

مقاله پژوهشی

بررسی میزان تولید تاکسول و ۱۰-دی استیل باکاتین III تحت الیسیتورهای کیتوزان و جاسمونیک اسید در کشت سوسپانسیون سلولی سرخدار (*Taxus baccata* L.)

راحله گریزی^۱، عزیزاله خیری^۲، زهرا قهرمانی^۳، محسن ثانی خانی^۴

^۱ دانشجوی دکتری، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران

^۲ دانشیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران

^۳ دانشیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران

^۴ استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران

* (نویسنده مسئول مکاتبات): kheiry@znu.ac.ir

تاریخ پذیرش: بهمن ۱۴۰۳

تاریخ دریافت: دی ۱۴۰۳

چکیده

تاکسول به عنوان مهم‌ترین تاکسان در درمان بسیاری از سرطان‌ها کاربرد دارد. به علت مقدار بسیار کم آن در گیاه سرخدار، از روش‌های جایگزین مانند کشت سوسپانسیون سلولی و همچنین برای افزایش تولید تاکسان‌ها از الیسیتورهای مختلف استفاده می‌شود. در این پژوهش پس از القای کالوس و کشت سوسپانسیون سلولی سرخدار، میزان تولید تاکسان‌ها تحت تاثیر جاسمونیک اسید ($40 \mu\text{M}$ و $20 \mu\text{M}$) و کیتوزان (50 mg/l و 30 mg/l) بررسی شدند. پس از القای کالوس در ساقه در محیط کشت B5 حاوی ۴ میلی گرم در لیتر 2-4-D، ۱ میلی گرم در لیتر کاینیتین، ۰/۵ میلی گرم در لیتر جیبرلین، ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۷ گرم در لیتر آگار همراه با ۱۰ سی سی در لیتر آنتی اکسیدان، کشت سوسپانسیون سلولی در محیط کشت B5 حاوی ۲ میلی گرم در لیتر پیکلرام، ۰/۱ میلی گرم در لیتر کاینیتین، ۰/۵ میلی گرم در لیتر جیبرلین، ۵ گرم در لیتر ساکارز، ۵ گرم در لیتر فروکتوز و ۱۰ سی سی در لیتر آنتی اکسیدان، انجام شد. ۸ روز پس از کشت، الیسیتورها اعمال و در روز ۱۷ پس از کشت، میزان فنل، فلاونوئید، آنزیم PAL، ۱۰-دی استیل باکاتین III و تاکسول اندازه گیری شدند. نتایج نشان داد در کیتوزان ۳۰ میلی گرم در لیتر، تاکسول ۲۱ درصد و میزان فنل، فلاونوئید و آنزیم PAL در کیتوزان نسبت به شاهد افزایش نشان دادند. میزان ۱۰-دی استیل باکاتین III در کیتوزان ۱۰ میلی گرم در لیتر ۶۲ درصد نسبت به شاهد افزایش نشان دادند. کیتوزان نسبت به جاسمونیک اسید تاثیر بهتری نشان داد و می‌توان برای بهینه سازی تولید تجاری تاکسول در سیستم‌های بیوراکتور از آن بهره گرفت.

کلیدواژه‌ها: الیسیتور، تاکسان‌ها، سرخدار، ضد سرطان، کشت تعلیقی.

مقدمه

است [۱]. این ماده برای اولین بار توسط Wani و Wall در سال

۱۹۷۱ از پوست گونه *T. brevifolia* Nutt. استخراج شد [۲]. اکنون

از داروی بسیار ارزشمند تاکسول برای درمان بسیاری از سرطان‌ها

تاکسول (Taxol) نام تجاری ماده پاکلی تاکسل (paclitaxel)

می‌باشد که توسط شرکت Bristol-Myers squibb به ثبت رسیده

استفاده می‌شود [۳]. درواقع تاکسول یک آلکالوئید دی‌ترپنوئیدی است که به گروهی از دی‌ترپن‌ها به نام تاکسان تعلق دارد [۴]. این ترکیب دارویی بسیار باارزش از گیاه سرخدار (*Taxus*) تولید می‌شود که بیشترین مقدار آن در گونه‌های *T. baccata*، *T. chinensis* و *T. brevifolia* یافت می‌شود [۵]. از نظر گیاه‌شناسی تیره سرخدار در راسته مخروطیان و زیرشاخه بازدانگان قرار می‌گیرد. همه‌ی گونه‌های این خانواده درختانی هستند که همیشه سبز، دو پایه و گاهی تک پایه و برگ‌ها به شکل متناوب آرایش یافته‌اند همچنین درخت سرخدار سایه‌پسند بوده و قادر است در محیط سایه رشد کند و فعالیت فیزیولوژیکی خود را با وجود نور کم ادامه دهد [۶]. پوست تنه درخت بسیار ضخیم بوده و به صورت فلس یا نوار از تنه درخت جدا می‌شود. گل آذین نر دارای یک محور کوتاه می‌باشد که توسط ۶ تا ۱۴ پرچم احاطه شده و در مجموع به شکل یک گرز دیده می‌شود. گل آذین ماده یک تخمک برافراشته محدود شده و در نوک شاخه‌ها و یا در کنار برگ‌ها قرار گرفته است. میوه آن حاوی یک دانه که توسط بخش گوشتی به نام آریل احاطه شده است [۷]. از زمان کشف تاکسول، انرژی قابل توجهی در تلاش برای افزایش استخراج تاکسول سرمایه‌گذاری شده است. تولید تاکسول از گیاه اقتصادی نبوده و یک علت بسیار مهم برای انتخاب روش جایگزین تولید تاکسول، غلظت کم (۰/۰۵-۰/۰۱٪) تاکسول است که مصرف ۱۰۰۰۰ کیلوگرم پوست تاکسوس یا ۳۰۰۰ درخت سرخدار برای تولید تنها یک کیلوگرم دارو ضروری است [۸]. علاوه براین، استخراج تاکسول از درخت سرخدار نیاز به سیستم پیچیده و تکنیک‌های خاص تصفیه با استفاده از تکنولوژی پیشرفته و گران قیمت دارد. با در نظر گرفتن موارد بالا و همچنین غلظت متغیر تاکسان‌ها در تاکسوس و نیز تقاضای بالا برای دارو، نیاز فوری به یافتن روش‌های جایگزین منابع تولید تاکسول وجود دارد [۹]. یک روش جایگزین برای تولید، از طریق روش نیمه سنتزی است که نیازمند مواد حدواسط باکاتین III و ۱۰-دی استیل باکاتین III موجود در سرخدار می‌باشد. یک منبع جایگزین و سازگار با محیط زیست برای تاکسول و ترکیبات آنالوگ، کشت سلول گیاهی است. از این نظر استفاده از گونه‌های سرخدار (*Taxus spp*) برای کشت سوسپانسیون سلولی در شرایط کنترل شده و همچنین مقرون به صرفه بودن این سیستم‌های بیوتکنولوژیکی،

در حال حاضر یک روش انتخابی برای بدست آوردن تاکسول را نشان می‌دهد. با وجود این، سطح تولید برای برآوردن تقاضای بازار ناکافی می‌باشد [۱۰]. برای افزایش تولید تاکسان‌ها در کشت سلول‌های گیاهی راهکارهای مختلفی مانند بهینه‌سازی شرایط کشت، انتخاب رده‌های سلولی با تولید بالا و افزودن الیسیستورها یا پیش‌ماده‌ها می‌توان بکار برد. با پیشرفت تکنولوژی، روش‌های مختلفی برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان ابداع شده است. یکی از این روش‌ها استفاده از الیسیستورها می‌باشد که یکی از پرکاربردترین و مفیدترین آن‌ها می‌باشد [۱۱، ۱۲]. استفاده از متیل جاسمونات یا جاسمونیک اسید و کیتوزان از جمله الیسیستورهای پرکاربرد و مفید به شمار می‌روند که در کشت سوسپانسیون سلولی گیاهان استفاده می‌شوند. جاسمونیک اسید و متیل جاسمونات به عنوان ترکیبات انتقال سیگنال عمل می‌کنند و باعث القای مهارکننده‌های پروتئیناز و ژن‌های دفاعی می‌شوند و متابولیسم ثانویه بسیاری از گیاهان را افزایش می‌دهند [۱۳]. به طور قابل توجهی، جاسمونات‌ها در افزایش تولید داروی ضد سرطان تاکسول در انواع گونه‌های سرخدار و کشت‌های سلولی موثر بوده‌اند [۱۴، ۱۵]. کیتوزان دومین پلی‌ساکارید طبیعی فراوان روی زمین بعد از سلولز است. برخی از مطالعات تایید می‌کنند که استفاده از کیتوزان به عنوان یک الیسیستور باعث افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در کشت‌های سوسپانسیون سلولی گیاهان مختلف می‌شود. به‌عنوان مثال، افزودن کیتوزان در کشت سوسپانسیون سلولی *Andrographis paniculata*، منجر به افزایش مقدار فلاونوئیدها شده است [۱۶]. در پژوهشی، کیتوهپتاز، یکی از مشتقات کیتوزان، تولید تاکسول را در کشت‌های سلولی *Taxus cuspidate* به‌طور قابل توجهی افزایش داد [۱۷]. نشان داده شده است که کیتوزان تولید تاکسول را به تهایبی یا در ترکیب با MJ و Ag⁺ در کشت سلول‌های *T. chinensis* تحریک می‌کند [۱۸].

مواد و روش‌ها

نهال‌های گیاه سرخدار (*T. baccata*) از شهر تنکابن خریداری شدند و به گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی زنجان با کنترل شرایط دمای روز ۲۵ درجه سانتی‌گراد و دمای شب ۱۸ درجه سانتی‌گراد و نیز رطوبت ۷۵ درصد منتقل شدند. پس از رشد سرشاخه‌های جدید، از سرشاخه‌های تازه رشد کرده (به علت

آگار، کشت شدند. ارلن‌های کشت بر روی شیکر انکوباتور دورانی با سرعت ۷۰ دور در دقیقه و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و در شرایط کاملاً تاریکی قرار داده شدند.

به منظور اعمال تیمار الیسیتورها، هشت روز پس از کشت سلول‌ها، ابتدا ارلن‌های با کشت سوسپانسیون مناسب و یکنواخت به زیر هود لامینار انتقال داده شدند. تیمار جاسمونیک اسید (JA) با سه غلظت ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میکرومولار در سه تکرار و همچنین تیمار کیتوزان (CH) با سه غلظت ۱۰، ۳۰ و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر و در سه تکرار، به ارلن‌ها اضافه شدند. پس از اعمال تیمارها ارلن‌های کشت به دستگاه شیکر انکوباتور با سرعت ۷۰ دور در دقیقه و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و شرایط کاملاً تاریکی منتقل شده و تا روز پایان تیماردهی (روز هفدهم) داخل شیکر انکوباتور نگهداری شدند. پس از پایان دوره میزان تاکسول و ۱۰-دی استیل باکاتین III توسط دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) اندازه‌گیری شدند.

به منظور استخراج و اندازه‌گیری میزان تاکسان‌ها، ابتدا کشت‌های سوسپانسیون سلولی توسط دستگاه فریزدرایر خشک شدند، سپس ۲ گرم از نمونه‌های پودر شده سلول‌ها در ۲۰۰ میلی‌لیتر متانول به مدت ۱۵ ساعت بر روی شیکر قرار داده شدند. نمونه‌ها در دستگاه اولتراسونیک به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شدند. از محلول هگزان و قیف جدا کننده برای حذف مواد قطبی اضافی استفاده شد و در آخر با استفاده از دی کلرومتان در سه مرتبه شستشو انجام شد و تاکسان‌ها در محلول دی کلرومتان حل شدند. با استفاده از دستگاه روتاری حلال را از تاکسان‌ها جدا کرده و عصاره حاصل را در ۲ میلی‌لیتر استونیتریل حل کرده و به دستگاه HPLC تزریق شد [۲۱] جهت اندازه‌گیری مقدار تاکسول و ۱۰-دی استیل باکاتین III از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) کنار ساخت کشور آلمان همراه با ستون دارای پرفکتسیل ۴/۶ x ۲۵۰ میلی‌متر C18 استفاده شد. از حلال‌های استونیتریل/آب HPLC به عنوان فاز متحرک استفاده شد و سرعت جریان حلال در ستون ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه، دما ۲۵ درجه سانتی‌گراد، طول موج UV ۲۳۰ نانومتر و مقدار نمونه تزریق شده ۲۰ میکرولیتر در نظر گرفته شد. میزان تاکسول و ۱۰-دی استیل باکاتین III بر اساس واحد میکروگرم بر گرم وزن خشک محلول سوسپانسیون گزارش شد. از استاندارد تاکسول و

آلودگی کمتر) به عنوان ریزنمونه به منظور کشت درون شیشه‌ای انتخاب شدند. پس از انتقال سرشاخه‌های جوان به آزمایشگاه کشت بافت، ریزنمونه‌ها به مدت یک ساعت زیر آب جاری قرار گرفتند، سپس برگ‌ها از ساقه جدا و ریزنمونه‌های ساقه به مدت یک دقیقه در الکل ۷۰ درصد (V/V) قرار داده شدند، سپس بلافاصله ریزنمونه‌ها در هیپوکلریت سدیم ۲ درصد به مدت ۱۲-۱۰ دقیقه قرار داده شدند و در ادامه سه بار با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. در مرحله آخر ریزنمونه‌ها با محلول کلرید جیوه ۰/۱ درصد به مدت ۱۰-۸ دقیقه ضدعفونی شده و سپس سه بار با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. بعد از اتمام مراحل ضدعفونی، ساقه‌ها به اندازه ۱ تا ۱/۵ سانتی متر برش داده شدند و به شیشه‌های کشت حاوی محیط کشت انتقال داده شدند.

برای القای کالوس ریزنمونه‌های ساقه به صورت افقی بر روی محیط کشت B₅ [۱۹] حاوی ۴ میلی‌گرم در لیتر هورمون 2-4-D (دی کلروفنوکسی استیک اسید)، ۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون کایننتین، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون جیبرلین، ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۷ گرم در لیتر آگار همراه با ۱۰ سی سی در لیتر آنتی اکسیدان، قرار داده شدند. برای جلوگیری از قهوه‌ای شدن و رشد بهتر کالوس‌ها از محلول آنتی‌اکسیدان استفاده شد. برای تهیه محلول آنتی اکسیدان مقادیر ۲۹/۲۳ گرم در لیتر گلوتامین، ۵/۰۱۹ گرم در لیتر اسیدآسکوربیک و ۴/۹۹۵ گرم در لیتر اسید سیتریک وزن شدند و در یک لیتر آب مقطر حل شدند و سپس به محیط کشت اضافه شدند، سپس ریزنمونه‌های کشت شده، در دستگاه اتافک رشد با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و نیز شرایط کاملاً تاریکی برای القای کالوس به مدت ۳ الی ۴ هفته نگهداری شدند [۲۰]. واکشت کالوس‌ها هر سه هفته یک بار در محیط کشت رشد کالوس‌ها (محیط کشت B₅ حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر پیکلرام، ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر کایننتین، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر جیبرلین، ۵ گرم در لیتر ساکارز، ۵ گرم در لیتر فروکتوز، ۷ گرم در لیتر آگار و همچنین ۱۰ سی سی در لیتر آنتی اکسیدان)، صورت می‌گیرد. بعد از به دست آمدن میزان مناسبی از کالوس‌ها کشت سوسپانسیون سلولی انجام شد.

برای استقرار کشت سوسپانسیون سلولی، در زیر هود لامینار مقدار ۲ گرم از کالوس‌ها توزین شد و در ارلن‌های ۱۰۰ سی سی حاوی ۱۵ سی سی محیط کشت مناسب رشد کالوس‌ها ولی بدون

۱۰-دی استیل باکاتین III برای تعیین منحنی کالبراسیون استفاده شد.

برای اندازه‌گیری میزان فنل کل ابتدا ۰/۵ گرم از نمونه کشت سوسپانسیون فریز درایر شده با ۲۰ میلی لیتر اتانول ۸۰ درصد به مدت ۱ دقیقه هموژن شدند سپس مخلوط هموژن شده فیلتر شد و مایع صاف شده در دستگاه سانتریفیوژ با دور 10000 g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. ۱ میلی لیتر از محلول رویی با ۱ میلی لیتر معرف فولین سیکالتیو و ۱۰ میلی لیتر سدیم کرینات ۷ درصد مخلوط شد و با آب مقطر به حجم ۲۵ میلی لیتر رسانده شد. سپس به مدت ۱ ساعت برای ته‌نشین شدن باقی ماند. جذب در طول موج ۷۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد [۲۲]. ترکیبات فنلی با استفاده از منحنی استاندارد اسید گالیک برآورد شد و محتوای آن بر حسب میلی گرم در گرم وزن خشک بیان شد.

برای بررسی میزان فلاونوئید ابتدا ۱/۵ میلی لیتر متانول، ۰/۱ میلی لیتر استات پتاسیم ۱ مولار، ۰/۱ میلی لیتر آلومینیوم کلرید ۱۰ درصد، ۵۰۰ میکرولیتر عصاره اتانولی بدست آمده در قسمت قبلی و ۲/۸ میلی لیتر آب مقطر اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد سپس جذب آن در طول موج ۴۱۵ نانومتر خوانده شد [۲۳]. ترکیبات فلاونوئیدی با استفاده از منحنی استاندارد اسید کوئرستین برآورد شد و محتوای آن بر حسب میلی گرم در گرم وزن خشک بیان شد.

فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لایز (PAL) بر اساس روش Beaudoin-Eagan و Thorpe صورت گرفت [۲۴]. برای این منظور مقدار ۰/۲ گرم توده سلولی در ۳ میلی لیتر بافر تریس (۵۰ میلی مولار حاوی ۱۵ میلی مولار β مرکاپتواتانول در pH ۸/۲) هموژن شدند. سپس به مدت ۲۰ دقیقه و دور ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. در ادامه ۱ میلی لیتر بافر استخراج، ۰/۵

میلی لیتر L-فنیل آلانین ۱۰ میلی مولار، ۰/۴ میلی لیتر آب مقطر دوبار تقطیر و ۰/۴ میلی لیتر از عصاره آنزیمی با هم مخلوط شدند و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت یک ساعت نگهداری شدند. مخلوط واکنش توسط ۰/۱ میلی لیتر اسیدکلریدریک ۶ مولار متوقف و اسید سینامیک توسط اتیل استات استخراج شد. سپس اتیل استات تبخیر شد و باقیمانده در ۱ میلی لیتر هیدروکسید سدیم ۰/۰۵ مولار حل شد و جذب محلول در طول موج ۲۹۰ نانومتر خوانده شد. فعالیت آنزیم PAL بر حسب میکرومول اسید سینامیک در میلی گرم پروتئین در ساعت تعیین شد و منحنی استاندارد رسم شد.

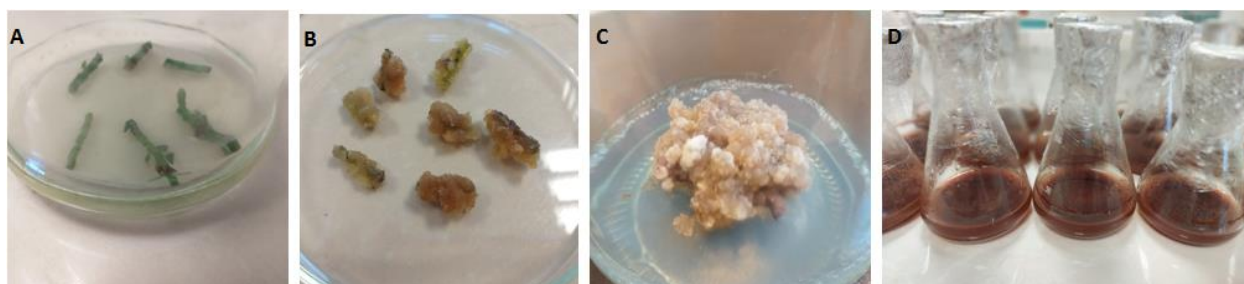
نتایج با استفاده از نرم افزار SPSS ورژن ۲۶ و تجزیه واریانس یک طرفه آنوا در سطح ۵ درصد بررسی شدند. برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون دانکن و همچنین شکل‌ها توسط نرم افزار اکسل ۲۰۱۳ رسم شدند.

نتایج:

پس از ایجاد کشت سوسپانسیون سلولی سرخدار (شکل ۱)، نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱) نشان داد که مقدار تاکسول و ۱۰-دی استیل باکاتین III در سطح یک درصد نسبت به نمونه کنترل اختلاف معنی‌داری می‌باشند.

میزان فنل کل:

تمام تیمارهای اعمال شده نسبت به نمونه شاهد افزایش معنی‌داری در محتوای فنل کل نشان دادند. تیمار کیتوزان با غلظت ۳۰ میلی گرم در لیتر بیشترین میزان فنل کل را نسبت به نمونه شاهد و دیگر تیمارها نشان داد. تیمارهای دیگر هم نسبت به یکدیگر اختلافشان معنی‌دار بوده و کمترین میزان آن در تیمار جاسمونیک اسید با غلظت ۱۰ میکرومولار مشاهده گردید (شکل ۲).



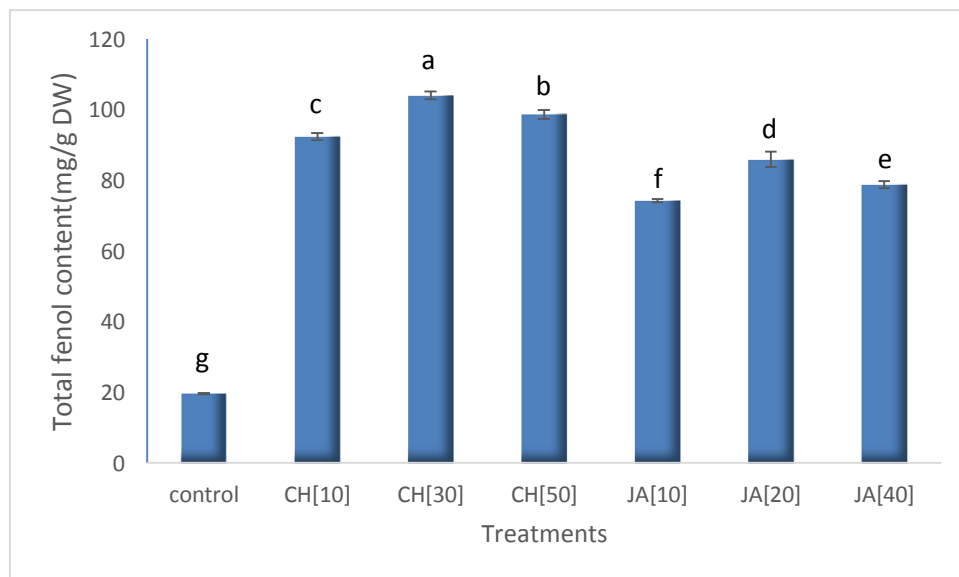
شکل ۱- مراحل کشت سوسپانسیون سلولی سرخدار: A: ریز نمونه ساقه، B: کالوس‌های القا شده در ریز نمونه‌های ساقه، C: کالوس‌های رشد کرده، D: سوسپانسیون سلولی

میزان فلاونوئید

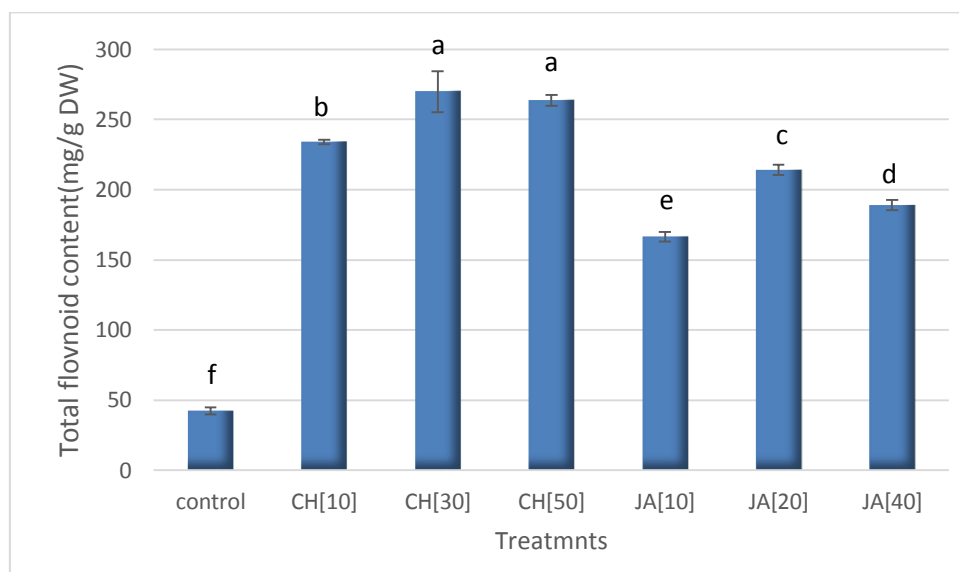
بررسی میزان فلاونوئید در کشت سوسپانسیون سلولی تحت تیمارهای اعمال شده نشان داد که تمامی تیمارها نسبت به نمونه شاهد افزایش معنی داری ایجاد کردند. تیمارهای کیتوزان با غلظت ۳۰ و ۵۰ میلی گرم در لیتر بیشترین میزان فلاونوئید را نشان دادند. در بین همه تیمارها تیمار جاسمونیک اسید با غلظت ۱۰ میکرومولار میزان فلاونوئید کمتری نسبت به تیمارهای دیگر داشت ولی تمامی تیمارها نسبت به نمونه شاهد افزایش نشان دادند (شکل ۳).

میزان فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالاز (PAL):

نتایج نشان داد که تمامی تیمارها نسبت به نمونه شاهد افزایش معنی داری را نشان دادند. بیشترین میزان فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالاز در تیمار کیتوزان با غلظت ۳۰ میلی گرم در لیتر مشاهده شد. سپس به ترتیب تیمارهای کیتوزان با غلظت ۵۰ و ۱۰ میلی گرم در لیتر و همچنین جاسمونیک اسید با غلظت های ۲۰ و ۴۰ و ۱۰ میکرومولار بیشترین میزان فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالاز را نسبت به نمونه شاهد نشان دادند (شکل ۴).



شکل ۲ - میزان فنل کل در کشت سوسپانسیون سلولی گیاه سرخدار تحت الیستورهای کیتوزان (۱۰، ۳۰، ۵۰ mg/l) و جاسمونیک اسید (۱۰، ۲۰، ۴۰ M) پس از گذشت ۱۷ روز. نتایج در سطح احتمال ۱ درصد بر اساس آزمون آماری دانکن می باشند

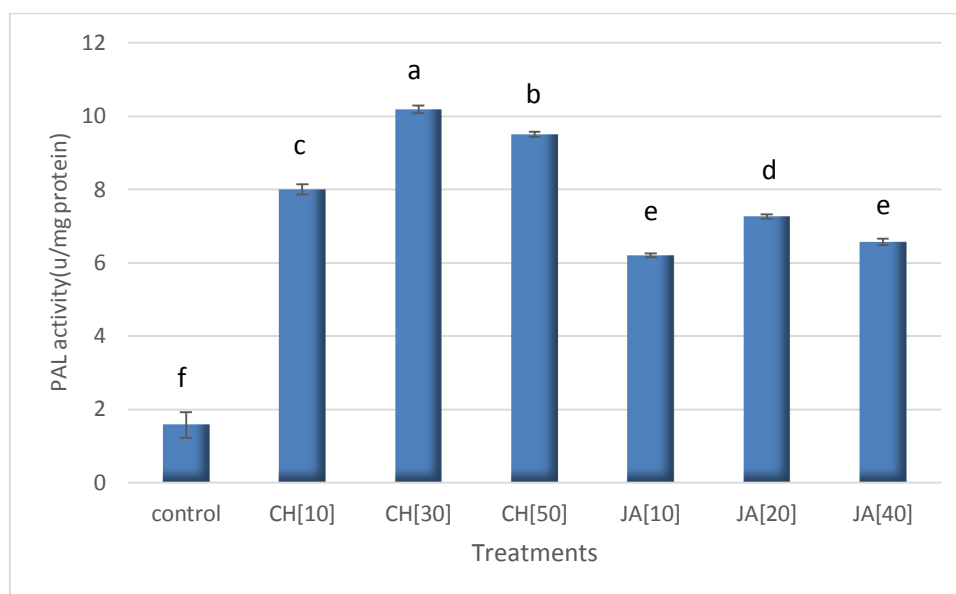


شکل ۳ - میزان فلاونوئید در کشت سوسپانسیون سلولی گیاه سرخدار تحت الیستورهای کیتوزان (۱۰، ۳۰، ۵۰ mg/l) و جاسمونیک اسید (۱۰، ۲۰، ۴۰ M) پس از گذشت ۱۷ روز. نتایج در سطح احتمال ۱ درصد بر اساس آزمون آماری دانکن می باشند.

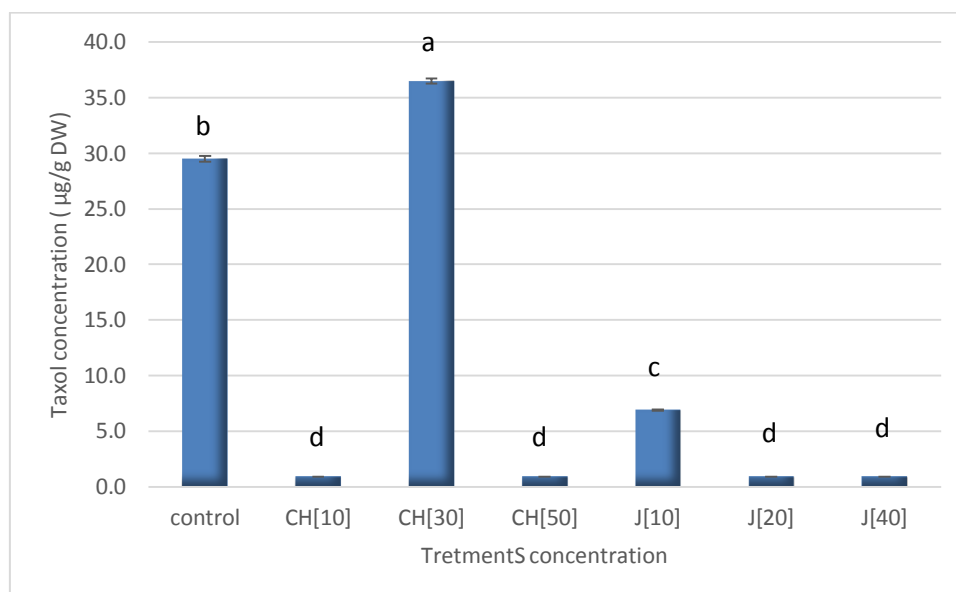
تغییرات میزان تاکسول:

نتایج آنالیز تاکسان‌های کشت سوسپانسیون سلولی سرخدار نشان داد که مقدار تاکسول نسبت به نمونه شاهد معنی دار می‌باشد. بیشترین میزان تاکسول در تیمار کیتوزان با غلظت ۳۰ میلی گرم در لیتر نسبت به نمونه شاهد و سایر تیمارها مشاهده شد. مقدار افزایش تاکسول در تیمار کیتوزان با غلظت ۳۰ میلی گرم در لیتر ۲۱ درصد نسبت به نمونه شاهد بود. بعد از تیمار کیتوزان ۳۰

میلی گرم در لیتر نمونه شاهد بیشترین میزان تاکسول را نشان داد و پس از آن جاسمونیک اسید با غلظت ۱۰ میکرومولار می‌باشد. کمترین میزان تاکسول در تیمارهای کیتوزان با غلظت‌های ۱۰ و ۵۰ میلی گرم در لیتر و جاسمونیک اسید با غلظت‌های ۲۰ و ۴۰ میکرومولار مشاهده شد که اختلاف معنی داری با یکدیگر نداشتند (شکل ۵).



شکل ۴- میزان فعالیت آنزیم PAL در کشت سوسپانسیون سلولی گیاه سرخدار تحت الیستورهای کیتوزان (۱۰، ۳۰، ۵۰ mg/l) و جاسمونیک اسید (۱۰، ۲۰، ۴۰ M) پس از گذشت ۱۷ روز. نتایج در سطح احتمال ۱ درصد بر اساس آزمون آماری دانکن می‌باشند



شکل ۵- میزان تاکسول در کشت سوسپانسیون سلولی گیاه سرخدار تحت الیستورهای کیتوزان (۱۰، ۳۰، ۵۰ mg/l) و جاسمونیک اسید (۱۰، ۲۰، ۴۰ M) پس از گذشت ۱۷ روز. حروف مشترک نشانگر عدم اختلاف معنی دار آماری در سطح احتمال ۱ درصد بر اساس آزمون دانکن می‌باشند

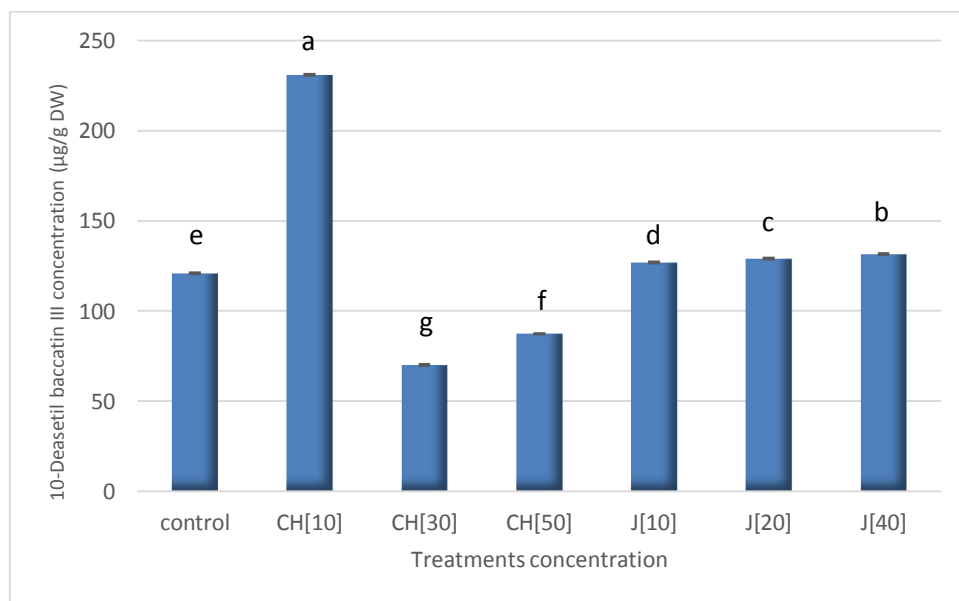
تغییرات میزان ۱۰-دی استیل باکاتین III:

اندازه‌گیری میزان ۱۰-دی استیل باکاتین III تحت تاثیر تیمارهای اعمال شده نشان داد که بین تیمارها و نمونه شاهد اختلاف معنی‌داری وجود دارد. بیشترین مقدار ۱۰-دی استیل باکاتین III در تیمار کیتوزان با غلظت ۱۰ میلی گرم در لیتر می‌باشد که ۶۲ درصد نسبت به نمونه شاهد افزایش نشان داده است. بعد از آن تیمار جاسمونیک اسید با غلظت ۴۰ میکرومولار (۸ درصد)، ۲۰ میکرومولار (۶ درصد) و ۱۰ میکرومولار (۴/۷ درصد) نسبت به نمونه شاهد افزایش نشان دادند. کیتوزان ۵۰ و ۳۰ میلی گرم در لیتر نسبت به نمونه شاهد کاهش معنی‌داری را نشان دادند (شکل ۶).

بحث

تاکسول به عنوان موثرترین داروی ضد سرطان می‌باشد که برای

درمان طیف گسترده‌ای از سرطان‌ها استفاده می‌شود. تولید صنعتی تاکسول نیازمند سنتز گیاهی می‌باشد که بر بقای گونه‌های سرخدار تاثیر می‌گذارد. بنابراین استفاده از روش‌های جایگزین و افزایش بازده تولید تاکسول امری ضروری است که با درک مسیر بیوسنتزی و همچنین ژن‌های دخیل در این مسیر امکان‌پذیر می‌باشد [۲۵]. در حال حاضر الیستورها یکی از موثرترین تکنیک‌های مورد استفاده برای بهبود تولید بیوتکنولوژیکی متابولیت‌های ثانویه می‌باشند. جاسمونیک اسید و مشتقات آن مانند متیل جاسمونات، به عنوان تنظیم‌کننده‌های رشد و یا بازدارنده‌های رشد گیاه هستند که نقش بسیار مهمی در رشد و نمو و پاسخ به تنش‌های محیطی دارند. اثرهای فیزیولوژیکی جاسمونات‌ها بستگی به نوع گونه گیاهی، نوع جاسمونات و غلظت بکار رفته دارد [۲۶]. جاسمونیک اسید و مشتقات آن در



شکل ۶- میزان ۱۰-دی استیل باکاتین III در کشت سوسپانسیون سلولی گیاه سرخدار تحت الیستورهای کیتوزان (۱۰، ۳۰، ۵۰ mg/l) و جاسمونیک اسید (۱۰، ۲۰، ۴۰ M) پس از گذشت ۱۷ روز. نتایج در سطح احتمال ۱ درصد بر اساس آزمون آماری دانکن می‌باشند.

جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس صفات مورد مطالعه در کشت سوسپانسیون سلولی سرخدار

میانگین مربعات					
منابع تغییرات	df	فنل کل	فلاونوئید	آزیم PAL	تاکسول
تیمار	۶	۲۳۹۶/۲۷**	۱۸۱۵۶/۰۳***	۲۳/۸۳**	۷۰۷/۹**
خطا	۱۴	۴/۳۳	۱۱۶/۷۴	۰/۰۷۳	۰/۰۵۴
ضریب تغییرات (%)	۲/۶	۵/۴	۳/۸	۲/۱	۰/۶۳

** بیان کننده اختلاف معنی‌داری در سطح ۰/۰۱ می‌باشد.

گیاهان در پاسخ به عوامل زیستی و غیر زیستی موجب تاثیر بر روی عوامل رونویسی القا شونده با جاسمونیک اسید شده و موجب افزایش بیان ژن های خاصی می شود. تاکنون سه عامل رونویسی القا شونده با متیل جاسمونات در سرخدار شناسایی شده اند که بر روی ژن های مسیر بیوسنتز تاکسول موجب تنظیم بیان ژن های مورد نظر می شوند [۲۷]. در پژوهشی نشان داده شد که اثر متیل جاسمونات وابسته به مدت زمان اعمال تیمار بوده و بیشترین بیان ژن در ۱۸ ساعت بعد از اعمال متیل جاسمونات مشاهده شده است [۲۷]. همچنین استفاده از کیتوزان به عنوان یک الیستور باعث افزایش تولید متابولیت های ثانویه در کشت سوسپانسیون سلولی در گیاهان مختلف می شود. در کشت سوسپانسیون سلولی *T. chinensis* از کیتوزان به عنوان یک محرک برای بهبود تولید تاکسول استفاده شد [۲۸].

۱۰-دی استیل باکاتین III و باکاتین III از مهمترین کلیدی ترین پیش سازهای سنتز تاکسول هستند و در کل میزان آن ها در گیاه نسبت به تاکسول بیشتر می باشد. از این دو پیش ماده جهت تولید نیمه سنتتیک تاکسول استفاده می شود [۲۹، ۳۰]. بنابراین استفاده از تکنیک کشت بافت و کشت سوسپانسیون سلولی برای افزایش تولید این دو پیش ماده بسیار مهم و با ارزش می باشد. ۱۰-دی استیل باکاتین III ترکیبی است که در اواسط مسیر بیوسنتز تاکسول می باشد و توسط آنزیم ۱۰-دی استیل باکاتین III^۱-استیل ترانسفراز به ترکیب باکاتین III تبدیل می شود. بیان تمام ژن هایی که در مسیر قبل از بیوسنتز این دو ترکیب مهم قرار دارند، بر روی میزان تولید ۱۰-دی استیل باکاتین III و باکاتین III تاثیر گذار می باشند.

در مطالعه حاضر، بررسی دقیق بر روی تولید تاکسول و ۱۰-دی استیل باکاتین III، تحت تیمارهای کیتوزان با سه غلظت ۱۰، ۳۰ و ۵۰ میلی گرم در لیتر و جاسمونیک اسید با سه غلظت ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میکرومولار انجام شد. پژوهش با توجه به نتایج بدست آمده از آنالیز داده های دستگاه HPLC نشان داد که کیتوزان ۱۰ میلی گرم در لیتر منجر به افزایش سنتز ۱۰-دی استیل باکاتین III شد. با مشاهده افزایش سنتز مواد حد واسط مسیر بیوسنتز می توان به این نتیجه رسید که سنتز تاکسان های انتهایی مسیر بیوسنتز کمتر باشد و طبق نتایج بدست آمده، این نتیجه به اثبات رسید و تیمار کیتوزان ۱۰ میلی گرم در لیتر که موجب

افزایش تولید تاکسان حد واسط مسیر بیوسنتزی (۱۰-دی استیل باکاتین III) شده است و از طرفی تولید تاکسول در این تیمار افزایش پیدا نکرده است. هرچه میزان ترکیب ۱۰-دی استیل باکاتین III بیشتر باشد میزان تاکسول کمتر می شود و بالعکس. ترکیب تاکسول در تیمار کیتوزان ۳۰ میلی گرم در لیتر افزایش نشان داد.

گونه های مختلف سرخدار حاوی انواع ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی هستند. برگ ها و شاخه های گونه های مختلف سرخدار به علت دارا بودن مقدار زیادی از ترکیبات فنلی مانند ایزوکورسیتین، کوئرسیتین، بیلوبتین و سیادوپیتسین، مورد توجه قرار می گیرند [۳۱]. چهارده فلاونوئید در *T. baccata* شناسایی شده اند که غالب ترین آن ها کوئرسیتین بوده است [۳۲]. استفاده از الیستورها یکی از تکنیک های مورد استفاده برای بهبود تولید متابولیت های ثانویه می باشند. در پژوهش حاضر دیده شد که تیمار کیتوزان با غلظت ۳۰ میلی گرم در لیتر باعث افزایش معنی داری نسبت به نمونه کنترل و دیگر تیمارها در میزان فنل کل شد همچنین بیشترین میزان فلاونوئید در تیمارهای کیتوزان با غلظت های ۳۰ و ۵۰ میلی گرم در لیتر نسبت به نمونه شاهد و دیگر تیمارها مشاهده شد. تمامی تیمارهای باعث افزایش معنی دار نسبت به نمونه شاهد شدند ولی بیشترین مقدار فنل و فلاونوئید در تیمار کیتوزان مشاهده شد. آنزیم های PAL و TAL دو آنزیم بسیار مهم می باشند که در تبدیل آمینو اسید فنیل آلانین و تیروزین به اسیدهای فنولی سینامیک اسید و کوماریک اسید نقش دارند. بنابراین این دو آنزیم نقطه تنظیمی مهمی در بیوسنتز ترکیبات فنلی می باشند و بسیاری از عوامل از جمله الیستورها، بیان ژن و فعالیت آن ها را مورد هدف قرار می دهند [۳۳]. در این پژوهش، در تمامی تیمارهای به کار رفته در کشت سوسپانسیون سلولی، فعالیت آنزیم PAL نسبت به نمونه شاهد افزایش یافته است. از طرفی افزایش فعالیت آنزیم PAL منجر به افزایش تولید ترکیبات فنلی می شود و این ترکیبات با داشتن خاصیت آنتی اکسیدانی و از بین بردن گونه های فعال اکسیژن، سلول ها را در برابر تنش اکسیداتیو محافظت می کنند.

نتیجه گیری

با توجه به افزایش روزافزون بیماری سرطان در جهان و نیاز به

- toward synthetic production of taxol. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*. 2021 Feb 5; 9: 632269.
- [11] Luciano, Á.J., Irineo, T.P., Virginia, O.V.R., Feregrino-Pérez, A.A., Hernández, A.C. and Gerardo, G.G.R., 2017. Integrating Plant Nutrients and Elicitors for Production of Secondary Metabolites, Sustainable Crop Production and Human Health: A Review. *International Journal of Agriculture & Biology*, 19(3).
- [12] Slazak B, Jędrzejska A, Badyra B, Shariatgorji R, Nilsson A, Andrén PE, Göransson U. The influence of plant stress hormones and biotic elicitors on Cyclopentadiene production in *Viola uliginosa* cell suspension cultures. *Plants*. 2022 Jul 19;11(14):1876.
- [13] Ruan J, Zhou Y, Zhou M, Yan J, Khurshid M, Weng W, Cheng J, Zhang K. Jasmonic acid signaling pathway in plants. *International journal of molecular sciences*. 2019 May 20; 20(10): 2479.
- [14] Demidova E, Globa E, Klushin A, Kochkin D, Nosov A. Effect of Methyl Jasmonate on the Growth and Biosynthesis of C13-and C14-Hydroxylated Taxoids in the Cell Culture of Yew (*Taxus wallichiana* Zucc.) of Different Ages. *Biomolecules*. 2023 Jun 9; 13(6): 969.
- [15] Zhoulideh Y, Mashayekhi MR. Effect of methyl jasmonate on Taxol production and bap gene expression of *Taxus baccata*. *Iranian Journal of Rangelands & Forests Plant Breeding & Genetic Research*. 2022 Jan 1; 30(1).
- [16] Mendhulkar VD, Vakil MM. Elicitation of flavonoids by salicylic acid and *Penicillium expansum* in *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees. cell culture. *Research in Biotechnology*. 2013 Mar 21;4(2).
- [17] Tachinbana S, Muranaka T, Itoh K. Effect of elicitors and a biogenetic precursor on paclitaxel production in cell suspension cultures of *Taxus cuspidata* var. nana. *Pakistan Journal of Biological Sciences: PJBS*. 2007 Sep 1; 10(17): 2856-61.
- [18] Zhang CH, Mei XG, Liu L, Yu LJ. Enhanced paclitaxel production induced by the combination of elicitors in cell suspension cultures of *Taxus chinensis*. *Biotechnology Letters*. 2000 Oct; 22: 1561-4.
- [19] OL G. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cultures. *Exp Cell Res*. 1968; 50: 148-51.
- [20] Palazón J, Cusidó RM, Bonfill M, Morales C, Piñol MT. Inhibition of paclitaxel and baccatin III accumulation by mevinolin and fosmidomycin in suspension cultures of *Taxus baccata*. *Journal of biotechnology*. 2003 Mar 6; 101(2): 157-63.
- داروی ضد سرطان تاکسول و همچنین در حال انقراض بودن این گونه با ارزش و کند رشد، نیاز به استفاده از کشت سوسپانسیون سلولی برای تولید تاکسول می باشد. در این پژوهش با استفاده از الیستورهای کیتوزان و جاسمونیک اسید سعی در افزایش تولید تاکسول شد که نتایج آزمایش نشان داد تیمار کیتوزان نسبت به تیمار جاسمونیک اسید از تاثیر بهتری برخوردار بود.
- منابع:**
- [1] Sofias AM, Dunne M, Storm G, Allen C. The battle of “nano” paclitaxel. *Advanced drug delivery reviews*. 2017 Dec 1;122:20-30.
- [2] Kingston DG. *Taxus. The Genus Taxus* Edited by Hideji Itokawa and Kuo-Hsiung Lee (University of North Carolina, Chapel Hill). Taylor and Francis, London and New York. 2003. xiii+ 447 pp. 17× 24.5 cm. \$145.00. ISBN 0-415-29837-7.
- [3] Harshita, Barkat MA, Rizwanullah M, Beg S, Potttoo FH, Siddiqui S, Ahmad FJ. Paclitaxel-loaded nanolipidic carriers with improved oral bioavailability and anticancer activity against human liver carcinoma. *AAPS PharmSciTech*. 2019 Jan 23;20(2):87.
- [4] Alves RC, Fernandes RP, Eloy JO, Salgado HR, Chorilli M. Characteristics, properties and analytical methods of paclitaxel: a review. *Critical reviews in analytical chemistry*. 2018 Mar 4; 48(2): 110-8.
- [5] Xiong X, Gou J, Liao Q, Li Y, Zhou Q, Bi G, Li C, Du R, Wang X, Sun T, Guo L. The *Taxus* genome provides insights into paclitaxel biosynthesis. *Nature Plants*. 2021 Aug; 7(8): 1026-36.
- [6] Dobrowolska D, Bončina A, Klumpp R. Ecology and silviculture of silver fir (*Abies alba* Mill.): A review. *Journal of Forest Research*. 2017 Nov 2; 22(6): 326-35.
- [7] Alavi SJ, Ahmadi K, Hosseini SM, Tabari M, Nouri Z. The response of English yew (*Taxus baccata* L.) to climate change in the Caspian Hyrcanian Mixed Forest ecoregion. *Regional Environmental Change*. 2019 Jun 1; 19: 1495-506.
- [8] Sabater-Jara AB, Tudela LR, López-Pérez AJ. In vitro culture of *Taxus* sp.: strategies to increase cell growth and taxoid production. *Phytochemistry reviews*. 2010 Jun;9:343-56.
- [9] Howat S, Park B, Oh IS, Jin YW, Lee EK, Loake GJ. Paclitaxel: biosynthesis, production and future prospects. *New biotechnology*. 2014 May 25; 31(3): 242-5.
- [10] Mutanda I, Li J, Xu F, Wang Y. Recent advances in metabolic engineering, protein engineering, and transcriptome-guided insights

- [21] Ghassempour A, Rezadoost H, Ahmadi M, Aboul-Enein HY. Seasons study of four important taxanes and purification of 10-deacetylbaccatin III from the needles of *Taxus baccata* L. by two-dimensional liquid chromatography. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies®*. 2009 Apr 28; 32(10): 1434-47.
- [22] Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM. [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In *Methods in enzymology* 1999 Jan 1 (Vol. 299, pp. 152-178). Academic press.
- [23] Sarker U, Oba S. Drought stress enhances nutritional and bioactive compounds, phenolic acids and antioxidant capacity of *Amaranthus leafy vegetable*. *BMC Plant biology*. 2018 Dec;18: 1-5.
- [24] Beaudoin-Eagan LD, Thorpe TA. Tyrosine and phenylalanine ammonia lyase activities during shoot initiation in tobacco callus cultures. *Plant Physiology*. 1985 Jul 1; 78(3): 438-41.
- [25] Wang T, Li L, Zhuang W, Zhang F, Shu X, Wang N, Wang Z. Recent research progress in taxol biosynthetic pathway and acylation reactions mediated by *Taxus* acyltransferases. *Molecules*. 2021 May 12; 26(10): 2855.
- [26] Wang J, Song L, Gong X, Xu J, Li M. Functions of jasmonic acid in plant regulation and response to abiotic stress. *International journal of molecular sciences*. 2020 Feb 20; 21(4): 1446.
- [27] Lenka SK, Nims NE, Vongpaseuth K, Boshar RA, Roberts SC, Walker EL. Jasmonate-responsive expression of paclitaxel biosynthesis genes in *Taxus cuspidata* cultured cells is negatively regulated by the bHLH transcription factors TcJAMYC1, TcJAMYC2, and TcJAMYC4. *Frontiers in plant science*. 2015 Feb 26; 6:115.
- [28] Zhang CH, Xu HB. Improved paclitaxel production by in situ extraction and elicitation in cell suspension cultures of *Taxus chinensis*. *Biotechnology letters*. 2001 Feb;23:189-93.
- [29] Nims E, Dubois CP, Roberts SC, Walker EL. Expression profiling of genes involved in paclitaxel biosynthesis for targeted metabolic engineering. *Metabolic engineering*. 2006 Sep 1; 8(5): 385-94.
- [30] Cragg GM, Newman DJ. Plants as a source of anti-cancer agents. *Journal of ethnopharmacology*. 2005 Aug 22; 100(1-2): 72-9.
- [31] Dang PH, Nguyen HX, Nguyen HH, Vo TD, Le TH, Phan TH, Nguyen MT, Nguyen NT. Lignans from the roots of *Taxus wallichiana* and their α -glucosidase inhibitory activities. *Journal of natural products*. 2017 Jun 23; 80(6): 1876-82.
- [32] Bekhouche M, Morsli A, Slaoui MK, Benyammi R, Krinat S, Paris C, Khelifi L. Antioxidant properties of the needles of *Taxus baccata* L. growing in Algeria and characterization of their antioxidant constituents by LC-DAD-ESI-MSn.
- [33] Samari E, Sharifi M, Ghanati F, Fuss E, Ahmadian Chashmi N. Chitosan-induced phenolics production is mediated by nitrogenous regulatory molecules: NO and PAs in *Linum album* hairy roots. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. 2020 Mar;140(3): 563-76.