DOI:10.22034/CMR.2023.2273 مقاله پژوهشی، صفحات ۳۲۸-۳۴۲

افزایش تولید تاکسول در ریشه های مویین ایجاد شده در سرخدار ایرانی (*Taxus baccata*.sp)

هوشنگ گوهر چینی[۲،۱*]، 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 ریشه های مویین در بسیاری از گیاهان دارویی مورد توجه پژوهشگران است. دراین مقاله اثرات الیسیتورهای متیل‌جاسمونات و اسیدسالسیلیک بر روی تولید تاکسول در ریشه های مویین ایجاد شده در سرخدار ایرانی بررسی می گردد. نویسندگان برای ایجاد ریشه‌های موئین در ریزنمونه‌های سرخدار ازسه نژاد اگروباکتریوم ریزوژنز A4، R1000 و ATCC15834 استفاده کردند. نتایج نشان داد که فقط سویه A4 باعث ایجاد ریشه های مویین در ریزنمونه ها شده و بررسی PCR نشان داد ژن ریشه زایی اگروباکتریوم به ریزنمونه‌ها منتقل شده است. در عملیات واکشت ریشه‌های مویین، از سه غلظت ۱، ۱۰ و ۱۰۰ میکرومول متیل جاسمونات و اسید سالسیلیک به صورت جداگانه و ترکیبی برای افزایش تولید پاکلی تاکسول مورد استفاده قرارگرفت. تجزیه و تحلیل انجام شده توسط کرماتوگرافی مایع با عملکرد بالا نشان داد که افزودن الیسیتورها به محیط کشت باعث افزایش میزان پاکلی تاکسول در ریشه های مویین می شود و بیشترین افزایش با افزودن ۱۰۰ میکرومول متیل جاسمونات به تنهایی بدست آمد که باعث افزایش ۵ برابری میزان تولید پاکلی‌تاکسول در ریشه‌های مویین گردیده است.

واژه‌های کلیدی: سرخدار ، پاکلی تاکسول، ریشه های مویین، اگروباکتریوم ریزوژنز، الیسیتور

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

مقدمه

گیاهان بخشی ضروری از رژیم غذایی روزمره ما را تشکیل می‌دهند و ارزش های غذایی آنها دهه‌ها به شدت مورد مطالعه قرارگرفته 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 فرایندهای حیاتی گیاهان ندارند، اما نقش شناخته شده‌ای در برهم کنش 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 تنش ها فعال می‌کنند. این پاسخ‌ها باعث تجمع متابولیت‌های ثانویه

DOI:10.22034/CMR.2023.2273 مقاله پژوهشی، صفحات ۳۲۸-۳۴۲

می‌شود (۲۸). بیش از ۵۰ درصد متابولیت‌های ثانویه محصولات دارویی است و برای اهداف پزشکی استفاده می‌شوند (۵). حداقل ۱۰۰۰۰۰ متابولیت ثانویه در۵۰۰۰۰ گونه گیاهی درحال حاضر شناخته شده است و هرساله ۴۰۰۰ متابولیت ثانویه جدید کشف می‌شود (۸).پاکلی‌تاکسل در ابتدا از *Taxus brevifolia* جدا شد. تاکسان‌ها از نظر بالینی در اوایل دهه ۱۹۹۰ به بازار ایالات متحده معرفی شد.(۱۸و۳۰) تاکسان‌ها، از جمله پاکلی تاکسل و مشتقات آن، با اتصال به لوله‌های توبولین دپلیمره شدن یا تداخل را در مجموعه توبولین متوقف می کنند (۲۲و۱۲). تاکسل در برابر انواع مختلف سرطان ها، از جمله سرطان تخمدان، پستان، سر و گردن، مثانه و دهانه رحم، ملانوم، سرطان ریه و سارکوم کاپوزی مرتبط با ایدز موثر می باشد. علاوه بر این، آزمایشات بالینی زیادی برای آزمایش اثر پاکلی تاکسل، به تنهایی ودر ترکیب با سایر داروهای شیمی درمانی، در برابر نئوپلاسم های مختلف دیگر در حال انجام است (۲۷). استفاده از پوست داخلی برای تولید تاکسول باعث تخریب گسترده درختان سرخدار می شود بطوریکه یک درخت را باید از بین برد تا فقط یک دوز داروی تاکسول بدست آید. در نتیجه منابع طبیعی به هیچ وجه پاسخگو نیست، و منابع دارویی دیگری سریعاً باید جایگزین گردد (۵) گیاهان دارویی با ارزش بالا همچون تاکسول ازاجزای اصلی معیشت مردم بعضی مناطق روستایی است و این وابستگی به ویژه در مناطق کوهستانی زیاد است. برداشت زودرس، بیش از حد، مداوم، و دانش ناکافی از برداشت پایدار، تهدیدهای دیگری برای گیاهان دارویی است که توسط تغییرات اقلیمی و فرسایش زمین تشدید می‌شود. داده ها و دانش در مورد توزیع فعلی و بالقوه آینده گیاهان دارویی با ارزش بالا در این مناطق نسبتاً کم است و این باعث تشدید خطر انقراض این گونه های گیاهی پر اهمیت شده است (۱۵). دهه ۱۹۳۰ تا ۱۹۶۰، ریشه های مویین HRs عمدتاً به عنوان نشانه ای از تهاجم پاتوژن در گیاهان باغبانی مورد مطالعه قرارگرفتند (۴). تا اینکه دهه ۱۹۷۰ تا ۱۹۸۰ Agrobacterium rhizogenes به عنوان عامل باکتریایی شناسایی شد که از طریق انتقال ژن Ri (القاء کننده ریشه) پلاسمید باکتری، سندرم ریشه مویین HR را القاء می کند (۳و ۷). این کشف مهم باعث انجام چندین مطالعه شد که به توسعه فناوری کشت ریشه‌های مویین (HRCs) کمک کرده است. اکنون می دانیم که HRs از محل زخم گیاهچه ها که توسط A. rhizogenes یک باکتری همزیست که در حال حاضر از لحاظ تاکسونومیکی *Rhizobium rhizogenes* نامیده می شود، ایجاد می‌گردد (۱۰). حتی زمانی که گیاه با تحریک بیان چندین پروتئین دفاعی برای سرکوب پاتوژن به عفونت باکتریایی پاسخ می‌دهد، *R. rhizogenes* مکانیسم‌هایی را برای استفاده از پروتئین‌های دفاعی گیاه با خنثی کردن آنها ایجاد می کند که در نتیجه مسیرهای دفاعی گیاه را از بین می‌برد (۱۶و ۲۳) تا به امروز، همه سیستم هایی که برای تولید پروتئین نوترکیب استفاده شدند دارای محدودیت هایی است. به عنوان مثال، ناتوانی در تولید و یا ترشح پروتئین‌های پیچیده کاربردی (مانند سیستم‌های باکتریایی)، خطر انتقال ویروس و مولکول‌های سمی (مانند سیستم‌های باکتریایی، سلول‌های پستانداران) یا هزینه‌های تولید بسیار بالا است (مانند سلول‌های پستانداران) (۲). از اوایل دهه ۲۰۰۰، تولید پروتئین‌های درمانی با استفاده از گیاهان تراریخته چندین مزیت عمده را نسبت به سایر سیستم‌های بیانی از جمله ایمنی (بدون خطر آلودگی ویروسی تهدید کننده انسان)، هزینه های بالادستی پایین و گلیکوزیلاسیون پیچیده ارائه داد. سوسپانسیون‌های سلول گیاهی و HRCs مزایای ذاتی گیاهان و محدودیت تولید را ترکیب می‌کنند. در مقایسه با سوسپانسیون های سلولی، HRCs چندین مزیت مانند پایداری ژنوتیپی و فنوتیپی و امکان ترشح خارج سلولی پروتئین‌های بیان شده (همچنین به عنوان ریزترشح نامیده می‌شود) ارائه یک روش مناسب برای خالص سازی پروتئین‌های هدف در یک محیط که مقدار کمی پروتئین

DOI:10.22034/CMR.2023.2273 مقاله پژوهشی، صفحات ۳۲۸-۳۴۲

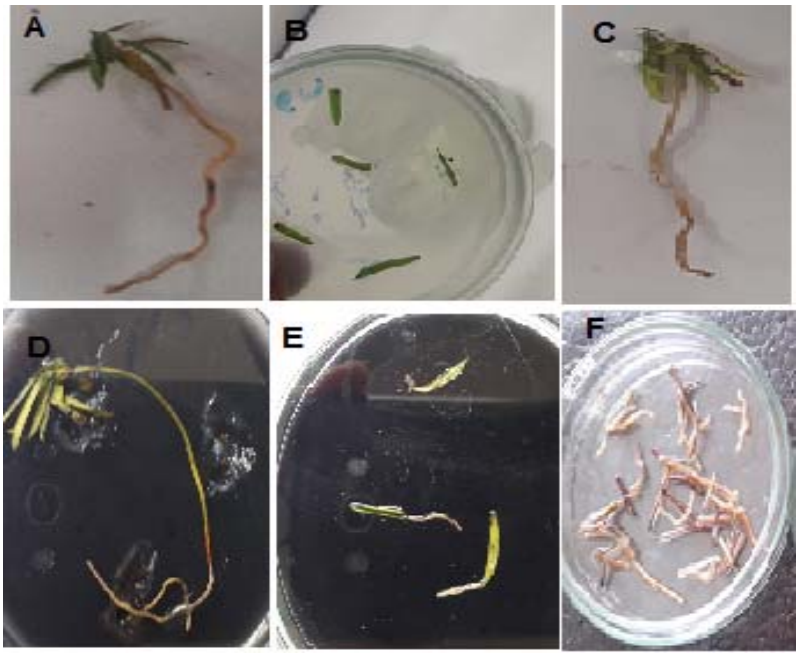
وجود دارد (۳۱). کشت‌های ریشه مویین(HRCs) قادر به تولید ترکیبات پیچیده در مقیاس بالا هستند (۱۱و ۲۶). در سال های اخیرا، پژوهشگران و محققان زیادی ریشه های مویین را در گیاهان دارویی برای تولید متابولیت های ثانویه مورد بررسی قرار داده اند (۳۳) فنوتیپ آنها براساس خصوصیات رشد نسبتاً سریع و بدون نیاز به هورمون‌های خارجی، نداشتن شاخه‌های جانبی، از دست دادن زمین گرایی، پایداری بیوشیمیایی و ژنتیکی مشخص می‌شود (۹) ریشه‌های مویین برای تولید بیشتر متابولیت های ثانویه به دلیل پایداری ژنتیکی بهتر، نسبت به سایر روش‌های کشت آزمایشگاهی ارجحیت دارند (۱۷). میزان بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه در ریشه‌های تراریخته، مبنای ژنتیکی دارد اما تحت تأثیر عوامل تغذیه‌ای (الیسیتورها) و محیطی نیز قرار می‌گیرد. ترکیب محیط کشت، رشد و تولید متابولیت‌های ثانویه را تحت تأثیر قرار می‌دهد. مقدار ساکارز، هورمون های 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 مویین می تواند 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 اگروباکتریوم ریزوژنز توسط پالوت-کارکاسون (۱۹۹۴) انجام شد اما هیچ جزئیاتی در مورد تولید تاکسان و تعیین آن در کشت ریشه های مویین در گونه های تاکسون ثبت نشده است. در پژوهشی دیگر ریشه‌های مویین *Taxus* × *media* واریته *Hicksii* مورد بررسی قرارگرفت محتوای پاکلی تاکسل تعیین شده در این کشت در یک کیلوگرم ماده خشک ۶۱۹ میلی‌گرم بود. آنها اولین نتایج خود را در مورد بهینه سازی تولید پاکلی تاکسل ارائه دادند (۶). همچنین در پژوهشی دیگر در کره جنوبی برروی سرخدار گونه *Taxus* Sieb Et Zucc *cuspidata* موفق شدند که ریشه‌های مویین با توان مناسب 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 مویین در این گونه مقایسه شد. در مجموع با روش های متفاوت آلودگی از طریق فرایندهای متداول واکشت یک دوره ۱۰ ماهه، زمان لازم بود که یک لینه ریشه مویین پایدار و دارای رشد سریع برای تولید بوجود آید. این ریشه های مویین تولید شده سطح بالایی ازپاکلی تاکسول را در پاسخ به الیسیتور متیل جاسمونات (MJ)، نشان دادن که می‌تواند به عنوان یک منبع جایگزین برای تولید پایدار پاکلی تاکسول استفاده شود (۳۳). کشت های بدست آمده از تلقیح آگروباکتریوم ریزوژنز بر روی ریزنمونه‌های جوان درترکیب با بیوراکتورها یک تکنیک قدرتمند اقتصادی است که از نظر محیطی برای تولید متابولیت های ثانویه ایمن است (۱۴)، در گذشته، بازدهی کمی برای کشت ریشه های مویین 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 مویین در برخی از نهاندانگان استفاده شد (۲۹)، در پژوهشی دیگر تلاش برای توسعه کشت ریشه مویین 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 بررسی های انجام شده در سرخدار ایرانی هنوز کاری در زمینه ایجاد ریشه های مویین و تولید داروی ارزشمند تاکسول از طریق این ریشه ها صورت نگرفته است برای اولین بار در سرخدار ایرانی اقدام به ایجاد ریشه ها مویین و بررسی اثرات الیستورها بر آنها و مقدار تولید تاکسول در این ریشه ها شد.

DOI:10.22034/CMR.2023.2273 مقاله پژوهشی، صفحات ۳۲۸-۳۴۲

مواد و روشها

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 ۱/۵درصد (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 شامل عصاره گوشت۵۰۰۰، عصاره مخمر۱۰۰۰، پپتون۵۰۰۰، سولفات منیزیم ۴۹۰۰، ساکارز۵۰۰۰، آگار (زمانیکه محلول جامد بکار رفت) ۲۰۰۰۰، میلی‌گرم در لیتر (mgl^{-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 O.D. = ۰/۲ در ۲۶۰ نانومتر پس از حل کردن انتخاب نمودیم اکنون باکتری‌ها برای تلقیح آگروباکتریوم بر روی ریزنمونه های سرخدار آماده بودند.



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

DOI:10.22034/CMR.2023.2273 مقاله پژوهشی، صفحات ۳۲۸-۳۴۲

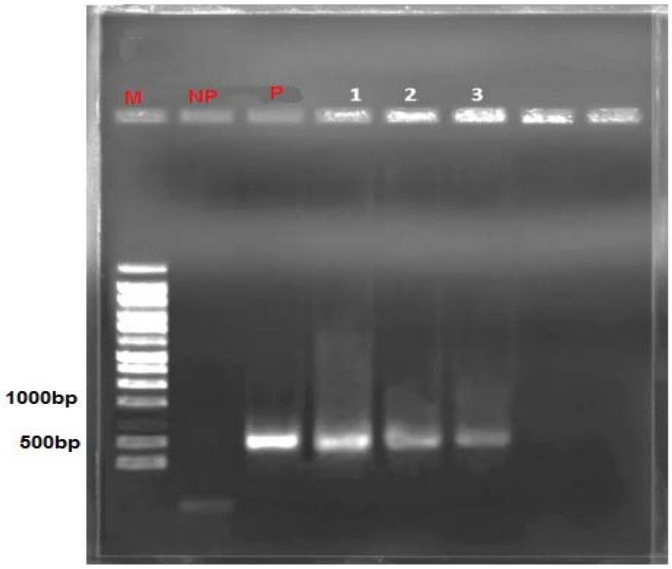
روش‌های مختلفی را برای القاء می‌توانیم بکار بگیریم، که ما از دو روش استفاده نمودیم که شامل روش عفونت مستقیم، که در آن ریزنمونه های زخمی توسط یک اسکلپر آغشته به آگروباکتریوم ریزوژنز آلوده شد و روش واکشت مایع که در آن نهال زخمی بار دیگر همراه با آگروباکتریوم ریزوژنز به مدت ۲۴ ساعت در یک محیط مایع واکشت شدند. بعد از تلقیح ریز نمونه ها به صورت تازه به محیط کشت MS $\frac{1}{2}$ (عناصر ماکرو نصف مقدار اصلی بکار رفتن) حاوی۰/۵ گرم در لیتر آنتی بیوتیک سفوتاکسیم برای حذف باکتری های اضافی باقیمانده روی بافت هاانتقال 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 واکشت 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 واکشت‌ها ادامه می‌یابد این فرایند را سه ماه ادامه دادیم تا لاین‌های مختلف ریشه مویین پایدار ایجاد گردند (شکل ۱).

آزمایش PCR برای تأیید ماهیت تراریختی: برای تأیید صحت انتقال ژن های ریشه زایی *Rol B* باکتری آگروباکتریوم ریزوژنز در ریشه های مویین بدست آمده باید وجود ژن ریشه‌زایی با تجزیه و تحلیل PCR در ریشه های مویین تائید می شد. ابتدا DNA از ریشه گیاه و ریشه مویین با استفاده ازکیت جداسازی DNA تهیه شده از شرکت آزما ژن استخراج شد. DNA ریشه گیاه به عنوان شاهد منفی که داری ژن Rol B نمی‌باشد و DNA ریشه مویین به عنوان نمونه آزمایشی که در صورت مشابهت باندی با شاهد منفی می‌تواند دلیل بر عدم انتقال ژن باشد و همچنین DNA پلاسمید باکتری بوسیله کیت جداسازی 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 فوروارد قطعه ۵۰۰ جفت بازی ژن RolB دارای توالی 3' 5'–ATCCAACTCACATCACAATGG- و پرایمر معکوس این ژن دارای توالی 3'- TTCTAAATCAGGTTCCTCCG – 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 پلیمراز تهیه شد. و ۳۵ سیکل انجام شد (۹۴ درجه سانتیگراد برای ۴۵ ثانیه، ۵۸ درجه سانتیگراد برای ۴۵ ثانیه، و ۷۲ درجه سانتیگراد برای ۴۵ ثانیه)، محصولات تکثیر شده با الکتروفورز بر روی ژل آگارز۰/۸درصد مشاهده شد (شکل۲). بعد از مشاهده ریشه های مویین اولیه در زمان واکشت 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،۱۰و۳۰ میکرو مول بصورت جداگانه و ترکیب با هم و بدون الیسیتور در سه تکرار بر افزایش تاکسول مورد بررسی قرارگرفت.

جدول۱- تیمارهای بکار رفته برای بررسی اثر متیل جاسمونات و اسید سالسیلیک بر افزایش میزان پاکلی تاکسل در ریشه هایی مویین 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	–	–

DOI:10.22034/CMR.2023.2273 مقاله پژوهشی، صفحات ۳۲۸-۳۴۲



شکل۲- تأیید انتقال ژن های ریشه زایی از آگروباکتریوم ریزوژنز به ریشه های 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 نمونه های ریشه مویین که بطور تصادفی انتخاب شدند

الیسیتورها بعد از تهیه محیط کشت و اتوکلاو آنها در زیر لامینار بعد از عبور از فیلتر به محیط های کشت اضافه شد. بعد از ثبت نتایج توسط نرم افزار اکسل و spss تجزیه واریانس داده ها 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 ریشه های 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 نمونه های جدا شده را ۲۴ ساعت در فریز درایر قراردادیم تا خشک شوند. بعد از پودر نمودن آنها سپس در ترکیب متانول آب به نسبت ۹:۱ قرارگرفتند و ۱۶ ساعت شیک گردیدند. پس از عبور از کاغذ صافی و فیلترشدن ۴۰ میلی‌لیتر دی‌کلرومتان روی محلول بدست آمده افزوده شد با استفاده از قیف جداکننده فاز دیکلرومتان از فاز آبی جدا شد و در روتاری تبخیر شد و عصاره خشک باقیمانده در یک میلی‌لیتر استونیتریل حل شد. برای آنالیز نمونه ها از دستگاه کروماتوگرافی مایع (HPLC) کنوئر آلمان(Knauer,) نشانگر (Knauer –uv k2501 227nm) ستون C18 (5µm * 25cm* 4.6cm)استفاده شد. سرعت جریان یک میلی‌لیتر بر دقیقه، دما ۲۵ درجه سلسیوس و مقدار نمونه تزریق شده ۲۰ ماکرولیتر بود. پیک‌ها در طول موج ۲۳۰ نانومتر نمایان شدند که شناسایی آنها با مقایسه زمان خروج پیک با استانداردهای تاکسان ها صورت پذیرفت در نهایت براساس سطح زیر پیک نمونه و تطابق آن منحنی تنظیم مقدار غلظت تاکسول در محلول اندازه گیری شد. لازم به ذکر است که استاندار ها بر اساس منابع انتخاب شدند (۶و ۲۰)

نتایج و بحث

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

DOI:10.22034/CMR.2023.2273 مقاله پژوهشی، صفحات ۳۲۸-۳۴۲

ریزنمونه ها در هر دو روش بکار گرفته شده ایجاد ریشه های مویین نمود. اما دو سویه دیگر از باکتری که در این پژوهش استفاده شد هیچگونه ریشه ای ایجاد ننمودند و لذا در ادامه کار مورد بررسی قرارنگرفتند. براساس این نتایج مشخص گردید که ممکن است بعضی از سویه های آگروباکتریوم ریزوژنز برای تبدیل و القاء ریشه های مویین در سرخدار موفقیت آمیز باشند و برخی سویه ها قادر به این کار نیستند پس در قدم اول باید سویه ای مناسب باتوجه به گونه سرخدار بکار بگیریم در مطالعات قبلی انجام شده، از سویه آگروباکتریوم ریزوژنز LBA9402، برای ترانسفورماسیون گیاهچه های سرخدار برای ایجاد ریشه های مویین در *Taxus * media* var. *Hicksii* استفاده شد (۹). در مطالعه ای دیگر برای ایجاد ریشه های مویین در *Taxus cuspidata* از سه سویه اگروباکتریوم ATCC 15834، R1000 و A4 استفاده شد و فقط دوسویه ATCC 15834، R1000 ایجاد ریشه های مویین نمودند این ریشه ها با ریشه های 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 شاخه های جانبی می‌شوند. در این پژوهش تقریباً در ۲۶درصد از نهال ها ریشه های مویین ایجاد شدند. بااین حال، بیشتر ریشه های مویین جدید بدست آمده از این ترانسفورماسیون به عنوان ریشه کامل نمی توانند رشد کنند (۳۳). علت رشد نکردن مناسب ریشه‌های مویین شاید این باشد که زمانیکه ژن rol انتقال می‌یابد ممکن است ژن تکمیل کننده این مسیر تکاملی را خاموش کند (۲۴). بسته به جایگاه ورود T-DNA به ژنوم گیاه میزبان، توان ریشه های موئین در تولید متابولیت ثانویه متفاوت است. مشخص شده است ریشه های مویین از نظر ژنتیکی پایدار بوده واکشت آنها آسان می‌باشد. با این وجود، ریشه های مویین هتروژن هستند و به نظر می‌رسد که به منظور دستیابی به لاین‌هایی از ریشه‌های مویین که دارای تولید بالایی باشند لازم است که عمل انتخاب چند بار انجام شود (۱۳). سه نمونه از ریشه‌های مویین 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 مویین 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 ترانسفورماسیون ر یشه‌های مویین و انتقال ژن ریشه‌زایی را تأیید می‌کرد (شکل۲). ریشه‌های مویین پس از اعتبارسنجی PCR به مدت سه ماه برای رشد بیشتر به محیط کشت WPM منتقل شدند. محتوای پاکلی تاکسل در ریشه‌های مویین 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 میانگین ها از طریق آزمون چند دامنه دانکن نتایج زیر بدست آمد (جدول ۲و شکل ۳).

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

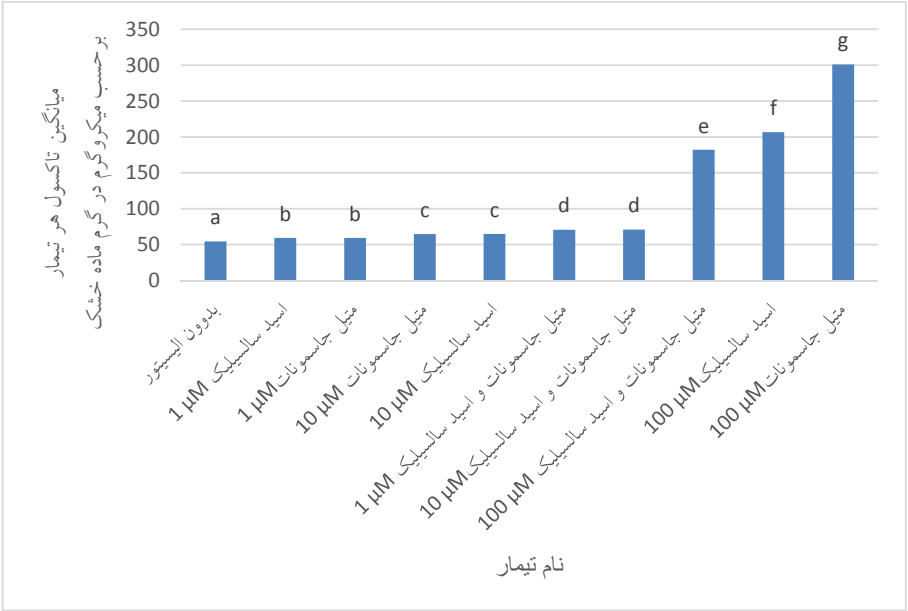
جدول۲- تجزیه واریانس اثر تیمار مقادیر مختلف متیل جاسمونات و اسید سالسیلیک بر میزان تاکسول در ریشه های مویین

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

** : معنی دار در سطح احتمال ۱درصد

مقاله پژوهشی، صفحات ۳۲۸-۳۴۲
DOI:10.22034/CMR.2023.2273

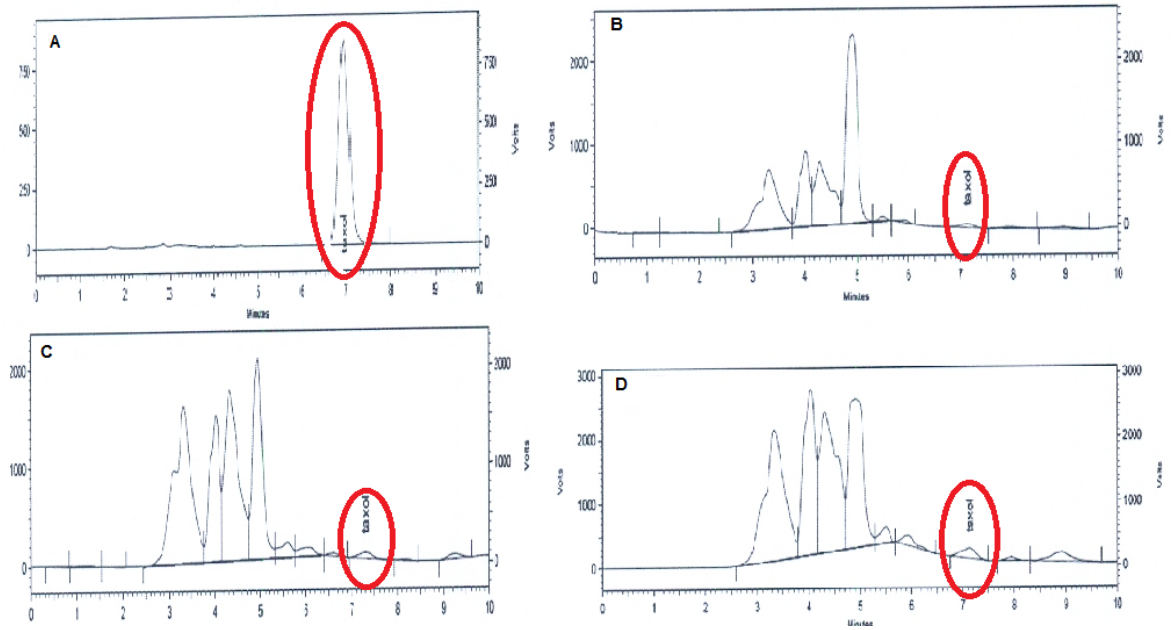
مطابق نتایج جدول ۲ بکارگیری الیسیتور متیل جاسمونات و اسید سالسیلیک بر میزن تاکسول موثر بوده و در سطح ۱ درصد معنی دار گردیده است و این نشان دهنده تأثیر مثبت و موثر این الیسیتورها بر افزایش تاکسول در ریشه های مویین است. اثر سودمند در مطالعات مختلف بکار گیری پیش سازها و الیسیتورها بر پاکلی تاکسل و تجمع تاکسان های 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 الیسیتورها به طور موثر تولید تاکسان ها و تجمع آنها را در هر دو کشت کالوس و سوسپانسیون سلولی گونه های 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 ریشه های مویین در حضورترکیبات پیش ساز در مقایسه با شاهد مشاهده شد. با این حال، ترکیب ۱۰۰ میکرومولار فنیل آلانین با ۱۰۰ میکرومول متیل جاسمونات، بیشترین (تقریباً ۲۸ برابر) افزایش تولید پاکلی تاکسل را به همراه داشت (۲۷)، کاربرد اسید سالسیلیک بر افزایش ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی در سوسپانسیون سلولی گیاه دارویی اسطوخودوس نشان داد که ۱۲میلی 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 سالسیلیک بر گیاه دارویی شنبلیله مشخص شد که بیان ژن های 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 الیسیتورها بر افزایش تولید تاکسول موثر است یا خیر؟ با بررسی بکارگیری در سنین مختلف ریشه های مویین و زمان باقی ماندن الیسیتور در محیط کشت می توان به آنها دست یافت. سپس برای مشخص شدن اینکه کدام الیسیتور بیشترین تأثیر را نسبت به شاهد و سایر تیمارها داشته است بررسی میانگین ها توسط آزمون چند دامنه ای دانکن انجام شد (شکل ۳).



شکل۳- نمودار مقایسه میانگین تیمارها با مقادیر مختلف متیل جاسمونات و اسید سالسیلیک توسط آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح ۱ درصد
حروف مشترک نشان دهنده نداشتن اختلاف معنی دار بین دو تیمار است

مقاله پژوهشی، صفحات ۳۲۸-۳۴۲
DOI:10.22034/CMR.2023.2273

مطابق نمودار مقایسه میانگین تیمار ها تمام تیمارها با شاهد (بدون الیسیتور) در میزان تاکسول اختلاف معنی دار داشتند و این نشان می دهد که بکارگیری الیستورها تأثیرمثبت در تولید تاکسول در ریشه های مویین 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 HPLCدر 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 مویین سرخدار ایرانی بیشتر است اما در تیمار ۹ که متیل جاسمونات و اسید سالسیلیک بصورت ترکیبی و هر را به مقدار ۱۰۰ میکرو مول 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 الیسیتور باشد یا اینکه بالا بودن مقدار الیسیتورهای بکارگرفته شده باشد زیرا در این تیمار ۲۰۰ میکرومول الیسیتور 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 الیسیتور بکار گرفته شده افزایش تاکسول بیشتری را بوجود آورده است در بررسی سایر تیمارها مشاهده شد که اختلاف افزایش تاکسول در تیمارهایی با میزان الیسیتور یکسان متیل جاسمونات و اسیدسالسیلیک مانند تیمار های ۱و۴ تیمارهای ۲و۵ و تیمارهای ۷و۸ اختلافاً معنی داری بین انها مشاهده نشد، اما با شاهد دارای اختلاف معنی داری بودند بطور کلی بکارگیری پس از بررسی گرافهای حاصل از آنالیزکروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا HPLC (شکل ۴)نشان داد الیستورها در افزایش تاکسول در ریشه ای مویین موثر است اما تعیین دقیق مقدار الیسیتور و نوع الیسیتور و سن گیاه و زمان در معرض قرار گرفتن الیسیتور بر میزان این افزایش می تواند موثر باشد.



شکل ۴- کروماتوگرافهای تجزیه و تحلیل کرماتوگرافی مایع با عملکرد بالا HPLC شکل A: استاندارد تاکسول شکل B: شاهد شکل C: تیمار ۶ شکل D:تیمار ۳

DOI:10.22034/CMR.2023.2273 مقاله پژوهشی، صفحات ۳۲۸-۳۴۲

بررسی سایر منابع نیز این موضوع را تائید می نماید (۱۹، ۲۷و ۳۵).

در پایان نتیجه گیری شد که سویه مناسب آگروباکتریوم ریزوژنز مناسب برای ایجاد ریشه های مویین در ریزنمونه های سرخدار ایرانی سویه A4 می باشد و برای نگهداری و توسعه این ریشه ها از محیط کشت 1/2 MS و WPM می توان استفاده نمود و برای افزایش محتوی تاکسول و اقزایش تولید تاکسول استخراجی از این ریشه های مویین بدست آمده می توان با بکار گیری الیسیتور 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 A4،R1000 و ATCC15834 استفاده نمودیم که پیشنهاد می گردد از سویه های دیگر این باکتری نیز استفاده شود و اثر آنها در ایجاد ریشه‌های مویین مورد بررسی ومطالعه قرارگیرد و اثرات الیسیتورهای 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.

منابع

۱- علیرضایی، ف.، و کیارستمی، خ.، ۱۳۹۹، بررسی اثر سالسیلیک اسید بر فعالیت آنتی اکسیدانی در کشت سوسپانسیون سلولی گیاه اسطوخودوس(*Lavandula angustifolia* Mill)، مجله پژوهش های سلولی وملکولی(مجله زیست شناسی ایران)، جلد ۳۳، شماره ۳، صفحات۳۱۱-۳۰۲.

۲- لطفی، م.، معروفی، ا.، اسماعیلی، ا.، و دستان، د.، ۱۴۰۰، بررسی بیان ژن های کلیدی بیوسنتز دیوسژنین در گیاه دارویی شنبلیله (*Trigonella Foenum graecum*) درپاسخ به سالسیلیک اسید و متیل جاسمونات، مجله پژوهش های سلولی ومولکولی(مجله زیست شناسی 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.

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:10056836 19355.

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

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.

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

DOI:10.22034/CMR.2023.2273 مقاله پژوهشی، صفحات ۳۲۸-۳۴۲

(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 Integ rative PlantBiol,* 48, PP: 121 - 127.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.

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.

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.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.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.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.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.org/10.1016/0378-8741(95)01367-9.

مقاله پژوهشی، صفحات ۳۲۸-۳۴۲ DOI:10.22034/CMR.2023.2273

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-Wicremesinhe, 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 Socaity 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