

افزایش تولید تاکسول در ریشه‌های مویین ایجاد شده در سرخدار ایرانی

*(Taxus baccata.sp)*هوشنگ گوهر چینی^{۱،۲*}، خدیجه باقری^۱ و محمد رضا زمانی^۳^۱ ایران، زنجان، دانشگاه زنجان، دانشکده کشاورزی، گروه ژنتیک و تولیدات گیاهی^۲ ایران، تهران، دانشگاه پیام نور^۳ ایران، میمه (اصفهان)، موسسه آموزش عالی غیردولتی غیرانتفاعی نوردانش

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۰/۲۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۱/۲۷

چکیده

تاکسول یکی از مهمترین داروهای ضد سرطان است که از درخت سرخدار قابل استخراج می‌باشد. امروزه تولید داروهای گیاهی از طریق ایجاد ریشه‌های مویین در بسیاری از گیاهان دارویی مورد توجه پژوهشگران است. در این مقاله اثرات الیستورهای متیل‌جاسمونات و اسیدسالیسیلیک بر روی تولید تاکسول در ریشه‌های مویین ایجاد شده در سرخدار ایرانی بررسی می‌گردد. نویسندگان برای ایجاد ریشه‌های مویین در ریزنمونه‌های سرخدار از سه نژاد آگروباکتریوم ریزوژنز A4، R1000 و ATCC15834 استفاده کردند. نتایج نشان داد که فقط سویه A4 باعث ایجاد ریشه‌های مویین در ریزنمونه‌ها شده و بررسی PCR نشان داد ژن ریشه‌زایی آگروباکتریوم به ریزنمونه‌ها منتقل شده است. در عملیات واکشت ریشه‌های مویین، از سه غلظت ۱، ۱۰ و ۱۰۰ میکرومول متیل‌جاسمونات و اسید سالیسیلیک به صورت جداگانه و ترکیبی برای افزایش تولید پاکلی تاکسول مورد استفاده قرار گرفت. تجزیه و تحلیل انجام شده توسط کرماتوگرافی مایع با عملکرد بالا نشان داد که افزودن الیستورها به محیط کشت باعث افزایش میزان پاکلی تاکسول در ریشه‌های مویین می‌شود و بیشترین افزایش با افزودن ۱۰۰ میکرومول متیل‌جاسمونات به تنهایی بدست آمد که باعث افزایش ۵ برابری میزان تولید پاکلی تاکسول در ریشه‌های مویین گردیده است.

واژه‌های کلیدی: سرخدار، پاکلی تاکسول، ریشه‌های مویین، آگروباکتریوم ریزوژنز، الیستور

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱۴۴۷۱۳۰۹۲، پست الکترونیکی: hgohar129@pnu.ac.ir

مقدمه

فرایندهای حیاتی گیاهان ندارند، اما نقش شناخته شده‌ای در برهم‌کنش گیاه با محیط آن دارند و به عنوان مواد شیمیایی دفاعی گیاه عمل می‌کنند (۲۱). گیاهان باید با تهدیدات مستمر محیطی مانند حملات پاتوژن (قارچ‌ها، ویروس‌ها، حشرات، نماتدها) و شرایط فیزیکی سخت (خشکسالی، شوری، دما، قرار گرفتن در معرض اشعه ماوراء بنفش) مقابله کنند. گیاهان سیگنال‌های تهدید را از طریق گیرنده‌ها و حسگرهای خود تشخیص می‌دهند و پاسخ‌های دفاعی را برای تثبیت در برابر این تنش‌ها فعال می‌کنند. این پاسخ‌ها باعث تجمع متابولیت‌های ثانویه

گیاهان بخشی ضروری از رژیم غذایی روزمره ما را تشکیل می‌دهند و ارزش‌های غذایی آنها دهه‌ها به شدت مورد مطالعه قرار گرفته است. گیاهان عالی علاوه بر متابولیت‌های اولیه مهم مانند لیپیدها، کربوهیدرات‌ها و اسیدهای آمینه همچنین طیف گسترده‌ای از متابولیت‌های ثانویه مانند آلکالوئیدها، آنتوسیانین‌ها، فلاونوئیدها، کینون‌ها، لیگنان‌ها، استروئیدها و ترپنوئیدها را تهیه می‌کنند که در داروسازی، مواد شیمیایی کشاورزی، طعم دهنده‌ها، عطرها، رنگ‌ها، آفت‌کش‌های زیستی و افزودنی‌های غذایی استفاده می‌شوند. متابولیت‌های ثانویه گیاهی نقش مهمی در حفظ

تولید تاکسول در این گونه ایجاد نمایند. شرایط مطلوب برای بهبود تولید پاکلی تاکسول در سه سویه آگروباکتریوم ریزوژنز (R1000، 15384 و A4) برای القاء ریشه موین در این گونه مقایسه شد. در مجموع با روش‌های متفاوت آلودگی از طریق فرایندهای متداول واکشت یک دوره ۱۰ ماهه، زمان لازم بود که یک لینه ریشه موین پایدار و دارای رشد سریع برای تولید بوجود آید. این ریشه‌های موین تولید شده سطح بالایی از پاکلی تاکسول را در پاسخ به الیستور متیل جاسمونات (MJ)، نشان دادند که می‌تواند به عنوان یک منبع جایگزین برای تولید پایدار پاکلی تاکسول استفاده شود (۳۳). کشت‌های بدست آمده از تلقیح آگروباکتریوم ریزوژنز بر روی ریزنمونه‌های جوان در ترکیب با بیوراکتورها یک تکنیک قدرتمند اقتصادی است که از نظر محیطی برای تولید متابولیت‌های ثانویه ایمن است (۱۴)، در گذشته، بازدهی کمی برای کشت ریشه‌های موین با رویکردهای مرسوم گزارش شده است، اما با استفاده از فنولیک‌ها مانند استوسیرینگون (۲۵) و فراصوت با فرکانس پایین تحت یک محیط کنترل شده راندمان تبدیل را می‌توان افزایش داد و بنابراین از این فرایند در تولید کشت‌های ریشه موین در برخی از نهان‌دانگان استفاده شد (۲۹)، در پژوهشی دیگر تلاش برای توسعه کشت ریشه موین در یک گیاه از بازدانگان بنام سرخدار *Taxus baccata sub sp. wallichiana* که چندان به آسانی قابل کشت نیست با کمک فراصوت برای تولید زیست توده بیشتر در نتیجه افزایش تولید متابولیت ثانویه تاکسول صورت گرفت (۲۰). در این مقاله با توجه به بررسی‌های انجام شده در سرخدار ایرانی هنوز کاری در زمینه ایجاد ریشه‌های موین و تولید داروی ارزشمند تاکسول از طریق این ریشه‌ها صورت نگرفته است برای اولین بار در سرخدار ایرانی اقدام به ایجاد ریشه‌ها موین و بررسی اثرات الیستورها بر آنها و مقدار تولید تاکسول در این ریشه‌ها شد.

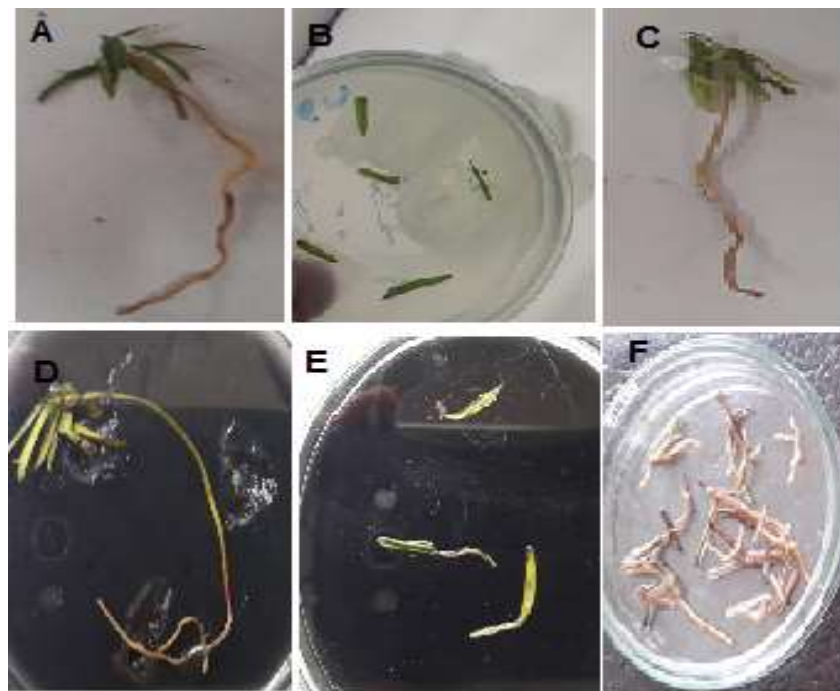
وجود دارد (۳۱). کشت‌های ریشه موین (HRCs) قادر به تولید ترکیبات پیچیده در مقیاس بالا هستند (۱۱ و ۲۶). در سال‌های اخیر، پژوهشگران و محققان زیادی ریشه‌های موین را در گیاهان دارویی برای تولید متابولیت‌های ثانویه مورد بررسی قرار داده‌اند (۳۳) فنوتیپ آنها براساس خصوصیات رشد نسبتاً سریع و بدون نیاز به هورمون‌های خارجی، نداشتن شاخه‌های جانبی، از دست دادن زمین‌گرایی، پایداری بیوشیمیایی و ژنتیکی مشخص می‌شود (۹) ریشه‌های موین برای تولید بیشتر متابولیت‌های ثانویه به دلیل پایداری ژنتیکی بهتر، نسبت به سایر روش‌های کشت آزمایشگاهی ارجحیت دارند (۱۷). میزان بیوستز متابولیت‌های ثانویه در ریشه‌های تراریخته، مبنای ژنتیکی دارد اما تحت تأثیر عوامل تغذیه‌ای (الیستورها) و محیطی نیز قرار می‌گیرد. ترکیب محیط کشت، رشد و تولید متابولیت‌های ثانویه را تحت تأثیر قرار می‌دهد. مقدار ساکارز، هورمون‌های رشد بیرونی، منبع نیتروژن و مقادیر نسبی آنها، نور، درجه حرارت و وجود مواد شیمیایی محرک یا باز دارنده، همگی می‌توانند رشد، مقدار بیوماس، و تولید متابولیت ثانویه را متأثر سازند (۳۲). براساس منابع بررسی شده ریشه‌های موین می‌تواند منبع جایگزین برای تولید تاکسان‌ها، سلول‌ها و بافت‌های گیاهی سرخدار که در آزمایشگاه کشت می‌شوند هستند (۲۳)، یکی از موارد انتقال ژن در گیاه سرخدار با آگروباکتریوم ریزوژنز توسط پالوت-کارکاسون (۱۹۹۴) انجام شد اما هیچ جزئیاتی در مورد تولید تاکسان و تعیین آن در کشت ریشه‌های موین در گونه‌های تاکسون ثبت نشده است. در پژوهشی دیگر ریشه‌های موین *Taxus × media* واریته *Hicksii* مورد بررسی قرار گرفت محتوای پاکلی تاکسل تعیین شده در این کشت در یک کیلوگرم ماده خشک ۶۱۹ میلی‌گرم بود. آنها اولین نتایج خود را در مورد بهینه‌سازی تولید پاکلی تاکسل ارائه دادند (۶). همچنین در پژوهشی دیگر در کره جنوبی بر روی سرخدار گونه *Taxus Sieb Et Zucc cuspidata* موفق شدند که ریشه‌های موین با توان مناسب

مواد و روشها

شامل عصاره گوشت ۵۰۰۰، عصاره مخمر ۱۰۰۰، پیتون ۵۰۰۰، سولفات منیزیم ۴۹۰۰، ساکارز ۵۰۰۰، آگار (زمانیکه محلول جامد بکار رفت) ۲۰۰۰۰، میلی‌گرم در لیتر (mg l⁻¹) کشت شدند از آب مقطر دوبار استریل برای آماده سازی محیط استفاده شد و pH با استفاده از سود ۰/۱ نرمال یا اسید کلریدریک ۰/۱ نرمال روی ۷ تنظیم شد. اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱/۱ کیلوگرم بر سانتی مترمربع به مدت ۱۵ دقیقه انجام شد. باکتری‌ها را در محیط مایع YEP برای ۲۴ ساعت روی شیکر قرار دادیم محتوای پلیت را با سرعت ۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ نمودیم و کشت را با ۰/۲ O.D. در ۲۶۰ نانومتر پس از حل کردن انتخاب نمودیم اکنون باکتری‌ها برای تلقیح آگروباکتریوم بر روی ریزنمونه های سرخدار آماده بودند.

تهیه بذور و استریل نمودن: بذور سرخدار مورد استفاده این پژوهش از جنگل‌های شمال کشور ایران از طریق موسسه جنگل‌ها و مراتع کشور تهیه شد. ابتدا بذور را شستشو دادیم و سپس تیمار یک دقیقه‌ای با اتیل الکل ۷۰ درصد (v/v) و سپس تیمار ۲۰ دقیقه‌ای با هیپو کلرید سدیم ۱/۵ درصد (w/v) اعمال نمودیم سپس با آب مقطر استریل در زیر لامینار جریان هوای آرام سه بار شسته شد و سپس بر روی محیط‌های کشت MS $\frac{1}{2}$ کاشته شدند تا گیاهان تازه بدست آوریم.

تلقیح باکتری: پس از تهیه گیاهان تازه از باکتری *Agrobacterium rhizogenes* سویه‌های A4، R1000 و ATCC15834 برای تلقیح نمونه‌ها استفاده شد. سویه‌های باکتری در محیط کشت YEP (yeast extract peptone) که



شکل ۱- القای ریشه موئین به گیاهچه های *L. baccata* (A): نهال ۳ ماهه حاصل از کشت جنین. (B): تلقیح برگ‌ها توسط *A. rhizogenes* (C): تلقیح، نهال‌ها توسط *A. rhizogenes* (D): ریشه موئین تازه تشکیل شده بعد از سه ماه در گیاهچه‌ها (E): ریشه موئین ایجاد شده در برگ‌ها بعد از سه تا چهار ماه بعد از عفونت *A. rhizogenes* (F): ریشه‌های موئین جدا شده برای تجزیه و تحلیل کرماتوگرافی مایع با عملکرد بالا HPLC.

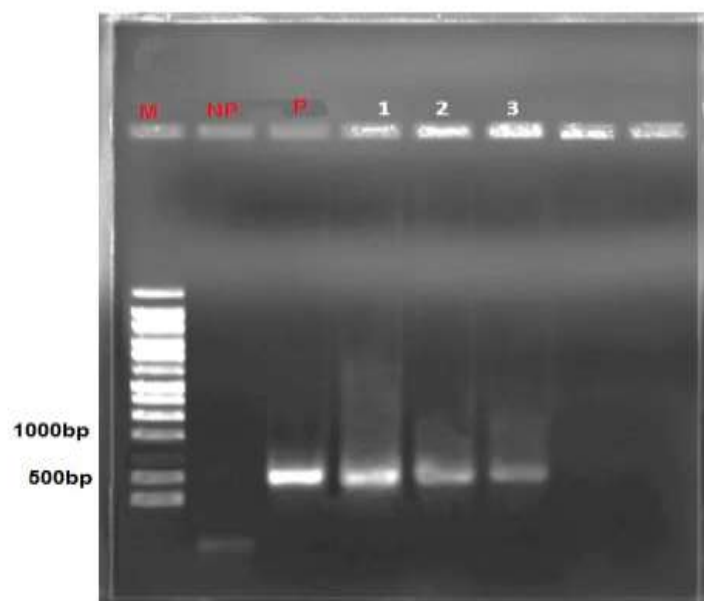
DNA پلاسمید جدا شده بود و بعنوان شاهد مثبت بکار گرفته شد. بعد از جداسازی DNA های مربوطه اقدام به طراحی پرایمرهای اختصاصی ژن Rol B شد. آغازگرها از شرکت سیناژن ایران تهیه شد. پرایمر فرورارد قطعه ۵۰۰ جفت بازی ژن RolB دارای توالی 3' -ATCCAATCACAATGG-5' و پرایمر معکوس این ژن دارای توالی 3' -TTCTAAATCAGGTTCTCCG-5' بود و برای ارزیابی از نشانگر یک کیلوبایتی استفاده شد Mix PCR در هر لوله با حجم ۲۵ میکرولیتر ۱۰۰ میلی مول پرایمر، ۵۰ نانوگرم در میلی‌لیتر DNA و ۱ واحد Taq پلیمرز تهیه شد. و ۳۵ سیکل انجام شد (۹۴ درجه سانتیگراد برای ۴۵ ثانیه، ۷۲ درجه سانتیگراد برای ۴۵ ثانیه)، محصولات تکثیر شده با الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۰/۸ درصد مشاهده شد (شکل ۲). بعد از مشاهده ریشه‌های موئین اولیه در زمان واکنش آنها در محیط WPM در قالب یک طرح کاملاً تصادفی با ۱۰ تیمار (جدول ۱) که شامل سه سطح متیل جاسمونات و اسید سالسیلیک ۱، ۱۰ و ۳۰ میکرو مول بصورت جداگانه و ترکیب با هم و بدون الیستور در سه تکرار بر افزایش تاکسول مورد بررسی قرار گرفت.

جدول ۱- تیمارهای بکار رفته برای بررسی اثر متیل جاسمونات و اسید سالسیلیک بر افزایش میزان پاکلی تاکسل در ریشه‌های موئین سرخدار (*Taxus baccata*.sp)

شماره تیمار	متیل جاسمونات Mμ	اسید سالسیلیک μM
۱	۱	-
۲	۱۰	-
۳	۱۰۰	-
۴	-	۱
۵	-	۱۰
۶	-	۱۰۰
۷	۱	۱
۸	۱۰	۱۰
۹	۱۰۰	۱۰۰
۱۰	-	-

روش‌های مختلفی را برای القاء می‌توانیم بکار بگیریم، که ما از دو روش استفاده نمودیم که شامل روش عفونت مستقیم، که در آن ریزنمونه‌های زخمی توسط یک اسکلیپر آغشته به آگروباکتریوم ریزوژنز آلوده شد و روش واکنش مایع که در آن نهال زخمی بار دیگر همراه با آگروباکتریوم ریزوژنز به مدت ۲۴ ساعت در یک محیط مایع واکنش شدند. بعد از تلقیح ریزنمونه‌ها به صورت تازه به محیط کشت $\frac{1}{2}$ MS (عناصر ماکرو نصف مقدار اصلی بکار رفتن) حاوی ۰/۵ گرم در لیتر آنتی بیوتیک سفوتاکسیم برای حذف باکتری‌های اضافی باقیمانده روی بافت‌ها انتقال یافتند و هر هفته محیط کشت آنها تازه شد و سفوتاکسیم اضافه شد تا زمانی که نشانه‌ای از رشد آگروباکتریوم در آنها مشاهده نشد. پس از آن، گیاهچه‌ها دوباره به مدت ۳ هفته در محیط کشت تازه WPM که فاقد سفوتاکسیم و تنظیم کننده‌های رشد گیاهی واکنش شدند. کشت‌ها در یک محیط تاریک برای ۳ هفته اول نگهداری شدند، و سپس شرایط به چرخه نوری ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی در ۲۵ درجه سانتیگراد تغییر یافت. دوباره واکنش‌ها ادامه می‌یابد این فرایند را سه ماه ادامه دادیم تا لاین‌های مختلف ریشه موئین پایدار ایجاد گردند (شکل ۱).

آزمایش PCR برای تأیید ماهیت تراریختی: برای تأیید صحت انتقال ژن‌های ریشه‌زایی *Rol B* باکتری آگروباکتریوم ریزوژنز در ریشه‌های موئین بدست آمده باید وجود ژن ریشه‌زایی با تجزیه و تحلیل PCR در ریشه‌های موئین تأیید می‌شد. ابتدا DNA از ریشه گیاه و ریشه موئین با استفاده از کیت جداسازی DNA تهیه شده از شرکت آزما ژن استخراج شد. DNA ریشه گیاه به عنوان شاهد منفی که دارای ژن *Rol B* نمی‌باشد و DNA ریشه موئین به عنوان نمونه آزمایشی که در صورت مشابهت بانندی با شاهد منفی می‌تواند دلیل بر عدم انتقال ژن باشد و همچنین DNA پلاسمید باکتری بوسیله کیت جداسازی



شکل ۲- تأیید انتقال ژن‌های ریشه‌زایی از آگروباکتریوم ریزوژنز به ریشه‌های مویین بدست آمده توسط PCR. M مارکر هزار جفت باز DNA است DNA NP ریشه گیاه بدون تلقیح است. P. DNA پلاسمید باکتری است. ۱، ۲، ۳ DNA نمونه‌های ریشه مویین که بطور تصادفی انتخاب شدند

کنوئر آلمان (Knauer)، نشانگر (Knauer, -uv k2501 227nm) ستون C18 (4.6cm * 25cm* 5µm) استفاده شد. سرعت جریان یک میلی‌لیتر بر دقیقه، دما ۲۵ درجه سلسیوس و مقدار نمونه تزریق شده ۲۰ میکرولیتر بود. پیک‌ها در طول موج ۲۳۰ نانومتر نمایان شدند که شناسایی آنها با مقایسه زمان خروج پیک با استانداردهای تاکسان‌ها صورت پذیرفت در نهایت براساس سطح زیر پیک نمونه و تطابق آن منحنی تنظیم مقدار غلظت تاکسول در محلول اندازه‌گیری شد. لازم به ذکر است که استانداردها بر اساس منابع انتخاب شدند (۲۰ و ۶)

نتایج و بحث

برای بالا بردن احتمال انتقال ژن ریشه‌زایی توسط آگروباکتریوم و همچنین به علت اینکه دانه‌های سرخدار به سختی جوانه می‌زنند از کشت جنین برای تولید نهال استفاده شد تا بتوانیم نهال‌های جوان بدست آوریم. سپس قطعاتی از برگ‌های این نهال‌ها به اندازه ۱ سانتیمتر مربع و همچنین هیپوکوتیل نهال‌های جوان با دو روش ذکر شده با سویه‌های R1000، A4 و ATCC15834 آلوده شدند. از میان این سه سویه فقط سویه A4 به طور موفقیت آمیز در

الیستورها بعد از تهیه محیط کشت و اتوکلاو آنها در زیر لامینار بعد از عبور از فیلتر به محیط‌های کشت اضافه شد. بعد از ثبت نتایج توسط نرم افزار اکسل و spss تجزیه واریانس داده‌ها انجام شد تا اختلاف واقعی بین تیمارها مشخص گردد و برای کم کردن اشتباه نوع اول و دوم و بالا بردن درصد صحت از مقایسه میانگین‌ها در سطح یک درصد استفاده شد.

آنالیز ریشه‌های بدست آمده از طریق HPLC : برای آنالیز ریشه مویین و مشخص نمودن حضور تاکسول در این ریشه‌ها اقدام به آنالیز آنها از طریق HPLC نمودیم. جهت استخراج تاکسان ابتدا نمونه‌های جدا شده را ۲۴ ساعت در فریز درایر قرار دادیم تا خشک شوند. بعد از پودر نمودن آنها سپس در ترکیب متانول آب به نسبت ۹:۱ قرار گرفتند و ۱۶ ساعت شیک گردیدند. پس از عبور از کاغذ صافی و فیلتر شدن ۴۰ میلی‌لیتر دی‌کلرومتان روی محلول بدست آمده افزوده شد با استفاده از قیف جداکننده فاز دی‌کلرومتان از فاز آبی جدا شد و در روتاری تیخیر شد و عصاره خشک باقیمانده در یک میلی‌لیتر استونیتریل حل شد. برای آنالیز نمونه‌ها از دستگاه کروماتوگرافی مایع (HPLC)

ریشه‌های موئین از میان نمونه‌های بدست آمده انتخاب شد اقدام به تجزیه و تحلیل PCR از آنها نمودیم. پس از الکتروفورز DNAهای استخراج شده تایید شد که باندهای مشابهی را در DNA ریشه موئین نمونه مانند DNA پلاسمید باکتری که بعنوان کنترل مثبت بکاربرده بودیم در برابر قطعه *Rol B* نشان داد در حالیکه این باند در DNA ریشه گیاه بعنوان کنترل منفی (بدون آلودگی آگروباکتریوم) وجود ندارد. این باندهای مشاهده شده ترانسفورمسیون ریشه‌های موئین و انتقال ژن ریشه‌زایی را تایید می‌کرد (شکل ۲). ریشه‌های موئین پس از اعتبارسنجی PCR به مدت سه ماه برای رشد بیشتر به محیط کشت WPM منتقل شدند. محتوای پاکلی تاکسل در ریشه‌های موئین سه ماه که حاوی مقادیر مختلف متیل جاسمونات و اسید سالسیلیک بودند مورد بررسی و مقایسه قرار گرفتند که پس از تجزیه واریانس و مقایسه میانگین‌ها از طریق آزمون چند دامنه دانکن نتایج زیر بدست آمد (جدول ۲ و شکل ۳).

پس از اعتبارسنجی PCR به مدت سه ماه برای رشد بیشتر به محیط کشت WPM منتقل شدند. محتوای پاکلی تاکسل در ریشه‌های موئین سه ماه که حاوی مقادیر مختلف متیل جاسمونات و اسید سالسیلیک بودند مورد بررسی و مقایسه قرار گرفتند که پس از تجزیه واریانس و مقایسه میانگین‌ها از طریق آزمون چند دامنه دانکن نتایج زیر بدست آمد (جدول ۲ و شکل ۳).

جدول ۲- تجزیه واریانس اثر تیمار مقادیر مختلف متیل جاسمونات و

اسید سالسیلیک بر میزان تاکسول در ریشه‌های موئین

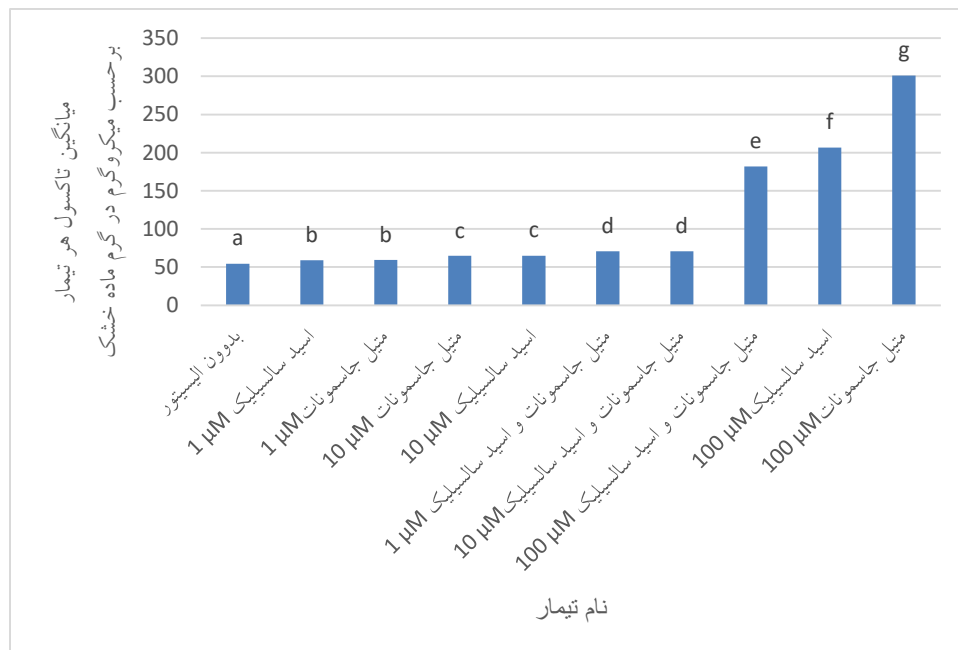
منبع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات (MS)
تیمار	۹	۶۲۲۸/۰۹**
خطا	۲۰	۴/۰۲
ضرب		۵/۳۰
تغییرات CV		

** : معنی دار در سطح احتمال ۱ درصد

ریزنمونه‌ها در هر دو روش بکار گرفته شده ایجاد ریشه‌های موئین نمود. اما دو سویه دیگر از باکتری که در این پژوهش استفاده شد هیچگونه ریشه‌ای ایجاد ننمودند و لذا در ادامه کار مورد بررسی قرارنگرفتند. براساس این نتایج مشخص گردید که ممکن است بعضی از سویه‌های آگروباکتریوم ریزوژن برای تبدیل و القاء ریشه‌های موئین در سرخدار موفقیت آمیز باشند و برخی سویه‌ها قادر به این کار نیستند پس در قدم اول باید سویه‌ای مناسب باتوجه به گونه سرخدار بکار بگیریم در مطالعات قبلی انجام شده، از سویه آگروباکتریوم ریزوژن *LBA9402*، برای ترانسفورمسیون گیاهچه‌های سرخدار برای ایجاد ریشه‌های موئین در *Taxus * media var. Hicksii* استفاده شد (۹). در مطالعه‌ای دیگر برای ایجاد ریشه‌های موئین در *Taxus cuspidata* از سه سویه آگروباکتریوم *ATCC 15834*، *R1000* و *A4* استفاده شد و فقط دو سویه *ATCC 15834*، *R1000* ایجاد ریشه‌های موئین نمودند این ریشه‌ها با ریشه‌های طبیعی *T. cuspidata* از نظر تعداد ریشه‌های نابجا و شکل متفاوت بودند. حتی در فقدان *IBA*، به عنوان هورمون اکسین، رشد می‌کنند، و حاوی بسیاری از شاخه‌های جانبی می‌شوند. در این پژوهش تقریباً در ۲۶ درصد از نهال‌ها ریشه‌های موئین ایجاد شدند. بااین حال، بیشتر ریشه‌های موئین جدید بدست آمده از این ترانسفورمسیون به عنوان ریشه کامل نمی‌توانند رشد کنند (۳۳). علت رشد نکردن مناسب ریشه‌های موئین شاید این باشد که زمانیکه ژن *rol* انتقال می‌یابد ممکن است ژن تکمیل‌کننده این مسیر تکاملی را خاموش کند (۲۴). بسته به جایگاه ورود *T-DNA* به ژنوم گیاه میزبان، توان ریشه‌های موئین در تولید متابولیت ثانویه متفاوت است. مشخص شده است ریشه‌های موئین از نظر ژنتیکی پایدار بوده و اکتش آنها آسان می‌باشد. با این وجود، ریشه‌های موئین هتروژن هستند و به نظر می‌رسد که به منظور دستیابی به لاین‌هایی از ریشه‌های موئین که دارای تولید بالایی باشند لازم است که عمل انتخاب چند بار انجام شود (۱۳). سه نمونه از

میکرومول متیل جاسمونات، بیشترین (تقریباً ۲۸ برابر) افزایش تولید پاکلی تاکسل را به همراه داشت (۲۷)، کاربرد اسید سالیسیلیک بر افزایش ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی در سوسپانسیون سلولی گیاه دارویی اسطوخودوس نشان داد که ۱۲ میلی گرم در لیتر از آن به مدت ۷۲ ساعت باعث افزایش ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی به ترتیب تا ۳/۵ و ۳ برابر می شود (۱). همچنین در بررسی متیل جاسمونات و اسید سالیسیلیک بر گیاه دارویی شنبلیله مشخص شد که بیان ژن‌های کلیدی مسیر بیوسنتزی دیوسژنین تغییر می یابد و بخصوص متیل جاسمونات باعث افزایش تولید دیوسژنین می شود (۲) البته نیاز به بررسی بیشتر است، که زمان بکارگیری ایستورها بر افزایش تولید تاکسول موثر است یا خیر؟ با بررسی بکارگیری در سنین مختلف ریشه‌های مویین و زمان باقی ماندن ایستور در محیط کشت می توان به آنها دست یافت. سپس برای مشخص شدن اینکه کدام ایستور بیشترین تأثیر را نسبت به شاهد و سایر تیمارها داشته است بررسی میانگین‌ها توسط آزمون چند دامنه ای دانکن انجام شد (شکل ۳).

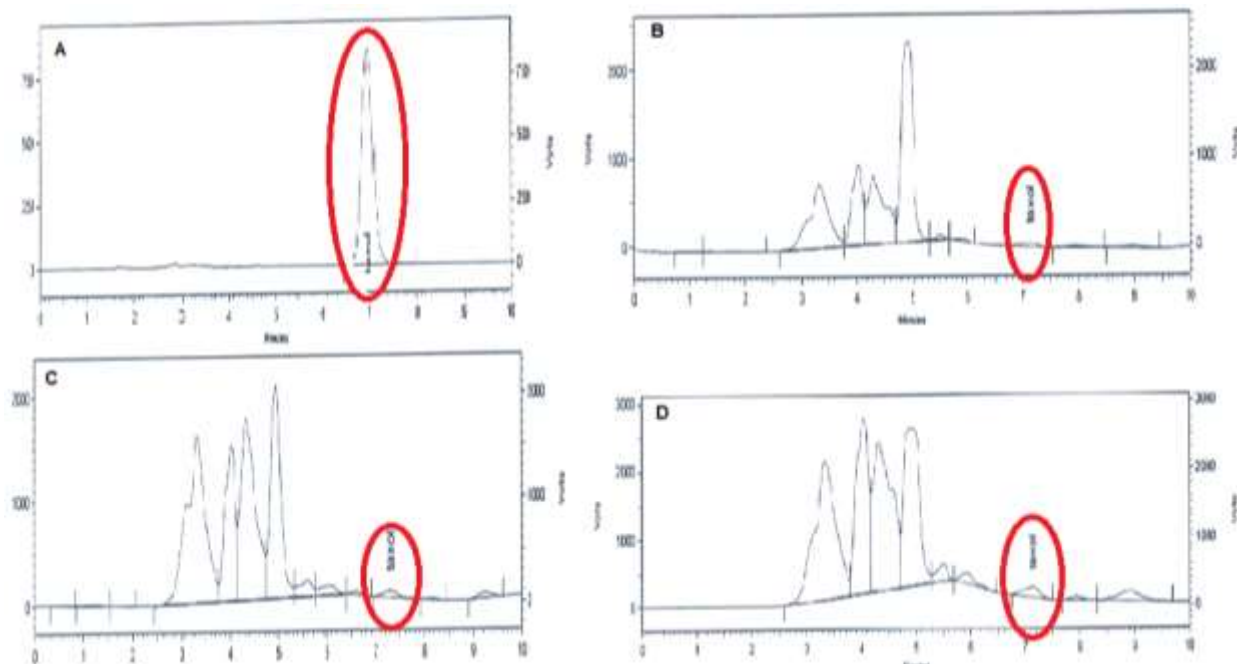
مطابق نتایج جدول ۲ بکارگیری ایستور متیل جاسمونات و اسید سالیسیلیک بر میزان تاکسول موثر بوده و در سطح ۱ درصد معنی دار گردیده است و این نشان دهنده تأثیر مثبت و موثر این ایستورها بر افزایش تاکسول در ریشه‌های مویین است. اثر سودمند در مطالعات مختلف بکارگیری پیش سازها و ایستورها بر پاکلی تاکسل و تجمع تاکسان‌های مرتبط در کشت سلولی سرخدار به خوبی مستند شده است به نظر می رسد امیدوارکننده باشد (۱۹) در مطالعات انجام شده ژونگ مشخص نمود که بکارگیری پیش سازها و ایستورها به طور موثر تولید تاکسان‌ها و تجمع آنها را در هر دو کشت کالوس و سوسپانسیون سلولی گونه‌های تاکسوس تحریک می کند (۳۵)، کاتارزینا سیکلوسکا و همکاران نیز در بررسی خود اثرات ال-فنیل آلانین (PHE) و p-آمینو بنزوئیک اسید (PAB) را به تنهایی یا در ترکیب با متیل جاسمونات بر رشد ریشه مویین و تولید تاکسان بررسی نمودند و مشخص گردید بیشترین افزایش زیست توده خشکی پس از ۴ هفته کشت ریشه‌های مویین در حضور ترکیبات پیش ساز در مقایسه با شاهد مشاهده شد. با این حال، ترکیب ۱۰۰ میکرومولار فنیل آلانین با ۱۰۰



شکل ۳- نمودار مقایسه میانگین تیمارها با مقادیر مختلف متیل جاسمونات و اسید سالیسیلیک توسط آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح ۱ درصد حروف مشترک نشان دهنده نداشتن اختلاف معنی دار بین دو تیمار است

السیستورهای بکارگرفته شده باشد زیرا در این تیمار ۲۰۰ میکرومول السیستور بکار رفته است و احتمال اینکه پیشنهاد دوم درست تر باشد بیشتر است زیرا وقتی این تیمار با سایر تیمارها مقایسه شد مشخص گردید که این تیمار میزان تاکسول را نسبت سایر تیمارهایی که بصورت ترکیبی اما با مقدار کمتر السیستور بکار گرفته شده افزایش تاکسول بیشتری را بوجود آورده است در بررسی سایر تیمارها مشاهده شد که اختلاف افزایش تاکسول در تیمارهایی با میزان السیستور یکسان متیل جاسمونات و اسیدسالسیلیک مانند تیمارهای ۴ و ۵ تیمارهای ۲ و ۷ و اختلافاً معنی داری بین آنها مشاهده نشد، اما با شاهد دارای اختلاف معنی داری بودند بطور کلی بکارگیری پس از بررسی گرافهای حاصل از آنالیز کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC) (شکل ۴) نشان داد الیستورها در افزایش تاکسول در ریشه ای موثر است اما تعیین دقیق مقدار السیستور و نوع السیستور و سن گیاه و زمان در معرض قرار گرفتن السیستور بر میزان این افزایش می تواند موثر باشد.

مطابق نمودار مقایسه میانگین تیمارها تمام تیمارها با شاهد (بدون السیستور) در میزان تاکسول اختلاف معنی دار داشتند و این نشان می دهد که بکارگیری الیستورها تأثیر مثبت در تولید تاکسول در ریشه های موین دارد و بیشترین تأثیر در تیمار شماره ۳ هنگامی که ۱۰۰ میکرومول متیل جاسمونات بکار گرفته شد میزان تاکسول بیش از ۵ برابر افزایش یافت و این نتیجه می تواند افق روشنی برای تولید تجاری این گیاه دارویی با ارزش باشد در تیمار ۶ که ۱۰۰ میکرومول اسید سالسیلیک به تنهایی بکار برده شد نیز اختلاف معنی داری در میزان تاکسول با شاهد نشان داد اما این تیمار در جایگاه دوم مقدار تاکسول بعد از آنالیز HPLC در این بررسی نشان داد و کمتر از تیمار ۳ بود به همین علت در این بررسی نتیجه گیری شد که تأثیر متیل جاسمونات بر افزایش تاکسول ریشه های موین سرخدار ایرانی بیشتر است اما در تیمار ۹ که متیل جاسمونات و اسید سالسیلیک بصورت ترکیبی و هر را به مقدار ۱۰۰ میکرومول بکار گرفته شد باعث افزایش تاکسول شد اما میزان آن پایین تر از دو تیمار ۳ و ۶ بود که می تواند اثر تداخلی این دو الیستور باشد یا اینکه بالا بودن مقدار



شکل ۴- کروماتوگرافهای تجزیه و تحلیل کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا HPLC شکل A: استاندارد تاکسول شکل B: شاهد شکل C: تیمار ۶ تیمار

D: تیمار ۳

استفاده نمودیم که پیشنهاد می‌گردد از سویه‌های دیگر این باکتری نیز استفاده شود و اثر آنها در ایجاد ریشه‌های موین مورد بررسی و مطالعه قرارگیرد و اثرات الیستورهای دیگر نیز مورد بررسی قرارگیرد.

سپاسگزاری

در پایان جا دارد که از ریاست دانشگاه پیام نور مرکز تهران شرق سرکار خانم دکتر نصری و مسئول آزمایشگاه سرکار خانم مظفری و کارشناس آزمایشگاه سرکار خانم بدری برای همکاری و مساعدت در اجرای این پروژه با بنده کمال تشکر و قدردانی را داشته باشم.

بررسی سایر منابع نیز این موضوع را تأیید می‌نماید (۱۹)، ۲۷ و ۳۵).

در پایان نتیجه‌گیری شد که سویه مناسب آگروباکتریوم ریزوژنز مناسب برای ایجاد ریشه‌های موین در ریزنمونه‌های سرخدار ایرانی سویه A4 می‌باشد و برای نگهداری و توسعه این ریشه‌ها از محیط کشت 1/2 MS و WPM می‌توان استفاده نمود و برای افزایش محتوی تاکسول و افزایش تولید تاکسول استخراجی از این ریشه‌های موین بدست آمده می‌توان با بکارگیری الیستور متیل جاسمونات به میزان ۱۰۰ میکرومول میزان تاکسول را ۶ برابر افزایش داد البته لازم به یاد آوری است در این پژوهش ما فقط از سه سویه R1000، A4 و ATCC15834

منابع

- ۱- علیرضایی، ف.، و کیارستمی، خ.، ۱۳۹۹، بررسی اثر سالیسیلیک اسید بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی در کشت سوسپانسیون سلولی گیاه اسطوخودوس (*angustifolia* Mill) (*Lavandula*)، مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی (مجله زیست‌شناسی ایران)، جلد ۳۳، شماره ۳، صفحات ۳۱۱-۳۰۲.
- ۲- لطفی، م.، معروفی، ا.، اسماعیلی، ا.، و دستان، د.، ۱۴۰۰، بررسی بیان ژن‌های کلیدی بیوسنتز دیوسژنین در گیاه دارویی شنبلیله (*Trigonella Foenum graecum*) در پاسخ به سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات، مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی (مجله زیست‌شناسی ایران) جلد ۳۴، شماره ۳، صفحات ۴۵۴-۴۴۰.
- 3- Chilton, M.D., Tepfer, D.A., Petit, A., David, C., Casse Delbart, F., and Tempé, J., 1982. Agrobacterium rhizogenes inserts T-DNA into the genomes of the host plant root cells, *Nature* 295, PP: 432-434. doi: 10.1038/295432a0
- 4- Doran, P.M., 2013. Biotechnology of hairy root systems. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 134, PP: 91-114. doi: 10.1007/978-3-642-39019-7.
- 5- Expósito, O., Bonfill, M., Moyano, E., Onrubia, M., Mirjalili, M.H., Cusidó, R.M., and Palazón, J., 2009, Biotechnological Production of Taxol and Related Taxoids: Current State and Prospects, 9, PP: 109-121. doi: [10.2174/187152009787047761](https://doi.org/10.2174/187152009787047761).
- 6- Furmanowa, M., and Syklowska-Baranek, K., 2000, Hairy root cultures of *Taxus _ media* var. *Hicksii* Rehd. as a new source of paclitaxel and 10-deacetylbaccatin III, *Biotechnology Letters*, 22, PP: 683-686. doi.org/10.1023/A:1005683619355.
- 7- Gelvin, S.B., 2009. Agrobacterium in the genomics age. *Plant Physiol*, 150, PP: 1665-1676. doi: 10.1104/pp.109.139873.
- 8- Gomez-Galera, S., Pelacho, A.M., Gene, A., Capell, T., and Christou, P., 2007, The genetic manipulation of medicinal and aromatic plants, *Plant Cell Reports*, 26, PP: 1689-1715. doi: [10.1007/s00299-007-0384-X](https://doi.org/10.1007/s00299-007-0384-X)
- 9- Guillon, S., Tremouillaux-Guiller, J., Pati, P.K., Rideau, M., and Gantet, P., 2006, Hairy root research: recent scenario and exciting prospects, *Curr Opin Plant Biology*, 9, PP: 341-346. doi: [10.1016/j.pbi.2006.03.008](https://doi.org/10.1016/j.pbi.2006.03.008).
- 10- Gutierrez-Valdes, N., Häkkinen, S.T., Lemasson, C., Guillet, M., Kirsi-Marja Oksman-Caldentey, K. M., Ritala, A., and Cardon, F., 2020. Hairy Root Cultures—A Versatile Tool With Multiple Applications, doi: 10.3389/p/fpls.2020.00033.
- 11- Häkkinen, S.T., and Ritala, A., 2010. Medicinal compounds produced in plant cell factories Medicinal plant biotechnology. Ed. R. Arora

- (Oxfordshire, U. K.: CABI Publishing), PP: 13–35. doi: 10.1079/9781845936785.0013.
- 12-Horwitz, S.B., 2004. Personal recollections on the early development of taxol, *Journal of Natural Products* 67 (2), PP: 136– 138. doi: 10.1021/np0304464.
- 13-Hu, Z.B., and Du, M., 2006. Hairy root and its application in plant genetic engineering *Journal of Integrative Plant Biol.* 48, PP: 121 - 127. doi: [10.1111/j.1744-7909.2006.00121.X](https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2006.00121.X).
- 14-Jeong, G.T., and Don-Hee, P., 2017. Mass Production of Transformed Hairy Root for Secondary Metabolites: A Case Study of Panax ginseng Hairy Roots. In *Production of Plant Derived Natural Compounds through Hairy Root Culture*, PP: 183-201. Springer, Cham. doi: 10.1007/978-3-319-69769-7_10.
- 15-Kunwar, R.M., Rimal, B., Sharma, H.P., Poudel, R.C., Pyakurel, D., Tiwari, A., Magar, S.T., Karki, G., Bhandari, G.S., Pandey, P., and Bussmann, R.W., 2020. Distribution and habitat modeling of *Dactylorhiza hatagirea* (D. Don) Soo, *Paris polyphylla* Sm. and *Taxus* species in Nepal Himalaya, *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants* doi.org/10.1016/j.jarmap.2020.100274.
- 16-Mauro, M.L., Costantino, P., and Bettini, P.P., 2017. The never ending story of rol genes: a century after. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 131, PP: 201–212. doi: [10.1007/s11240-017-1277-5](https://doi.org/10.1007/s11240-017-1277-5).
- 17-Nakano, Y., 2017. Effect of acetosyringone on agrobacterium-mediated transformation of eustoma grandiflorum leaf disks, *Japan Agricult. Res. Quarter, JARQ* 51 (4), PP: 351–355. doi: 10.6090/jarq.51.351.
- 18-Oberlies, N.H., and Kroll, D.J., 2004. Camptothecin and taxol: historic achievements in natural products research. *Journal of Natural Products* 67 (2), PP: 129– 135. doi: 10.1021/np030498t.
- 19-Pinol, M.T., Cusido, R.M., Palazo, N.J., Bonfill, M., 2007. In: Pua EC, Davey MR, editors. *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, PP: 205–23.
- 20-Pragati, S., and Vimlendu Bhushan, S., 2021. Development of hairy root culture in *Taxus baccata* sub sp *wallichiana* as an alternative for increased Taxol production, *Materials Today: Proceedings*, [https://doi.org/10.1016/j.matpr, 03,407 p](https://doi.org/10.1016/j.matpr.2021.03.407).
- 21-Ramakrishna, A., and Ravishankar, G.A., 2011. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signaling and Behavior* 6 (11), PP: 1720–1731. doi: 10.4161/psb.6.11.17613.
- 22-Schiff, P.B., Fant, J., and Horwitz, S.B., 1979. Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. *Nature* 277 (5698), PP: 665– 667. doi: [10.1038/277665a0](https://doi.org/10.1038/277665a0).
- 23-Sevon, N., and Oksman-Caldentey, K.M., 2002. Agrobacterium rhizogenes-mediated transformation: Root cultures as a source of alkaloids, *Planta Med*, 68, PP: 859-868. doi: 10.1055/s-2002-34924.
- 24-Sinkar, V.P., Frank, F., White, F.F., Furner, I. J., Abrahamsen, M., Pythoud, F., and Gordon, M.P., 1988. Reversion of Aberrant Plants Transformed with Agrobacterium rhizogenes Is Associated with the Transcriptional Inactivation of the TL-DNA Genes, *Plant Physiology*, Vol. 86, No. 2, PP: 584-590. doi: 10.1104/pp.86.2.584.
- 25-Srivastava, M., Singh, G., Sharma, S., Shukla, S., and Misra, P., 2019. Elicitation enhanced the yield of glycyrrhizin and antioxidant activities in hairy root cultures of *Glycyrrhiza glabra* L., *Journal Plant Growth Regul*, 38 (2), PP: 373–384. doi: 10.1007/s00344-018-9847-2.
- 26-Stoger, E., Fischer, R., Moloney, M., and Ma, J.K.C., 2014. Plant molecular pharming for the treatment of chronic and infectious diseases. *Annu. Rev. Plant Biology*, 65, PP: 743–768. doi: 10.1146/annurev-arplant-050213-035850.
- 27-Syklowska-Baranek, K., Pietrosiuk, A., Kokoszka, A., and Furmanowa, M., 2009. Enhancement of taxane production in hairy root culture of *Taxus x media* var. *Hicksii*, *Journal of Plant Physiology*, 166, PP: 1950—1954 doi: [10.1016/j.jplph.2009.05.001](https://doi.org/10.1016/j.jplph.2009.05.001).
- 28-Thakur, M., Bhattacharya, S., Khosla, P.K., and Puri, S., 2019. Improving production of plant secondary metabolites through biotic and abiotic elicitation, *journal of applied research on medicinal and aromatic plants*, 12, PP: 1-12, doi: [10.1016/j.jarmap.2018.11.004](https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2018.11.004).
- 29-Thilip, C., Soundar Raju, C., Varutharaju, K., Aslam, A., and Shajahan, A., 2015. Improved Agrobacterium rhizogenes-mediated hairy root culture system of *Withaniasomnifera* (L.) Dunal using sonication and heat treatment, *3 Biotech*, 5 (6), PP: 949–956. doi: [10.1007/s13205-015-0297-2](https://doi.org/10.1007/s13205-015-0297-2).
- 30-Wall, M.E., and Wani, M.C., 1996. Camptothecin and taxol: from discovery to clinic. *Journal of Ethnopharmacology* 51 (1– 3), PP: 239– 254. doi: [10.1016/0378-8741\(95\)01367-9](https://doi.org/10.1016/0378-8741(95)01367-9).

- 31-Wang, J.W., and Wu, J.Y., 2013. Effective elicitors and process strategies for enhancement of secondary metabolite production in hairy root cultures. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 134, PP: 55-89. doi: 10.1007/10_2013_183.
- 32-Wicremesinha, E.R.M., and Arteca, R.N., 1993. Taxus callus cultures: initiation, growth optimization, characterization and taxol production. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 35, 181. doi.org/10.1007/BF00032968.
- 33-Xu, H., Kim, Y.K., Suh, S.Y., Uddin, M.R., Lee, S.Y., and Park, S.U., 2008. Decursin production from hairy root culture of *Angelica gigas*. *Journal Korean Society Appl Biology Chemistry* 51, In press. doi:10.3839/jksabc.2008.062.
- 34-Yukimune, Y., Tabata, H., Higashi, Y., and Hara, Y., 1996. Methyl jasmonate induced over production of paclitaxel and baccatin III in *Taxus* cell suspension cultures, *Nat, Biotechnol.*, 14, 1129 p. doi.org/10.1038/nbt0996-1129.
- 35- Zhong, J.J., 2002. Plant cell culture for production of paclitaxel and other taxanes. Review, *Journal Biosci Bioeng.* 94, PP: 591-599, Doi:10.1263/jbb.94.591.

Increasing taxol production in hairy roots formed in Iranian yew (*Taxus baccata.sp.*)

Goharchini H.^{1,2}, Bagheri Kh.¹ and Zamani M.R.³

¹ Dept. of Genetics and Plant Products, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, I.R. of Iran

² Dept. of Agriculture, Payame Noor University, Tehran, I.R. of Iran

³ Noor e Danesh Institute of Higher Education, Mimeh, Isfahan, I.R. of Iran

Abstract

Taxol is one of the most important anti-cancer drugs that can be extracted from the yew tree. Today, the production of herbal medicines through the formation of hairy roots in many medicinal plants is of interest to researchers. In this article, the effects of methyl jasmonate and salicylic acid elicitors on the production of taxol in the hairy roots created in Iranian yew are investigated. The authors used three strains of *Agrobacterium rhizogenes* A4, R1000 and ATCC15834 to create hairy roots in yew explants. The results showed that only A4 strain caused the formation of hairy roots in the explants and PCR analysis showed that the *Agrobacterium* rooting gene was transferred to the explants. In the process of growing hairy roots, three concentrations of 1, 10 and 100 micromoles of methyl jasmonate and salicylic acid were used separately and in combination to increase paclitaxel production. The analysis performed by high-performance liquid chromatography showed that the addition of elicitors to the culture medium increases the amount of paclitaxel in the hairy roots, and the greatest increase was obtained by adding 100 μmol of methyl jasmonate alone, which increased the amount of production by 5 times. Paclitaxel is absorbed in hairy roots.

Key words: Yew, Taxol, Hairy roots, *Agrobacterium rhizogenes*, Elicitor