Downloaded from hmj.hums.ac.ir at 0:09 +0330 on Friday December 15th 2017

تولید بتاکربولین آلکالوئیدها در کشت سوسپانسیون سلولی مخلوط دو گیاه اسپند و عطر سنگ

دکتر غلامرضا اصغری [۱] دکتر علیرضا قنادی [۱] دکتر سارا همتیان [۲]

[۱] دانشیار گروه فارماکوگنوزی، [۲] استاد گروه فارماکوگنوزی، [۳] داروساز عمومی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

مجله پزشکی هرمزگان سال دهم شماره دوم تابستان ۸۵ صفحات ۱۴۳-۱۳۷

چکیده

مقدمه: *گیاه اسپند با نام علمی .Peganum harmala L از خانواده Zygophylaceae و عطر سنگ با نام علمی .Varthemia persica DC از خانواده Compositae جهت مطالعات کشت همزمان انتخاب شدند. اسپند منبع غنی طبیعی از بتاکربولین آلکالوئیدها می‌باشد. بتاکربولین آلکالوئیدها دارای فعالیت نوروفارماکولوژیک متفاوتی شامل آنتاگونیست بنزودیازپین مهار جذب آمین می‌باشند. تولید این ترکیبات در کشت سلولی گیاهان می‌تواند تحت تأثیر عوامل مختلف افزایش یابد. هدف این مطالعه، بررسی تأثیر سلولهای گیاه عطرسنگ به عنوان محرک بر تولید بتاکربولین الکالوئیدها توسط گیاه اسپند می‌باشد.*

روش کار: *در این مطالعه تجربی، دانه‌های گیاه اسپند و گیاه عطر سنگ استریل و تحت شرایط آسپتیک جهت تهیه دانه رست به پتری‌دیش منتقل شد. موراشیک و اسکوک، حاوی ساکارز و تنظیم کننده‌های رشد تهیه شد و در زمان مناسب و کشت انجام شد. کشت مخلوط سوسپانسیون سلولی دو گیاه با نسبت های متفاوت ایجاد شد. سپس نمونه‌برداری از کشت سوسپانسیون سلولی مخلوط انجام گردید. از نمونه‌های تهیه شده عصاره متانولی تهیه گردید و آلکالوئیدهای هارمین، هارمالول و هارمول به روش کروماتوکرافی لایه نازک جداسازی و شناسایی شدند. میزان تولید آلکالوئیدها با روش اسپکتروفتومتری به طور جداگانه اندازه‌گیری شد.*

نتایج: *در تمام نمونه ها آلکالوئیدهای هارمین، هارمال ول و هارمول تولید شده بود. میزان تولید هر یک از آلکالوئیدها در فاز پایانی سیکل رشد به حداکثر رسید. مخلوط نسبت ۱:۱ سوسپانسیون سلولی گیاه اسپند و گیاه عطر سنگ باعث تولید بیشتر آلکالوئیدها در مقایسه با سوسپانسیون سلولی اسپند شده است.*

نتیجه‌گیری: *به نظر می‌رسد حضور سلولهای گیاه عطر سنگ در تولید بتاکربولین آلکالوئیدها در کشت سوسپانسیون سلولی گیاه اسپند مؤثر باشد. همچنین میزان تولید بتاکربولین آلکالوئیدها در کشت سوسپانسیون سلولی مخلوط دو گیاه اسپند و عطر سنگ متناسب با سیکل رشد افزایش می یابد.*

کلیدواژه‌ها: *آلکالوئیدها - سوسپانسیون سلولی - اسپند - عطرسنگ*

نویسنده مسئول:
دکتر غلامرضا اصغری
دانشکده داروسازی و علوم دارویی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان
اصفهان - ایران
تلفن: ۷۹۲۲۶۴۴ ۳۱۱ ۹۸+
پست الکترونیکی:
asghari@pharm.mui.ac.ir

دریافت مقاله: ۸۴/۵/۲۳ اصلاح نهایی: ۸۴/۱۰/۳ پذیرش مقاله: ۸۵/۴/۱۴

مقدمه:

گیاه اسپند با نام علمی .Peganum harmala L از خانواده Zygophylaceae می‌باشد. مهمترین ترکیبات شیمیایی اسپند، آلکالوئیدها است. در ریشه و دانه اسپند و در سلولهای کشت شده گیاه، آلکالوئیدهای هارمین، هارمالول و هارمول وجود دارد (۱،۲). اسپند منبع غنی طبیعی از بتاکربولین آلکالوئیدها می‌باشد. تولید این آلکالوئیدها در کالوس و سوسپانسیون گیاه مطالعه شده است. کشت سلولی این گیاه توانمندی خوبی در تبدیلات بیوشیمیایی از خود نشان داده است (۳). کشت سلولی

Downloaded from hmj.hums.ac.ir at 0:09 +0330 on Friday December 15th 2017

گیاه اسپند بعنوان یک مدل مناسب برای مطالعات تولید متابولیتها در کشت سلولی شناخته شده است (٤). بتاکربولین آلکالوئیدها هارمن دارای فعالیت گشادکنندگی عروق می‌باشند (٥). اثرات ضدمیکروبی و سلول کشی بتاکربولین آلکالوئیدها گیاه اسپند بر روی دودمانهای سلولهای سرطانی گزارش شده است (٦،٧).

گیاه عطر سنگ (Varthemia persica DC) گیاهی معطر از خانواده کاسنی (Compositae) است که تنها گونه موجود در ایران و انحصاری فلات ایران می‌باشد (٨).

ترکیبات مونوترپنی و سزکویی ترپنی در اسانس گیاه عطر سنگ شناسایی و گزارش شده است (٩). اثرات فارماکولوژیکی گونه‌ای از گیاه عطر سنگ بررسی شده است. این اثرات شامل فعالیت ضدباکتریایی، ضدقارچی، ضدتجمع پلاکتی و ضددیابتی می‌باشند (١٣-١٠).

گیاهان در طبیعت متابولیتهای ثانویه را به عنوان مکانیسم‌های دفاعی تولید می‌کنند. امکان تولید متابولیتهای ثانویه در سلولهای گیاهی کشت داده شده در شیشه نیز وجود دارد و شرایط کشت مانند مواد غذایی، سطح هورمونها، نور، دما، PH، گازهای محیط با میکروبها و یا سلولهای گیاهی دیگر بر بیوسنتز متابولیتهای ثانویه اثر می‌گذارند (١٤).

کشت همزمان میکروب و گیاه می‌تواند سنتز مواد شیمیایی در سلولهای گیاهی کشت داده شده را موجب شود. به نظر می‌رسد که افزایش سنتز محصولات ثانویه در پاسخ به انواع مختلفی از تحریک‌ها، یک پاسخ عمومی در سلولهای کشت داده شده باشد (١٥).

گزارشاتی محدود در خصوص تحریک توسط سلولهای گیاهی در کشت سلولی مخلوط دو گیاه نیز منتشر شده است که در یکی از آنها سلولهای گیاه Atropa belladonna و Duboisia hybrid که متعلق به یک خانواده هستند و در دیگری سلولهای کشت شده گیاه Ammi majus L. و Rutas graveolens L. که متعلق به دو خانواده جداگانه می‌باشند، مورد بررسی قرار گرفته است (١٦،١٧).

به لحاظ اهمیت حضور بتاکربولین آلکالوئیدها در گیاه اسپند، در این تحقیق، تأثیر سلولهای گیاه عطر سنگ بعنوان محرک بر تولید بتاکربولین آلکالوئیدها سلولهای کشت شده گیاه اسپند (هارمین، هارمول و هارمالول) بررسی می‌شود.

روش کار:

١- ایجاد کشت و سوسپانسیون سلولی:

الف – تهیه دانه رست:

بذرهای گیاه اسپند (Peganum harmala) از شرکت کندلوس تهیه گردید. بذرهای گیاه عطر سنگ (Varthemia persica DC) از دامنه‌های شمالی کوههای کرکس در ارتفاع m ٢٤٠٠ – ٢٢٠٠ در استان اصفهان جمع‌آوری گردید. گیاه بوسیله کارشناش گیاه‌شناسی شناسایی شده است و یک نمونه از آن در هر باریم دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان با شماره ١٣٧٨ نگهداری می‌شود. به منظور ایجاد دانه رست ابتدا سطح دانه‌ها توسط محلول آب اکسیژنه ٣٠ درصد وزن در حجم (W/V) که حاوی یک درصد حجم در حجم (V/V) توین ٨٠ بوده به مدت ٥ دقیقه شستشو داده شد. سپس دانه ها را با آب مقطر استریل شستشو داده و به ظروف پتری دیش شیشه ای که کف آنها با دو لایه کاغذ صافی پوشانیده شده و حاوی ٢٠ میلی لیتر آب مقطر در محیط آسپتیک انتقال داده شد. ظروف مذکور و محتوای آن قبلاً استریل شده بود. سپس ظروف پتری دیش در تاریکی و در دمای ٢±٢٧ درجه سانتیگراد و رژیم نوری ١٦ ساعت روشنایی و ٨ ساعت تاریکی به منظور تشکیل کالوس نگهداری شدند (١٨).

ب – تهیه محیط کشت جامد و مایع:

مقادیر مشخصی از پودر محیط کشت پایه موراشیک و اسکوگ به آب مقطر اضافه و توسط همزن مغناطیسی گرمازا تا حل شدن کامل بهم زده شد. سپس سوکروز به میزان ٣٠ گرم در لیتر و اسیداسکوربیک به میزان ٥ میلی گرم در لیتر به محلول اضافه شد. به منظور تهیه کشت

Downloaded from hmj.hums.ac.ir at 0:09 +0330 on Friday December 15th 2017

جامد، آگار به میزان ۱۲ گرم در لیتر به آهستگی اضافه و عمل همزن و گرم کردن محلول ادامه یافت تا رنگ محلول شفاف شد. سپس تنظیم کنندگان رشد ۲ و ٤- دی کلروفنوکسی استیک اسید و کینتین به میزان لازم اضافه شد و pH محلول با اضافه کردن محلول سود و یا اسیدکلروسدری یک نرمال تنظیم شد. در نهایت محیط کشت حاصل را با اضافه کردن آب مقطر به حجم رسانیده و میزان ۵۰ میلی‌لیتر آن در ارلن مایرهای ۲۵۰ میلی‌لیتری توزیع گردید. درب ارلن مایرها با ورقه نازک آلومینیومی بسته شد و در دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد و به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو شدند. سپس محیط کشت ها خنک شده و در دمای آزمایشگاه جهت ایجاد کالوس و با واکشت آن (محیط کشت جامد حاوی آگار) و یا ایجاد سوسپانسیون و یا واکشت آن (محیط کشت مایع بدون آگار) نگهداری شدند (۱۹).

ج – تهیه و نگهداری کالوس و سوسپانسیون سلولی:

کالوسها از دانه رست ها تهیه و با انجام واکشت نگهداری شدند. واکشت هر ٤ هفته یکبار با توجه به رشد کالوس انجام گرفت. جهت انجام واکشت، کالوسهای شاداب در محیط سترون به قطعات یک سانتیمتر مکعبی تقسیم و به محیط کشت جدید منتقل شدند.

سوسپانسیون سلولی با انتقال قطعه‌ای از کالوس شاداب به حجم ٤-۳ سانتیمتر مکعب به ارلن مایر حاوی محیط کشت مایع تهیه شد. کالوس منتقل شده و توسط بهم زن مغناطیسی که قبل از استریل شدن محیط کشت مایع در آن قرار داده شده بود، به سلولهای منفرد و یا مجتمع سلولها تبدیل شد. عمل بهم زدن تا ایجاد سوسپانسیون یکنواخت در محیط کشت ادامه یافت. سپس ارلن مایرها بر روی بهم زن دوار با سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه قرار داده شد. کشت سوسپانسیون سلولی با واکشت آن هر ٤ هفته یکبار نگهداری شد. جهت انجام واکشت سوسپانسیون با محیط کشت مایع تازه به نسب ۱ به ۲ رقیق گردید. هر دو کشت کالوس و کشت سوسپانسیون سلولی در دمای ۲±۲۷ درجه سانتیگراد و در رژیم نوری ١٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. منبع نور لامپ فلورسنت بود (۲۰).

۲- مخلوط نمودن کشت های سوسپانسیون سلولی:

مخلوط نمودن کشت های سوسپانسیون سلولی اسپند و عطرسنگ بعد از اولین واکشت، در ٤ هفته متوالی از سیکل رشد انجام شد. هر هفته از سوسپانسیون سلولی های اسپند و عطرسنگ به ترتیب نسبتهای ۳:۱، ۱:۳ برداشته و با هم مخلوط شدند (۱۵،۱٦). سپس همه کشت ها در اتاق کشت با دمای ۲±۲۵ درجه سانتیگراد روی تکان دهنده دورانی در شرایط نوری ١٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار داده شد.

۳- استخراج آلکالوئیدها:

هر هفته سلولهای سوسپانسیون سلولی اسپند (بعنوان شاهد) و کشت‌های مخلوط با نسبت ۳:۱، ۱:۱ و ۱:۳ به وسیله قیف بوخنر از محیط کشت جدا گردید و در هوای آزاد به مدت ٢٤ ساعت خشک گردید. سپس سلولهای خشک شده هر کدام را در یک هاون چینی پودر کرده، پودرهای حاصل با ترازوی آنالیتیکال وزن شد. مقدار ۱۰ میلی لیتر متانول به هر کدام اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه توسط دسته هاون به هم زده شدند و عصاره با قیفی که درون آن پنبه و مواد آبگیر قرار داشت، صاف گردید. حجم عصاره های صاف شده، یادداشت شده و بعد بوسیله دستگاه تقطیر در خلاء تغلیظ و به حجم یک میلی لیتر رسیدند (۲۱).

٤- شناسایی و تعیین کمی آلکالوئیدها:

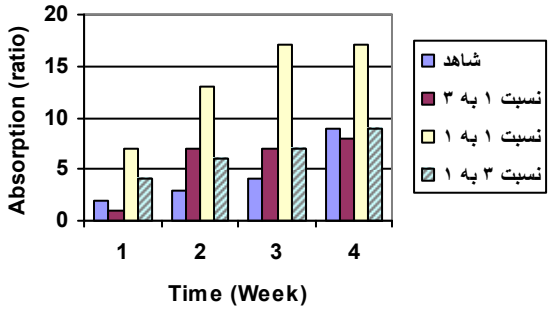
لکه های حاصل از آنالیز کروماتوکرافی لایه نازک (TLC) توسط نور ماوراء بنفش و با مقایسه Rf شناسایی شدند. سیلیکاژل CF_{254} ٦۰ به عنوان فاز ثابت و اتیل استات، ایزوپروپیل الکل، آمونیاک (۵:۱۵:۸۵) بعنوان فاز متحرک انتخاب شد (۲۲). لکه‌ها هر کدام جداگانه بطور دقیق و کامل توسط اسپانول از سطح پلیت تراشیده شد و به درون لوله آزمایش کاملاً خشک انتقال داده شد و سپس ۱۰ میلی لیتر متانول درون لوله آزمایش ریخته و به وسیله شکر به خوبی مخلوط شد.

Downloaded from hmj.hums.ac.ir at 0:09 +0330 on Friday December 15th 2017

محلول حاصل سانتریفوژ و سپس صاف و به حجم ۵۰ میلی لیتر رسید. اسکن جذب انجام و طول موج ماکزیمم هر یک از آلکالوئیدها بدست آمد. سپس میزان جذب نمونه های حاصل از لکه های در طول موج ماکزیمم مربوطه تعیین گردید.

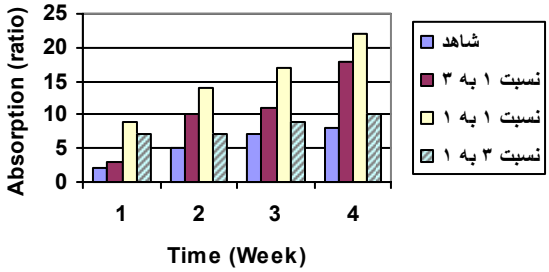
نتایج:

در نمودار شماره ۱ ارتباط تولید هارمین با سیکل رشد در نسبت های مختلف کشت سوسپانسیون سلول مخلوط عطر سنگ و اسپند در مقایسه با سوسپانسیون سلولی اسپند بعنوان شاهد نشان داده شده است.



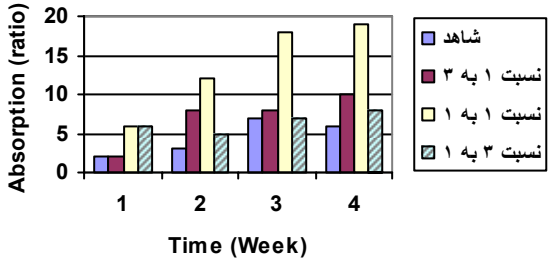
نمودار شماره ۱- ارتباط تولید هارمین با سیکل رشد در نسبت های مختلف کشت سوسپانسیون سلول مخلوط عطرسنگ و اسپند در مقایسه با سوسپانسیون سلولی اسپند بعنوان شاهد

در نمودار شماره ۲ ارتباط تولید هارمالول با سیکل رشد در نسبت های مختلف کشت سوسپانسیون سلول مخلوط عطرسنگ و اسپند در مقایسه با سوسپانسیون سلولی اسپند بعنوان شاهد نشان داده شده است.



نمودار شماره ۲- ارتباط تولید هارمول با سیکل رشد در نسبت های مختلف کشت سوسپانسیون سلول مخلوط عطرسنگ و اسپند در مقایسه با سوسپانسیون سلولی اسپند بعنوان شاهد

در نمودار شماره ۳ ارتباط تولید هارمول با سیکل رشد در نسبت های مختلف کشت سوسپانسیون سلول مخلوط عطرسنگ و اسپند در مقایسه با سوسپانسیون سلولی اسپند بعنوان شاهد نشان داده شده است.



نمودار شماره ۳- ارتباط تولید هارمول با سیکل رشد در نسبت های مختلف کشت سوسپانسیون سلول مخلوط عطرسنگ و اسپند در مقایسه با سوسپانسیون سلولی اسپند بعنوان شاهد

همینطور که در نمودارها مشاهده می‌شود، تولید هر سه الکالوئید در نسبت ۱:۱ کشت مخلوط (عطرسنگ و اسپند) در مقایسه با نسبت های دیگر بیشتر است.

بحث و نتیجه‌گیری:

در عصاره متانولی سوسپانسیون سلولی اسپند، آلکالوئیدهای هارمین، هارمالول و هارمول شناسایی گردیدند. این سه ترکیب تقریباً در همه کشت های سوسپانسیونی اسپند تنها و مخلوط با عطرسنگ نیز شناسایی شدند. طبق نتایج بدست آمده، میزان تام تولید بتاکربولین آلکالوئیدها در اثر افزایش زمان (در ٤ هفته متوالی)، افزایش داشت.

همینطور که در نمودار شماره ۱ مشاهده می‌شود، میزان تولید هارمین در هفته‌های دوم، سوم و چهارم در نسبت های ۳:۱ کشت مخلوط (عطرسنگ به اسپند) و ۱:۳ تقریباً به یک اندازه بود. میزان تولید هارمین در نسبت ۱:۱ کشت مخلوط (عطرسنگ به اسپند) بیشتر از سایر نسبت ها می‌باشد.

میزان تولید هارمین در سوسپانسیون سلولی اسپند که بعنوان شاهد می‌باشد، همزمان با سیکل رشد افزایش می‌یابد. در نسبت ۳:۱ کشت مخلوط در هفته اول سیکل رشد افزایش تولید هارمین قابل مشاهده است در حالی

Downloaded from hmj.hums.ac.ir at 0:09 +0330 on Friday December 15th 2017

که در هفته دوم و سوم غلظت آن ثابت می‌باشد. در نسبت ۱:۱ کشت مخلوط در روزهای هفتم تا چهاردهم و چهاردهم تا بیست و یکم، تولید هارمین افزایش داشته است و این در حالی است که در نسبت کشت مخلوط ۱:۳ سیکل رشد تأثیر کمتری بر میزان تولید هارمین داشته است. ارتباط تولید هارمالول با سیکل رشد در نسبت های مختلف دو کشت سوسپانسیون سلولی در نمودار شماره ۲ نشان داده شده است. تولید هارمالول در نسبت ۱:۱ کشت مخلوط (عطرسنگ و اسپند) در هفته های دوم و سوم افزایش ولی در هفته چهارم کاهش داشته است.

تولید هارمالول در کشت مخلوط در نسبت ۳:۱ کشت مخلوط (عطرسنگ به اسپند) در روزهای هفتم تا چهاردهم و چهاردهم تا بیست و یکم افزایش داشته است. به نظر می‌رسد در نسبت ۱:۳، کشت مخلوط (عطرسنگ به اسپند) سیکل رشد تأثیر چندانی در میزان تولید هارمالول نداشته است.

همینطور که در نمودار شماره ۳ مشاهده می‌شود، میزان تولید نیز همانند هارمین در سوسپانسیون سلولی اسپند که بعنوان شاهد می‌باشد، همزمان با سیکل رشد افزایش می‌یابد. تولید هارمول در نسبت ۳:۱ کشت مخلوط (عطرسنگ به اسپند) نیز همین افزایش را با شدت کمتر نشان می‌دهد.

محققین دو گیاه Ammi majus L. (Apiacea) و Ruta graveolens L. (Rutaceae) انتخاب کرده و نسبت های مختلف از سوسپانسیون سلولی از هر دو گیاه را با هم مخلوط کردند. در میزان تولید فورانوکومارین‌ها در آنها در مقایسه با کشت تنها، تغییراتی مشاهده شده است (۱۷). نسبت‌های خاص مخلوط دو گیاه باعث افزایش تولید فورانوکومارین‌ها شده است. مکانیسم‌هایی مانند عملکرد آنزیم‌های مهارکننده ممکن است در این تأثیرگذاری مداخله داشته باشند. محرکهای زیستی با از بین بردن این سدهای مهارکننده و یا دستکاری مسیر آنزیم‌ها، ممکن است آنزیم‌های مؤثر در متابولیسم ثانویه را چند برابر نماید. از آنجایی که این دستکاریها معمولاً به صورت تجربی صورت می‌گیرند، بنابراین اثرات ناشی از آنها اغلب غیر قابل پیش‌بینی می‌باشد (۲۳).

محرکهای زیستی شامل پلیمرهای گلوکان، گلیکوپروتئین‌ها، اسیدهای مولکولی کم وزن و مواد دیواره سلولی است که از سلولهای کشتهای مخلوط آزاد می‌شوند. غلظت هارمول تولید شده در نمونه‌ها از هارمین و هارمالول بیشتر بود. احتمالاً به علت ساختار مشابه هارمول و هارمالول (تفاوت در یک باند دوگانه در حلقه)، ممکن است هارمالول به هارمول تبدیل شده باشند.

در مطالعه دیگری محققین دو گیاه از یک خانواده Solanaceae را انتخاب کردند. آنها کشت های تهیه شده از ریشه‌های موئینه Altropa belladonna و جوانه‌های Duboisia hyprid را با نسبت های مختلف با هم مخلوط کرده و میزان تولید تروپان آلکالوئیدها اسکوپولامین و هیوسیامین بررسی کردند که کشت مخلوط منجر به تولید میزان متفاوتی از تروپان آلکالوئیدها در مقایسه با کشت تنها شد (۱٦).

به طور کلی می‌توان نتیجه گرفت که کشت همزمان دو گیاه اسپند و عطرسنگ باعث افزایش تولید آلکالوئیدها شده است و بهترین میزان برای کشت همزمان گیاه اسپند و گیاه عطرسنگ نسبت ۱ به ۱ می‌باشد و بهترین زمان ایجاد کشت مخلوط در طول سیکل رشد بستگی به نوع آلکالوئید هدف دارد که در مورد هارمین، هارمول و هارمالول با یکدیگر متفاوت می‌باشد. این تفاوت ممکن است به دلیل پیشتاز بودن تولید یک ترکیب برای ترکیب دیگر در مسیر بیوسنتز آن باشد.

سپاسگزاری:

از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان که هزینه‌های این طرح با شماره ۸۲۲۹۰ را تأمین نموده است، تشکر و قدردانی می‌شود.

Downloaded from hmj.hums.ac.ir at 0:09 +0330 on Friday December 15th 2017

References منابع

1. Ayoub MT, Rashan LJ. Isoharmine-β-carbolin alkaloid from peganum harmala seeds. *Phytochemistry*. 1991;303:1046-1047.
2. Sasse F, Heckenberg U, Berlin J. Accumulation of β-carbolin alkaloids and serotonin by cell cultures of peganum harmala L. *Plant Physiol*. 1982;69(2):400-404.
3. Zhu W, Asghari G, Lockwood GB. Factors affecting volatile terpene and non-terpene biotransformation products in plant cell cultures. *Fitoterapia*. 2000;715:501-506.
4. Berlinn J, Rugenhangen C, Kuzovkin IN, Fecker LF, Sasse F. Are tissue cultures of peganum harmala a useful model system for studying how to manipulate the formation of secondry metabolites? *Plant Cell Tissue Culture*. 1994;38:289-297.
5. Shi CC, Chen SY, Wang GJ, Liao JF, Chen CF. Jyh-Fei L, Chieh F. Vasorelaxant effect of Harman. *Eur J Pharmacol*. 2000;390(3):319-325.
6. Parshanthu D. John S. Antibacterial activity of peganum harmala. *Fitoterapia*. 1999;70:437-438.
7. Lamchouri F, Sattaf A, Cherrah Y, Hassar M, Zemzami M, Atif N, et al. In vitro cell-toxicity of peganum harmala alkaloids on cancerous cell-lines. *Fitoterapia*. 2000;71(1):50-54.
8. Ghahraman A. Floor of Iran, Tehran, University of Tehran, 2000.
9. Ghasemi N, Asghari G, Shams Ardakani A, Siahpoush A: Charcterization of volatile constituents from aerial parts of varthemia persica DC (Var. persica); *Iranian Journal of Pharmaceutical Research.* 2003;241-243.
10. Al-Dabbas MM, Hashinaga F, Abdelgaleil SA, Suganuma T, Akiyama K, Hayashib H. Antibacterial activity of an edudesmane sesquiterpene isolated from common varthemia, Varthemia iphionoides. *J Ethnopharmacol*. 2005;97(2):237-240.
11. Afifi FU, Al-khalil S. Abdul-Haq BK. Antifungal flavonoids from varthemia iphionoides. *Phytother Res*. 1991;5:173-175.
12. Afifi FU, Saket M, Jaghabir M, Al-Eisowi D. Effect of varthemia iphionoides on blood glucose level of normal rats with steptozocin-induced diabetes mellitus. *Curr Ther Research*. 1997;2:888-892.
13. Afifi F, Aburjai T. Antiplatelet activity of varthemia iphionoides. *Fitoterapia*. 2004;75:629-633.
14. Thengane SR, Kulkarni DK, Shrikhande VA, Joshi P, Snoawance KB, Krishnamurthy KV. Influence of medium composition on callus induction and camptothecin(S) accumulation in nothapodytes foetida. *Plant Cell Tissue And Organ Cult*. 2003;72:247-251.
15. Dicosmo F, Misawa M. Eliciting secondary metabolism in plant cell culture. *Trends Biotechnol*. 1985;12:318-321.
16. Matylda SG, Krolicka M, Kozyra K, Glownick F, Bourgoud E. Establishment of a co-culture of ammi majus and ruta graveolance for the synthesis of furanocoumarines. *Plant Sciences*. 2003;165:1315-1316.
17. Subroto MA, Kwok KH, Hamill JD, Doran PM. Co-culture of genetically transformed roots and shoots for synthesis, translocation, and biotransformation of secondary metabolites. *Biotechnol Bioeng*. 1996;49:481-499.
18. Asghari G, Mahmidi S. The effect of culture system on benzaldehyde production by cultured cells of silybum marianum (L). *Iranian Journal Of Pharmaceutical Sciences*. 2005;1:91-95.
19. Asghari G, Saidfar G, Mahmudi S. Biotransformation of aromatic aldehydes by cell cultures of peganum harmala and silybum mariamum. *Iranian Journal of pharmaceutical Researches*. 2005;3:127-130.
20. Lockwood GB, Asghari G, Hakimi B. Production of essential oil constituents by cultured cells of corum copticum L. *Flavour Fragr Journal*. 2002;17:465-458.

21. Bajaj YPS. Biotechnology in agriculture and forestry, medicinal and aromatic plants. New York: Springer-Verlage; 1988.

22. Wagner H, Bladt S. Plant Drug Analysis: A thin layer chromatography Atlas. 2nd ed. Berlin: Springer-Verlage; 1995.

23. Shams Ardakani M, Hemmati SH, Mohagheghzadeh A. Effect of elicitors on the enhancement of podophylotoxin biosynthesis in suspension cultures of Linum album. *Daru*. 2005;13:56-60.

Downloaded from hmj.hums.ac.ir at 0:09 +0330 on Friday December 15th 2017