نقش زیست‌فناوری در تولید محصولات ثانویه‌ی گیاهی

نسرین اسماعیل‌زاده (کارشناس ارشد)
سیدمهدی حسینی مزینانی (استادیار پژوهشی)
مرکز ملی تحقیقات مهندسی ژنتیک و تکنولوژی زیستی

تولید محصولات ثانویه‌ی گیاهی از طریق کشت سلول‌های گیاهی، در مقایسه با تولید آنها به روش‌های سنتی مزایای بسیار دارد. روش‌های متفاوتی نظیر بهینه‌سازی محیط کشت، طراحی واکنشگر مناسب، تثبیت سلول‌های گیاهی، هدایت عمل انتقال مواد، و... برای افزایش تولید این محصولات به کار گرفته شده‌اند ولی هنوز نمی‌توان مواد دارویی مانند مرفین و گلیکوزیدهای قلبی، روغن‌ها و حشره‌کش‌ها را در تعلیق‌های سلولی به‌میزانی که در یک گیاه کامل تولید می‌شوند تهیه کرد. مهم‌ترین عامل این است که در شرایط پینه‌یی (کالوس) کشت سلولی، عمل تمایز و تبدیل سلول‌ها بندرت صورت می‌گیرد و این امر باعث جلوگیری از ساخت آنزیم‌های لازم برای سنتز و تجمع محصولات ثانویه می‌شود. با توجه به خصوصیات سلول‌های گیاهی، مشخص شده است که کشت بافت‌های تمایزیافته‌ی گیاه، نظیر بافت ریشه، برکشت سلولی برتری دارد. کشت ریشه‌های منتقل‌شده یا ریشه‌های مویی امکان گسترش روش‌های تجاری برای تولید این محصولات را فراهم می‌کند. بزرگ‌ترین ویژگی استفاده از این کشت‌ها، رشد سریع و قابلیت نگهداری آنها در محیط‌های بدون هورمون، و امکان واردکردن ژن‌های خارجی است.

مقدمه

گیاهان علاوه بر آن که از منابع مهم غذایی‌اند، تأمین‌کننده‌ی طیف وسیعی از مواد شیمیایی نظیر داروها، حشره‌کش‌ها، عطرها، رنگ‌ها و چاشنی‌ها هستند. این محصولات را «محصولات یا فراورده‌های ثانویه» می‌نامند. در طبیعت، از این فراورده‌های سوخت‌وسازی به عنوان عوامل دفاعی گیاه در مقابل بیماری‌ها و آفت‌ها، و نیز به عنوان مواد شیمیایی جاذب حشرات و حیواناتی که دانه‌ها و گرده‌های گیاهان را منتشر می‌کنند، استفاده می‌شود.[۱]

علی‌رغم پیشرفت روش‌های شیمیایی و میکروبی، گیاهان هنوز منبع مهم ترکیباتی هستند که به‌علت پیچیدگی و گرانی نمی‌توان آنها را به‌طریقی دیگر تولید کرد. قیمت هرکیلو از این محصولات از چنددلار (کدیین) تا چند هزار دلار (روغن یاسمین) است. هرگرم از ضد تومورهایی نظیر وینبلاستین یا وینکریستین که از گیاه کاتارانتوس روزئوس به دست می‌آیند، و در معالجه‌ی سرطان خون استفاده دارد، ۶۰۰۰ دلار به فروش می‌رسد. بازار مواد دارویی گیاهی در آمریکا حدود ۹ بیلیون دلار برآورد می‌شود و بازار جهانی برای چاشنی‌ها و عطرها در همین حدود است. جدول ۱ کاربرد بعضی از محصولات گیاهی را در صنعت نشان می‌دهد.[۲]

صنعت تولید محصولات ثانویه متأثر از پیشرفت در دو زمینه‌ی اساسی است:

الف) توسعه‌ی فناوری‌های جدید برای تولید انبوه محصولات ثانویه‌ی گیاهی؛ در این بخش باید راه‌های جدیدی برای دست‌ورزی تولید محصولات شناسایی شود تا بتوان میزان تولید آنها را، در مقایسه با آنچه که در یک گیاه کامل تولید می‌شود، افزایش داد.

ب) کشف محصولات ثانویه‌ی جدید از منابع گیاهی جدید. اولویت اصلی در این بخش، یافتن محصولات جدید شیمیایی در گیاهان جنگلی است، پیش از آنکه این گیاهان برای همیشه از بین بروند.[۳]

کاربرد کشت سلول‌های گیاهی در تولید محصولات ثانویه

حدود ۴۰ سال پیش، قابلیت استفاده از کشت سلول‌های گیاهی برای تولید محصولات ثانویه‌ی گیاهی، همزمان با موفقیت در توسعه‌ی روش‌های این کشت تعیین شد ــ همان‌گونه که از تخمیر میکروبی و قارچی برای تولید آنتی‌بیوتیک‌ها و اسیدهای آمینه استفاده می‌شد. تولید

جدول ۱ـ برخی از محصولات گیاهی و کاربرد آنها در صنعت

منشاء گیاهی	محصول گیاهی	کاربرد
	دارویی	
Papaver Somniferum	کدیین	مسکن
Atropa belladonna	آتروپین	مهارگرکولینرژیک
Digitalis lanata	دیگوکسین	محرک قلب
Cinchona ledgeriana	کوآنین	ضد مالاریا
Catharanthus roseus	وینکریستین	ضد سرطان خون
Taxus brevifolia	تاکسول	ضد سرطان سینه و تخمدان
	افزودنی‌های غذایی	
Cinchona ledgeriana	کوآنین	تند و تیزکننده
Thaumatococcus danielli	تاماتین	شیرین‌کننده
Lycopersicon esculentum	لیکوپن	رنگدانه‌ی قرمز
Crocus sativus	کروسین	رنگدانه‌ی زرد
Nicotiana tabacum	نیکوتین	حشره‌کش
Chrysanthemum cineraefolium	پیرترین	حشره‌کش
	آنزیم‌ها	
Papaya, Pineapple, fig plants	پروتئازهای سولفیدریل	تصفیه‌ی آبجو، تردکردن گوشت، لکه‌گیری لباس
Citrus fruits, and tomatoes	پکتینازها	تصفیه‌ی آب میوه
barely and other grains	آمیلازها	شکستن نشاسته به شکر
Jasminum sp.	روغن یاسمین	عطر

محصولات ثانویه‌ی گیاهی با استفاده از محیط‌های کشت آزمایشگاهی (*in vitro*)، در مقایسه با روش‌های سنتی تولید این محصولات مزایای بسیاری دارد.[۴و۵] مهم‌ترین این مزایا عبارت‌اند از:

۱ـ عوامل محیطی مانند آب و هوا، آفت‌ها، بیماری‌ها، شرایط فصلی و جغرافیایی تأثیری بر رشد گیاه ندارند.

۲ـ این نوع کشت‌ها تا حد زیادی قابل کنترل‌اند، بنابراین قابلیت هماهنگی سطح تولید آنها با سطح تقاضای بازار وجود دارد.

۳ـ با استفاده از رده‌های سلولی مشخص، می‌توان ثبات کیفی محصولات تولید شده را تضمین کرد.

۴ـ اگر این محصولات در شرایط قابل کنترل تولید شوند، مراحل بعدی استخراج راحت‌تر انجام می‌شود.

۵ـ روش‌های جدید تولید این محصولات را می‌توان با استفاده از رده‌های سلولی جهش‌یافته شناسایی کرد. این روش‌ها منجر به تولید محصولات جدیدی می‌شوند که تا پیش از آن در یک گیاه کامل هم تولید نشده است.

۶ـ در مواردی که کشت گیاه کامل به‌دلیل چرخه‌ی طولانی زندگی مشکل یا پرهزینه است، استفاده از کشت سلول‌ها مناسب‌تر خواهد بود.

۷ـ بعضی از کشت‌های سلولی از طریق یک یا چند مرحله واکنش آنزیمی، قابلیت تبدیل مولکول‌های حیاتی به ترکیبات مهم و با ارزش اقتصادی را دارند. این عمل که «دگرگونی زیستی»[۱] نامیده می‌شود، برای تولید چندین ترکیب مختلف دارویی مورد استفاده قرار گرفته است. کشت‌های سلولی مشتق شده از گیاهان *Digitalis lanata* متیل دیجیتوکسین هیدروکسیلاز (یک استروئید قلبی ـ عروقی) را به متیل دیوکسین (ترکیبی که برای درمان بیماری‌های قلبی استفاده می‌شود) تبدیل می‌کنند.

۸ـ کشت سلول‌های گیاهی قابلیت انجام واکنش‌های شیمیایی مانند انواع کاتالیزها (شامل اکسایش، احیا، آبکافت،...)، گلیکولیزکردن، متیله و دی‌متیله کردن، و نیز بسپارش را دارند. بعضی از انواع سلول‌های گیاهی و آنزیم‌های مشتق شده از گیاهان، فعالیت‌های کاتالیزی سریع‌تری نسبت به کاتالیزورهای غیرزیستی دارند. پروتئازها، پکتینازها، و آمیلازها سه دسته‌ی مهم آنزیم‌های مشتق‌شده‌ی گیاهی هستند.

کشت تعلیق‌های سلولی می‌تواند نقش مهمی در تولید تجارتی محصولات ثانویه‌ی گیاهی داشته باشد. برای مثال، تاکسول (داروی ضد سرطان تخمدان) از تنه‌ی درختان ۶۰ـ۵۰ ساله‌ی گیاه *Taxus brevifolia* به دست می‌آید. برای به‌دست آوردن ماده‌ی مورد نیاز برای درمان هر بیمار، ۱۲ درخت از این گونه مورد نیاز است. با توجه به این که تنها 10^6 درخت از این نوع باقی مانده و برای درمان بیماران سالانه 10^5 درخت مورد نیاز است، نقش حساس کشت سلولی از لحاظ تأمین مصارف دارویی و بوم‌شناسی مشخص می‌شود.[۶]

در زمینه‌ی کشت سلول‌های گیاهی برای تولید محصولات ثانویه، مطالعات با ارزشی در کشورهای ژاپن، آلمان و در مقیاس کمتر در آمریکا صورت گرفته است. در سال ۱۹۸۳، نخستین کشت سلول‌های گیاهی در ژاپن به‌صورت تجاری مورد استفاده قرار گرفت. شیکونین دارویی است که از آن، در ژاپن، به‌عنوان داروی ضد تورم و ضد باکتری، و نیز در مواد آرایشی به‌عنوان رنگ استفاده می‌شود. این ماده در ریشه‌های گیاه KO-Shikon (*Lithospermum erythrohizon*) یافت می‌شود و حدود ۲ درصد وزن ریشه را تشکیل می‌دهد. اما چندین سال طول می‌کشد تا گیاهان به اندازه‌ی لازم برای تولید این محصولات برسند. در سال ۱۹۸۴، فوجیتا و همکارانش با انتخاب یک رده‌ی سلولی با تولید بالا و روش تولید دومرحله‌یی که شامل رشد و تولید بود، طی ۲۳ روز عمل تخمیر سلول‌ها در یک تانک ۷۵۰ لیتری، موفق به تولید

زیست‌توده[۲] یی شدند که ۲۳ درصد وزن آن را شیکونین تشکیل می‌داد.[۷]

از آنجا که کشت تعلیق‌های سلولی برای راه‌اندازی و نگه‌داری راحت‌ترند و نیز به‌سادگی می‌توان این کشت‌ها را توسعه داد و به مرحله‌ی تولید صنعتی رساند، تاکنون بیشترین گرایش در تولید محصولات ثانویه، تحریک سلول‌های تمایزنیافته در کشت تعلیق‌های سلولی بوده است. با وجود گزارش‌های بسیار در زمینه‌ی تولید محصولات ثانویه از طریق کشت سلولی، هنوز نمی‌توان مواد دارویی مانند مرفین، گلیکوزیدهای قلبی، روغن‌ها و حشره‌کش‌ها را در تعلیق‌های سلولی به‌میزانی که در یک گیاه کامل تولید می‌شوند، تهیه کرد. مهم‌ترین عامل این است که در شرایط پینه‌یی کشت سلولی، عمل تمایز و تبدیل سلول‌ها به‌ندرت صورت می‌گیرد. دانشمندان معتقدند که این موضوع باعث جلوگیری از ساخت آنزیم‌های لازم برای سنتز و تجمع محصولات ثانویه می‌شود.[۲]

محصولات ثانویه‌ی گیاهی در دوره‌ی خاصی از زندگی گیاه و در سلول‌های تمایزیافته‌ی یک اندام خاص ساخته می‌شوند. این مواد همچنین به دنبال رشد سلول‌ها، و در واکنش سلول به تحریکات داخلی و خارجی تولید می‌شوند. این امر حاکی از وجود یک سازوکار کنترل‌کننده‌ی پیچیده برای ساخت این مواد است. در محیط کشت، سلول‌ها دیگر تحت کنترل بافت‌های سازمان‌یافته‌ی یک گیاه کامل نیستند. از این رو، کمبود تولید محصولات ثانویه در کشت تعلیق‌های سلولی یا سلول‌های تمایزنیافته دور از انتظار نیست. در تولید محصولات ثانویه، آنزیم‌های مختلفی دخالت دارند. مثلاً در تولید ترکیب وینکریستین حداقل ۱۱ مرحله‌ی آنزیمی مختلف دخالت دارند. گزارش‌های موجود نشان می‌دهند که کشت سلول‌های تمایزنیافته‌ی گیاهی برای تولید بالا و مستمر محصولات ثانویه قابل اعتماد نیستند. از خصوصیات مشترک این کشت‌های سلولی عدم ثبات زیست‌شیمیایی است، که براثر عدم ثبات ژنتیکی ــ ویژه‌ی کشت‌های سلولی در درازمدت ــ حاصل می‌شود.[۸]

کشت سلول‌های گیاهی، به‌لحاظ ناتوانی این سلول‌ها از رشد در حجم‌های بزرگ و درنتیجه نداشتن صرفه‌ی اقتصادی، محدود شده است؛ مگر در مواردی که مواد با ارزش و تقاضای کم ــ مثل بعضی از داروها ــ ساخته می‌شوند. اگر چه سلول‌های گیاهی می‌توانند در ظرف‌های چندلیتری کشت داده شوند، پایین بودن سوخت‌وساز و رشد ذاتی آنها در مقایسه با سیستم‌های میکروبی و نیازهای خاص آنها برای طراحی واکنشگرهای مخصوصی که بتوانند هم‌زدن را در حد نیاز برآورده سازند و به سلول‌های شکننده‌ی گیاهی نیز آسیب نرساند، موجب عقب‌ماندن کشت سلول‌های گیاهی در حجم‌های بزرگ شده است. حتی در وضعیتی که سیستم‌های چندلیتری گسترش یافته‌اند، فقط مقدار کمی از مواد دلخواه تولید شده‌اند.[۹]

سرنوشت فراورده‌های سوخت‌وساز تولید شده

سلول‌های گیاهی در محیط کشت، محصولات ثانویه را در فضای ذخیره‌یی درون‌سلولی نگهداری یا آنها را به بیرون ترشح می‌کنند. در یک گیاه کامل، عمل خروج مواد ممکن است شامل انتقال مواد به دیگر سلول‌های ذخیره‌یی باشد، در این صورت خروج مواد مستلزم حمل و جابه‌جایی در یک مسیر طولانی است. اما در محیط کشت، این مواد به دیواره‌ی سلولی منتقل می‌شود یا غالباً به محیط کشت می‌ریزند. به‌عکس ممکن است سلول‌ها موادی را از محیط برداشته و آنها را با تغییر یا بدون تغییر در فضای ذخیره‌یی درون‌سلولی ذخیره کنند. اگرچه بعضی از سیستم‌های گیاهی، حتی در جزئیات، مورد بررسی و آزمایش قرار گرفته‌اند، سازوکار مولکولی عمل جابه‌جایی هنوز به درستی مشخص نشده است. غشاء سلولی ــ جداکننده‌ی فضای سیتوپلاسمی از خارج سلول ــ و تونوپلاست ــ احاطه کننده‌ی واکوئل ــ هر دو در جابه‌جایی فعال و غیر فعال دخالت دارند و هردو سازوکار نیز در جابه‌جایی محصولات نهایی و محصولات واسطه‌یی نقش دارند.[۱۰] انتخاب‌های موجود برای سلول‌ها درخصوص انتقال فراورده‌های ثانویه‌ی گیاهی شامل موارد زیر است:

- در حالت اول یا انتخاب ذخیره، سلول‌هایی که محصولات ثانویه را تولید می‌کنند محصولات نهایی را به واکوئل منتقل و در آنجا ذخیره می‌کنند. در این حالت، ظرفیت تولید محصولات ثانویه با ظرفیت واکوئل ارتباط مستقیم دارد.
- در حالت دوم یا انتخاب ترشح، سلول‌ها محصولات را به محیط ترشح می‌کنند. در نتیجه، ظرفیت تولید سلول و تولید نهایی به ویژگی‌های محیط منحصر می‌شود.
- در حالت سوم، محصولات ثانویه نشأت‌گرفته از سلول‌های دیگر موجود در محیط کشت، می‌توانند از محیط جمع‌آوری و در داخل سلول ذخیره شوند.

روش‌های افزایش تولید محصولات ثانویه

بهینه‌سازی محیط کشت، طراحی واکنشگر، تثبیت سلول‌های گیاهی، هدایت عمل انتقال و عبور مواد، تحریک استخراج و درک راه‌های زیست‌ساخت، تأثیر قابل توجهی در تجاری کردن کشت سلول‌های گیاهی دارند. این عوامل اگر به‌صورت تلفیقی در کشت تعلیق‌های سلولی استفاده شوند، تولید محصولات ثانویه را تا چندین برابر افزایش

می‌دهند. برخی از عوامل مؤثر در افزایش تولید محصولات ثانویه عبارت‌اند از:

الف) ویژگی‌های محیط کشت

مبنای برخی از روش‌های افزایش تولید محصول، دست‌ورزی ویژگی‌های محیط کشت است. محیط استفاده شده در تعلیق‌های سلولی دربرگیرنده‌ی مواد اولیه و هورمون‌های تنظیم‌کننده‌ی رشد است. تغییر و بهینه‌سازی محیط کشت برای تحریک سلول‌ها و تولید مواد ثانویه، معمولاً با افزایش غلظت سوکروز یا کاهش غلظت فسفات و تنظیم میزان هورمون‌های رشد انجام می‌شود. مثلاً درخصوص *Thalictrum minus* برای ظاهرشدن کیسه‌های (آبدانه‌های)[3] ترشحی، محیط کشتی شامل مقادیر مناسبی از هورمون‌های گیاهی ۱ـ نفتالین استیک‌اسید و ۶ـ بنزآلدئین مورد نیاز است و اگر به جای آن از هورمون ۴،۲ـ دی‌کلروفنوکسی استیک‌اسید استفاده شود، کیسه‌های ترشحی تشکیل نمی‌شوند و فقط مقدار کمی بربرین ــ عامل ضدباکتری که در شرق استفاده‌ی زیاد دارد ــ تولید می‌شود.

کلاتمن و همکارانش در سال ۱۹۹۴، نقش اکسیژن و مواد اولیه را در تولید ایندول آلکالوئیدها از کاتارانتوس روزئوس بررسی کردند. آنان به این نتیجه رسیدند که وجود مقدار زیاد اکسیژن در محیط کشت، تولید آلکالوئید را بیش از پنج برابر افزایش می‌دهد.[۱۲]

ب) طراحی واکنشگر

درخصوص طراحی واکنشگر، الگوهای جدیدی برای کشت سلول‌های شکننده‌ی گیاهی پیشنهاد شده است. ویژگی این الگوها به صورتی است که در هنگام رساندن اکسیژن و مواد اولیه‌ی لازم به تمام سلول‌ها کمترین آسیب به سلول‌های گیاهی وارد شود. نوتیلا و همکارانش در تحقیقی که در سال ۱۹۹۴ انجام دادند، سه نوع واکنشگر مختلف را ــ واکنشگرهایی با سیستم پخش هوا و مجهز به همزن‌های مکانیکی، بدون همزن‌های مکانیکی، یا با محیط گردان ــ برای رشد ریشه‌های مویی و تولید بهتر آلکالوئید ایندول از کاتارانتوس روزئوس با هم مقایسه کردند. بهترین نتیجه با واکنشگر مجهز به سیستم پخش هوا و بدون همزن به دست آمد. این سیستم به سلول‌های حساس و شکننده‌ی ریشه‌های مویی آسیب نمی‌رساند.[۱۳]

ج) تثبیت سلول‌های گیاهی در محیط کشت

پیش‌تر گفتیم که هرچه تعداد سلول‌های تمایز یافته کمتر باشند تولید محصولات ثانویه نیز کمتر خواهد بود. یک راه مناسب برای حل این مشکل، افزایش درجه‌ی تمایز سلولی در واکنشگرهای طراحی شده است. از جمله اقداماتی که در این زمینه انجام شده است، افزایش ارتباط سلول‌ها از طریق تثبیت سلول‌ها در یک شبکه (ماتریس) است.[۱۴] سه روش اساسی تثبیت سلول‌های گیاهی عبارت‌اند از:

۱ـ استفاده از صفحات نایلونی مشبک: سلول‌ها به این صفحات متصل می‌شوند و مواد اولیه‌ی مورد نیاز، با استفاده از جریان هوای سترون‌شده در محیط کشت می‌چرخند و به سلول‌ها می‌رسند.

۲ـ استفاده از بلوک‌های مشبک: وقتی سلول‌ها بزرگ و تقسیم می‌شوند، فضاهای موجود در بلوک‌ها را پر می‌کنند. این روش موجب هدایت فعالیت سلولی از مرحله‌ی رشد به ساخت محصولات ثانویه می‌شود.

۳ـ استفاده از مهره‌های آلژینات برای شکار سلول‌های گیاهی: آلژینات سدیم با اتوکلاو کردن، سترون می‌شود و پس از سردشدن با سلول‌های محیط کشت ترکیب می‌شود. تعلیق آلژینات سدیم و سلول قطره قطره به محلول کلرید کلسیم اضافه می‌شود. این دو محلول وقتی با هم ترکیب می‌شوند، مهره‌هایی از آلژینات کلسیم تشکیل می‌شود که سلول‌های گیاهی در آن به دام می‌افتند.

د) انتخاب سلول‌های تولیدکننده

یکی از مهم‌ترین مراحل تولید محصولات ثانویه، شناسایی و انتخاب سلول‌های تولیدکننده است. درخصوص شیکونین ــ که یک ترکیب رنگی است ــ انتخاب سلول‌های تولیدکننده آسان است. انتخاب و بهینه‌سازی شرایط کشت موجب شد میزان شیکونین از ۲درصد در ریشه‌ها به ۲۳ درصد در محیط کشت افزایش یابد. همچنین سلول‌هایی باید انتخاب شوند که رشد سریع دارند و می‌توانند تعلیق‌های سلولی خوبی تولید کنند. از آنجاکه توانایی رشد سریع سلول‌ها در بیشتر موارد با تمایز زیست‌شیمیایی و بافتی اندکی همراه است، تعلیق‌های سلولی قادر به رشد مناسب در واکنشگرها نیستند. حتی در کشت‌های سلولی که این محصولات را در سطحی بالاتر از یک گیاه کامل تولید می‌کنند، سنتز این مواد ممکن است در مرحله‌ی ثابت رشد گیاه انجام شود، یا در مرحله‌یی که سلول‌ها از محیط رشد به محیط تولیدی انتقال داده می‌شوند ــ که در این صورت باعث کاهش رشد سلول‌ها می‌شوند.

هـ) هدایت عمل انتقال و عبور مواد

۱ـ افزایش نفوذپذیری: کوشش‌های بسیاری برای قابل نفوذکردن تونوپلاست و غشاء پلاسمایی صورت گرفته تا محصولات ثانویه بتوانند به محیط کشت سلول راه یابند. برای این منظور، معمولاً مواد شیمیایی نظیر حلال‌های آلی و مواد پاک‌کننده (گندزدا)[4] استفاده

می‌شوند، زیرا این مواد قادرند دیواره‌ی سلولی را تخریب کنند. این روش غالباً در مواردی استفاده می‌شود که راه دیگری برای برداشت محصول نباشد. در بیشتر این موارد باید از مقدار زیادی حلال یا مواد پاک‌کننده استفاده شود که منجر به خرابی اجزاء سلول و مرگ سلول‌ها می‌شود. استفاده از میدان‌های الکتریکی، امواج فراصوتی و دی‌متیل سولفوکسید روش‌های دیگری برای این منظورند.

۲ـ سیستم دوفازی. رشد آهسته‌ی سلول‌های گیاهی و تولید کم محصول از عواملی هستند که افزایش استفاده از کشت سلولی را محدود کرده‌اند. از سوی دیگر، این محصولات معمولاً در داخل سلول ذخیره می‌شوند که به دست آوردن آنها به ناچار موجب از بین رفتن سلول‌ها می‌شود. برای حل این مشکلات، کشت سلولی استخراجی در ۱۰ سال گذشته در سطح وسیعی مورد مطالعه قرار گرفته است. در این شیوه، خارج‌سازی محصول از محیط کشت سلولی طی عمل تخمیر انجام می‌شود، که به‌این ترتیب سلول‌ها نیز حیات خود را حفظ می‌کنند.[۹]

در این سیستم، برای کنترل و هدایت جابه‌جایی مواد، یک فاز استخراجی به واکنشگر اضافه می‌شود که یک جایگاه ساختگی را برای تجمع محصولات فراهم می‌سازد. مطالعات انجام شده، ارزش این روش را، به‌خصوص در مواردی که با واکنشگرهای مناسب همراه باشد، نشان داده است. ساخت فراورده‌های سوخت‌وساز در سیتوپلاسم یا در کیسه‌ها (آبدانه‌ها)، که به‌طور معمول منتهی به ذخیره‌ی محصولات نهایی در فضای درون‌سلولی می‌شوند، ممکن است به صورتی دست‌ورزی شوند که ذخیره‌ی خارج از سلولی در فاز استخراجی واکنشگر صورت گیرد. از این رو، در این روش نیازی به تخریب دیواره‌ی سلولی نیست و سلول‌ها ترکیب درون‌سلولی طبیعی دارند؛ فقط سرعت جابه‌جایی مواد اولیه از میان راه‌های سوخت‌وسازی و در نهایت به فضای خارج سلولی افزایش می‌یابد. از مزایای دیگر این روش این است که محصولات تولید شده که مستعد از بین رفتن به‌وسیله‌ی آنزیم‌های خارج سلولی هستند، به‌سرعت جدا می‌شوند. مزیت دیگر اینکه، این محصولات در حجم کمتری نسبت به محیط خارج سلولی جای می‌گیرند که موجب می‌شود مراحل بعدی برداشت ساده‌تر انجام گیرد.

انتخاب فاز دوم مناسب، بستگی به خصوصیات ریخت‌شناختی[۵] سلول گیاهی و محصول نهایی دارد. در این زمینه هیچ قاعده‌ی کلی وجود ندارد. بنابراین، برای هر کشت جدید سلول گیاهی باید یک فاز دوم مناسب پیدا شود. به‌طور کلی روش‌های انتخاب باید براین اساس استوار باشد که ظرفیت جداکنندگی به حداکثر و تأثیر سم بر سلول‌ها به حداقل برسد.

۳ـ سیستم کشت دومرحله‌یی. برای تولید بیشتر محصولات ثانویه، سیستم‌های کشت دومرحله‌یی توسعه یافته‌اند. در مرحله‌ی اول، سلول‌های گیاهی در شرایط مناسب رشد می‌یابند و در دومین مرحله، محیط کشت با یک محیط محرک تولید محصول عوض می‌شود. استفاده از مرحله‌ی استخراجی نیز تأثیر زیادی بر روی روش تغذیه‌ی سیستم دارد و موجب به‌دست آوردن کشت سلولی متراکم می‌شود. در این سیستم محصول تولید شده، به‌طور مداوم از محیط کشت خارج می‌شود.

۴ـ روش‌های افزایش محرک‌های تولید. تحریک آنزیم‌های مسیر زیست‌ساخت، یکی از روش‌های تنظیم رفتارهای پویای فراورده‌های سوخت‌وساز ثانویه است. تحریک تولید فراورده‌های سوخت‌وساز ثانویه، به وسیله‌ی محرک‌های شیمیایی ویژه، مورد توجه قرار گرفته است. علی‌رغم نامشخص‌بودن ژنتیک مولکولی و سازوکارهای هدایتی که گیاهان و کشت‌های گیاهی حساس از طریق آنها پاسخ می‌دهند، بعضی از مولکول‌های محرک مشخص شده‌اند. برای نمونه، گلوکان ــ نمونه‌ی مشخص اولیگوساکاریدها ــ که از قارچ‌های زیادی جدا شده است، به‌عنوان محرک تولید مورد استفاده قرار می‌گیرد. به‌تازگی استفاده از متیل یاسمونات به عنوان روشی مناسب برای افزایش تولید طیف زیادی از فراورده‌های سوخت‌وساز ثانویه مورد استفاده قرار گرفته است.[۱۱]

هدایت عمل انتقال با استفاده از مهندسی ژنتیک

از سازوکار انتقال مواد در سلول‌های گیاهی در سطح مولکولی اطلاعات بسیار ناقصی در دسترس داریم؛ در حالی که برای دست‌ورزی انتقال در عرض غشاء سلول‌های گیاهی، تحقیقات پایه‌یی بیشتری لازم است. پروتیین‌های درگیر در عمل انتقال فعال، باید جداسازی، و ساختمان آنها مشخص شود. با روش‌های مولکولی ایجاد نوترکیبی ممکن است در آینده بتوانیم این پروتیین‌ها را از تونوپلاست به غشاء سلول انتقال دهیم و سلول‌های تراریختی تولید کنیم که بتوانند به‌جای ذخیره‌ی مواد تولیدی در واکوئل، این مواد را به خارج از سلول منتقل کنند. این سلول‌های دست‌ورزی شده، قابلیت کاربری زیست‌فناوری را در کشت سلول‌های گیاهی به‌منظور تولید محصولات ثانویه افزایش خواهند داد. بنابراین، یکی از موارد مهم تحقیقات در زیست‌فناوری، دست‌ورزی سیستم انتقال به‌منظور ترشح فراورده‌های سوخت‌وساز ثانویه به محیط کشت است.[۱۵]

تولید فراورده‌های ثانویه در بافت‌های متمایز

چنان که اشاره شد، سلول‌های گیاهی مانند سلول‌های میکروبی قابل

کشت‌اند. اما تفاوت‌های اساسی بین سلول‌های میکروبی و گیاهی وجود دارد. مثلاً سلول‌های میکروبی در حدود 10^4 مرتبه کوچکتر از سلول‌های گیاهی‌اند. سلول‌های گیاهی به دلیل گستردگی سطح آنها، گازها و مواد اولیه را در مقادیر کمتری جذب می‌کنند. این سلول‌ها همچنین به سبب بزرگی سلول و واکوئل، نسبت به سلول‌های میکروبی شکننده‌ترند. بزرگترین تفاوت دو سیستم گیاهی و میکروبی در این است که سلول‌های میکروبی به‌عنوان یک ریزاندامگان، کلیه‌ی اعمال حیاتی را به‌تنهایی انجام می‌دهند. در حالی که گیاهان از میلیون‌ها سلول تشکیل شده‌اند که اعمال آنها وابسته به یکدیگر است.[۱۶] بنابراین، سلول‌های گیاهی باید در شرایطی کشت شوند که امکان تمایز سلولی تا حدی وجود داشته باشد. در این صورت آنها قادر خواهند بود طیف وسیعی از محصولات ثانویه را تولید کنند. با توجه به این موارد، در سال‌های اخیر کشت بافت‌های تمایزیافته‌ی گیاه، مانند کشت نوساقه[۶]، کشت رویان[۷]، و کشت بافت ریشه[۸] توجه بسیاری را به خود معطوف داشته است. این نوع کشت‌ها برای بافت‌هایی مناسب‌اند که محصول مورد نظر در آن تولید می‌شود.

مهم‌ترین مزیت کشت بافت‌های تمایزیافته ــ مانند بافت ریشه ــ بر کشت پینه‌یی (کالوس) یا بافت‌های تمایزنیافته این است که این کشت‌ها، تشکیلات بخشینه‌ی ریشه را حفظ می‌کنند و این موضوع منجر به ثبات کروموزومی در کشت‌های درازمدت می‌شود. مثلاً در سال ۱۹۸۸ آیرد و همکارانش سلول‌های بخشینه‌ی بافت ریشه‌ی هشت‌گونه‌ی گیاهی را آزمایش کردند و اثری از آنوپلوئیدی[۹] (سلولی که تعداد کروموزوم‌هایش از مجموعه‌ی مضاعف هاپلوئید کمتر یا بیشتر است) و پلی‌پلوئیدی[۱۰] (سلولی که تعداد کروموزوم‌هایش ۳ یا ۴ برابر تعداد کروموزوم‌های طبیعی است) در این کشت‌ها دیده نشد.[۱۷]

در ادامه، به دو شیوه‌ی اصلی تولید فراورده‌های ثانویه در بافت‌های تمایزیافته اشاره می‌شود:

الف) تولید محصولات ثانویه در بافت ریشه

ریشه‌ی گیاهان به‌عنوان منبع غذایی، از ارزش اقتصادی بالایی برخوردار است. مثلاً سیب زمینی و کازاوا[۱۱] به‌عنوان یک منبع غذای اصلی در بیشتر نقاط دنیا استفاده می‌شوند. همچنین سبزی‌هایی مانند هویج، ترب، و چغندر در قسمت ریشه‌ی گیاهان ساخته می‌شوند. کاربرد دیگر ریشه‌ی گیاهان ــ که امروزه به آن اهمیت کمتری داده می‌شود ــ استفاده از فراورده‌های سوخت‌وسازی است که به‌عنوان محصولات ثانویه در ریشه‌ی گیاهان ساخته می‌شود. استفاده‌ی دارویی از ریشه‌ی گیاهان به زمان‌های باستان برمی‌گردد که برای درمان بیماری‌هایی نظیر مالاریا و ناراحتی‌های سیستم عصبی از آنها استفاده می‌شد. استفاده‌ی دارویی از گیاهان در کشورهایی نظیر ایران، چین، ژاپن، پرتغال و.... به‌صورت سنتی معمول بوده است و هنوز هم بین عامه‌ی مردم رواج دارد. طیف وسیعی از مواد دارویی، روغن‌ها، چاشنی‌های غذایی و غیره در ریشه‌ی گیاهان ساخته می‌شود. علاوه بر این، ممکن است ریشه‌ی گیاهان خواص زیست‌شیمیایی دیگری داشته باشند که هنوز شناخته نشده‌اند. در مقایسه با بخش‌های دیگر گیاه، توجه کمتری به ترکیبات ساخته‌شده در ریشه‌ی گیاهان می‌شود. یکی از دلایل این امر آن است که چون ریشه‌ها در زیر زمین هستند حتی زیست‌شناسان آن را اندام نگهدارنده‌ی گیاه می‌دانند که آب و مواد غذایی را به گیاه می‌رساند. دلیل دیگر آن کمبود سیستم‌های آزمایشی مناسب برای مطالعات فیزیولوژی و زیست‌شیمیایی این قسمت از گیاه است.[۱۸]

اولین گزارشی که نشان داد ریشه‌ها ممکن است به‌طور مشخص در ساخت محصولات ثانویه نقش داشته باشند، آزمایشی بود که به‌وسیله‌ی داوسن در سال ۱۹۴۲ انجام شد. وی با پیوند متقابل تنباکو و گوجه‌فرنگی نشان داد که ریشه‌ها محل اصلی تشکیل آلکالوئید نیکوتین در تنباکو هستند. در گوجه‌فرنگی پیوند داده شده با ریشه‌ی تنباکو، نیکوتین در برگ‌ها مشاهده شد در حالی که در پیوند تنباکو با ریشه‌ی گوجه فرنگی این عمل انجام نشد.[۱۹]

ب) تولید محصولات ثانویه از طریق کشت ریشه‌های منتقل شده

در اواسط دهه‌ی ۱۹۸۰ محققان بسیاری در آزمایشگاه‌های مختلف و به‌طور جداگانه ارزش استفاده از کشت ریشه‌های منتقل شده را برای تولید محصولات ثانویه تشخیص دادند. بزرگترین مزیت استفاده از این کشت‌ها، رشد سریع و قابلیت نگهداری آنها در محیط‌های بدون هورمون است. همچنین روش‌های مستقیم وارد کردن ژن‌های خارجی برای تأثیرگذاری در ظرفیت زیست‌ساختی کشت‌ها فراهم می‌شود.[۲۰]

گونه‌های مختلف باکتری گرم‌منفی آگروباکتریم[۱۲] ــ که به‌طور طبیعی در خاک یافت می‌شود ــ بخصوص آگروباکتریم تومفاسینس[۱۳] و آگروباکتریم ریزوژن[۱۴] قادر به انتقال ژنتیکی سلول‌های گیاهی‌اند. به‌دیگر سخن، این باکتری دارای نوعی سیستم طبیعی برای آزمایش‌های مهندسی ژنتیک در سلول‌های گیاهی است. عفونت‌زایی این باکتری ناشی از پلاسمید موجود در آن است. این پلاسمید در آگروباکتریم تومفاسینس «القاکننده‌ی تومور»، و در آگروباکتریم ریزوژن «القاکننده‌ی ریشه» است. در روی پلاسمید یک قسمت قابل انتقال به‌نام T-DNA وجود دارد که می‌تواند ازطریق فعال‌سازی ژن‌های *Vir*، به درون ژنوم گیاه منتقل شود. این ژن‌ها در قسمتی از پلاسمید قرار دارند که منتقل نمی‌شوند. بیماری «تاول تاجی»[۱۵] از طریق آگروباکتریم تومفاسینس، و بیماری «ریشه‌های مویی»[۱۶] از طریق آگروباکتریم رایزوژن ایجاد می‌شود. این

بیماری تعداد زیادی از گیاهان دولپه‌یی را تحت تأثیر قرار می‌دهد.[۲۱]

نقشی که کشت سلول‌های گیاهی در سنتز مواد شیمیایی دارد، ممکن است به‌وسیله‌ی کشت ریشه‌های مویی، که رشد خیلی سریعی دارند، دگرگون شود. این کشت‌ها همچنین می‌توانند نقش مهمی در درک سوخت‌وساز ثانویه داشته باشند. تاکنون، در بیش از صد گونه‌ی مختلف گیاهی ریشه‌های مویی ایجاد شده است.[۲۲]

کشت ریشه‌های مویی امکان توسعه‌ی روش‌های تجاری را برای تولید محصولات ثانویه فراهم می‌کند. اما این محصولات محدود به موادی هستند که در ریشه‌ی گیاه سنتز می‌شوند. این محدودیت را می‌توان با استفاده از «ریشه‌های سبز» اتوتروف (ریشه‌هایی که قادر به انجام عمل فتوسنتز هستند) برطرف کرد. این ریشه‌ها، که با قراردادن کشت‌ها در معرض نور زیاد به وجود می‌آیند، برای تولید فراورده‌های سوخت‌وسازی که کلروپلاست را سنتز می‌کنند مورد استفاده قرار می‌گیرند.[۹] ریشه‌های سبز از نظر کالبدشناسی شبیه به ریشه‌ی معمولی‌اند، کلروپلاست طبیعی دارند، و به نور وابسته‌اند. میزان کلروفیل و فعالیت ریبونوز دی‌فسفات کربوکسیلاز آنها همانند برگ‌هاست. بنابراین، کشت ریشه‌های مویی توانمندی زیست‌ساختی دارند که در ریشه‌های معمولی یافت نمی‌شود.

برای مشخص‌شدن آنزیم‌هایی که در سنتز فراورده‌های سوخت و سازی ثانویه دخالت دارند، کشت‌های منتقل شده از طریق آگروباکتریم ــ که رشد سریعی دارند ــ مناسب‌تر از کشت تعلیق‌های سلولی‌اند. وقتی این آنزیم‌ها مشخص شوند، ژن آنها می‌تواند به باکتری منتقل شود و تحت کنترل توالی‌های تنظیم‌کننده‌ی مناسب، بیان شوند. این عمل درخصوص آنزیم استریکتوسیدین سنتتاز که در سنتز ایندول آلکالوئیدها ــ مثل وینبلاستین و وینکریستین ــ نقش دارد، انجام شده است. این اولین آنزیم گیاهی است که کلون شده و در باکتری بیان شده است. موفقیت به دست آمده نشان می‌دهد که آنزیم‌های دیگری که در سوخت و ساز ثانویه‌ی گیاهی دخالت دارند، می‌توانند به همین ترتیب کلون و بیان شوند. به هر ترتیب، امکان سنتز تمام یا قسمتی از فراورده‌های سوخت‌وساز ثانویه در باکتری وجود دارد. از آنجاکه سلول‌های باکتریایی به‌راحتی می‌توانند در تخمیرگرها رشد کنند و محصولات ثانویه را بسازند، این روش در درازمدت ممکن است بهترین سیستم برای تولید فراورده‌های سوخت‌وسازی ثانویه در خارج از گیاه باشد.[۲۳]

نتیجه گیری

افزایش روزافزون استفاده از محصولات گیاهی در صنعت و تولید اندک این فراورده‌ها در گیاهان سبب شده تا استفاده از کشت سلول‌ها و بافت‌های گیاهی برای تولید مواد شیمیایی و دارویی مورد توجه قرار گیرد. طی چند سال گذشته، تلاش‌های بسیاری برای تجاری کردن کشت سلول‌های گیاهی صورت گرفته است. مثلاً روی تاکسول که یک داروی ضد سرطان است تحقیقات بسیاری انجام شده است که منجر به یافتن روش‌های مناسب کشت سلول‌های این گیاه شده است؛ به گونه‌یی که در حدود چهار سال پیش وجود مقادیر ناچیز تاکسول خیلی مهم تلقی می‌شد، اما اینک در گروه‌های صنعتی تولید مقادیر ۱۱۰ میلی‌گرم و ۱۵۳ میلی‌گرم این دارو گزارش شده است.[۲۴و۲۵]

درک مولکولی بهتر راه‌های عبور، انتقال و استخراج مواد در گیاهان در حال تکامل است. استفاده از متیل یاسمونات روشی است که می‌تواند موجب افزایش تولید محصول در کوتاه‌مدت شود. همچنین روش‌های مهندسی ژنتیک و کشت ریشه‌های مویی همراه با تنظیم راه‌های فراورده‌های سوخت و ساز ثانویه موجب خواهند شد که شرایط تولید به حداکثر، و زمان لازم برای یافتن شرایط بهینه به حداقل برسد.

پانوشت‌ها

1. biotransformation
2. biomass
3. vesiculus
4. detergent
5. morfology
6. shoot culture
7. embryo culture
8. root culture
9. aneuploidy
10. polyploidy
11. Cassava
12. agrobacterium
13. agrobacterium tumifaciens
14. agrobacterium rhizogenes
15. crown gall
16. hairy root

منابع

1. Balandrin, M.F., Klocke, J.A., Wurtele, E.S., and Bollinger, W.H., "Natural plant chemicals: sources of industrial and medicinal materials", *Science,* **228**, pp 1154-60 (1985).
2. Stanfford, A. and Warren, G., *Plant cell and Tissue Culture,* Chapter 6. Open University Press, West Sussex, England (1991).
3. Curtin, M.E., "Harvesting profitable products from plant tissue culture", *BIOTECHNOLOGY,* **1**, pp 649-657 (1983).
4. Butterworth-Heinemann Ltd., "Biotechnological innovations in crop improvements", *Biotechnology by Open Learning,* (1991).
5. Lebowitz, R.J., "Plant biotechnology", A Laboratory Manual, WCB Publishers (1995).

6. Hermann, E.B., "A unique opportunity for plant cell culture", *Agricell Report,* **16,** p 34 (1991).
7. Fujita, Y., Takahashi, S. and Yamada, Y. "Selection of cell lines with high productivity of shikonin derivatives through protoplast of Lithospermum erythrohizon", *Proceeding 3rd European Conference on Biotechnology,* **1,** pp 161-166 (1984).
8. Grierson, D., "Biosynthesis and manipulation of plant products", *Plant Biotechnology Series,* **3,** Chapman & Hall (1993).
9. Ho Nam Chang and Sang Jun Sim, "Extractive plant cell culture", *Current Opinion in Biotechnology,* **6,** pp 209-212 (1995).
10. Brodelius, p., and Pederson, H., "Increasing secondary metabolite production in plant-cell culture by redirecting transport", *TIBTECH,* **11,** pp 30-36 (1993).
11. Roberts, S.C. and Shuler, M.L., "Large scale plant cell culture", *Current Opinion in Biotechnology,* **8,** pp 154-159 (1997).
12. Schlatmann, J.E., Moreno, P.R.H., and et., "Effect of oxygen and nutrient limitation on ajmalicine production and related enzyme activities in high density cultures of Catharanthus roseus", *Biotechnol. Bioeng.,* **44,** pp 461-468 (1994).
13. Nuutila, A.M., Toivonen, L., and Kauppinen, V., "Bioreactor studies on hairy root cultures of Catharanthus roseus: Comparison of three bioreactor types", *Biotechnol. Tech.,* **8,** pp 61-66 (1994).
14. Dixon, R.A., *Plant Cell Culture, A Practical Approach,* Oxford University Press, Oxford (1985).
15. Mantell, S.H., Matthews, J.A., and McKee, R.A., *Principles of plant Biotechnology, An introduction to genetic engineering in plants,* Backwell Scientific Publications (1985).
16. Taticek, R.A., Lee, C.W. and Shuler, M.L., "Large scale insect and plant cell culture", *Current Opinion in Biotechnology,* **5,** pp 165-174 (1994).
17. Aird, E.L.H., Hamil, J.D. and Rhodes, M.J.C., "Cytogenetic analysis of hairy root cultures from a number of plant species transformed by Agrobacterium rhizogenes", *Plant Cell Tiss. Org. Cult.,* **15,** pp 47-57 (1988).
18. Flores, H.E., Hoy, M.W. and Pichard, J.J., "Secondary metabolites from root cultures", *TIBTECH,* **5,** pp 64-68 (1987).
19. Dawson, R.F., "Nicotine synthesis in excised tobacco roots", *Am. J. Bot.* **29,** pp 813-815 (1942).
20. Shanks, J.V., and Morgan, J., "Plant hairy root culture", *Curr. Opin. Biotechnol.,* **10(2),** pp 151-155 (1999).
21. Hamill, J.D., Parr, A.J., and et., "New routes to plant secondary products", *BIOTECHNOLOGY,* **5,** pp 800-804 (1987).
22. Canto-Canche, B., Loyola-Vargas, B., and Loyola-Vargas, V.M., "Chemicals from roots hairy roots, and their application", *Adv., Exp., Med., Biol.,* **464,** pp 235-275 (1999).
23. Bhojwani, S.S., Razdan, M.K., *Studies in Plant Science 5, Plant Tissue Culture: Theory and Practice,* a Revised Edition, Chapter 17, pp 537-563 (1996).
24. Ketchum, R.E.B., and Gibson, D.M., "Paclitaxel production in suspension cell cultures of Taxus", *Plant Cell, Tissue and Organ Culture,* **46,** pp 9-16 (1996).
25. Hirasuna, T.J., Pestchanker, L.J., and et., "Taxol production in suspension cultures of Taxus baccata", *Plant Cell, Tissue and Organ Culture,* **44,** pp 95-102 (1996).