مجله ایمنی زیستی
دوره ۱۰، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۶

تولید متابولیت‌های ثانویه از طریق مهندسی ژنتیک و کشت بافت

علی‌اکبر غلامی
دانش‌آموخته کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان

Gholami.2359@gmail.com

چکیده

واکنش‌های شیمیایی که در گیاهان روی می‌دهد، به عنوان متابولیسم شناخته می‌شوند. متابولیت‌های اولیه شامل ترکیبات بیوشیمیایی مهم یعنی کربوهیدرات‌ها، پروتئین‌ها و چربی‌ها می‌باشند. سایر ترکیبات بیوشیمیایی که جزء این سه گروه نباشد، به عنوان متابولیت‌های‌ثانویه شناخته می‌شوند که دامنه وسیعی از مواد مانند ترکیبات دارویی، چاشنی‌های غذایی، حشره‌کش‌ها و رنگ‌های طبیعی را شامل می‌شوند. کشت بافت گیاهی یکی از مهم‌ترین تکنیک‌های تولید صنعتی متابولیت‌های ثانویه است. زیرا پتانسیل تولید این مواد در شرایط طبیعی بسیار محدود می‌باشد. تکنیک‌های مورد استفاده در این زمینه عمدتا عبارت‌اند از: کشت سلول، کشت اندام و کشت ریشه‌های مویین. با این حال، استفاده از کشت‌های سلولی گیاهی برای تولید ترکیبات مهم دارویی با کاربرد صنعتی، فقط زمانی ممکن است که محصول به میزان بسیار زیادی تولید شود و یا این‌که بیشتر از یک محصول از کشت‌های مورد نظر حاصل شود. این امر با روش‌های مرسوم انتخاب لاین سلولی و سایر پارامترهای مرتبط با افزایش رشد یا تولید امکان‌پذیر نیست. بنابراین باید مسیرهای متابولیک و مراحل تنظیم‌کننده آن‌ها بررسی شوند تا بتوان ژن‌های تنظیم‌کننده مربوط به مراحل محدود کننده تولید را overexpress کرد. به طور کلی می‌توان گفت که استفاده از این تکنیک‌ها در تولید برخی ترکیبات دارویی طبیعی می‌تواند سود اقتصادی بالایی را به همراه داشته باشد.

کلمات کلیدی: متابولیت‌های‌ثانویه، مهندسی ژنتیک، کشت بافت

مقدمه

سلول‌ها، خصوصا سلول‌های گیاهی دو دسته از ترکیبات را تولید می‌کنند، متابولیت‌های‌اولیه و متابولیت‌های‌ثانویه. متابولیت‌های‌اولیه مستقیما در رشد و متابولیسم درگیر هستند و شامل کربوهیدرات‌ها، لیپیدها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک می‌باشند. در گیاهان متابولیت‌های‌اولیه طی فرایند فتوسنتز تولید شده و سپس در ساخت ترکیبات سلول نقش‌آفرینی می‌کنند. این ترکیبات در حجم زیاد و با ارزش اقتصادی پایین تولید می‌شوند و عمدتا به‌عنوان ماده خام صنعت، مواد غذایی و افزودنی‌ها کاربرد دارند. (۱). متابولیت‌های ثانویه از بیوسنتز متابولیت‌های اولیه

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-08-02]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.3.4.7]

به دست می‌آیند و به‌عنوان ترکیبات فرعی و انتهایی متابولیسم اولیه در نظر گرفته می‌شوند. همچنین این ترکیبات در فرآیندهای متابولیسمی وارد نمی‌شوند. مهم‌ترین متابولیت‌های ثانویه آلکالوئیدها، فنولیک‌ها، روغن‌های ضروری، استروئیدها، لیگنین‌ها، تانن‌ها و فلاوونوئیدها هستند. متابولیت‌های ثانویه عمدتا در گونه‌ها و خانواده‌های خاصی از سلسله گیاهان تولید می‌شوند. این ترکیبات به مقدار کمی در سلول ذخیره شده و عمدتا در سلول‌های تخصصی و در مرحله خاصی از چرخه زندگی گیاه تولید می‌شوند و همین امر استخراج و تخلیص آن‌ها را در مقایسه با متابولیت‌های اولیه که در تمام سلول‌ها تولید می‌شوند، دشوار می‌کند. گیاهان دارویی از لحاظ میزان متابولیت‌های ثانویه بسیار غنی هستند و ترکیبات آن‌ها را در انگلیسی *Medicinal* یا *Officinal* می‌نامند (۱).

انواع متابولیت‌های ثانویه

متابولیت‌ها دارای سه گروه مهم‌اند، یعنی ترپن‌ها، ترکیبات فنلی و ترکیبات حاوی نیتروژن (N) و سولفور (S). ترپن‌ها از واحدهای ایزوپنتانوئید (C-۵) تشکیل شده‌اند و از تغذیه تعداد زیادی از گیاه‌خواران ممانعت می‌کنند. سنتز اولیه ترکیبات فنولی از تولیدات مسیر شیکومیک اسید است و چندین نقش دفاعی را در گیاهان ایفا می‌کنند. عضو سوم این ترکیبات گروه بزرگی است، یعنی ترکیبات دارای N و S که اساس آن‌ها سنتز از اسیدآمینه‌های عمومی است (۲).

۱ – ترپن‌ها

ترپن‌ها بزرگ‌ترین گروه از متابولیت‌های ثانویه را تشکیل می‌دهند که با مواد سنتز شده عمومی با منش استیل کوآنزیم A یا حد واسط‌های گلیکولیتیک پیوند می‌شوند. گستره وسیعی از ساختمان‌های ترپنی متفاوت به وسیله گیاهان تحت عنوان متابولیت‌های ثانویه تولید شده‌اند که به نظر می‌رسد به‌صورت سموم یا بازدانده‌های تغذیه‌ای علیه شمار زیادی از حشرات و پستانداران تغذیه کننده گیاهان عمل نمایند (۳).

الف)- منوترپن‌ها

بیشتر این مشتقات مواد سمی عمده‌ای برای حشرات هستند، مثلا پیرتروئیدها (استرهای منوترپنی) موجود در گل‌های گونه داودی که حشره‌کش‌های قوی (نوروتوکسین) علیه حشراتی نظیر سخت بالپوشان، بید و زنبورها و غیره دارند و اجزای مورد نظر در حشره‌کش‌های تجاری‌اند چرا که در محیط، کم‌دوام بوده و دوره کارنس پایینی داشته و سمیت پایینی برای پستانداران دارند (٤).

ب)- سزکوی ترپن‌ها (C15)

تعدادی از این ترکیبات همانند Costunolideها گزارش شده‌اند که نقش دفاعی در گیاهان دارند و مواد ضد گیاه‌خواری خانواده کمپوزیته که با یک حلقه لاکتون ۵ عضوی (استر حلقوی) که مانع شونده تغذیه‌ای در بسیاری از حشرات محسوب می‌شود (۵).

ج)- دی‌ترپن‌ها (C20)

اسید آبیتیک یک دی‌ترپن است که در کاج و درختان تیره بقولات درون یا همراه رزین در داخل کانال‌های رزین تنه درخت یافت می‌شود. وقتی که این کانال‌ها به وسیله حشرات تغذیه کننده سوراخ می‌شود، رزین خارج شده ممکن است به صورت مانع فیزیکی، تغذیه حشره را متوقف کند و مانع شونده شیمیایی برای ادامه پروداتوری باشد. از ترکیبات دیگر این گروه فوربول (استر دی‌ترپن) در گیاهان تیره فرفیون یافت می‌شود و به عنوان خارش دهنده پوست عمل

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-08-02]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.3.4.7]

می‌کند و از سموم داخلی پستانداران است (٤).

د) – تری‌ترپن‌ها (C30)

چندین استروئید الکل (استرول) در این گروه قرار دارند و ترکیبات مهمی در غشاهای سلولی، به ویژه در غشاء پلاسمایی و در جابجایی زنجیره‌های اسید چرب به حساب می‌آیند. شیره گیاهی چندین گلوکوزید تلخ (استرول) تولید می‌کند که باعث محافظت گیاه علیه گیاه‌خواران، اکثر حشرات و دام‌ها می‌شود. فیتواکسین‌ها در بعضی از نقش‌های دفاعی با قطع پوست‌اندازی، نمو و فرایندهای فیزیولوژیکی حشره، سبب مرگ می‌شوند (٦).

ه)– پلی‌ترپن‌ها n (C5)

پلی‌ترپن‌های زیادی با وزن مولکولی بالا در گیاهان وجود دارند: ترپن‌های طویل شامل تتراترپن و پلی ترپن. تتراترپن‌ها پایه خانواده رنگدانه‌های کارتنوئید هستند. سایر ترکیبات پلاستیک‌های گیاهی‌اند، پلیمرهایی شامل ۱۵۰۰۰–۱۵۰۰ واحد ایزوپنتیل که تقریبا تمام باندهای دوگانه (C-C) در ساختار فضایی سیس (Z) هستند در حالی‌که در پلاستیک گاتا (gutta) باندهای دوگانه در ساختار فضایی ترانس (E) هستند. پلاستیک‌ها در لوله‌های بلند بنام لاتیسفر یافت می‌شوند که حفاظت مکانیکی را برای التیام زخم‌ها فراهم می‌کند و همین طور به صورت یک ماده دفاعی ضد گیاه‌خواری عمل می‌کنند (۷).

۲– ترکیبات فنولی

گیاهان گروهی از تولیدات ثانویه متنوع را تولید می‌کنند که حاوی یک گروه فنلی است و یک گروه عملکردی که هیدروکسیل روی حلقه آروماتیک دارند و از نظر شیمیایی گروه نامتجانسی هستند. این گروه بخش مهمی از سیستم دفاعی گیاه علیه آفات و بیماری‌های شامل نماتدهای پارازیت ریشه است. افزایش ازون (یعنی ٣٢,٤ ppb) محتوی کل فنول را افزایش می‌دهد (۸).

الف)– کومارین

ترکیبات فنلی ساده که در گیاهان پراکنده‌اند و عملکرد آن‌ها در مکانیسم‌های دفاعی گیاه علیه حشرات گیاه‌خوار و قارچ‌ها دارای ظرفیت‌های متفاوتی است. این ترکیبات حاصل مسیر اسید شیکمیک هستند و عموما در باکتری‌ها، قارچ‌ها و گیاهان حضور دارند ولی در جانوران وجود ندارند (۹).

ب)– فورانو کومارین

یک نوع کومارین با تمایل ویژه برای سمیت گیاهی که به فراوانی در اعضای خانواده چتریان شامل کرفس، جعفری و هویج وحشی دیده می‌شود. این ترکیبات به طور طبیعی تا فعال نشوند، سمی نیستند و در شرایط نور UV-A این ترکیبات در شرایط الکترونی با انرژی بالا قرار می‌گیرند و می‌توانند در مارپیچ مضاعف DNA وارد و با بازهای پیریمدینی باند شده و باعث توقف نسخه‌برداری و فرایند ترمیم DNA و نهایتا مرگ سلولی شوند (۱۰).

ج)– لیگنین

پلیمری با انشعابات بالایی از گروه‌های فنیل‌پروپانوئید که از سه الکل تشکیل یافته است، شامل Coniferyl، Coumaryl و Sinapyl که رادیکال‌های آزاد اکسید شده به میزان زیاد، آنزیم پروکسیداز واکنش تحریکی و تصادفی را در تشکیل لیگنین می‌دهد. لیگنی شدن باعث توقف رشد عامل بیماری‌زا می‌شود که پاسخی تکراری به آلودگی یا زخم است (۱۱).

د)– فلاونوئیدها

فلاونوئیدها یکی از بزرگ‌ترین کلاس‌های ترکیبات

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-08-02]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.3.4.7]

فنلی در گیاهان هستند که عملکردهای متفاوتی در سیستم گیاهی ایفا می‌کنند، از جمله ایجاد رنگدانه‌ها و دفاع از گیاهان (۱۲). دو گروه عمده از این ترکیبات در گل‌ها یافت می‌شوند که شامل فلاون‌ها و فلاونول که در عملکرد حفاظتی سلول‌ها از تشعشع UV-B نقش ایفا می‌کنند. چرا که این ترکیبات در لایه پوست برگ‌ها و ساقه‌ها تجمع می‌یابند و نور را در این منطقه جذب می‌کنند. این در حالی است که امواج نور مرئی به‌صورت پیوسته عبور می‌کند (۱۳). علاوه بر این افزایش نور UV-B باعث افزایش این دو ماده می‌شود و در واقع این ترکیبات، گیاهان را در مقابل تشعشع زیان‌بار اشعه UV-B محافظت می‌نمایند (۸).

و) – ایزوفلاونوئیدها

این ترکیبات مشتق از حد واسط فلاونون، ناریگنین است که در گیاهان وجود دارند و نقش مهمی در توسعه و پاسخ‌های دفاعی گیاه دارند. این ترکیبات به‌وسیله بقولات ترشح می‌شوند و نقش مهمی در ارتقاء تشکیل گره‌های ریزوبیوم‌های همزیست ایفا می‌کنند (۱٤).

ه)– تانن‌ها

این ترکیبات شامل گروه دومی از پلیمرهای فنلی گیاه با خواص دفاعی هستند. اغلب تانن‌ها دارای جرم مولکولی بین ۳۰۰ و ٦۰۰ دالتون هستند. عموما تانن‌ها خاصیت سمی دارند و به طور چشمگیری رشد و بقا گیاه‌خواران را کاهش می‌دهند و همین طور به عنوان ماده بازدارنده تغذیه‌ای در یک طیف وسیعی از حیوانات عمل می‌کنند. در پستانداران گیاه‌خوار این ترکیبات ایجاد یک بوی ناخوشایند تند می‌کنند که نتیجه اتصال پروتئین‌های بزاقی آن‌ها است (۱۵).

۳ – متابولیت‌های حاوی سولفور

این ترکیبات شامل GSH، GSL، فیتوآلکسین‌ها، تیونین، دیفنسین و آلینین می‌باشند که به طور مستقیم و غیرمستقیم با دفاع گیاهان علیه عوامل بیماری‌زای میکروبی ارتباط دارند (۱٦).

الف)– GSH

یک ترکیب از سولفور آلی در بخش محلول گیاهی است که نقش مهمی در جابجایی ذخیره سولفور کاهش‌یافته در تنظیم رشد و نمو گیاهی است و به‌صورت یک آنتی‌اکسیدانت در پاسخ‌های استرس‌زا عمل می‌کند (۱۷). سلول‌های تخصص یافته همانند کرک‌های گیاهی، فعالیت بالایی از آنزیم‌های سنتز این ترکیب و سایر کلات کننده‌های گیاهی را برای سمیت‌زدایی فلزات سنگین نشان می‌دهند (۱۸).

ب)– GSL [1]

گروهی از گلوکوسیدهای گیاهی حاوی سولفور و نیتروژن با جرم مولکولی پایین هستند، که به وسیله گیاهان عالی به منظور افزایش مقاومت علیه اثرات نامطلوب شکارچیان، رقبا و پارازیت‌ها ترشح می‌شوند. به سبب این‌که این ترکیبات با شکسته شدن مواد دفاعی فرار آزاد می‌شوند، اثرات سمی یا بازدارنده به نمایش می‌گذارند، مثل گلوکوسید در روغن خردل (۱۹).

ج) – فیتو آلکسین‌ها

فیتوآلکسین‌ها در پاسخ به آلودگی‌های باکتریایی یا قارچی یا اشکال دیگر استرس‌ها سنتز می‌شوند که این فرآیند، پراکندگی عوامل بیماری‌زای مهاجم را با تجمع در اطراف محل آلودگی محدود می‌کنند و یک مکانیسم عمومی مقاومت به میکروب‌های بیماری‌زا در بخشی از گیاهان محسوب می‌شوند (۲۰).

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-08-02]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.3.4.7]

د) – دفینسین‌ها، تیونین‌ها و لکتین‌ها

همه این ترکیبات پروتئین‌های غیر ذخیره‌ای گیاهی هستند که پس از حمله میکروبی سنتز شده و تجمع می‌یابند (۲۱). همه این ترکیبات، بازدارنده رشد بخش زیادی از قارچ‌ها هستند، بعضی از دفینسین‌ها ضد قارچ بوده و گاهی فعالیت ضد باکتریایی نیز دارند (۲۲). علاوه بر این ژن‌های دیفنسین نسبتا پاتوژن القاء هستند و سایر ترکیبات که درگیر با مقاومت‌اند می‌توانند بیان همیشگی داشته باشند (۲۳).

٤- متابولیت‌های حاوی نیتروژن

این ترکیبات شامل آلکالوئیدها، سیانوژنیک گلوکوسیدها و اسید آمینه‌های غیرپروتئینی است. اغلب این ترکیبات از اسید آمینه‌های عادی سنتز می‌شوند. تمامی این ترکیبات به سبب نقش دفاعی ضد گیاه‌خواری و سمیت آن‌ها برای انسان بسیار جالب توجه‌اند.

الف)- آلکالوئیدها

خانواده بزرگی از متابولیت‌های حاوی نیتروژن در تقریبا ۲۰ درصد گونه‌های گیاهان آوندی یافت می‌شوند. اغلب به فراوانی در دولپه‌ای‌های گیاهی و تا حدودی در تک‌لپه‌ای‌ها و بازدانگان دیده می‌شوند. عموما اغلب این ترکیبات، شامل آلکالوئیدهای پیرولیزیدین (PAs) هستند که تا درجاتی سمی‌اند و در خدمت دفاع اولیه علیه آلودگی‌های باکتریایی و حمله گیاه‌خواران هستند. این ترکیبات معمولا از چند اسیدآمینه عمومی، به‌ویژه آسپارتیک اسید، لیزین، تیروزین وتریپتوفان سنتز می‌شوند (٢٤).

ب)- گلیکوزیدهای سیانوژنیک

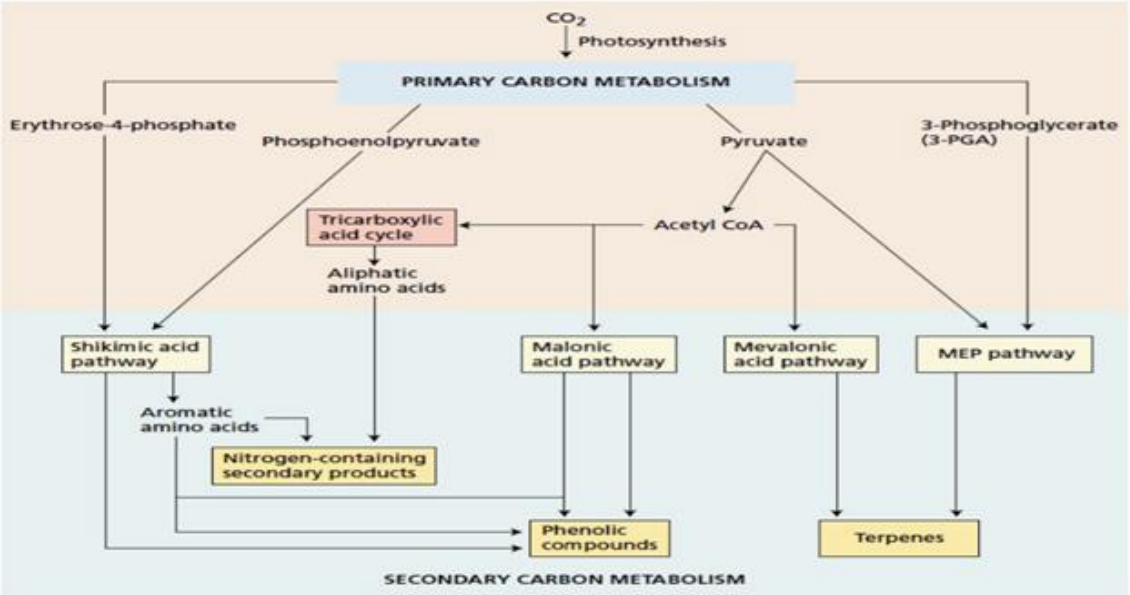
این ترکیبات گروهی از ترکیبات محافظتی حاوی نیتروژن را تشکیل می‌دهند که جدا از آلکالوییدها است و سم HCN را آزاد می‌کنند و در اعضای خانواده گرامینه، رز و بقولات وجود دارند (۲۵). این ترکیبات در حالت عادی سمی نیستند، اما با شکسته شدن سریع، مواد سمی فرار مثل HCN و H2S خارج می‌کنند که در هنگام خرد شدن گیاه رخ می‌دهد. حضور این ترکیبات بازدارنده تغذیه به وسیله حشرات و دیگر گیاه‌خواران نظیر حلزون و لیسک است (٢٦).

مسیرهای بیوسنتزی

اسکلت کربنی متابولیت‌های ثانویه از کربوهیدرات‌ها تامین‌شده و طی فرآیند فتوسنتز ایجاد می‌شود. متابولیت‌های‌اولیه دیگری که در تولید متابولیت‌های ثانویه نقش دارند، اسیدهای آمینه هستند. استیل کوآنزیم و اسید مِوالونیک نیز نقش مهمی در تولید انواع ترپنوئیدها دارند. مسیر اسید شیکیمیک نیز در تولید لیگنین‌ها و ایندول آلکالوئیدها نقش آفرینی می‌کند (شکل ۱).

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-08-02]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.3.4.7]



شکل ۱- یک تصویر ساده از مسیرهای عمده زیرساختی متابولیت‌های ثانویه و ارتباط داخلی آن‌ها با متابولیسم اولیه

دو مسیر برای زیست ساختی ترپن وجود دارد

ترپن‌ها از متابولیت‌های اولیه و حداقل از دو مسیر متفاوت زیست ساختی می‌شوند. در مسیر موالونیک که به خوبی مورد مطالعه قرارگرفته است، سه مولکول کوآنزیم-A مرحله به مرحله به هم ملحق می‌شوند تا اسید موالونیک را تولید کنند (شکل ۲). سپس این ترکیب مهم ٦ کربنه حد واسط، پیروفسفریله شده و ضمن دکربوکسیله و دهیدراته شدن، ایزوپنتیل (IPP) را تولید می‌کنند. IPP ساختمان ۵ کربنه فعال شده ترپن‌ها به شمار می‌رود (٢٦).

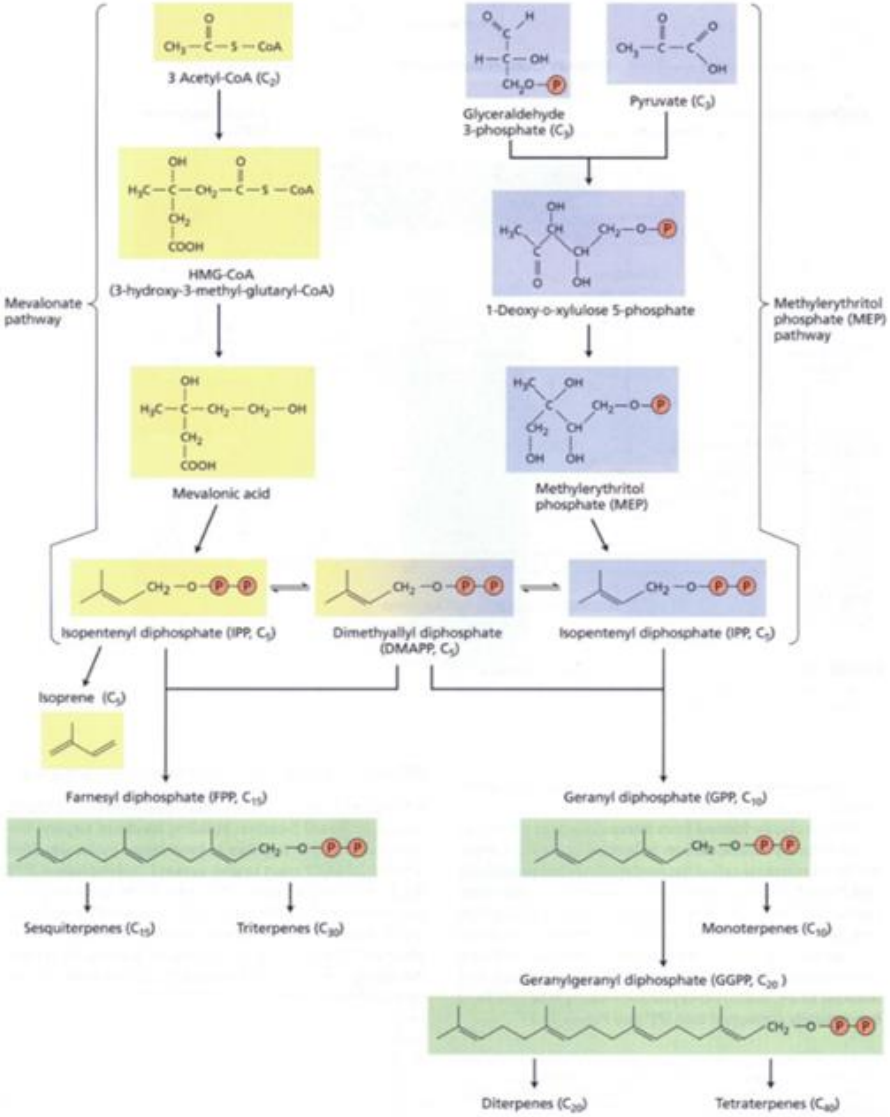
همچنین IPP می‌تواند از ترکیبات حد واسط چرخه گلیکولیز یا چرخه احیای کربن فتوسنتزی و به‌واسطه یکسری از واکنش‌ها که به مجموع آن‌ها مسیر متیل اریتریتول فسفات (MEP) گفته می‌شود، تشکیل شود. به نظر می‌رسد این مسیر در کلروپلاست‌ها و سایر پلاستیدها انجام می‌گیرد. گلیسرآلدئید-۳-فسفات و دو اتم کربن مشتق از پیروات فشرده می‌شود تا ترکیب ۵ کربنه حد واسط ۱-داکسی- دی-اکسیلوز-۵- پیروفسفات را تولید نماید. بعد از بازآرایی و احیا، این ترکیب حد واسط به ۲-سی-متیل-دی اریتریتول ٤-فسفات (MEP) تبدیل می‌شود که در واقع به IPP تبدیل می‌شود (شکل ۲) (٢٦).

ایزوپنتیل دی فسفات و ایزومر آن (دی میتیل آلیل دی فسفات،DPP) ساختارهای فعال شده پنج کربنی ساخت ترپن‌ها هستند، که برای تشکیل مولکول‌های بزرگ‌تر به هم ملحق می‌شوند. در ابتدا IPP و DPP برای تشکیل ژرانیل‌دی‌فسفات (GPP) باهم واکنش می‌دهند. GPP تقریبا پیش ماده ده کربنی همه مونوترپن‌هاست (شکل ۲). سپس GPP می‌تواند به مولکول دیگر از IPP متصل شود تا ترکیب ۱۵ کربنه فارنسیل‌دی‌فسفات (FDP) که تقریبا پیش ماده تمامی سزکوئی‌ترپن‌ها است، تولید شود. اضافه شدن یک مولکول IPP دیگر سبب تولید ترکیب ۲۰ کربنه ژرانیل‌ژرانیل‌دی‌فسفات (GGPP) می‌شود که پیش

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-08-02]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.3.4.7]

ماده دی‌ترپن‌هاست. در نهایت FPP و GGPP می‌توانند ضمن دیمر شدن به ترتیب تولید تری‌ترپن (۳۰ کربنه) و تتراترپن (٤٠ کربنه) نمایند (شکل ۲) (٢٦).



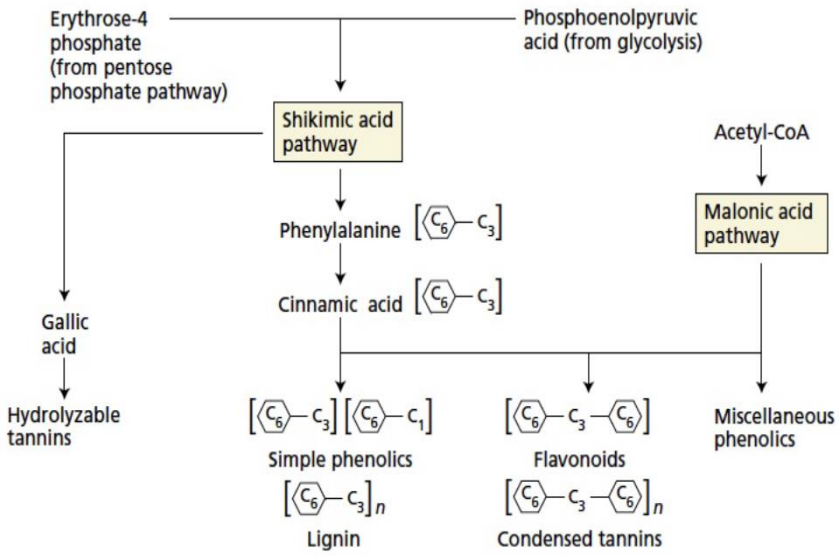
شکل ۲- نمایش فهرست‌وار زیست ساختی ترپن‌ها. واحدهای ۵ کربنی پایه ترپن‌ها از دو مسیر ساخته می‌شوند. ترکیبات حد واسط فسفریله شده IPP و DMAPP برای ساختن ترپن‌های ۱۰ و ۱۵ کربنه و ترپن‌های بزرگ‌تر باهم ترکیب می‌شوند.

مسیر زیست ساختی فنول‌ها

فنول‌های گیاهی از طریق متفاوتی زیست ساختی می‌شوند و بنابراین از دیدگاه متابولیکی گروه ناهمگن را تشکیل می‌دهند. دو مسیر پایه در ساخت فنول‌های گیاهی دخیل هستند. مسیر اسید شیکمیک و مسیر اسید مالونیک. مسیر اسید شیکمیک در زیست ساختی اکثر فنول‌های گیاهی دخیل است. مسیر اسیدمالونیک نیز اگرچه منبع مهمی برای تولیدات ثانویه فنولی در باکتری‌ها و قارچ‌ها به شمار می‌رود، اما اهمیت آن در گیاهان عالی کمتر است (شکل ۳) (٢٦).

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-08-02]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.3.4.7]

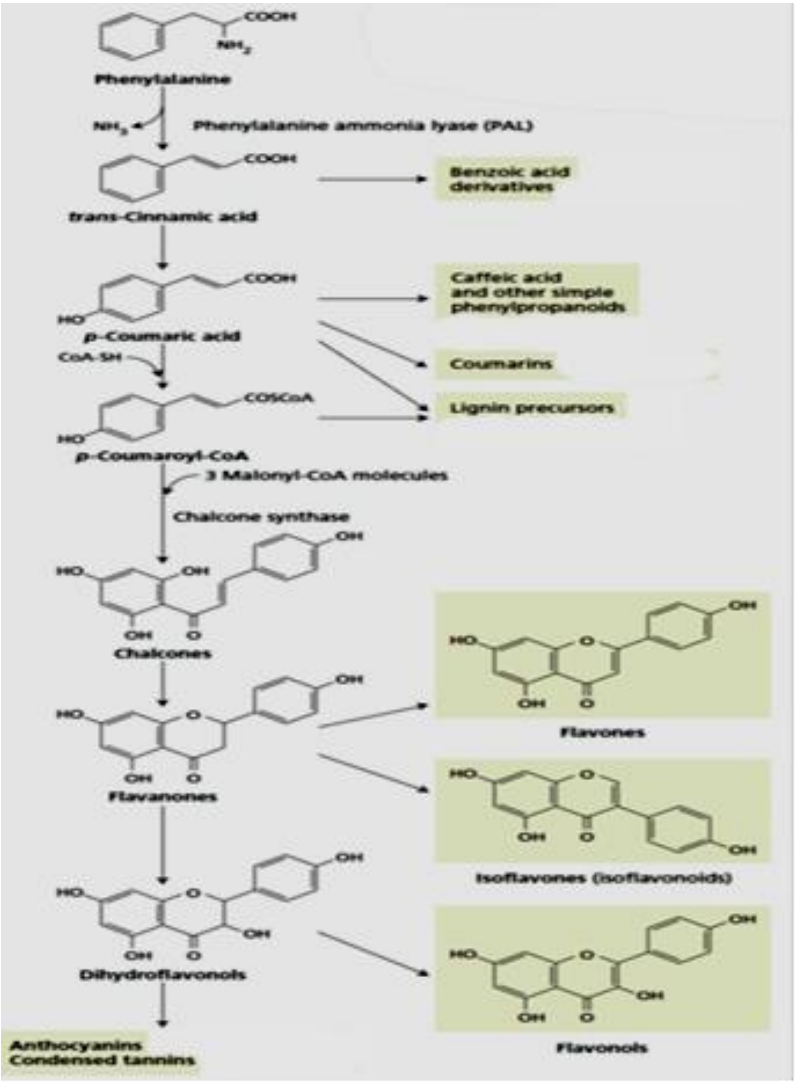


شکل ۳- فنول‌های گیاهی به طریق مختلف زیست ساختی می‌شوند. در گیاهان عالی، اغلب فنول‌ها حداقل تا حدودی از فنیل‌آلانین مشتق می‌شوند. فنیل آلانین یک فرآورده از مسیر اسید شیکمیک است. فرمول‌هایی که در داخل پرانتز واقع شده‌اند، نشان‌دهنده آرایش پایه اسکلت کربنی می‌باشند.

فراوان‌ترین گروه ترکیبات فنولی در گیاهان از فنیل‌آلانین مشتق می‌شوند. این کار با حذف یک مولکول آمونیاک از فنیل‌آلانین و تشکیل اسید سینامیک انجام می‌شود. این واکنش به واسطه فنیل‌آلانین آمونیاک لیاز (PAL) کاتالیز می‌شود. احتمالا PAL آنزیمی است که در بحث متابولیسم ثانویه گیاهی، بیش از سایر آنزیم‌ها مورد مطالعه قرار گرفته است و لذا واکنشی که این آنزیم می‌کند نیز یک مرحله تنظیم‌کننده مهم در تشکیل بسیاری از ترکیبات فنولی به شمار می‌رود (شکل ٤) (٢٦).

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-08-02]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.3.4.7]



شکل ۴- نمایش فهرست‌وار زیست ساختی فنول از فنیل آلانین. تشکیل برخی از فنول‌های گیاهی، شامل فنیل پروپانوئیدهای ساده، کومارین‌ها، مشتقات اسید بنزوئیک، لیگین، آنتوسانین‌ها، ایزوفلاون‌ها، تانن‌های فشرده و سایر فلاونوئیدها با فنیل آلانین آغاز می‌شود.

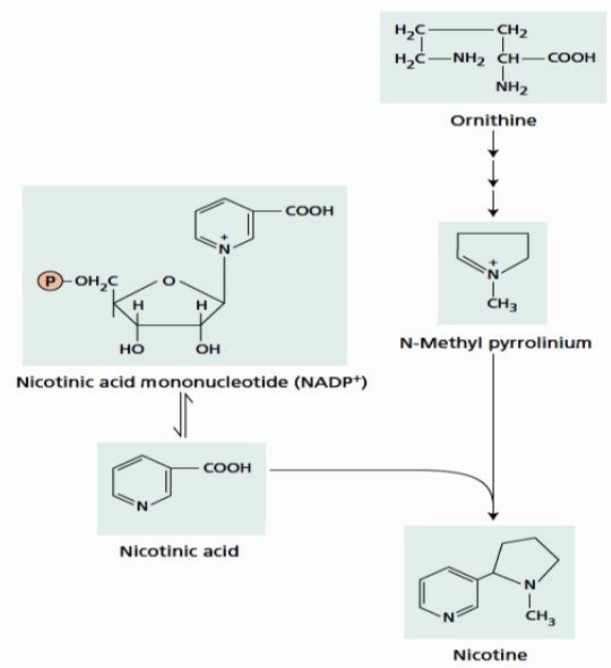
مسیر بیوسنتزی آلکالوئیدها

آلکالوئیدها معمولا از یکی از اسیدهای آمینه به ویژه لیزین، تیروزین و تریپتوفان ساخته می‌شود. اما اسکلت کربنی برخی از آلکالوئیدها واجد بخشی است که از مسیر ترپن مشتق شده است. جدول شماره ۱ انواع عمده آلکالوئیدها و پیش ماده‌های اسیدآمینه آن‌ها را نشان می‌دهد. انواع مختلفی از این ترکیبات که نیکوتین و ترکیبات نزدیک به آن را نیز شامل می‌شود، از اورنیتین (Ornitin) مشتق می‌شوند (شکل ۵) که خود نیز یکی از ترکیبات حد واسط در زیست ساختی آرژینین به شمار می‌روند. نیاستین (B-ویتامین نیکوتین اسید) یک پیش ماده از حلقه پیریدین (شش‌ضلعی) این آلکالوئید است، به نحوی که حلقه پیرولیدینی (پنج ضلعی) نیکوتینی از اورنیتین مشتق

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-08-02]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.3.4.7]

می‌شود. اسید نیکوتینیک نیز جزء از NAD^+ و $NADP^+$ است که به‌عنوان ناقل الکترون در متابولیسم ایفای نقش می‌کند (۲۶).



شکل ۵- زیست ساختی نیکوتین با زیست ساختی اسید نیکوتینیک (نیاسین) از آسپارتات و گلیسرآلدئید-۳-فسفات آغاز می‌شود. اسید نیکوتینیک نیز یک جز از NAD و NADP است که عامل مشارکت‌کننده مهمی در واکنش‌های اکسیداسیون-احیایی زیستی به شمار می‌رود. حلقه پنج‌ضلعی نیکوتین از اورنیتین که یک ماده حد واسط در زیست ساختی آرژنین به شمار می‌رود، مشتق می‌شود.

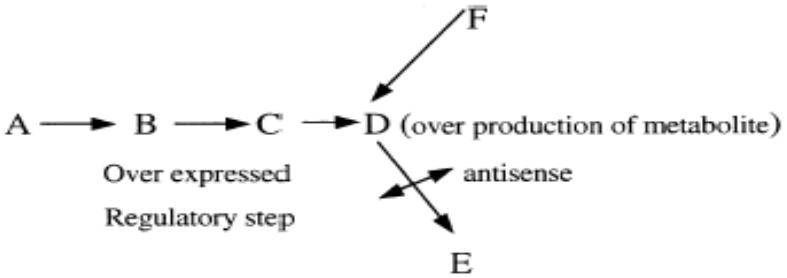
مهندسی تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان

در حال حاضر دستاوردهای زیاد و گوناگونی در مهندسی متابولیک متابولیت‌های ثانویه به دست آمده است. مسیرهای بیوشیمیایی مختلفی با استفاده از ژن‌های رمز کننده آنزیم‌های مهندسی‌شده و پروتئین‌های تنظیمی بررسی شده‌اند. در عین حال از ژن‌های آنتی‌سنس نیز برای مسدود کردن مسیرهای بیوشیمیایی و افزایش تولید متابولیت ثانویه خاصی استفاده می‌شود. به دلیل کاربردهای فراوان، متابولیت‌های ثانویه موضوع جالبی برای تحقیقات اصلاح نباتات از طریق فنون مولکولی و مهندسی ژنتیک محسوب می‌شوند. در ده سال گذشته تحقیقات چندانی در ارتباط با متابولیت‌های ثانویه انجام نشده است (۲۷). مانع بزرگ در انجام این تحقیقات اطلاعات اندک از مسیرهای تولید زیستی متابولیت‌های ثانویه و برهم‌کنش آنزیم‌های درگیر در این مسیر است. همچنین تعداد معدودی از ژن‌های مربوط به متابولیت‌های ثانویه در دسترس است. یکی از مسیرهایی که مطالعات بیشتری در سطح ژن‌های دست‌اندرکار آن نسبت به دیگر متابولیت‌های ثانویه انجام شده است، مسیر تولید فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌ها است (۲۸, ۲۹). هدف از مهندسی ژنتیک

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-08-02]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.3.4.7]

مسیر یک متابولیت ثانویه، افزایش مقدار یک ماده خاص یا گروهی از ترکیبات و یا حتی کاهش مقدار این ترکیبات است (۳۲,۳۱,۳۰, ۲۸,۲۷). برای دستیابی به هدف دوم که کاهش میزان تولید یک ماده خاص یا گروهی از مواد ناخواسته است، راه‌های مختلفی وجود دارد (شکل ٦). (این مواد ممکن است ترکیبات سمی در یک محصول گیاهی، مواد مانع خالص‌سازی یک فرآورده صنعتی یا موادی از این دست باشد). یکی از این راه‌ها، مسدود کردن یک مرحله از مسیر تولید متابولیت ثانویه و مختل کردن تولید یا فعالیت آنزیم مربوط به آن مرحله است. این هدف می‌تواند با کاهش میزان mRNA مسئول تولید این آنزیم، با استفاده از فناوری آنتی‌سنس، iRNA یا بیان بالای یک آنتی‌بادی علیه آنزیم مسئول محقق شود. فناوری آنتی‌سنس به خوبی برای تغییر رنگ گل‌ها استفاده شده است (۳۳). راه‌های دیگر دستیابی به این هدف، تغییر مسیر به سوی مسیرهای موازی یا افزایش کاتابولیسم ماده نهایی است (شکل ٦)، اما ممکن است هدف از انجام تحقیقات، افزایش تولید یک ترکیب خاص در گیاه بوده، یا انتقال ژن‌های مربوط به مسیر تولید یک متابولیت ثانویه به یک گیاه یا یک ریزسازواره مورد نظر باشد. همچنین ممکن است تولید یک ماده جدید که به‌صورت طبیعی در گیاهان تولید نشود، هدف یک پروژه تولیدی پژوهشی باشد. در برخی روش‌ها با تغییر میزان بیان یک یا چند ژن، بر موانع تولید یک ماده غلبه می‌کنند و در روش‌های دیگر، با حذف مسیرهای موازی (رقابتی) یا کاهش کاتابولیسم ماده مورد نظر، مقدار آن ماده را در گیاه می‌افزایند. ایجاد تغییراتی در بیان ژن‌های تنظیمی که کنترل مسیر تولید زیستی متابولیت‌های ثانویه را بر عهده دارند نیز از جمله روش‌های افزایش یا کاهش تولید ترکیب مورد نظر است (۳٤). در ادامه این مطلب برخی از نتایج به‌دست آمده از بررسی نحوه تولید متابولیت‌های ثانویه ژن‌های مسئول و تنظیم بیان ژن‌های درگیر ارائه می‌شود.



شکل ۶- استراتژی‌های افزایش تولید با دست‌ورزی ژنتیکی عبارت‌اند از: افزایش تولید پیش‌سازهای متابولیت‌های ثانویه مثل (A) overexpress کردن محصول ژن که مسیر خاصی را محدود می‌کند (مثل (B، تولید شاخه جدیدی از مسیر موجود (مثلا F به C)، تنظیم پایین‌دستی واکنش موجود با روش آنتی سنس (مثلا بلوک کردن C به E).

ژن‌های مسئول بیوسنتز فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌ها

بیوسنتز فلاونوئید و آنتوسیانین از اولین مسیرهای متابولیت‌های ثانویه بود که مهندسی ژنتیک آن‌ها صورت گرفت. دلیل این موضوع این بود که مسیر بیوسنتز آن‌ها به خوبی شناخته شده بود و نتایج تغییرات انجام شده به راحتی از روی تغییر رنگ گل‌ها قابل‌مشاهده است (۳۵,۲۹,۲۸).

آزمایش‌های زیادی شامل افزایش بیان ژن‌های مختلف

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-08-02]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.3.4.7]

برای ایجاد رنگ‌های جدید گل یا تولید ترکیبات جدید در گیاه انجام شده است. اکثر پژوهش‌های انجام شده در زمینه بیوسنتز فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌ها در گیاه گوجه‌فرنگی صورت گرفته است. مشخص‌شده است که آنزیمی از گروه ایزومراز به نام CHI از آنزیم‌های مراحل اولیه مسیر تولید فلاونوئید نقشی کلیدی در افزایش تولید فلاونول دارد (۳٦).

بیوسنتز ایزوفلاون‌ها که ترکیباتی ضدمیکروبی هستند، بر اثر آلودگی میکروبی در حبوبات القا می‌شود. افزایش بیان ژن ایزوفلاوون سنتتاز که یک آنزیم سیتوکروم P450 است، باعث تولید این ترکیبات در آرابیداپسیس، توتون و ذرت که به طور عادی توانایی تولید این مواد را ندارند، می‌شود (۳۸,۳۷). تولید این ترکیبات در این گیاهان بستگی به در دسترس بودن پیش ماده‌های مسیر فنیل پروپانوئید دارد. القا یا مهندسی این مسیر می‌تواند در اصلاح و بهبود سامانه بیوسنتز ایزوفلاون در گیاهان میزبان مهم باشد (۳۹).

ژن‌های تنظیم‌کننده، تولید فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌ها

یک روش برای مهندسی بیان ژن‌های یک مسیر بیوشیمیایی استفاده از عوامل رونویسی خاصی است که ژن‌های مسیرهای بیوشیمیایی متعددی را کنترل می‌کنند. در دانه ذرت تولید آنتوسیانین توسط ترکیبی از دو عامل رونویسی R و Cl تنظیم می‌شود. پروتئین‌های R شباهت زیادی با پروتئین‌هایی که توسط ژن‌های مهره‌داران رمز می‌شود، ژن (c-MY)، دارد درحالی‌که پروتئین‌های Cl مشابه محصولات ژن‌های c-MYB است. القای مسیر تولید فلاونوئید با افزایش بیان این دو عامل رونویسی R و C1 در سلول‌های تمایز نیافته ذرت در محیط کشت صورت می‌گیرد (٤۰).

ژن‌های بیوسنتز ایندول آلکالوئیدها

مسیر ترپنوئید ایندول آلکالوئید موضوع بسیاری از تحقیقات مهندسی ژنتیک بوده است، چرا که حدود ۱۵ نوع از ترکیبات این مسیر از نظر صنعتی اهمیت دارند. آلکالوئید ضد تومور وینبلاستین از آن جمله است. همه این آلکالوئیدها در یک قسمت از مسیر بیوشیمیایی تا تولید ماده واسط استریکتوزیدین مشترک هستند و از این نقطه، مسیر در گونه‌های مختلف گیاهی تولید کننده مواد آلکالوئیدی منشعب می‌شود. بیشتر مطالعات انجام شده برای تهیه نقشه ژنتیکی بخش اولیه و مشترک مسیر و افزودن میزان بیان ژن‌های این بخش از مسیر بوده است. هدف از این کارها افزایش فعالیت مسیر تولید آلکالوئیدها است. به‌طور مثال، ژن‌های رمز کننده تریپتوفان دِکربوکسیدلاز (TDC) و STR-SS در سلول‌های گیاه *Catharnthus roseus* به خوبی مورد مطالعه قرار گرفته است (٣٤).

ژن‌های تنظیم‌کننده تولید ایندول آلکالوئید

دو عامل رونویسی به نام‌های ORCA2 و ORCA3 که در چندین مرحله از مسیر بیوشیمیایی تولید آلکالوئید در *Catharnthus roseus* نقش تنظیمی دارند، تعیین شده‌اند (٤۱).

افزایش بیان ORCA3 به‌تنهایی باعث افزایش تولید آلکالوئیدها نمی‌شود، چرا که این عامل رونویسی، ژن G10H را که یک آنزیم سیتوکروم P450 موثر در کاتالیز مرحله اول تولید سکولوگانین است، تنظیم نمی‌کند. اما پس از تغذیه سلول‌ها با پیش ماده سکولوگانین که همان لوگانین است، تولید آلکالوئیدها تا میزان ۳ برابر افزایش می‌یابد (٤۱). هر دو این

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-08-02]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.3.4.7]

عوامل تنظیمی (ORCA2 و ORCA3) درگیر تولید زیستی ترپنوئید ایندول آلکالوئید هستند، گرچه کنترلی بر ژن G10H ندارند. این موضوع نشان می‌دهد که ژن‌های دیگری نیز درگیر تنظیم فعالیت این مسیر هستند که می‌تواند موضوع پژوهش‌های بعدی در این زمینه باشد (٤١).

کشت سلول گیاهی برای تولید متابولیت‌های ثانویه

در طی دهه گذشته پیشرفت‌های قابل ملاحظه‌ای در تحریک، تولید و تجمع متابولیت‌های ثانویه در کشت‌های سلولی گیاهی صورت گرفته است. کشت سلول‌های گیاهی یک منبع مناسب و مهم برای تولید متابولیت‌های ثانویه باارزش در اکثر گیاهان است. سلول‌های گیاهی از نظر بیوسنتزی خاصیت توتی‌پتانسی دارند. بدین معنی که هر سلول تحت کشت، تمام اطلاعات ژنتیکی گیاه والد را دارا است و از این رو این توانایی را دارد تا دامنه‌ای از مواد شیمیایی را که در گیاه والدینی یافت می‌شود، تولید نماید (٤٢).

مزیت این روش در مقایسه با تولید از طریق کشت‌های رایج به شرح ذیل است:

– این روش مستقل از تغییرات فصلی، جغرافیایی و فاکتورهای محیطی مختلف می‌باشد.

– در این روش ممکن است ترکیبات جدیدی تولید شوند که در شرایط طبیعی در گیاه مادری وجود نداشته باشند.

– تولید با هزینه کم و سرعت بالا انجام می‌گیرد.

برخی تکنیک‌ها جهت افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در شرایط کشت سلولی:

۱–انتخاب لاین‌های سلولی با قابلیت تولید بالا

در این روش یک گیاه مادری که حاوی سطوح بالایی از متابولیت‌های مورد نظر است انتخاب شده و کالوس‌زایی در این گیاه القاء می‌شود تا لاین‌های سلولی با تولید بالا به دست آید. سپس یک غربال در جمعیت ناهمگن برای کلونی‌های سلولی مختلف که دارای بالاترین میزان از محصولات مورد نظر هستند انجام می‌گیرند. از ناهمگنی ژنتیکی (از نظر فعالیت بیوشیمیایی) در داخل جمعیت سلول‌ها برای حصول لاین‌های سلولی با قابلیت تولید بالا استفاده می‌گردد (٤٢, ٥٤)

۲–بهینه‌سازی عناصر غذایی و تنظیم کننده‌های رشد محیط کشت:

– قند

میزان ساکارز بر میزان تولید و تجمع متابولیت‌های ثانویه در کشت‌های سلولی موثر می‌باشد. به طور مثال در کشت سلولی گیاه حسن‌یوسف با ۲/۵ و ۷/۵ درصد ساکارز، میزان عملکرد رزمارینیک اسید به ترتیب برابر با ۰/۸ و ۳/۳ گرم در لیتر بوده است و در اغلب موارد گزارش شده که با افزایش میزان قندها در محیط کشت میزان تولید متابولیت‌های ثانویه افزایش می‌یابد. در برخی موارد هم عکس این قضیه گزارش شده است (٤٣)

– نیتروژن

ثابت شده است که غلظت نیتروژن بر میزان تولیدات پروتئینی و آمینواسیدی در سوسپانسیون‌های سلولی موثر است. محیط‌های کشت گیاهی مثل MS، B5 یا LS هم نیترات و هم آمونیوم را به عنوان منبع نیتروژن در اختیار دارند. به هر نشان داده شده است که نسبت نیتروژن/ نیترات و همچنین میزان کل نیتروژن در محیط کشت بر تولید متابولیت‌های ثانویه در کشت‌های سلولی موثر است. برای مثال میزان پایین‌تر

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-08-02]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.3.4.7]

$NH4^+$ و میزان بیشتر NO3، تولید شیکونین و بتاسیانین‌ها را افزایش داد، در حالی که میزان آمونیوم بیشتر و میزان نیترات کمتر باعث افزایش تولید بربرین و یوبی‌کوئینون گردید (٤٤).

– فسفات

میزان بالای فسفات در محیط کشت باعث افزایش رشد سلول می‌شود. در حالی که می‌تواند تاثیر منفی بر تجمع متابولیت‌های ثانویه داشته باشد و بسته به گونه گیاهی و ترکیب محیط کشت، افزایش فسفات می‌تواند تاثیر مثبت یا منفی بر تجمع متابولیت‌های ثانویه داشته باشد (٤٢)

– تنظیم‌کننده‌های رشد

غلظت مواد تنظیم‌کننده رشد اغلب یک فاکتور مهم در تولید و انباشت متابولیت‌های ثانویه است. نوع و غلظت اکسین یا سیتوکینین یا نسبت اکسین/سیتوکینین به‌طور چشم‌گیری هم رشد و هم تولید متابولیت ثانویه را تحت تاثیر قرار می‌دهد (٤٢). مشخص‌شده که هورمون رشدی 2,4-D در اکثر موارد مانع تولید متابولیت‌های ثانویه می‌شود. در این‌گونه موارد حذف 2,4-D یا جایگزینی آن با نفتالین استیک اسید (NAA) یا ایندول استیک اسید (IAA) باعث افزایش تولید آنتوسیانین‌ها در کشت‌های سوسپانسیونی *Populus* و *D. carotta*، بتاسیانین در سوسپانسیون *Portulaca*، یا نیکوتین در کشت‌های سوسپانسیونی *N. tabaccum*، شیکونین در سوسپانسیون *L. erythtrorhizon* و آنتراکوئینون‌ها در *M. citrifolia* شده است (٤٥).

۳–پیش ماده‌ها

اضافه کردن پیش‌ماده‌ها برای افزایش متابولیت‌های ثانویه در کشت سلول‌های گیاهی به‌طور غالب استفاده می‌شود و هر ترکیبی (ترکیب حد واسط) که در آغاز یک مسیر بوسنتزی متابولیت‌های ثانویه قرار دارد، می‌تواند جهت افزایش عملکرد متابولیت به کار رود. به‌طور مثال اضافه کردن فنیل‌آلانین به عنوان یک پیش ماده باعث بهبود عملکرد تولید رزمارینیک اسید در کشت سلولی گیاه حسن‌یوسف شده است (٤٦). در آزمایش دیگری با افزودن پیش ماده‌های موالونات و ان–بنزوییل گلایسین به کشت سوسپانسیون سلولی گیاه سرخدار میزان تولید تاکسول تا حدود ۳ برابر افزایش یافت (٤٧).

٤–بهینه‌سازی شرایط محیط کشت

– دما

دمای ۲۵–۱۷ درجه سانتی‌گراد به طور معمول جهت القا بافت کالوس و رشد سلول‌های کشت شده مورد استفاده قرار می‌گیرد. با این وجود درجه حرارت مناسب برای هرگونه گیاهی ممکن است متفاوت باشد (٤٢).

– نور

به طور کلی هم کیفیت و هم شدت نور می‌تواند بر میزان تولید متابولیت‌های ثانویه تاثیرگذار باشد و این بستگی به گونه گیاهی دارد. برای مثال مشخص شده است تجمع آنتوسیانین به میزان بسیار زیادی به وسیله نور درکشت سلولی گیاه هویج و هیبریدهای انگور تحریک می‌شود (٤٥).

- PH محیط کشت

به منظور تولید حداکثر متابولیت‌های ثانویه در محیط‌های کشت سلولی معمولا PH محیط کشت باید بین ٦–٥ تنظیم شود و از PH بالاتر بایستی خودداری شود.

– تهویه محیط کشت

به‌هم‌زدن و هوادهی محیط کشت برای تولید

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-08-02]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.3.4.7]

متابولیت‌های ثانویه در مقیاس وسیع ضروری است. گزارش شده که افزایش میزان اکسیژن به میزان ۵۰ درصد، مقدار یک نوع آلکالویید را تا ۳g/L در محیط کشت به مدت ۲۰ روز پس از رشد در یک بیورآکتور افزایش می‌دهد (٤٨). در اغلب موارد مشخص شده که تهویه سریع‌تر و مطلوب‌تر موجب افزایش تولید متابولیت‌ها در کشت‌های سلولی می‌گردد.

۵-انگیزش

در طبیعت در برخی موارد متابولیت‌های ثانویه گیاهی، به عنوان یک مکانیسم دفاعی در برابر حمله پاتوژن‌ها تولید می‌شود و مشخص شده که گیاهان هنگامی که با ترکیباتی با منشا پاتوژنی روبرو می‌شوند، واکنشی مشابهی را از خود نشان می‌دهند. الیستورها سیگنال‌هایی تولید می‌کنند که باعث تحریک تشکیل متابولیت‌های ثانویه می‌شوند و از این روش می‌توان برای تولید بیشتر متابولیت‌ها استفاده نمود (٤٢). الیستورها می‌توانند بسته به نوع گیاه و نوع متابولیت مورد نظر از ارگانیسم‌ها استخراج شوند و یا اینکه از برخی مواد شیمیایی به‌عنوان الیسیتور استفاده نمود. برای مثال مشخص شده که افزودن نیترات نقره، کلرید کبالت، سولفات وانادیل و فنیل‌آلانین به‌عنوان الیسیتورهای شیمیایی و همچنین استفاده از الیسیتورهای استخراجی از قارچ *Rhizopus stelonifera* در کشت سوسپانسیون سلولی درخت سرخدار، میزان تاکسول تولید شده نسبت به حالتی که هیچ الیسستوری اضافه نشده بود، چندین برابر افزایش یافت (۵۳).

٦-نفوذپذیر کردن سلول

در بسیاری از موارد، محصولات تولید شده در کشت سوسپانسیون سلولی، در واکوئل‌های سلول گیاهی ذخیره می‌شوند. به منظور آزاد کردن این محصولات از واکوئل سلول گیاهی، دو مانع غشایی یعنی غشا پلاسما و تونوپلاست بایستی نفوذپذیر باشند. تلاش‌هایی برای نفوذپذیر کردن سلول‌های گیاهی به طور موقت انجام شده است تا بدین وسیله سلول‌ها را زنده نگه دارند و مدت زمان انتقال متابولبت‌ها را به داخل یا خارج سلول کوتاه کنند (٤٩ ,۵۰). بدین منظور از موادی مثل ایزوپروپانول و دی‌متیل سولفوکساید (DMSO) استفاده شده است (٤٢).

۷-انتقال محصولات در شرایط in vitro

گاهی اوقات تجمع کم متابولیت‌های ثانویه در کشت‌های سلولی ممکن است به دلیل فقدان بیوسنتز آنزیم‌های کلیدی نباشد. بلکه ممکن است به دلایل بازداری به حالت فیدبک، تجزیه آنزیمی یا غیر آنزیمی محصولات در محیط کشت یا فرار بودن مواد تولید شده باشد. در چنین مواردی این امکان وجود دارد که با اضافه کردن یک مکان مصنوعی، به ترکیب رزینی به نام XAD-7 می‌باشد که در کشت سلول‌های گیاهی بدین منظور استفاده می‌گردد (٤٢).

۸-کشت اندام‌های گیاهی برای تولید متابولیت‌های ثانویه

چون تولید متابولیت‌های ثانویه بیشتر در بافت‌های تمایزیافته انجام می‌شود، تلاش‌های زیادی صورت گرفته تا بتوان ترکیبات دارویی بسیار مهم را از طریق کشت ریشه و ساقه گیاه به دست آورد. کشت چنین اندام‌هایی از نظر تولید نسبتا پایدارتر می‌باشد (۵۱). سیستم ریشه‌ای گیاهان عالی عموما رشد آهسته‌تری داشته و برای برداشت مشکل می‌باشد و بدین دلیل برای تولید متابولیت‌های که در ریشه گیاه وجود دارد، معمولا از کشت ریشه‌مویین استفاده می‌شود. در

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-08-02]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.3.4.7]

تعدادی از گیاهان دارویی از جمله شابیزک، پروانش کبیر، گل انگشتانه و درمه کوهی کشت بافت ساقه به منظور تولید متابولیت‌های ثانویه مورد مطالعه قرار گرفته است (٤٢).

۹- کشت ریشه‌های‌مویین برای تولید متابولیت‌های ثانویه

با توجه به توانایی باکتری*Agrobactrium rhizogenes* برای القای ریشه‌های مویین در تعدادی از میزبان‌های گیاهی، می‌توان از این ریشه‌ها به عنوان منبعی برای تولید مواد دارویی استفاده نمود (۵۲).

ریشه‌های‌مویین به وسیله انتقال T_DNA (Transfer DNA) از پلاسمید *Agrobactrium rhizogenes* به بافت‌های میزبان القا می‌شود که در نتیجه، ویژگی سنتز هورمون اکسین توسط ژن‌هایی که به‌وسیله DNA باکتریایی کد می‌شود به میزبان سرایت می‌کند. به منظور مطالعه روی تولید انبوه ریشه‌های مویین، در مواردی آن‌ها را در بیورآکتورها کشت کرده‌اند. کشت ریشه‌های مویین در بسیاری از گیاهان دارویی ازجمله کاسنی، تاتوره، سنا، سرخارگل، جینسینگ، مریم‌گلی، افسنطین، سنبل‌الطیب، بذرالبنج و شیرین‌بیان برای تولید متابولیت‌های ثانویه مورد استفاده قرارگرفته است (٤٢). اساسا اهمیت ریشه‌های‌مویین به دلیل رشد سریع آن‌ها بدون نیاز به اکسین‌های خارجی است. چشم‌گیرترین موفقیت در زمینه تولید ریشه‌های مویین در مقیاس وسیع در بیورآکتورها در مورد کشت ریشه‌مویین گیاه دارویی جینسینگ (*Panax ginseng*) به دست آمده است که در یک محفظه رشد با ظرفیت ۲۰ تن انجام گرفته است (٤٢).

۱۰- تثبیت سلول‌های گیاهی برای تولید متابولیت‌های ثانویه

در این تکنیک سلول‌های گیاهی مورد نظر یا یک آنزیم فعال (از لحاظ کاتالیزوری) را در یک ستون ثابت محصور کرده و از ورود آن به فاز مایع جلوگیری می‌کنند. این ستون مانند یک کارخانه عمل کرده که مواد ورودی (پیش ماده‌ها) از یک طرف وارد ستون شده و از طرف دیگر ماده موثره مورد نظر خارج می‌شود. مزیت این سیستم سرعت بالای عملکرد آن می‌باشد. آلجینات کلسیم رایج‌ترین ماده‌ای است که به منظور محصور کردن سلول‌ها و آنزیم‌ها به کار می‌رود (٤٢). از این تکنیک برای تولید مواد موثره در کشت سلولی گیاهانی مانند هویج، پروانش کبیر، گل انگشتانه، خشخاش، توتون و اسطوخودوس استفاده شده است.

نتیجه‌گیری

تولید انبوه و سریع متابولیت‌های‌ثانویه در مقیاس بالا با استفاده از روش‌های شیمیایی مشکل و یا غیرممکن می‌باشد. استراتژی‌های متعددی برای بهبود تولید متابولیت‌ها پذیرفته شده است. از جمله کشت بافت گیاهی و مهندسی ژنتیک راه‌حلی مناسب و ارزان برای تولید آسان و انبوه متابولیت‌های ثانویه می‌باشد. کشت بافت گیاهی یکی از مهم‌ترین تکنیک‌ها در راستای تولید صنعتی متابولیت‌های ثانویه است. به هر حال هنوز مشکلاتی در سر راه تولید متابولیت‌ها با استفاده از کشت‌های سلولی وجود دارد که مهم‌ترین این موارد عبارت‌اند از: ناپایداری لاین‌های سلولی، عملکرد پایین، مشکلات مربوط به رشد کند و افزایش مقیاس. مهندسی متابولیک افق پرامیدی را بر روی آینده بشر باز نموده است و نوید بخش آینده‌ای بسیار

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-08-02]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.3.4.7]

روشن برای تولید متابولیت‌ها و مواد با ارزش، است امید است که با پیشرفت علم در زمینه‌های بیوشیمی، تنظیم مسیر تولید متابولیت‌های ثانویه و همچنین توانایی ظهور صفات مطلوب به وسیله انتقال ژن، این تکنولوژی به سمت تولید طیف وسیعی از مواد دارویی طبیعی پیش‌رود.

References

فهرست منابع

1-Van Etten H, Temporini E, Wasmann C, 2001. Phytoalexin (and phytoanticipin) tolerance as a virulence trait: why is it not required by all pathogens? Physiological and Molecular Plant Pathology, 59: 83-93.

2-Ramawat KG Merillon JM.1999. Biotechnology; Secondary Metabolites. Scien Publisher, NH, USA Page 21-25.

3- Gershenzon J, Croteau R, 1991. Terpenoids. In Herbivores their interaction with secondary plant metabolites, Vol I: The chemical participants, 2nd ed. G.A. Rosenthal and M.R. Berenbaum, eds, Academic press, San Diego, pp: 165-219.

4- Ogbemudia, F. O. and Thompson, E. O.2014. Variation in Plants Secondary Metabolites and Potential Ecological Roles – A Review. International Journal of Modern Biology and Medicine5(3): 111-130.

5- Picman AK, 1986. Biological activities of sesquiterpene lactones. Biochemical systematics and Ecology, 14: 255-281.

6- Mordue AJ, Blackwell A, 1993. Azadirachtin: an update. Journal of Insect Physiology, 39: 903-924.

7- Eisner T, Meinwald J.1995. Chemical ecology: The chemistry of biotic interaction. Eds, National Academy Press, Washington, DC.

8- Savirnata NM, Jukunen-Titto R, Oksanen E, karjalainen RO, 2010. Leaf phenolic compounds in red clover (Trfolium Pratense L.) induced by exposure to moderately elevated ozone. Environmental Pollution, 158(2): 440-446.

9- Brooker N, Windorski J, Blumi E, 2008. Halogenated coumarins derivatives as novel seed protectants. Communication in Agriculture and Applied Biological Sciences, 73(2): 81-89.

10- Ali ST, Mahmooduzzafar-Abdin MZ, Iqbal M, 2008. Ontogenetic changes in foliar features and psoralen content of Psoralea corylifolia Linn. exposed to SO2 stress. Journal of Environmental Biology, 29(5): 661-668.

11- Gould JM, 1983. Probing the structure and dynamics of lignin in situ. What's New in Plant Physiology, 14: 25-91.

12- Kondo T, Yoshida K, Nakagawa A, Kawai T, Tamura H, Goto T, 1992. Structural basis of blue-color development in flower petals from commelina communis. Nature, 358: 515-518.

13- Lake JA, Field KJ, Davey MP, Beerling DJ and Lomax BH. 2009. Metabolic and physiological responses reveal multi-phasic acclimation of Arabiodopsis thaliana to Chronic UV Radiation. Plant, Cell and Environment, 32(10): 1377-1389.

14- Sreevidya VS, Srinivasa RC, Rao C, Sullia SB, Ladha JK, Reddy PM, 2006. Metabolic engineering of rice with soyabean isoflavone synthase for promoting nodulation gene expression in rhizobia. Journal of Experimental Botany, 57(9): 1957-1969.

15- Mayer AM, 1987. Polyphenols oxidase in plants-recent progress. Phytochemistry, 26: 11-20.

16- Grubb C, Abel S, 2006. Glucosinolate metabolism and its control. Trends in Plant Science, 11: 89–100.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-08-02]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.3.4.7]

17- **Kang SY, Kim YC, 2007.** Decursinol and decursin protect primary cultured rat cortical cells from glutamate-induced neurotoxicity. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 59(6): 863-870.

18- **Choi YE, Harada E, Wada M, Tsuboi H, Morita Y, Kusano T, Sano H, 2001.** Detoxification of cadmium in tobacco plants: formation and active excretion of crystals containing cadmium and calcium through trichomes. Planta, 213: 45–50.

19- **DeVos M, Jander G, 2009.** Myzus persicae (Green peach aphid) salivary components induce defence responses in Arabidopsis thaliana. Plant Cell & Environment, 32(11): 1548-1560.

20- **Van Etten HD, Mansfield JW, Bailey JA, Farmer EE, 1994.** Two classes of plant antibiotics: Phytoalexins versus "phytoanticipins". Plant Cell, 6: 1191-1192.

21- **Van Loon LC, Pierpoint WS, Boller T, Conejero V, 1994.** Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. Plant Molecular Biology Reporter, 12: 245–264.

22- **Thomma BPHJ, Cammue BPA, Thevissen K, 2002.** Plant defenses. Planta, 216(2): 193–202.

23- **Parashina EV, Serdobinskii LA, Kalle EG, Lavorova NA, Avetisov VA, Lunin VG, Naroditskii BS, 2000.** Genetic engineering of oilseed rape and tomato plants expressing a radish defensin gene. Russian Journal of Plant Physiology, 47: 417–423.

24- **Pearce G, Strydom D, Johnson S, Ryan CA, 1991.** A polypeptide from tomato leaves induces wound inducible protienase inhibitor proteins. Science, 253: 895-898.

25- **Seigler DS, 1981.** Secondery metabolites and plant systematic. Conn EE (ed), The biochemistry of plants, Vol 7. Secondery plant products. Plenum, New York and London, pp: 139-176.

26- **Taiz L, Zeiger E, 1995.** Plant Physiology Edition. Panima Publishing Corporation, New Delhi, Bangalore Page 368-385.

27- **Verpoorte R, van der Heijden R, Memelink J. 2000.** Engineering the plant• cell factory for secondary metabolite production. Transgenic Res, 9:323-343.

28- **Dixon RA, Steele CL.1999.** Flavonoids and isoflavonoids – a goldmine• for metabolic engineering. Trends Plant Sci, 4:394-400.

29- **Forkmann G, Martens S.2001.** Metabolic engineering and applications of flavonoids. Curr Opin Biotechnol, 12:155-160.

30- **Facchini PJ.2001.** Alkaloid biosynthesis in plants: biochemistry, cellbiology, molecular regulation, and metabolic engineering applications. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 52:29-66.

31- **Dixon RA. 2001.** Natural products and plant disease resistance. Nature, 411:843-847.

32- **DellaPenna D. 2001.** Plant metabolic engineering. Plant Physiol 125:160-163.

33- **Mol JN, van der Krol AR, van Tunen AJ, van Blokland R, de Lange P, Stuitje AR. 1990.** Regulation of plant gene expression by antisense RNA.FEBS Lett, 268:427-430.

34- **Verpoorte R, van der Heijden R, Memelink J. 2001.** Plant biotechnology and the production of alkaloids. Prospects of metabolic engineering. In The Alkaloids, Vol 50. Edited by Cordell GA. San Diego: Academic Press, p 453-508.

35- **Davies KM. 2000.** Plant colour and fragrance. In Metabolic Engineering of Plant Secondary Metabolism. Edited by Verpoorte R, Alfermann AW. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers;127-164.

36- **Muir SR, Collins GJ, Robinson S, Hughes S, Bovy A, De Vos CHR, Van Tunen AJ, Verhoeyen ME. 2001.** Overexpression of petunia chalcone isomerase in tomato results in fruits containing increased levels of flavonols. Nat Biotechnol, 19:470-474.

37- **Yu O, Jung W, Shi J, Croes RA, Fader GM, McGonigle B, Odell JT. 2000.** Production of the isoflavones genistein and daidzein in non-legume dicot and monocot tissues. Plant Physiol, 124:781-793.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-08-02]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.3.4.7]

38- Jung W, Yu O, Lau S, O'Keefe DP, Odell J, Fader G, McGonigle B.2000. Identification and expression of isoflavone synthase, the keyenzyme for biosynthesis of isoflavones in legumes. Nat Biotechnol, 18:208-212.

39- Verpoorte R and Memelink J.2002. Engineering secondary metabolite production in plants. Current Opinion in Biotechnology 13:181–187.

40- Grotewold E, Chamberlin M, Snook M, Siame B, Butler L, Swenson J, Maddock S, St Clair G, Bowen B.1998. Engineering secondary metabolism in maize cells ectopic expression of transcription factors. Plant Cell, 10:721-740.

41- Van der Fits L, Memelink J. 2000.ORCA3, a jasmonate-responsive transcriptional regulator of plant primary and secondary metabolism. Science, 289:295-297.

42- Ramachandra Rao S, Ravishankar GA. 2002. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. cultures: Chemical factories of secondary metabolites. Biotechnology Advances 20: 101-153.

43- Misava M. 1985. Production of useful plant metabolites. In: Flechter A, editors. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. Berlin: springer-Verlag 59-88.

44- Bohn H, Rink E. 1988. Betalaines. In: Constabel F, Vasil I, editors. Cell culture and somatic cell genetics of plants. New York: Academic Press 5: 449-463.

45- Seitz HU, Hinderer W. 1988. Anthocyanins. In: constabeb F, Vasil I, editors. Cell culture and somatic cell genetics of plants. San Diego: Academic Press 5: 49-76.

46- Ibrahim RK. 1987. Regulation of synthesis of phenolics. In: Constabel F, Vasil I, editors. Cell culture and somatic cell genetics of plants. San Diego: Academic Press 4: 77-95.

47- Cusido R M, Palazon J, Bonfill M, Naviaosorio A, Morales C, Pinol M T. 2002. Improved paclitaxel and baccatin III production in suspension cultures of Taxus media. Biotechnol Prog 18: 418-423.

48- Kreis W, Reinhard E.1989. The production of secondary metabolites by plant cells cultivated in bioreactors. Planta Med 55: 409-416.

49- Parr AJ, Robins RJ, Rhodes MJC. 1987. Release of secondary metabolites by plant cell cultures. In: webb C, Mavituna F, editors. Plant and animal cells: process possibilities. Chichester: Ellos Horwood: 229-237.

50- Brodelius P, Nilsson K.1983. Permeabilization of immobilized plant cells resulting in release of intracellularly stored products with preserved cell viability. Eur. J. Appl. Microbial. Biotechnol 17: 275-280.

51- Roja G. 1994. Biotechnology of indigenous medicinal plants. PhD Thesis. Bombay University. Bombay.

52- Ravishankar GA, Ramachandra Rao S. 2000. Biotechnological production of phytopharmaceuticals. J. Biochem. Mol. Biol. Biophys 4: 73-102.

53- Flores He, Vivanco JM, Loyola-Vorgas M.1999. Radicle biochemistry: the biology of root-specific metabolism. Trends. Plant. Sci 4: 220-226.

54- Bourgaud, F. Gravot, A. Milesi, S. Gontier E.2001. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. Plant Science 161: 839–851.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-08-02]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.3.4.7]

production of secondary metabolites through genetic engineering and plant tissue culture

Ali Akbar Gholami

Graduated from MSc in Agricultural Biotechnology, Shahid Madani University of Azerbaijan, Tabriz, Iran

Gholami.2359@gmail.com

Abstract
Chemical reactions that occur in plants known as metabolism and metabolites of important biochemical compounds, including carbohydrates, proteins and fats are. Other biochemical compounds that these three groups are known as secondary metabolites in a wide range of materials such as medicinal compounds, spices, pesticides and natural colors are included. One of the most important techniques of plant tissue culture in line with the industrial production of secondary metabolites because the production potential of these substances in normal conditions is very limited. The technique used in this area mainly include: cell culture, organ culture and hairy root cultures. Plant tissue culture is one of the most important techniques in line with the industrial production of secondary metabolites, but the use of cell culture plant for the production of compounds important drug for industrial use only becomes possible when the product greatly be produced, or more than one product from culture to be achieved. This selection of cell lines with conventional methods and other parameters related to growth or production is not possible. Therefore, we should be able to evaluate the metabolic pathways and the genes they regulate the process limiting production to overexpress (high expression) said. In general, it can be said that the use of these techniques in the production of certain drug can naturally bring great economic benefits.
Key words: secondary metabolites, Genetic engineering, tissue culture

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-08-02]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.3.4.7]