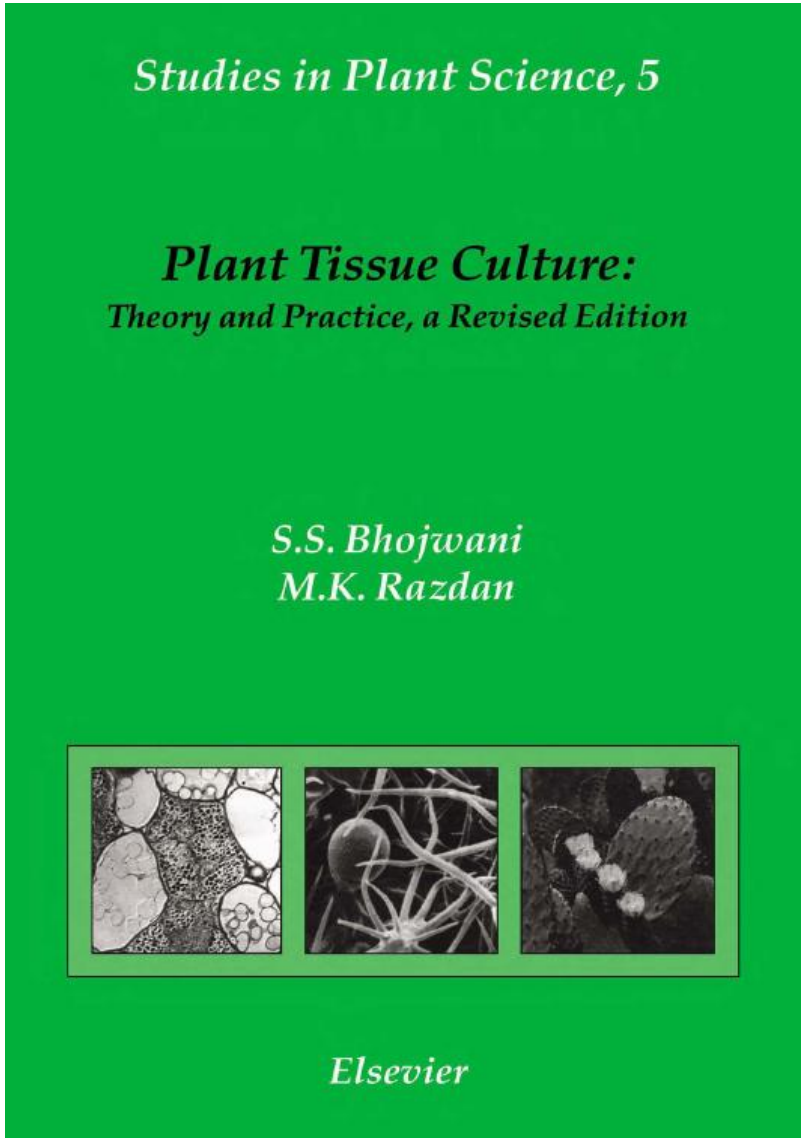
Figure 5 Phylogenetic trees showing relationship of strain HD86-9 with other related fungal species retrieved from GenBank based on their sequence homologies of 18S rDNA (a) and ITS region including the 5·8S rDNA (b).

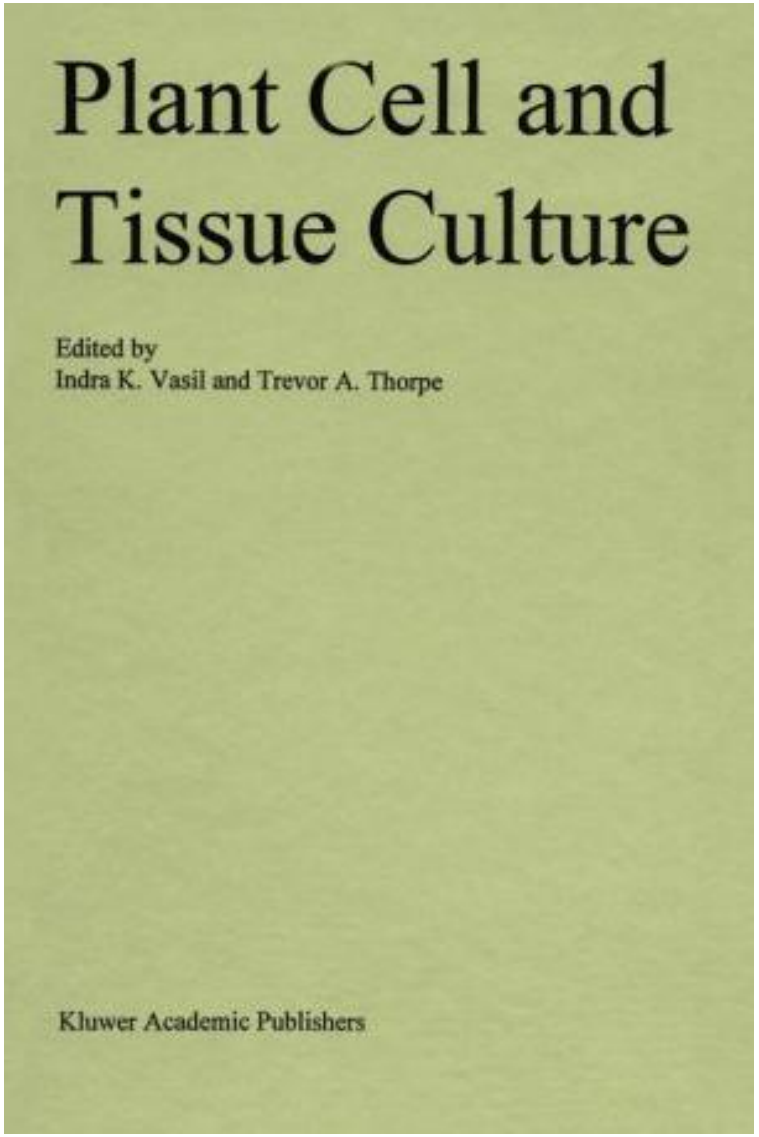
مراحل جداسازی و معرفی اندوفیت های جدید

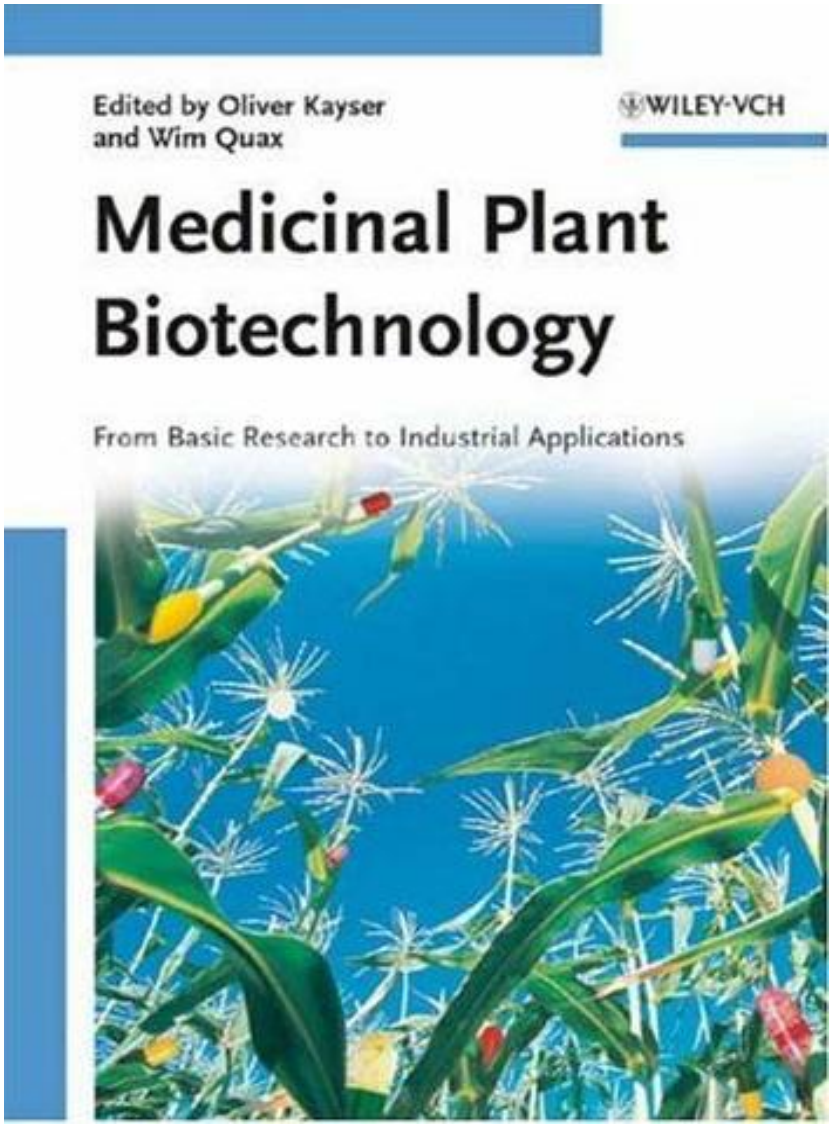


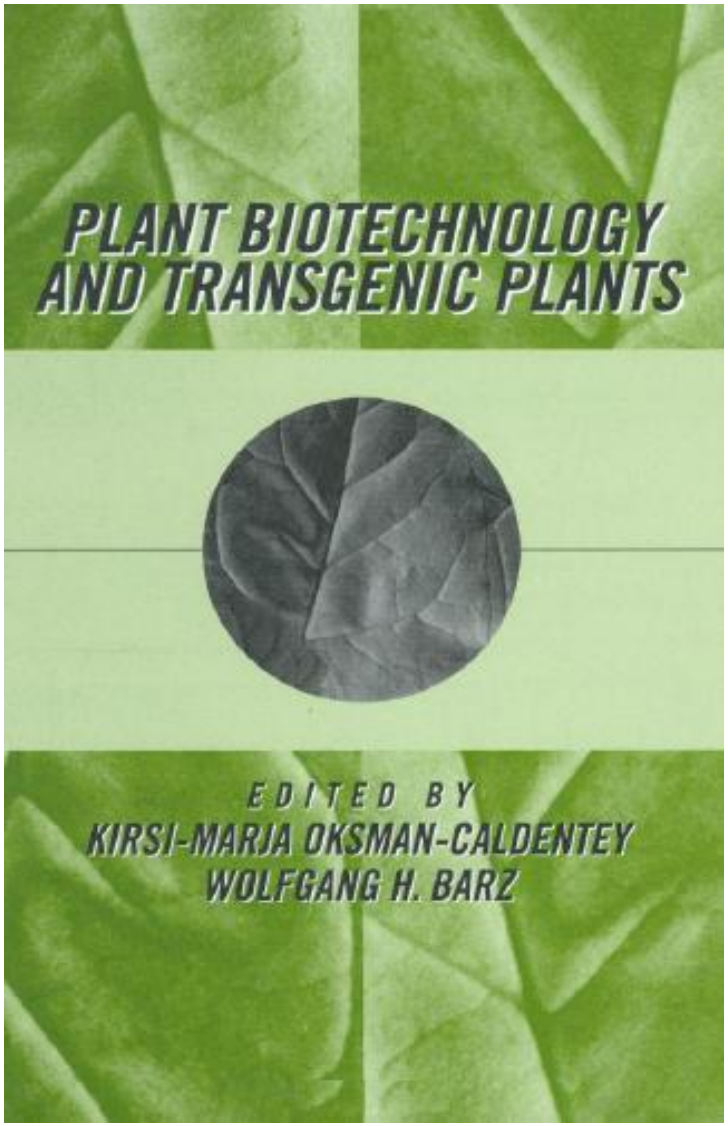

METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY™ 318
Plant Cell Culture Protocols
SECOND EDITION
Edited by
Victor M. Loyola-Vargas
Felipe Vázquez-Flota
HUMANA PRESS


Methods in Molecular Biology ™
VOLUME 111
Plant Cell Culture Protocols
Edited by
Robert D. Hall
HUMANA PRESS


Studies in Plant Science, 5
Plant Tissue Culture:
Theory and Practice, a Revised Edition
S.S. Bhojwani
M.K. Razdan
Elsevier

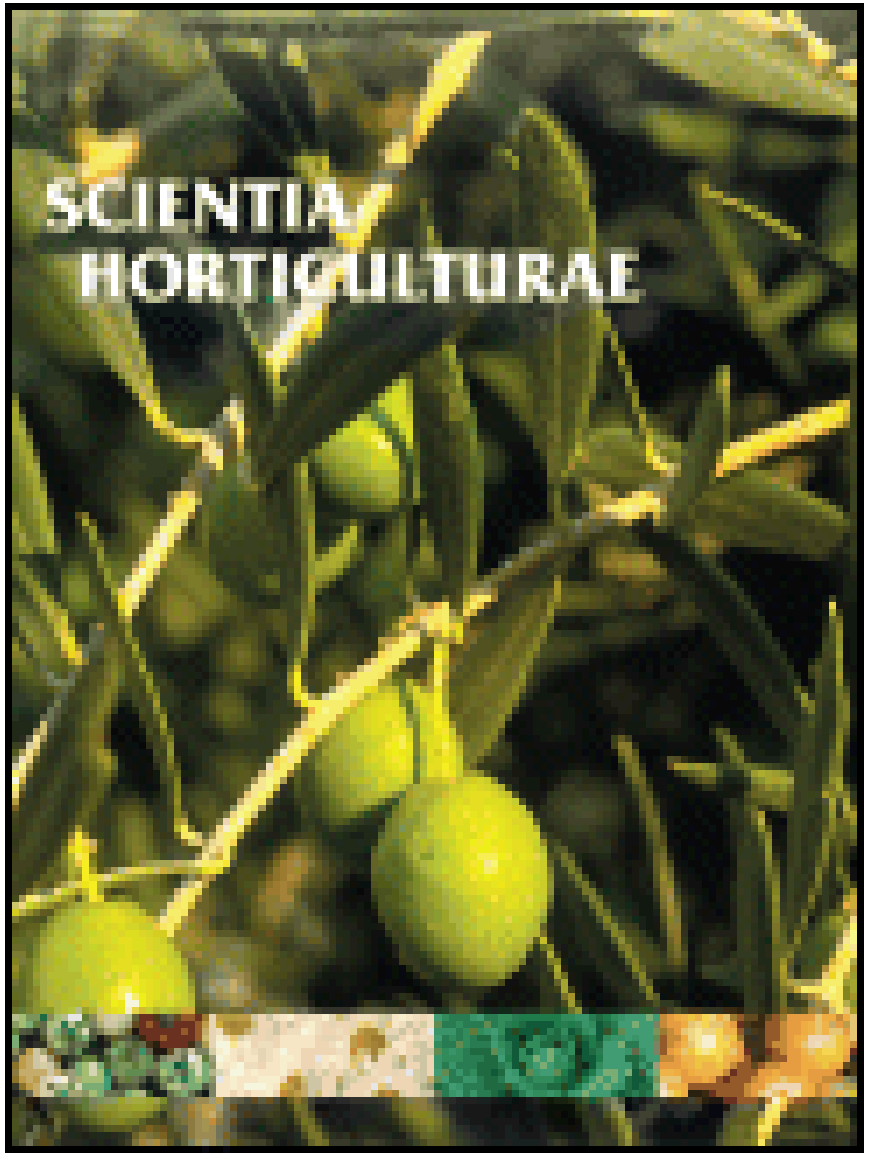

Plant Cell and Tissue Culture
Edited by
Indra K. Vasil and Trevor A. Thorpe
Kluwer Academic Publishers


Edited by Oliver Kayser
and Wim Quax
WILEY-VCH
Medicinal Plant
Biotechnology
From Basic Research to Industrial Applications


PLANT BIOTECHNOLOGY
AND TRANSGENIC PLANTS
EDITED BY
KIRSI-MARJA OKSMAN-CALDENTEY
WOLFGANG H. BARZ

Plant Cell Reports

PCTOC
JOURNAL OF PLANT BIOTECHNOLOGY


SCIENTIA
HORTICULTURAE

Biotechnology
Letters