Journal of Medicinal Plants Biotechnology

JMPB

Review Article

The Role of Somaclonal Variation in Plant Tissue Culture for Enhancing Secondary Metabolites in Medicinal Plants

*Mohammad-Reza Jalali[1] and Mina Amani[2]**

1.MSc student in Horticultural Science and Engineering, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran.
2.PhD student in Horticultural Science and Engineering, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

ARTICLE INFO

Article history

Submitted: 2025-4-11
Revised: 2025-8-26
Accepted: 2025-9-22

KEYWORDS

Medicinal plant,
Secondary metabolites,
Somaclonal variation,
Tissue culture.

ABSTRACT

Plant tissue culture is recognized as a key tool in various research fields, especially in the area of medicinal plants. These techniques are employed for mass propagation, conservation, and production of secondary metabolites in medicinal plants. There are various methods for in-vitro culture, including micropropagation, axillary bud culture, organ culture, root and callus culture, organogenesis, somatic embryogenesis, and cell suspension culture. Since cell suspension culture and callus are typically preferred for producing plant chemicals, following root and shoot cultures as well as somatic embryogenesis, these methods play a significant role in optimizing the production of secondary metabolites. However, one of the major challenges in plant tissue culture is the potential occurrence of somaclonal variation, which can result from genetic mutations or changes in epigenetic markers. These variations particularly arise in highly differentiated explants and during the callus stage. Additionally, the occurrence of somaclonal variation may pose a barrier to successful in-vitro propagation and preservation of germplasm. This issue is especially critical in cases where maintaining the genetic and biochemical characteristics of medicinal plants is important. In the present study, the potential somaclonal variations resulting from the tissue culture of medicinal plants and their implications for the production of secondary metabolites are examined and discussed. This research can contribute to a better understanding of the challenges and opportunities associated with the use of tissue culture for the production of medicinal plants and valuable metabolites.

* Corresponding author: ***Mina Amani***
✉ E-mail: *Mina76amani@yahoo.com*

مجله زیست فناوری گیاهان دارویی

JMPB

مقاله مروری

نقش تغییرات سوماکلونال در کشت بافت گیاهی به منظور افزایش متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی

محمدرضا جلالی[۱] و مینا امانی*[۲]

۱.دانشجوی کارشناسی ارشد علوم و مهندسی باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

۲. دانشجوی دکتری علوم و مهندسی باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله

دریافت: ۲۲-۱-۱۴۰۴

بازنگری: ۴-۶-۱۴۰۴

پذیرش: ۳۱-۶-۱۴۰۴

چکیده: کشت بافت گیاهی به‌عنوان یک ابزار کلیدی در تحقیقات مختلف، به‌ویژه در زمینه گیاهان دارویی، شناخته شده است. این تکنیک‌ها به‌منظور تکثیر انبوه، حفاظت و تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی به کار می‌روند. روش‌های متنوعی برای کشت درون‌شیشه‌ای وجود دارد که شامل ریزازدیادی، جوانه‌جانبی، کشت اندام هوایی، کشت ریشه و کالوس، اندام‌زایی، جنین‌زایی سوماتیک و کشت سوسپانسیون سلولی هستند. ازآنجاکه برای تولید مواد شیمیایی گیاهی، کشت سوسپانسیون سلولی و کالوس معمولاً به‌دنبال کشت‌ریشه و اندام‌هوایی و هم‌چنین جنین‌زایی سوماتیک ترجیح داده می‌شود، این روش‌ها نقش مهمی در بهینه‌سازی تولید متابولیت‌های ثانویه دارند. با این‌حال، یکی از چالش‌های عمده در کشت بافت گیاهی، احتمال بروز تغییرات سوماکلونال است که می‌تواند ناشی از جهش‌های ژنی و یا تغییرات در علائم اپی‌ژنتیکی باشد. این تغییرات به‌ویژه در ریز نمونه‌های بسیار تمایزیافته و در مرحله کالوس رخ می‌دهند. هم‌چنین وقوع تغییرات سوماکلونال ممکن است مانعی برای موفقیت در تکثیر درون شیشه‌ای و حفظ ژرم‌پلاسم باشد. این موضوع به‌ویژه در مواردی که حفظ ویژگی‌های ژنتیکی و بیوشیمیایی گیاهان دارویی اهمیت دارد، بسیار حیاتی است. در تحقیق حاضر، تغییرات احتمالی سوماکلونال به دنبال کشت بافت گیاهی دارویی و پیامدهای آن در تولید متابولیت‌های ثانویه بررسی و ارائه شده است. این مطالعه می‌تواند به درک بهتر از چالش‌ها و فرصت‌های موجود در استفاده از کشت بافت برای تولید گیاهان دارویی و متابولیت‌های ارزشمند کمک کند.

واژگان کلیدی:

تنوع سوماکلونال، کشت بافت، گیاه دارویی، متابولیت¬های ثانویه.

*نویسنده مسئول: **مینا امانی**

✉ E-mail: *Mina76amani@yahoo.com*

Journal homepage: ***jmpb.znu.ac.ir***

مقدمه

کشت بافت گیاهی به‌عنوان یک تکنیک نوین در علوم گیاهی، به محققان این امکان را می‌دهد که با استفاده از روش‌های کنترل‌شده، گیاهان را در شرایط آزمایشگاهی تولید و تکثیر کنند. این روش به‌ویژه در زمینه تولید گیاهان دارویی و افزایش متابولیت‌های ثانویه اهمیت ویژه‌ای دارد. متابولیت‌های ثانویه، ترکیباتی هستند که به‌طور مستقیم در فرآیندهای متابولیکی اصلی گیاهان شرکت نمی‌کنند، اما نقش‌های حیاتی در بقا و سازگاری گیاهان در محیط‌های مختلف ایفا می‌کنند. این ترکیبات، ازجمله آلکالوئیدها، فلاونوئیدها و ترپنوئیدها، به دلیل خواص دارویی و درمانی خود، در صنایع داروسازی و آرایشی بهداشتی مورد توجه قرار گرفته‌اند (Kaeppler *et al.*, 2000; Miguel & Marum, 2011; Smulders and de Klerk, 2011; Us-Camas *et al.*, 2014). تغییرات سوماکلونال، که به تغییرات ژنتیکی و فنوتیپی در گیاهان حاصل از کشت بافت اشاره دارد، می‌تواند به‌عنوان یک ابزار مؤثر برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی مورد استفاده قرار گیرد. این تغییرات می‌توانند ناشی از تنش‌های محیطی، تغییرات در شرایط کشت و یا اصلاحات ژنتیکی باشند. با بهره‌گیری از این تغییرات، محققان قادرند به تولید گیاهانی با غلظت بالاتر از متابولیت‌های ثانویه هدف بپردازند و در نتیجه، ارزش دارویی و اقتصادی این گیاهان را افزایش دهند (Krishna *et al.*, 2016). در این زمینه، شناسایی و انتخاب بهترین شرایط کشت و هم‌چنین بررسی تأثیر عوامل مختلف بر روی تولید متابولیت‌های ثانویه، از اهمیت بالایی برخوردار است. در این مقاله، به بررسی نقش تغییرات سوماکلونال در کشت بافت گیاهی و تأثیر آن بر افزایش متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی خواهیم پرداخت و به بررسی روش‌ها و تکنیک‌های نوین در این حوزه خواهیم پرداخت.

کشت درون شیشه‌ای گیاهان دارویی

فرض‌براین است که کشت بافت، یک پتانسیل جایگزین برای حفاظت از گیاهان دارویی در معرض انقراض باشد (Pant, 2013). درواقع، بهره‌برداری بیش‌ازحد از گیاهان دارویی ممکن است بر جمعیت گیاهی در رویشگاه طبیعی آن تأثیر منفی بگذارد؛ بنابراین، بسته به تکنیک مورد استفاده، کشت بافت می‌تواند به‌عنوان یک روش جایگزین برای ریزازدیادی برخی از این گیاهان و هم‌چنین برای تولید متابولیت ثانویه در این گیاهان در شرایط درون شیشه‌ای استفاده شود (Iriawati *et al.*, 2014). علاوه‌براین، سیستم‌های کشت بافت، سلول یا اندام گیاهی، منبع بالقوه‌ای از ترکیبات گیاهی باارزش و تجدیدپذیر هستند که با روش‌های دیگر تولید نمی‌شوند (Mulabagal Vanisree & Tsay Hsin-Sheng, 2004)؛ بنابراین، زیست فناوری گیاهان دارویی در ارائه منبع مستمر و قابل اعتماد داروهای گیاهی بسیار سودمند است و می‌تواند برای کشت بافت گیاهی در مقیاس بزرگ که این متابولیت‌ها را می‌توان از آن جدا کرد، استفاده کرد (Debnath *et al.*, 2006). کشت بافت به‌عنوان یک تکنیک پیشرفته در تولید گیاهان دارویی، شامل روش‌های متنوعی ازجمله کشت اندام هوایی، کشت مریستم، اندام‌زایی، کشت کالوس، ریزازدیادی، کشت جوانه‌جانبی، کشت سوسپانسیون سلولی و جنین‌زایی سوماتیک است. مطالعات متعدد نشان داده‌اند که بافت‌های بسیار متمایز، ازجمله برگ‌ها، دمبرگ‌ها و بذرها، به همراه مریستم‌های موجود مانند جوانه‌های جانبی و نوک

ساقه، به‌طور مؤثری در این فرایندها مورد استفاده قرار می‌گیرند. این روش‌ها نه‌تنها به تکثیر گیاهان دارویی کمک می‌کنند، بلکه امکان تولید انبوه متابولیت‌های ثانویه باارزش را نیز فراهم می‌سازند. با استفاده از این تکنیک‌ها، می‌توان به حفظ و گسترش تنوع ژنتیکی گیاهان دارویی و بهینه‌سازی شرایط کشت دست یافت.

علاوه‌براین، واضح است که کشت‌هایی که از کالوس به‌دست می‌آیند، مانند جنین‌زایی سوماتیک، کشت سوسپانسیون سلولی و کشت کالوس، نسبت به تولید گیاهان از طریق شاخه‌های جانبی مزایای بیشتری دارند. این کشت‌ها به‌ویژه در تولید انبوه گیاهان و متابولیت‌های ثانویه بسیار مؤثر هستند، زیرا می‌توانند شرایط کنترل‌شده‌تری را برای رشد و توسعه فراهم کنند و به بهبود کیفیت و کمیت محصولات نهایی کمک کنند (جدول ۱).

جدول ۱- فهرست برخی از گیاهان دارویی تجزیه‌وتحلیل شده از طریق تنوع سوماکلونال

نام علمی گیاه	روش کشت	ترکیبات محیط کشت	نشانگر مولکولی	تنوع ژنتیکی	منابع
Viola pilosa Blume	کشت جوانه‌های جانبی	MS + یک میلی‌گرم در لیتر BA + ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر کینتین) (القای ساقه)	RAPD، ISSR	ندارد	Soni & Kaur (2014)
		MS + یک میلی‌گرم در لیتر IBA (القای ریشه)			
Spilanthes acmella (L.) Murr	کشت جوانه‌های جانبی	MS + یک میلی‌گرم در لیتر BAP (القای ساقه)	RAPD، ISSR	ندارد	Yadav *et al.*, (2014)
Plantago major	کشت کالوس	MS + غلظت‌های مختلف 2,4-D و KIN (القای کالوس)	ISSR	دارد	Esmaeili *et al.*, (2014)
Rauvolfia serpentina L.	اندام‌زایی غیرمستقیم	MS +BAP + NAA (القای کالوس)	ISSR	دارد	Saravanan *et al.*, (2011)
		MS + ۲۲/۱۹ میکرومولار BAP + ۸۶/۸۶۴ میکرومولار ADS (القای ساقه)			
		MS + ۱۷/۷۴ میکرومولار BAP + ۳۲/۵۷ میکرومولار ADS (باززایی مستقیم)	ISSR	ندارد	
Zingiber officinale Rosc.	کشت جوانه‌های جانبی	MS + یک میلی‌گرم در لیتر BA، یک میلی‌گرم در لیتر IAA و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر آدنین سولفات	تخمین سیتوفتومتری محتوای DNA هسته‌ای 4C، RAPD	ندارد	Mohanty *et al.*, (2008)
Guadua angustifolia Kunth	کشت جوانه‌های جانبی	MS + دو میلی‌گرم در لیتر BAP + ۱۰ میلی‌گرم در لیتر آدنین سولفات (القای ساقه)	RAPD، ISSR	ندارد	Nadha *et al.*, (2011)
Hibiscus sabdariffa L.	کشت مریستم	MS + ۰/۱ تا دو میلی‌گرم در لیتر BAP و کینتین (القای دوده)	RAPD	دارد	GovindenSoulange *et al*, (2010)

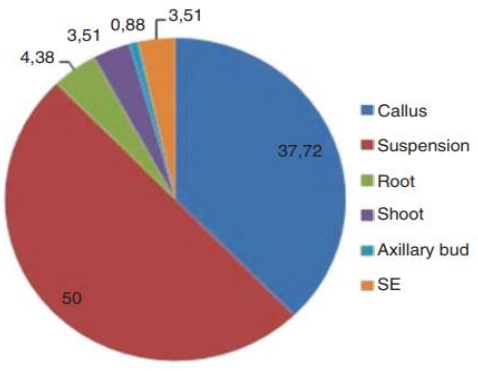
			MS + ۲/۵ تا ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA (القای ریشه)		
Boerhaavia diffusa L.	کشت جوانه	RAPD	MS + دو میکرومولار BAP (القای ساقه) MS + یک میکرومولار تا ۱۰ میکرومولار IAA و یک تا ۱۰ میکرومولار IBA (القای ریشه)	ندارد	Patil & Bhalsing (2015)
ادامه جدول ۱					
Celastrus paniculatus Willd.	کشت جوانه	RAPD، ISSR	MS + ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم در لیترNAA (القای ساقه) ½ MS + ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IAA (القای ریشه)	ندارد	Senapati *et al.*, (2013)
Dendrocalamus strictus (Roxb.) nees	کشت گره	RAPD، ISSR	MS + چهار میلی‌گرم در لیتر BAP (القای ساقه) MS + سه میلی‌گرم در لیتر NAA (القای ریشه)	ندارد	Goyal *et al*., (2015)
*Echinacea purpurea (*L.) Moench	اندام‌زایی	AFLP	½ MS + ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA + یک میلی‌گرم در لیتر 6-BA (القای ساقه)	دارد	Chuang *et al.*, 2009)
Tylophora indica Burm F. Merrill.	اندام‌زایی غیرمستقیم	ISSR	MS + دو میلی‌گرم در لیتر BAP + ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA (القای کالوس) MS + ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر TDZ (القای ساقه) ½ MS + ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA	ندارد	Sharma *et al*., (2014)
Tylophora indica Burm F. Merrill.	اندام‌زایی غیرمستقیم	ISSR	MS + یک میلی‌گرم در لیتر NAA و یک میلی‌گرم در لیتر BAP (القای کالوس) MS + ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA + دو میلی‌گرم در لیتر BAP (القای ساقه و ریشه)	کم	Hu *et al.*, (2011)
Artemisia absinthium L.	اندام‌زایی	ISSR، SSAP	MS + ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D + ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر کینتین (القای کالوس) MS + ۴/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP۶- + ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA (القای ساقه) MS + ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA (ریشه)	وجود ندارد.	Kour *et al.*, (2014)
Amorphophallus albus Liu and Wei	ریخت‌زایی از کالوس	RAPD، ISSR	MS + ۵/۳۷ میکرومولار NAA + ۴/۴۴ میکرومولار 6-BA (القای کالوس)	دارد	Hu *et al.*, (2008)

ادامه جدول ۱

Maesa spp.	کشت جوانه‌های جانبی	MS + ۴/۴، ۸/۸، ۱۳/۲ و ۲۲/۲ مولار BA + MS + ۴/۴، ۸/۸، ۱۳/۲ و ۲۲/۲ مولار BA + ۵، ۱۰/۷ و ۱۳/۵ مولار NAA	Flow cytometry	ندارد	Faizal *et al.*, (2011)
Aloe barbadensis Mill.	اندام‌زایی غیرمستقیم	MS + ۰/۲۵ تا یک میلی‌گرم در لیتر NAA + دو درصد ساکارز	ISSR ،RAPD	ندارد	Sahoo & Rout (2014)
Aloe vera (L.) Burm.f	کشت ساقه	MS + ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر 6-BA	مطالعه Mitotic karyotype، RAPD	ندارد	Haque & Gosh (2013)
Smallanthus sonchifolius (Poepp. and Endl.) H. Robinson	جنین‌زایی غیرمستقیم سوماتیک	MS + یک میلی‌گرم در لیتر تیامین + ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر Lmyo-inositol + یک میلی‌گرم در لیتر 2,4-D + ۰/۰۱، ۰/۰۵ یا ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر میلی‌گرم در لیتر BA	Flow cytometry، ISSR	دارد	Viehmannova *et al.*, (2014)
Justicia betonica Linn.	اندام‌زایی غیرمستقیم	MS + ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP	شاخص میتوزی و اندازه هسته	ندارد	Yaacob *et al.*, (2013)
Mandevilla velutina	کشت کالوس	MS + دو میلی‌گرم در لیتر 2,4-D + دو میلی‌گرم در لیتر 6-BA + سه میلی‌گرم در لیتر 6-furfuryl-aminopurine	تجزیه‌وتحلیل مورفوژنتیک و بیوشیمیایی	دارد	Maraschin *et al.*, (2002)
Curcuma longa L.	کشت کالوس	LS + سه میلی‌گرم در لیتر 2,4-D	تجزیه‌وتحلیل بیوشیمیایی	دارد	Roopadarshini & Gayatri (2012)
Curcuma longa L.	کشت جوانه‌های جانبی	MS + یک تا پنج میلی‌گرم در لیتر 6-BA + یک تا دو میلی‌گرم در لیتر IAA، NAA، کینتین	سیتوفتومتری، RAPD	ندارد	Panda *et al.*, (2007)
Anoectochilus formosanus H AYATA	کشت جوانه‌های جانبی	MS + یک میلی‌گرم در لیتر NAA + دو میلی‌گرم در لیتر 6-BA	ISSR	ندارد	Zhang *et al.*, (2009)
Ducrosia anethifolia	اندام‌زایی	MS + 2,4-D + NAA + BA + کینتین	AFLP	دارد	Shooshtari *et al.*, (2013)

کشت درون شیشه‌ای و تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی

بیش از ۱۰۰ گونه گیاه دارویی درون شیشه‌ای به‌منظور افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه با استفاده از کشت سوسپانسیون سلولی (Khanpour-ardestani *et al.*, 2015; Mulabagal Vanisree and Tsay Hsin-Sheng, 2004; Srivastava *et al.*, 2011; Al-Sane *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2015; Amini *et al.*, 2014)، کشت کالوس (Mulabagal Vanisree and Tsay HsinSheng, 2004; Nakka and Devendra, 2012; Mittal and Sharma, 2017; Khanpour-Ardestani *et al.*, 2015; Arya *et al.*, 2007; Besher *et al.*, 2014; Ataei-Azimi *et al.*, 2008; Obae *et al.*, 2011; Nikam and Savant, 2009; Roopadarshini and Gayatri, 2012)، کشت ریشه (Mulabagal Vanisree and Tsay Hsin-Sheng, 2004; Mahdieh *et al.*, 2015)، کشت ساقه (Mulabagal Vanisree and Tsay Hsin-Sheng, 2004; Nandhini *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2014)، جنین‌زایی سوماتیک (Bhattacharyya *et al.*, 2014; Iriawati *et al.*, 2014; Pathak *et al.*, 2012; Ptak *et al.*, 2013) و کشت جوانه‌های جانبی (Faizal *et al.*, 2011) کشت شده‌اند. این نشان‌دهنده اهمیت کالوس و کشت سوسپانسیون سلولی در تولید متابولیت‌های ثانویه است (شکل ۱). بسته به گونه‌های گیاهان دارویی مورد استفاده، ترکیباتی مانند آلکالوئیدها، فلاونوئیدها، ساپونین‌ها و بسیاری دیگر، اغلب با روش‌های کشت بافت، عمدتاً توسط سوسپانسیون سلولی و کشت کالوس تولید می‌شوند. به‌عنوان مثال، تولید فلاونوئیدها با کشت کالوس، کشت سوسپانسیون، تغییر و تکنیک‌های دیگر افزایش می‌یابد (Bansal and Mulabagal Vanisree .Bharati, 2014) و Tsay Hsin-Sheng (۲۰۰۴) همچنین اهمیت کشت کالوس (۳۸/۵۴ درصد) و کشت سوسپانسیون (۶۱/۴۶ درصد) را در تولید داروهای گیاهی نشان دادند. برخی بررسی‌ها نشان داده‌اند که مقدار متابولیت‌های ثانویه از گیاهان درون شیشه‌ای بیشتر از گیاهان برون شیشه‌ای با ترکیبات بیشتر در برگ نسبت به ساقه و ریشه است (AtaeiAzimi *et al.*, 2008; Nakka and Devendra, 2012; Chen *et al.*, 2014; Sivanandhan *et al.*, 2015). بااین‌حال، تولید متابولیت‌های ثانویه به ترکیب محیط و دسته مواد شیمیایی گیاهی بستگی دارد (Karalija and Paric, 2011; Besher *et al.*, 2014; Mahdieh *et al.*, 2015). به‌عنوان مثال، بالاترین محتوای هیوسیامین در محیط حاوی دسته‌های مختلف درشت‌مغذی‌ها، سه منبع کربن (تیامین-HCL، پیریدوکسین و اسید نیکوتینیک)، کینتین و نفتالین استیک اسید به‌عنوان تنظیم‌کننده رشد و ساکارز (۵۰ گرم) بود؛ محیطی با مواد کمتر، تنظیم‌کننده‌های رشد متفاوت و ساکارز (۳۰ گرم) که در آن کمترین مقدار آلکالوئیدهای تروپان در کالوس تولید شد؛ درحالی‌که، بیشترین محتوای اسکوپولامین در گیاهان وحشی به دست آمد (Besher *et al.*, 2014). علاوه بر این، ترکیبات فیتوشیمیایی به‌طور متفاوتی به یک محیط، واکنش نشان می‌دهند (Karalija and Paric, 2011).



شکل ۱- نمایش فراوانی (درصد) استفاده از تکنیک‌های کشت بافت گیاهی در تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهی (Ngezahayo, 2018)

روش کشت درون شیشه‌ای نیز بر کیفیت و کمیت متابولیت‌های ثانویه تولید شده تأثیر می‌گذارد. در *Echinacea angustifolia* DC.، مشتقات اسید کافئیک به‌طور قابل توجهی در شاخساره از کشت جوانه‌های جانبی تولید می‌شوند؛ درحالی‌که آلکامیدها عمدتاً در شاخه‌های کالوس و باززایی برگ انباشته می‌شوند (Lucchesini *et al.*, 2009). تولید ترکیبات فیتوشیمیایی همچنین به متابولیت‌های ثانویه بستگی دارد که بر روش کشت بافت تأثیر می‌گذارند و وابسته به ژنوتیپ است (Obae *et al.*, 2011). به‌عنوان مثال، در گونه‌های Maesa، هیچ تفاوتی در متابولیت‌های ثانویه بین گیاهان باززایی شده و شاهد آن‌ها وجود ندارد (Faizal *et al.*, 2011). در روش کشت مشابه، مقادیر ترکیبات فیتوشیمیایی به‌طور متفاوتی سنتز می‌شوند. کالوس غیرجنینی متابولیت‌های ثانویه بیشتری مانند آلکالوئیدها، ترپنوئیدها و فنول‌ها را نسبت به کالوس جنین‌زا تولید می‌کند (Iriawati *et al.*, 2014).

شواهد سیستماتیک در مورد کاهش متابولیت‌های ثانویه در گونه‌های گیاهی در شرایط کشت درون‌شیشه‌ای در مقالات ارائه‌شده محدود است. درحالی‌که این مطالعات عوامل مختلف مؤثر بر تولید متابولیت‌های ثانویه را بررسی می‌کنند، هیچ‌یک به‌طور خاص به شرایط کشت درون‌شیشه‌ای نمی‌پردازند. با این حال، آن‌ها زمینه‌های مرتبطی درباره تأثیرات محیطی بر متابولیت‌های ثانویه ارائه می‌دهند. عوامل محیطی تأثیر قابل توجهی بر انباشت متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی دارند و این تأثیرات بسته به گونه‌های مختلف متفاوت است و ممکن است منجر به افزایش یا کاهش تا ۵۰ درصدی در سطوح متابولیت‌های ثانویه شود (Pant *et al.*, 2021). به‌طور مشابه، کیفیت قهوه که توسط متابولیت‌های ثانویه و ویژگی‌های حسی تعیین می‌شود، به تغییرات محیطی از جمله نور، ارتفاع، تنش آبی، دما و سطوح دی‌اکسید کربن حساس است (Ahmed *et al.*, 2021). تیره Brassicaceae تنوع قابل توجهی در متابولیت‌های ثانویه نشان می‌دهد، به‌طوری‌که پلی‌فنول‌ها (۶۸/۷۵ درصد)، ترپن‌ها/کاروتنوئیدها (۳۱/۲۵ درصد) و گلیکوزینولات‌ها (۲۵ درصد) به خواص زیست‌فعال آن‌ها کمک می‌کنند (Mattosinhos *et al.*, 2022). تأثیرات دو برابر شدن ژنوم بر متابولیت‌های ثانویه الگوهای ناسازگاری را در گونه‌های مختلف نشان می‌دهد (Gaynor *et al.*, 2020).

تنوع سوماکلونال در گیاهان دارویی

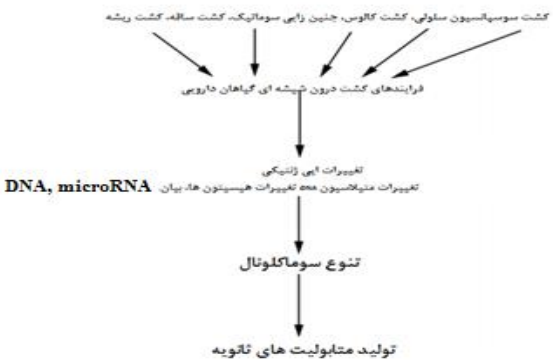
پیامد اصلی کشت درون شیشه‌ای گیاه، بروز تنوع سوماکلونال درنتیجه جهش ژنی یا تغییرات اپی‌ژنتیکی است (Larkin and Scrowcoft, 1981; Gould, 1986; reviewed by Kaeppler *et al.*, 2000; reviewed by Krishna *et al.*, 2016). نوع ریزنمونه، منبع ریزنمونه، نحوه زادآوری، دوره طول کشت و تعداد چرخه‌های باززایی، محیط کشت، ژنوتیپ و پلوئیدی برخی از منابع تغییرات شناسایی شده در کشت بافت گیاهی هستند (Krishna *et al.*, 2016). اگرچه تغییرات سوماکلونال نیز می‌تواند توسط جهش‌های سوماتیکی موجود در گیاه مادری ایجاد شود (Karp, 1994)، اما بافت‌های بسیار متمایز (ریشه، برگ و ساقه) معمولاً تغییرات سوماکلونال بیشتری نسبت به جوانه‌های جانبی و نوک ساقه

ایجاد می‌کنند (Duncan, 1997). اطلاعات به دست آمده از متون علمی نشان داد که برگ، دمبرگ و دانه بیشتر به‌عنوان ریزنمونه در گیاهان دارویی استفاده می‌شود. علاوه بر این، به‌طورکلی اعتقاد بر این است که تغییرات سوماکلونال عمدتاً در مرحله کالوس رخ می‌دهد که نشان‌دهنده شرایط بسیار تنش‌زا برای ژنوم گیاه است (Larkin and Scowcroft, 1981)؛ درحالی‌که ریزازدیادی با افزایش انشعاب از اندام‌های اولیه موجود از قبل مانند شاخه‌ها یا جوانه‌های جانبی باید انجام شود. تا حد زیادی پایداری گیاهان اهداکننده را حفظ می‌کند (Hao and Deng, 2003; Ngezahayo and Liu, 2014). در گیاهان دارویی، به جای تجزیه‌وتحلیل تغییرات سوماکلونال، بیشتر مطالعات بر روی تکثیر در مقیاس بزرگ و ترکیبات گیاه دارویی برای مصارف تجاری و پزشکی متمرکز شده است. در چند گیاه مورد مطالعه، هیچ‌گونه تنوع ژنتیکی سوماکلونال از کشت درون شیشه‌ای بدون عبور به مرحله کالوس وجود ندارد. علی‌رغم این، می‌توان حدس زد که تکنیک‌های اصلی آزمایشگاهی مورد استفاده در تولید متابولیت‌های ثانویه، یعنی سوسپانسیون سلولی، کشت کالوس و جنین‌زایی سوماتیک، احتمالاً با تغییرات سوماکلونال همراه هستند. علاوه بر این، مشاهده شد کشت‌هایی که از یک فاز کالوس عبور می‌کنند (سوسپانسیون سلولی و کشت کالوس و جنین‌زایی سوماتیک) غالب هستند که همچنین قرار است تنوع سوماکلونال ایجاد کنند. در گیاهان زراعی (*Arabidopsis thaliana*, *Fragaria×ananassa*, *Triticum aestivum* L., *Oryza sativa* L., *Gossypium hirsutum* YZ1, *Zea mays* L., *Citrus sinensis* L. Osb.) مشاهده شده است که کالوس، کشت نوک ساقه و جنین‌زایی سوماتیک با بیان ژن microRNA همراه است که در آن microRNAها، نقش‌های مختلفی ازجمله تنظیم ژن‌های هدف، پاسخ به تنش، جوان‌سازی در گیاهان ریزازدیادی شده، تشکیل کالوس جنین‌زا و جنین‌زایی سوماتیک، جنین‌زایی و رشد پس از جنین، کاهش ژن‌های هدف، پاسخ به هورمون، کاهش و دوره نوری (Luo *et al.*, 2006; Chu *et al.*, 2016; Qiao and Xiang, 2013; Yang *et al.*, 2013b; ChavezHernández *et al.*, 2015)، بیان MicroRNA و تغییرات هیستون نیز در کشت‌های سوسپانسیون سلولی از *Arabidopsis thaliana* (Tanurdzic *et al.*, 2008) (Law and Suttle, 2005) و در کشت کالوس *Zea mays* (Alatzas and Foundouli, 2006) را انجام می‌دهند؛ بنابراین، در کشت بافت گیاهی دارویی با عبور به مرحله کالوس هنوز نتایج مشابهی وجود ندارد، اما بیان microRNAها در کشت کالوس تاکسوس مشاهده شده است (Zhang *et al.*, 2015). سایر تغییرات اپی‌ژنتیکی (تغییرات متیلاسیون DNA سیتوزین و تغییرات هیستون) نیز ممکن است رخ دهد.

نقش تنوع سوماکلونال در تنظیم بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه

تولید متابولیت‌های ثانویه، اغلب در فرایند کشت بافت گیاه دارویی، بویژه در کشت سوسپانسیون سلولی و کالوس در مقایسه با گیاهان تیمارنشده مشاهده می‌شود. مرحله کالوس با تغییرات سوماکلونال همراه است که احتمالاً یکی از محرک‌های بالقوه ترکیبات گیاهی فوق هستند (شکل ۲). تنوع سوماکلونال نتیجه جهش‌های ژنومی یا تغییرات اپی‌ژنتیکی از فرایند کشت بافت گیاهی است (Larkin and Scrowcoft, 1981; Gould, 1986; reviewed by Kaeppler *et*

al., 2000). اگرچه تنوع سوماکلونال در گیاهان دارویی درون شیشه‌ای بخوبی مستند نشده است، ولی احتمالاً در شبکه تنظیم‌کننده تولید متابولیت-های ثانویه، نقش داشته باشد. درواقع، در*Curcuma longa* L.، مقدار قابل توجهی کورکومین، اولئورزین و روغن فرار (درصد) در گونه-های سوماکلونال درمقایسه با احیاکننده‌های طبیعی و همچنین گیاه شاهد مشاهده شد(Roopadarshini and Gayatri, 2012). این موضوع ممکن است بویژه با تغییرات اپی-ژنتیکی، یعنی تغییرات کووالانسی ارثی کروماتین که بدلیل تغییر توالی DNA نیست (بازبینی‌شده توسط UsCamas *et al.*, 2014) باشد. به‌عنوان مثال، هتروکروماتین به دلیل متیلاسیون DNA و یا تغییرات هیستون، ژن‌هایی را که در ناحیه هتروکروماتین هستند، بدلیل در دسترس نبودن دستگاه رونویسی خاموش می‌کند (بازبینی‌شده توسط UsCamas *et al.*, 2014). به نوبه خود، متیلاسیون DNA تصور می‌شود که توسط یک مسیر microRNA واسطه می‌شود (Wu *et al.*, 2010). سه مکانیسم اصلی اپی‌ژنتیکی به‌طور گسترده در کشت بافت گیاهی مطالعه شده است، یعنی متیلاسیون DNA، تغییرات هیستون و microRNA (Smulders and de Klerk, 2011). در این میان، متیلاسیون DNA نشان داده است که با تنظیم بیان ژن، جنین‌زایی سوماتیک *Medicago truncatula* را درگیر می‌کند (Kurdyukov *et al.*, 2014). متابولیت‌های ثانویه، که مسیرهای بیوسنتز آن‌ها به‌طور مکرر مطالعه شده است فلاونوئیدها و آلکالوئیدها هستند. برای مثال، بیوسنتز فلاونوئیدها یک فرایند چند مرحله‌ای است که در آن مجموعه-ای از آنزیم‌ها هر مرحله را کاتالیز می‌کنند (Ferreyra *et al.*, 2012). در شرایط تنش‌زا مانند قرارگرفتن در معرض تنش شوری، مشاهده شده است که یک تنظیم اپی‌ژنتیکی مسیرهای بیوسنتزی و آنتی‌اکسیدانی فلاونوئید وجود دارد (Barthi *et al.*, 2015). در این زمینه، می‌توان فرض کرد که تنظیم اپی‌ژنتیکی به ژن‌هایی مربوط می‌شود که در مسیر بیوسنتز ترکیبات موردنظر در کشت بافت نقش دارند. تجزیه و تحلیل محتوای آلکالوئید در کالوس‌های درون شیشه‌ای و گیاهان برون شیشه‌ای نشان داده است که در سطح رونویسی مسیر بیوسنتز آلکالوئید، نوعی تنظیم وجود دارد (Pathak *et al.*, 2012). علاوه بر این، توسعه تکنیک‌های کشت سلول‌های گیاهی دارویی به شناسایی بیش از ۸۰ آنزیم بیوسنتز آلکالوئید منجر شده است (Kutchin, 1998) که نشان‌دهنده دخالت احتمالی علائم اپی‌ژنتیکی در این فرایند است. در گونه‌های تاکسوس، بیان بیش‌ازحد microRNAها باعث افزایش ژن‌های متابولیت‌های ثانویه مانند تاکسول، فنیل پروپانوئید و بیوسنتز فلاونوئیدی شد و درنتیجه عملکرد آن‌ها را به‌عنوان عوامل مهمی، که کل شبکه متابولیک را در طول فرایند کشت بافت تنظیم می‌کنند، نشان داد (Zhang *et al.*, 2015). بااین حال، تنها تعداد کمی از ژن‌ها به متابولیت‌های ثانویه مربوط هستند که نشان می‌دهد عوامل دیگری غیر از microRNAها نیز در فرایند تنظیمی وجود دارند (Zhang *et al.*, 2015). ممکن است این احتمال وجود داشته باشد که تغییرات DNA و تغییرات هیستون دخیل باشد، بویژه زمانی که در پروموتورهای ژن رخ می‌دهد.



شکل ۲- مکانیسم احتمالی تولید متابولیت‌های ثانویه در کشت درون شیشه‌ای گیاهان دارویی ناشی از تنوع سوماکلونال

نتیجه‌گیری

چندین استراتژی برای کشت سلول‌ها، اندام‌ها و بافت‌های گیاهان دارویی درون شیشه‌ای برای دو مزیت اصلی، تکثیر انبوه و تولید متابولیت‌های ثانویه دنبال شده است. زیست فناوری گیاهی از طیف وسیعی از این تکنیک‌ها مانند کشت اندام هوایی، کشت مریستم، اندام‌زایی، کشت کالوس، ریزازدیادی، کشت جوانه جانبی، کشت سوسپانسیون سلولی و جنین‌زایی سوماتیک استفاده کرده است. ریزازدیادی بدون عبور از فاز کالوس (مثل کشت جوانه جانبی) بدلیل توانایی آن در تولید گیاهچه‌های باززایی شده واقعی، برای تکثیر انبوه و نگرانی‌های حفاظتی روشی امیدوارکننده است. روش‌های کشت بافت مانند سوسپانسیون سلولی و کشت کالوس به تولید متابولیت‌های ثانویه اختصاص دارد. با این حال، آن-ها خطر بالقوه ایجاد تغییرات سوماکلونال را مطرح می‌کنند که در مورد گیاهان دارویی، بویژه از جنبه-های اپی‌ژنتیکی، به‌عنوان عوامل بالقوه در شبکه تنظیم ژن بخوبی مستند نشده‌اند؛ بنابراین، نقش احتمالی این تغییرات در تحریک تولید متابولیت-های ثانویه باید به طور دقیقتری بررسی و روشن شود.

منابع

Abyari, M., Nasr, N., Soorni, J., & Sadhu, D. (2016). Enhanced accumulation of Scopoletin in cell suspension culture of *Spilanthes acmella* Murr. Using precursor feeding. *Biological and Applied Sciences*, *59*, 1–7.

Ahmed, S. A., & Baig, M. M. V. (2014). Biotic elicitor enhanced production of psoralen in suspension cultures of *Psoralea corylifolia* L. *Saudi Journal of Biological Sciences*, *21*, 499–504.

Ahmed, S., Brinkley, S., Smith, E., Sela, A., Theisen, M., Thibodeau, C., ... & Cash, S. B. (2021). Climate change and coffee quality: systematic review on the effects of environmental and management variation on secondary metabolites and sensory attributes of *Coffea arabica* and Coffea canephora. *Frontiers in plant science*, *12*, 708013.

Alatzas, A., & Foundouli, A. (2006). Distribution of ubiquitinated histone H2A during plant cell differentiation in maize root and dedifferentiation in callus culture. *Plant Science*, *171*, 481–487.

Al-Sane, K. O., Shibli, R. A., Freihat, N. M., & Hammouri, M. K. (2005). Cell suspension culture and secondary metabolites production

Amini, S.-A., Shabani, L., Afghani, L., Jalpour, Z., & Sharifi-Tehrani, M. (2014). Squalestatin-induced production of taxol and baccatin in cell suspension culture of yew (*Taxus baccata* L.). *Turkish Journal of Biology*, *38*, 528–536.

Arya, D., Patni, V., & Kant, U. (2007). *In vitro* propagation and quercetin quantification in callus cultures of Rasna (*Puchea lanceolata* Oliver & Hiern.). *Indian Journal of Biotechnology*, *7*, 383–387.

Ataei-Azimi, A., Hashemloian, B. D., Ebrahimzadeh, H., & Majd, A. (2008). High *in vitro* production of ant-canceric indole alkaloids from periwinkle (*Catharanthus roseus*) tissue culture.

African Journal of Biotechnology, 7(16), 2834–2839.

Bansal, Y. K., & Bharati, A. J. (2014). *In vitro* production of flavonoids: A review. *World Journal of Pharmaceutical Sciences, 3*(6), 508–533.

Berdasco, M., Alcazar, R., Garcıa-Ortiz, M. V., et al. (2008). Promoter DNA hypermethylation and gene repression in undifferentiated *Arabidopsis* cells. *PLoS One, 3*, e3306.

Besher, S., Al-Ammouri, Y., & Murshed, R. (2014). Production of tropan alkaloids in the *in vitro* and callus cultures of *Hyoscyamus aureus* and their genetic stability assessment using ISSR markers. *Physiology and Molecular Biology of Plants, 20*(3), 343–349.

Bharti, P., Mahajan, M., Vishwakarma, A. K., Bhardwaj, J., & Yadav, S. K. (2015). AtROS1 overexpression provides evidence for epigenetic regulation of genes encoding enzymes of flavonoid biosynthesis and antioxidant pathways during salt stress in transgenic tobacco. *Journal of Experimental Botany, 66*(19), 5959–5969.

Bhattacharyya, P., Kumaria, S., Diengdoh, R., & Tandon, P. (2014). Genetic stability and phytochemical analysis of the *in vitro* regenerated plants of *Dendrobium nobile* Lindl., an endangered medicinal orchid. *Meta Gene, 2*, 489–504.

Borpuzari, P. P., & Borthakur, M. (2016). Effect of plant growth regulators and explants sources on somatic embryogenesis of matured tissue of the anticancerous medicinal plant *Plumbago rosea*. *Journal of Medicinal Plants Studies, 4*(5), 165–170.

Chakradhar, T., & Pullaiah, T. (2014). *In vitro* regeneration through adventitious buds in Wattakaka volubilis, a rare medicinal plant. *African Journal of Biotechnology, 13*(1), 55–60.

Chandrasekhar, T., Hussain, T. M., Gopal, G. R., & Rao, J. V. S. (2006). Somatic embryogenesis of *Tylophora indica* (Burm.f.) Merril., an important medicinal plant. *International Journal of Applied Science and Engineering, 4*(1), 33–40.

Chávez-Hernández, E. C., Alejandri-Ramírez, N. D., Juárez-González, V. T., & Dinkova, T. D. (2015). Maize miRNA and target regulation in response to hormone depletion and light exposure during somatic embryogenesis. *Frontiers in Plant Science, 6*, 555.

Chen, C.-C., Chang, H.-C., Kuo, C.-L., Agrawal, D. C., Wu, C.-R., & Tsay, H.-S. (2014). *In vitro* propagation and analysis of secondary metabolites in *Glossogyne tenuifolia* (Hsiang-Ju) – a medicinal plant native to Taiwan. *Botanical Studies, 55*(45), 1–9.

Chen-Guang, Z., Jing-Li, Y., Li-Kun, L., Cheng-Nan, L., De-An, X., & Cheng-Hao, L. (2011). Research progress in somatic embryogenesis of Siberian ginseng (*Eleutherococcus senticosus* maxim.). *Journal of Medicinal Plant Research, 5*(33), 7140–7145.

Chu, Z., Chen, J., Xu, H., Dong, Z., Chen, F., & Cui, D. (2016). Identification and comparative analysis of microRNA in wheat (*Triticum aestivum* L.) callus derived from mature and immature embryos during *in vitro* culture. *Frontiers in Plant Science, 7*, 1302.

Chuang, S. J., Chen, C. L., Chen, J. J., Chou, W. Y., & Sung, J. M. (2009). Detection of somaclonal variation in micro-propagated *Echinacea purpurea* using AFLP marker. *Scientia Horticulturae, 120*(1), 121–126.

Daniel, A., Kalidass, C., & Mohan, V. R. (2010). *In vitro* multiple shoot induction through axillary bud of *Ocimum basilicum* L. an important medicinal plant. *International Journal of Biological Technology, 1*(1), 24–28.

De Souza, A. V., et al. (2007). *In vitro* propagation of *Lychnophora pinaster* (Asteraceae): A threatened endemic medicinal plant. *Hsc, 42*(7), 1665–1669.

Debnath, M., Malik, C. P., & Bisen, P. S. (2006). Micropropagation: A tool for the production of high quality plant-based medicines. *Current Pharmaceutical*

Biotechnology, 7, 33–49.

Deventhiran, M., John, W. W., Sheik, N. M. M., Jaikumar, K., Saravanan, P., & Anand, D. (2017). *In vitro* propagation and comparative phytochemical analysis of wild plant and micropropagated *Cleome rutidosperma* DC. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research, 9*(2), 253–257.

Dohling, S., Kumaria, S., & Tandon, P. (2012). Multiple shoot induction from axillary bud cultures of the medicinal orchid, *Dendrobium longicornu*. *AoB Plants, 2012*, pls032.

Duncan, R. R. (1997). Tissue culture-induced variation and crop improvement. *Advances in Agronomy, 58*, 201–240.

Esmaeili, F., Shooshtari, L., Ghorbanpour, M., & Etminan, A. (2014). Assessment of somaclonal variation in *Plantago major* using molecular markers. *Journal of Biodiversity and Environmental Sciences (JBES), 5*(4), 402–408.

Faizal, A., Lambert, E., Foubert, K., Apers, S., & Danny, G. (2011). *In vitro* propagation of four saponin producing *Maesa* species. *Plant Cell Tissue and Organ Culture, 106*, 215–223.

Ferreyra, M. L., Falcone, R. S. P., & Casati, P. (2012). Flavonoids: Biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. *Frontiers in Plant Science, 3*(222), 1–15.

Gaynor, M. L., Lim-Hing, S., & Mason, C. M. (2020). Impact of genome duplication on secondary metabolite composition in non-cultivated species: a systematic meta-analysis. *Annals of Botany, 126*(3), 363-376.

Gould, A. R. (1986). Factors controlling generations of variability *in vitro*. In I. K. Vasil (Ed.), *Cell culture and somatic cell genetics in plants. 3. Plant regeneration and genetic variability* (pp. 549–567). Orlando: Academic.

Govinden-Soulange, J., Somanah, D., Ranghoo-Sanmukhiya, M., Boodia, N., & Rajkomar, B. (2010). Detection of somaclonal variation in micropropagated *Hibiscus sabdariffa* L. using RAPD markers. *University of Mauritius Research Journal*, 1–13.

Goyal, A. K., Pradhan, S., Basistha, B. C., & Sen, A. (2015). Micropropagation and assessment of genetic fidelity of *Dendrocalamus strictus* (Roxb.) nees using RAPD and ISSR markers. *3 Biotech, 5*, 473–482.

Hao, Y. J., & Deng, X. X. (2003). Genetically stable regeneration of apple plants from slow growth. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 72*, 253–260.

Haque, S. M., & Ghosh, B. (2013). High frequency microcloning of *Aloe vera* and their true-totype conformity by molecular cytogenetic assessment of two years old field growing regenerated plants. *Botanical Studies, 54*(46), 1–10.

Hu, J., Gao, X., Liu, J., Xie, C., & Li, J. (2008). Plant regeneration from petiole callus of *Amorphophallus albus* and analysis of somaclonal variation of regenerated plants by RAPD and ISSR markers. *Botanical Studies, 49*, 189–197.

Hu, J.-B., Li, Q., & Li, J. (2011). ISSR analysis of somaclonal variation in callus-derived plants of *Amorphophalus rivieri* Durieu. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica, 53*(1), 120–124.

Ilahi, I., Rahim, F., & Jabeen, M. (2007). Enhanced clonal propagation and alkaloid biosynthesis in cultures of *Rauwolfia*. *Pakistan Journal of Biological Sciences, 13*(1), 45–56.

in African violet (*Saintpaulia ionantha* Wendl.). *Jordan Journal of Agricultural Sciences, 1*(1), 84–92.

Iriawati, Rahmawati, A., & Esyanti, R. R. (2014). Analysis of secondary metabolite production in somatic embryo of Pasak Bumi (*Eurycoma longifolia* Jack.). *Procedia Chemistry, 13*, 112–118.

Iyer, R. I., Jayaraman, G., & Ramesh, A. (2009). Direct somatic embryogenesis in *Myristica malabarica* Lam., an endemic, threatened medicinal species of Southern India and detection of phytochemicals of potential medicinal value. *Indian*

Journal of Science and Technology, *2*(7), 11–17.

Joshee, N., Biswas, B. K., & Yadav, A. K. (2007). Somatic embryogenesis and plant development in *Centella asiatica* L., a highly prized medicinal plant of the tropics. *Hortscience*, *42*(3), 633–637.

Joshi P and Dhawan (2007) Axillary multiplication of *Swertia chirayita* (Roxb. Ex Fleming) H. Karst., a critically endangered medicinal herb of temperate Himalayas. In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant 43(6):631–638.

Kaeppler, S. M., Kaeppler, H. F., & Rhee, Y. (2000). Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. *Plant Molecular Biology*, *43*, 179–188.

Karalija, E., & Parić, A. (2011). The effect of BA and IBA on the secondary metabolite production by shoot culture of *Thymus vulgaris* L. *Biologica Nyssana*, *2*(1), 29–35.

Karp, A. (1994). Origins, causes and uses of variation in plant tissue cultures. In I. K. Vasil & T. A. Thorpe (Eds.), *Plant cell and tissue culture* (pp. 139–152). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.

Kaul, S., Das, S., & Srivastava, P. S. (2013). Micropropagation of *Ajuga bracteosa*, a medicinal herb. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, *19*(2), 289–296.

Kaushal, S., Sidana, A., & Dev, K. (2014). *In vitro* plant production through apical meristem culture of *Gentiana kurroo* Royle. *Journal of Medicinal Plants Studies*, *3*(1), 04–09.

Khanpour-Ardestani, N., Sharifi, M., & Behmanesh, M. (2015). Establishment of callus and cell suspension culture of *Scrophularia striata* Boiss.: An *in vitro* approach for acteoside production. *Cytotechnology*, *67*, 475–485.

Kher, M. M., Joshi, D., Nekkala, S., Nataraj, M., & Raykundaliya, D. P. (2014). Micropropagation of *Pluchea lanceolata* (Olier & Hiern.) using nodal explant. *Journal of Horticultural Research*, *22*(1), 35–39.

Kour, B., Kour, G., Kaul, S., & Dhar, M. K. (2014). *In Vitro* mass multiplication and assessment of genetic stability of *In Vitro* raised *Artemisia absinthium* L. plants using ISSR and SSAP molecular markers. *Advances in Botany*, *2014*, 1–7.

Krishna, H., Alizadeh, M., Singh, D., Singh, U., Chauhan, N., Eftekhari, M., & Sadh, R. K. (2016). Somaclonal variations and their applications in horticultural crops improvement. *3 Biotech*, *6*(54), 1–18.

Kshirsagar, P. R., Chavan, J. J., Umdale, S. D., Nimbalkar, M. S., Dixt, G. B., & Gaikwad, N. B. (2015). Highly efficient in vitro regeneration, establishment of callus and cell suspension cultures and RAPD analysis of regenerants of Swertia lawii Burkill. *Biotechnology Reports*, *6*, 79–84.

Kumar, V., Moyo, M., & Staden, J. V. (2017). Somatic embryogenesis in *Hypoxis hemerocallidea*: An important African medicinal plant. *South African Journal of Botany*, *108*, 331–336.

Kurdyukov, S., Mathesius, U., Nolan, K. E., Sheahan, M. B., Goffard, N., Carroll, B. J., & Rose, R. J. (2014). The 2HA line of *Medicago truncatula* has characteristics of an epigenetic mutant that is weakly ethylene insensitive. *BMC Plant Biology*, *14*, 174.

Kutchin, T. M. (1998). Molecular genetics of plant alkaloid biosynthesis. In G. Cordell (Ed.), *The alkaloids* (Vol. 50, pp. 257–316). San Diego: Academic.

Laibach, F. (1929). Ectogenesis in plants: Methods and genetic possibilities of propagating embryos otherwise dying in the seed. *Journal of Heredity*, *20*, 201–208.

Larkin, P. J., & Scowcroft, W. R. (1981). Somaclonal variation: A novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theoretical and Applied Genetics*, *60*, 197–214.

Law, R. D., & Suttle, J. C. (2005). Chromatin remodeling in plant cell culture: Patterns of DNA methylation and histone H3 and H4 acetylation vary during growth of asynchronous potato

cell suspensions. *Plant Physiology and Biochemistry, 43*, 527–534.

Lopez-Arellano, M., Dhir, S., Albino, N. C., Santiago, A., & Morris T Dhir, S. K. (2015). Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from protoplast culture of *Stevia rebaudiana*. *British Biotechnology Journal, 5*(1), 1–12.

Lucchesini, M., Bertoli, A., Mensuali-Sodi, A., & Pistelli, L. (2009). Establishment of in vitro tissue cultures from *Echinacea angustifolia* D.C. adult plants for the production of phytochemical compounds. *Scientia Horticulturae, 122*, 484–490.

Luo, Y.-C., Zhou, H., Li, Y., Chen, J.-Y., Yang, J.-H., Chen, Y.-Q., & Qu, L.-H. (2006). Rice embryogenic calli express a unique set of microRNAs, suggesting regulatory roles of microRNAs in plant post-embryogenic development. *Febes Letters, 580*, 5111–5116.

Mahdieh, M., Noori, M., & Hoseinkhani, S. (2015). Studies of *in vitro* adventitious root induction and flavonoid profiles in *Rumex crispus*. *Advanced Life Sciences, 5*(3), 53–57.

Maraschin, M., Sugui, J. A., Wood, K. V., Bonham, C., Buchi, D. F., Cantao, M. P., Carobrez, S. G., Araujo, P. S., Peixoto, M. L., Verpoorte, R., & Fontana, J. D. (2002). Somaclonal variation: A morphogenetic and biochemical analysis of *Mandevilla velutina* cultured cells. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 35*, 633–643.

Mattosinhos, P. D. S., Sarandy, M. M., Novaes, R. D., Esposito, D., & Goncalves, R. V. (2022). Anti-inflammatory, antioxidant, and skin regenerative potential of secondary metabolites from plants of the Brassicaceae family: A systematic review of in vitro and in vivo preclinical evidence (biological activities Brassicaceae skin diseases). *Antioxidants*, *11*(7), 1346.

Meena, M. K., Singh, N., & Patni, V. (2012). *In vitro* multiple shoot induction through axillary bud of *Cocculus hirsutus* (L.) Diels: A threatened medicinal plant. *African Journal of Biotechnology, 11*(12), 2952–2956.

Miguel, C., & Marum, L. (2011). An epigenetic view of plant cells cultured *in vitro*: Somaclonal variation and beyond. *Journal of Experimental Botany, 62*(11), 3713–3725.

Mittal, J., & Sharma, M. M. (2017). Enhanced production of berberine in *In vitro* regenerated cell of *Tinospora cordifolia* and its analysis through LCMS QToF. *3 Biotech, 7*(25), 1–12.

Mohanty, S., Panda, M. K., Subudhi, E., Acharya, L., & Nayak, S. (2008). Genetic stability of micropropagated ginger derived from axillary bud through cytophotometric and RAPD analysis. *Zeitschrift für Naturforschung, 63c*, 747–754.

Moon, H.-K., Kim, Y.-W., Hong, Y.-P., & Park, S.-Y. (2013). Improvement of somatic embryogenesis and plantlet conversion in *Oplopanax elatus*, an endangered medicinal woody plant. *Springerplus, 2*(428), 1–8.

Mulabagal, V., & Tsay, H.-S. (2004). Plant cell cultures – An alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites. *International Journal of Applied Science and Engineering, 2*(1), 29–48.

Nadha, H. K., Kumar, R., Sharma, R. K., Anand, M., & Sood, A. (2011). Evaluation of clonal fidelity of *in vitro* raised plants of *Guadua angustifolia* Kunth using DNA-based markers. *Journal of Medicinal Plant Research, 5*(23), 5636–5641.

Nagesh, K. S., Shanthamma, C., & Pullaiah, T. (2010). Somatic embryogenesis and plant regeneration from callus cultures of *Curculigo orchioides* Gaertn. *Indian Journal of Biotechnology, 9*, 408–413.

Nakka, S., & Devendra, B. N. (2012). A rapid *in vitro* propagation and estimation of secondary metabolites for *in vivo* and *in vitro* propagated *Crotalaria* species, a Fabaceae member. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences, 2*(3), 897–916.

Nandhini, R. S., Bayyapureddy, A., & Reji, J. V. (2015). An enhanced *In Vitro* production of Saponins and other bioactives from *Bacopa monnieri* L. Penn. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences, 6*(3), 446–451.

Ngezahayo, F. (2018). Somaclonal variations and their applications in medicinal plant improvement. In Biotechnological Approaches for Medicinal and Aromatic Plants: Conservation, Genetic Improvement and Utilization (pp. 503-519). Singapore: Springer Singapore.

Ngezahayo, F., & Liu, B. (2014). Axillary bud proliferation approach for plant biodiversity conservation and restoration. *International Journal of Biodiversity, 2014*, 1–9.

Nikam, T. D., & Savant, R. S. (2009). Multiple shoot regeneration and alkaloid cerpegin accumulation in callus culture of *Ceropegia juncea* Roxb. *Physiology and Molecular Biology of Plants, 15*(1), 71–77.

Obae, S. G., Klandorf, H., & West, T. P. (2011). Growth characteristics and Ginsenosides production of *In Vitro* tissues of American ginseng, *Panax quinquefolius* L. *Hortscience, 46*(8), 1136–1140.

Opabode, J. T., Akinyemiju, A. O., & Ayeni, O. O. (2011). Plant regeneration via somatic embryogenesis from immature leaves in *Tetrapleura tetraptera* (SCHUM. & THONN.) TAUB. *Archives of Biological Sciences, 63*(4), 1135–1145.

Panda, M. K., Mohanty, S., Subudi, E., Acharya, L., & Nayak, S. (2007). Assessment of genetic stability of micropropagated plants of *Curcuma longa* L. by cytophotometry and RAPD analyses. *International Journal of Integrative Biology, 1*(3), 189–195.

Pant, B. (2013). Medicinal orchids and their uses: Tissue culture a potential alternative for conservation. *African Journal of Plant Science, 7*(10), 448–467.

Pant, P., Pandey, S., & Dall'Acqua, S. (2021). The influence of environmental conditions on secondary metabolites in medicinal plants: A literature review. *Chemistry & Biodiversity, 18*(11), e2100345.

Parida, R., Mohanty, S., & Nayak, S. (2011). Evaluation of genetic fidelity of *in vitro* propagated GREATER GALANGAL (*Alpinia galanga* L.) using DNA based markers. *International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences, 1*(3), 123–133.

Pathak, S., Mishra, B. K., Misra, P., Misra, P., Joshi, V. K., Shukla, S., & Trivedi, P. K. (2012). High frequency somatic embryogenesis, regeneration and correlation of alkaloid biosynthesis with gene expression in *Papaver somniferum*. *Plant Growth Regulation, 68*, 17–25.

Patil, K. S., & Bhalsing, S. R. (2015). Efficient micropropagation and assessment of genetic fidelity of *Boerhaavia diffusa* L- High trade medicinal plant. *Physiology and Molecular Biology of Plants, 21*(3), 425–432.

Prakash, E., Khan, S. V., Meru, E., & Rao, K. R. (2001). Somatic embryogenesis in *Pimpinella tirupatiensis* Bal. and subr., an endangered medicinal plant of Tirumala hills. *Current Science, 81*(9, 10), 1239–1242.

Ptak, A., Tahchy, A. E., Skrzypek, E., Wójtowicz, T., & Laurain-Mattar, D. (2013). Influence of auxins on somatic embryogenesis and alkaloid accumulation in *Leucojum aestivum* callus. *Central European Journal of Biology, 8*(6), 591–599.

Puhan, P., & Rath, S. P. (2012). *In vitro* propagation of *Aegle marmelos* (L.) corr., a medicinal plant through axillary bud multiplication. *Advances in Bioscience and Biotechnology, 3*, 121–125.

Qiao, M., & Xiang, F. (2013). A set of *Arabidopsis thaliana* miRNAs involve shoot regeneration *in vitro*. *Plant Signaling & Behavior, 8*(3), e23479.

Reddy, S. H., Chakravarthi, M., &

Chandrashekara, K. N. (2012). *In vitro* multiple shoot induction through axillary bud of *Asclepias curassavica* L. – A valuable medicinal plant. *International Journal of Scientific Research, 2*(8), 1–7.

Roopadarshini, V., & Gayatri, M. C. (2012). Isolation of somaclonal variants for morphological and biochemical traits in *Curcuma longa* (turmeric). *Research in Plant Biology, 2*(3), 31–37.

Sahai, A., Shahzad, A., & Anis, M. (2010). High frequency plant production via shoot organogenesis and somatic embryogenesis from callus in *Tylophora indica*, an endangered plant species. *Turkish Journal of Botany, 34*, 11–20.

Sahoo, S., & Rout, G. R. (2014). Plant regeneration from leaf explants of *Aloe barbadensis* mill. And genetic fidelity assessment through DNA markers. *Physiology and Molecular Biology of Plants, 20*(2), 235–240.

Saini, R. K., Shetty, N. P., Giridhar, P., & Ravishankar, G. A. (2012). Rapid *in vitro* regeneration method for *Moringa oleifera* and performance evaluation of field grown nutritionally enriched tissue cultured plants. *3 Biotech, 2*, 187–192.

Saravanan, S., Sarvesan, R., & Vinod, M. S. (2011). Identification of DNA elements involved in somaclonal variants of *Rauvolfia serpentina* (L.) arising from indirect organogenesis as evaluated by ISSR analysis. *Indian Journal of Science and Technology, 4*(10), 1241–1245.

Sasikumar, S., Raveendar, S., Premkumar, A., Ignacimuthu, S., & Agastian, P. (2009). Micropropagation of *Baliospermum montanum* (wild.) Muell. Arg.- a threatened medicinal plant. *Indian Journal of Biotechnology, 8*, 223–226.

Sebastinraj, J., & Sidique, K. M. I. (2011). *In vitro* rapid clonal propagation of *Aristolochia bracteolata* lam. (Aristolochiaceae)- A valuable medicinal plant. *World Journal of Agricultural Sciences, 7*(6), 653–658.

Senapati, S. K., Aparajita, S., & Rout, G. (2013). Micropropagation and assessment of genetic stability in *Celastrus paniculatus*: An endangered medicinal plant. *Biologia, 68*(4), 627–632.

Sharma, M. M., Verma, R. N., Singh, A., & Batra, A. (2014). Assessment of clonal fidelity of *Tylophora indica* (Burm. f.) Merrill "*in vitro*" plantlets by ISSR molecular markers. *Springer Plus, 3*(400), 1–9.

Sharmin, S. A., Alam, M. J., Sheikh, M. M. I., Sarker, K. K., Khalekuzzaman, M., Haque, M. A., Alam, M. F., & Alam, I. (2014). Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Wedelia calendulacea* less. An endangered medicinal plant. *Brazilian Archives of Biology and Technology, 57*(3), 394–401.

Shooshtari, L., Omidi, M., Majidi, E., Naghavi, M., Ghorbanpour, M., & Etminan, A. (2013). Assessment of somaclonal variation of regenerated *Ducrosia anethifolia* plants using AFLP markers. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 17*(4), 99–106.

Singh, P., Singh, A., Shukla, A. K., Singh, L., Pande, V., & Nailwal, T. K. (2009). Somatic embryogenesis and in vitro regeneration of an endangered medicinal plant sarpgandha (*Rauvolfia serpentina* L.). *Life Science Journal, 6*(2), 57–62.

Sivanandhan, G., Vasudevan, V., Selvaraj, N., Lim, Y. P., & Ganapathi, A. (2015). L-Dopa production and antioxidant activity in *Hybanthus enneaspermus* (L.) F. Muell regeneration. *Physiology and Molecular Biology of Plants, 1*(3), 395–406.

Smulders, M. J. M., & de Klerk, G. J. (2011). Epigenetics in plant tissue culture. *Plant Growth Regulation, 63*, 137–146.

Soni, M., & Kaur, R. (2014). Rapid *in vitro* propagation, conservation and analysis of genetic stability of *Viola pilosa*. *Physiology and Molecular Biology of Plants, 20*(1), 95–101.

Srinivas, D., & Reddy, K. J. (2017). Plant regeneration studies in Euphorbia fusiformis through somatic embryo

genesis. *Biotechnology Journal International, 17*(2), 1–6.

Srivastava, P., Sisodia, V., & Chaturvedi, R. (2011). Effect of culture conditions on synthesis of triterpenoids in suspension cultures of *Lantana camara* L. *Bioprocess and Biosystems Engineering, 34*, 75–80.

Sudarshana, M. S., Niranjan, M. H., & Girisha, S. T. (2008). *In vitro* flowering, somatic embryogenesis and regeneration in *Boerhaavia diffusa* Linn. – a medicinal plant. *Global Journal of Biotechnology and Biochemistry, 3*(2), 83–86.

Tanurdzic, M., Vaughn, M. W., Jiang, H., Lee, T.-J., Slotkin, R. K., Sosinski, B., Thompson, W. F., Doerge, R. W., & Martienssen, R. A. (2008). Epigenomic consequences of immortalized plant cell suspension culture. *PLoS Biology, 6*, e302.

Thangavel, K., Maridass, M., Sasikala, M., & Ganesan, V. (2008). *In vitro* micropropagation of *Talinum portulacifolium* L. through axillary bud culture. *Ethnobot Leaflets, 12*, 413–418.

Us-Camas, R., Rivera-Solís, G., Duarte-Aké, F., & De-la-Peña, C. (2014). *In vitro* culture: An epigenetic challenge for plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 118*, 187–201.

Viehmannova, I., Bortlova, Z., Vitamvas, J., Cepkova, P. H., Eliasova, K., Svobodova, E., & Travnickova, M. (2014). Assessment of somaclonal variation in somatic embryo-derived plants of yacon [*Smallanthus sonchifolius* (Poepp. and Endl.) H. Robinson] using intersimple sequence repeat analysis and flow cytometry. *Electronic Journal of Biotechnology, 17*, 102–106.

Wang, J., Qian, J., Yao, L., & Lu, Y. (2015). Enhanced production of flavonoids by methyl jasmonate elicitation in cell suspension culture of *Hypericum perforatum*. *Bioresources and Bioprocessing, 2*(5), 1–9.

Wu, L., Zhou, H., Zhang, Q., Zhang, J., Ni, F., Liu, C., & Qi, Y. (2010). DNA methylation mediated by a MicroRNA pathway. *Molecular Cell, 38*, 465–475.

Yaacob, J. S., Taha, R. M., Jaafar, N., Hasni, Z., Elias, H., & Mohamed, N. (2013). Callus induction, plant regeneration and somaclonal variation in *in vivo* and *in vitro* grown white shrimp plant (*Justicia betonica* Linn.). *Australian Journal of Crop Science, 7*(2), 281–288.

Yadav, K., Kumar, S., & Singh, N. (2014). Genetic fidelity assessment of *Spilanthes acmella* (L.) Murr. By RAPD and ISSR markers assay. *Indian Journal of Biotechnology, 13*, 274–277.

Yang, J., Wu, S., & Li, C. (2013a). High efficiency secondary somatic embryogenesis in *Hovenia dulcis* Thunb. through solid and liquid cultures. *The Scientific World Journal, 2013*, Article ID 718754 6 pages.

Yang, X., Wang, L., Yuan, D., Lindsey, K., & Zhang, X. (2013b). Small RNA and degradome sequencing reveal complex miRNA regulation during cotton somatic embryogenesis. *Journal of Experimental Botany, 64*(6), 1521–1536.

Zhang, F., Yali, L. V., Dong, H., & Guo, S. (2010). Analysis of genetic stability through Intersimple sequence repeats molecular markers in micropropagated plantlets of *Anoectochilus formosanus* H AYATA, a medicinal plant. *Biological & Pharmaceutical Bulletin, 33*(3), 384–388.

Zhang, F.-S., Lv, Y.-l., Zhao, Y., & Guo, S.-X. (2009). Promoting role of an endophyte on the growth and contents of kinsenosides and flavonoids of *Anoectochilus formosanus* Hayata, a rare and threatened medicinal Orchidaceae plant. *Journal of Zhejiang University. Science. B, 14*(9), 785–792.

Zhang, M., Dong, Y., Nie, L., Lu, M., Fu, C., & Yu, L. (2015). High-throughput sequencing reveals miRNA effects on the primary and secondary production properties in long-term subcultured *Taxus* cells. *Frontiers in Plant Science, 6*, 1–12.