

Production of β -carboline alkaloids on co-culture of *peganum harmala L.* and *varthemia persica DC*

Gh.R. Asghari, PhD¹ A. Ghanadi, PhD² S. Hemmatian, Pharm D³

Associate Professor Department of Pharmacology¹, Full Professor Department of Pharmacology², Pharmacist³, Isfahan University of Medical Sciences

ABSTRACT

Introduction: *peganum harmala L.* (Zygophyllaceae) and *varthemia persica DC* (Compositae) were used for co-culture studies. *P.harmala* was found to be one of the richest natural sources of β -carboline alkaloids. β -carboline alkaloids possess different neuropharmacologic activities including BDZ antagonism, MAO-inhibitor and aminoreuptake inhibitor.

The production of β -carboline alkaloids in cell suspension culture of these two plants may be increased by various factors including co-culture.

Methods: In this experimental study, *P.harmala* seeds surface were sterilized and transferred under aseptic condition to the Petri dishes to produce seedlings. Callus cultures were established from seedling and cell suspension cultures were obtained from callus. The cultures were established in Murashige and Skoog media supplemented with sucrose and growth regulators.

Co-culture of two plants was established by using different ratio of each culture. Methanol extract of cultured cells was prepared. The harmin, harmalol and harmol were extracted and identified by TLC. The quantity of alkaloids was determined using U.V spectrophotometer.

Results: Harmin, harmalol and harmol were produced in all samples. The highest concentration of alkaloids was found in the termination phase of growth cycle. The co-culture of *P.harmala* and *V.persica* cell suspension at the ratio of 1:1 produced more alkaloids comparing to *P.harmala* cell suspension.

Conclusion: *V. Persica* cell suspension seems to influence β -carboline alkaloid production in *P.harmala* cultures. Total β -carboline alkaloid production increase parallel to growth cycle.

Key words: Alkaloids - Cell Suspension - *Peganum Harmala* - *Varthemia Persica* - Co-Culture

Correspondence:
Gh.R. Asghari, PhD.
Department of
Pharmacology School
of Pharmacy Isfahan
University Of Medical
Sciences
Isfahan, Iran
Tel: +98 311 7922644
Email:
asghari@pharm.mui.ac.ir

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 فارماکوتوزی، ^۲ استاد گروه فارماکوتوزی، ^۳ داروساز عمومی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

مجله پزشکی هرمزگان سال دهم شماره دوم تابستان ۸۵ صفحات ۱۵۰-۱۴۳

چکیده

مقدمه: گیاه اسپند با نام علمی *Peganum harmala L.* از خانواده *Zygophyllaceae* 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 می باشد. بتاکربولین آلکالوئیدها دارای فعالیت نوروفارماکولوژیک متفاوتی شامل آنتاگونیست بنزودیازپین مهار جذب آمین می باشند. تولید این ترکیبات در کشت سلولی گیاهان می تواند تحت تأثیر عوامل مختلف افزایش یابد. هدف این مطالعه، بررسی تأثیر سلولهای گیاه عطر سنگ به عنوان محرک بر تولید بتاکربولین آلکالوئیدها توسط گیاه اسپند می باشد.

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

نتایج: در تمام نمونه ها آلکالوئیدهای هارمین، هارمالول 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.

نتیجه گیری: به نظر می رسد 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.

کلیدواژه ها: آلکالوئیدها - سوسپانسیون سلولی - اسپند - عطر سنگ

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

دریافت مقاله: ۸۴/۵/۲۳ اصلاح نهایی: ۸۴/۱۰/۳۰ پذیرش مقاله: ۸۵/۴/۱۴

مقدمه:

گیاه اسپند بعنوان یک مدل مناسب برای مطالعات تولید متابولیتها در کشت سلولی شناخته شده است (۴). بتاکربولین آلکالوئیدها هارمن دارای فعالیت گشادکنندگی عروق می باشند (۵). اثرات ضد میکروبی و سلول کشی بتاکربولین آلکالوئیدها گیاه اسپند بر روی دودمانهای سلولهای سرطانی گزارش شده است (۶،۷).

گیاه عطر سنگ (*Varthemia persica DC.*) گیاهی معطر از خانواده کاسنی (*Compositae*) است که تنها گونه موجود در ایران و انحصاری فلات ایران می باشد (۸).

گیاه اسپند با نام علمی *Peganum harmala L.* از خانواده *Zygophyllaceae* می باشد. 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 می باشد. 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

کوههای کرکس در ارتفاع ۲۴۰۰ - ۲۲۰۰ m در استان اصفهان جمع‌آوری گردید. گیاه بوسیله کارشناس گیاه‌شناسی شناسایی شده است و یک نمونه از آن در هر باریم دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان با شماره ۱۳۷۸ نگهداری می‌شود. به منظور ایجاد دانه رست ابتدا سطح دانه‌ها توسط محلول آب اکسیژنه ۳۰ درصد وزن در حجم (W/V) که حاوی یک درصد حجم در حجم (V/V) توپین ۸۰ بوده به مدت ۵ دقیقه شستشو داده شد. سپس دانه‌ها را با آب مقطر استریل شستشو داده و به ظروف پتری دیش شیشه‌ای که کف آنها با دو لایه کاغذ صافی پوشانیده شده و حاوی ۲۰ 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 ۲۷±۲ درجه سانتیگراد و رژیم نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی به منظور تشکیل کالوس نگهداری شدند (۱۸).

ب - تهیه محیط کشت جامد و مایع:

مقادیر مشخصی از پودر محیط کشت پایه موراشیک و اسکوک به آب مقطر اضافه و توسط همزن مغناطیسی گرم‌زا تا حل شدن کامل بهم زده شد. سپس سوکروز به میزان ۳۰ گرم در لیتر و اسیداسکوربیک به میزان ۵ میلی گرم در لیتر به محلول اضافه شد. به منظور تهیه کشت 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 تنظیم‌کنندگان رشد ۲ و ۴-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 کشت‌ها 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).

ترکیبات مونوترپنی و سزکویی ترپنی در اسانس گیاه عطر سنگ شناسایی و گزارش شده است (۹). اثرات فارماکولوژیکی گونه‌ای از گیاه عطر سنگ بررسی شده است. این اثرات شامل فعالیت ضدباکتریایی، ضدقارچی، ضدتجمع پلاکتی و ضددیابتی می‌باشند (۱۰-۱۳).

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 میکروبیها و یا سلول‌های گیاهی دیگر بر بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه اثر می‌گذارند (۱۴).

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 (۱۵).

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 *Rutas graveolens L.* و *Ammi majus L.* که متعلق به دو خانواده جداگانه می‌باشند، مورد بررسی قرار گرفته است (۱۶،۱۷).

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:

۱- 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

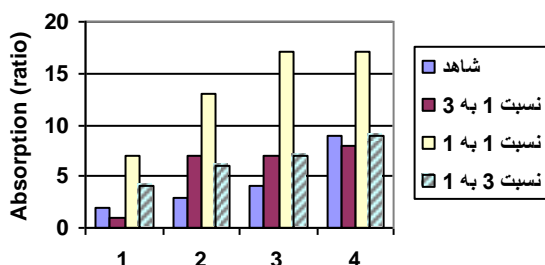
کرده، پودرهای حاصل با ترازوی آنالیتیکال وزن شد. مقدار ۱۰ میلی لیتر متانول به هر کدام اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه توسط دسته هاون به هم زده شدند و عصاره با قیفی که درون آن پنبه و مواد آبرگیر قرار داشت، صاف گردید. حجم عصاره های صاف شده، یادداشت شده و بعد بوسیله دستگاه تقطیر در خلاء تغلیظ و به حجم یک میلی لیتر رسیدند (۲۱).

۴- شناسایی و تعیین کمی آلکالوئیدها:

لکه های حاصل از آنالیز کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) توسط نور ماوراء بنفش و با مقایسه R_f شناسایی شدند. سیلیکاژل CF_{254} ۶۰ به عنوان فاز ثابت و اتیل استات، ایزوپروپیل الکل، آمونیاک (۵:۱۵:۸۵) بعنوان فاز متحرک انتخاب شد (۲۲). لکه ها 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. محلول حاصل سانتریفوژ و سپس صاف و به حجم ۵۰ میلی لیتر رسید. اسکن جذب انجام و طول موج ماکزیم هر یک از آلکالوئیدها بدست آمد. سپس میزان جذب نمونه های حاصل از لکه های در طول موج ماکزیم 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

ج- تهیه و نگهداری کالوس و سوسپانسیون سلولی: کالوسها از دانه رست ها تهیه و با انجام واکنش نگهداری شدند. واکنش هر ۴ هفته یکبار با توجه به رشد کالوس انجام گرفت. جهت انجام واکنش، کالوسهای شاداب در محیط سترون به قطعات یک سانتیمتر مکعبی تقسیم و به محیط کشت جدید منتقل شدند.

سوسپانسیون سلولی با انتقال قطعه ای از کالوس شاداب به حجم ۳-۴ 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 واکنش آن هر ۴ هفته یکبار نگهداری شد. جهت انجام واکنش سوسپانسیون با محیط کشت مایع تازه به نسبت ۱ به ۲ رقیق گردید. هر دو کشت کالوس و کشت سوسپانسیون سلولی در دمای 27 ± 2 درجه سانتیگراد و در رژیم نوری ۱۶ 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 واکنش، در ۴ هفته متوالی از سیکل رشد انجام شد. هر هفته از سوسپانسیون سلولی های اسپند و عطرسنگ به ترتیب نسبتهای ۱:۳، ۳:۱ برداشته و با هم مخلوط شدند (۱۵، ۱۶). سپس همه کشت ها در اتاق کشت با دمای 25 ± 2 درجه سانتیگراد روی تکان دهنده دورانی در شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار داده شد.

۳- استخراج آلکالوئیدها:

هر هفته سلولهای سوسپانسیون سلولی اسپند (بعنوان شاهد) و کشت های مخلوط با نسبت ۱:۳، ۳:۱ و ۱:۳ به وسیله قیف بوخزر از محیط کشت جدا گردید و در هوای آزاد به مدت ۲۴ ساعت خشک گردید. سپس سلولهای خشک شده هر کدام را در یک هاون چینی پودر

اسپند تنها و مخلوط با عطرسنگ نیز شناسایی شدند. طبق نتایج بدست آمده، میزان تام تولید بتاکربولین آلکالوئیدها در اثر افزایش زمان (در ۴ 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 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.

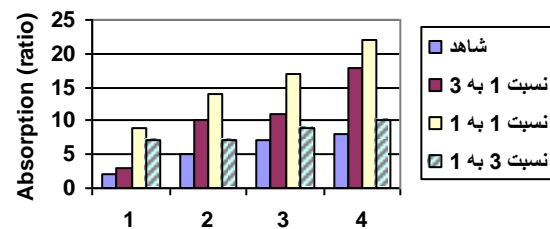
تولید هارمالول در کشت مخلوط در نسبت ۳:۱ کشت مخلوط (عطرسنگ به اسپند) در روزهای هفتم تا چهاردهم و چهاردهم تا بیست و یکم افزایش داشته است. به نظر می‌رسد در نسبت ۱:۳، کشت مخلوط (عطرسنگ به اسپند) سیکل رشد تأثیر چندانی در میزان تولید هارمالول نداشته است.

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 فورانوگومارین‌ها در آنها در مقایسه با کشت تنها،

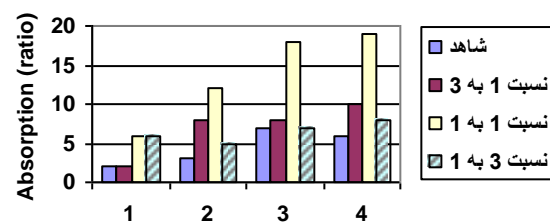
عطرسنگ و اسپند در مقایسه با سوسپانسیون سلولی اسپند بعنوان شاهد

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 هارمالول 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 آلکالوئید 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

Duboisia hybrid 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 (۱۶).

به طور کلی می توان 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 می باشد 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 می باشد. 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 هزینه های این طرح با شماره ۸۲۲۹۰ را تأمین نموده است، تشکر و قدردانی می شود.

تغییراتی مشاهده شده است (۱۷). نسبت های خاص مخلوط دو گیاه باعث افزایش تولید فورانوکومارین ها شده است. مکانیسم هایی مانند عملکرد آنزیم های مهارکننده ممکن است در این تأثیرگذاری مداخله داشته باشند. محرک های زیستی با از بین بردن این سدهای مهارکننده و یا دستکاری مسیر آنزیم ها، ممکن است آنزیم های مؤثر در متابولیسم ثانویه را چند برابر نماید. از آنجایی که این دستکاریها معمولاً به صورت تجربی صورت می گیرند، بنابراین اثرات ناشی از آنها اغلب غیر قابل پیش بینی می باشد (۲۳).

محرک های زیستی شامل پلیمرهای گلوکان، گلیکوپروتئین ها، اسیدهای مولکولی کم وزن و مواد دیواره سلولی است که از سلولهای کشتهای مخلوط آزاد می شوند. غلظت هارمول تولید شده در نمونه ها 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 ریشه های موئینه *Altropa belladonna* و جوانه های

References

منابع

1. Ayoub MT, Rashan LJ. Isoharmin- 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. Berlin 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 secondary 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: Characterization 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, Abdalgaleil 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 streptozocin-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, Glowacki 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 marianum. *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.