مقایسه میزان تاکسول تولید شده در شرایط درون شیشه‌ای با بافت‌های طبیعی گیاه *Taxus baccata L.* و *Taxus berevifolia Nutt.*

زینب رحمتی[1*]، وحیده پیام نور[1]، کمال قاسمی بزدی[2] و پونه ابراهیمی[3]

[1] **گرگان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، دانشکده علوم جنگل، گروه جنگل‌شناسی و اکولوژی جنگل**

[2] **گرگان، مؤسسه تحقیقات پنبه کشور، بیوتکنولوژی**

[3] **گرگان، دانشگاه گلستان، دانشکده علوم پایه، گروه شیمی**

تاریخ دریافت: ۹۴/۱/۳۱ تاریخ پذیرش: ۹۵/۳/۲۹

چکیده

تاکسول به‌عنوان یک ترکیب طبیعی بسیار کارآمد با سمیت پایین در کنترل و درمان طیف گسترده‌ای از سرطان‌ها شامل سرطان پستان، رحم، تخمدان و سایر انواع آن معرفی شده است که منبع اولیه تولید آن، گیاه سرخدار (*Taxus sp*) می‌باشد. محدود بودن تعداد درختان سرخدار و عدم امکان تهیه مستقیم تاکسول از اندام‌های طبیعی بدلیل ممنوعیت قانونی قطع این درختان باعث شده از کشت‌های درون شیشه‌ای به‌عنوان جایگزین مناسب برای تهیه تاکسول استفاده شود. امروزه کشت سلول، بافت‌ها و اندام‌های گیاهی می‌تواند امکان تکثیر سریع و انبوه بسیاری از گیاهان دارویی را فراهم آورد. این تحقیق بمنظور بررسی، تعیین و مقایسه میزان تاکسول موجود در کالوس‌های حاصل از شرایط درون شیشه‌ای با برخی از بافت‌های طبیعی گیاهان *Taxus baccata* و *T. berevifolia* انجام شد. بدین‌منظور برای القای کالوس از ریزنمونه ساقه و برگ و محیط کشت پایه WPM بهمراه هورمون های 2,4-D و کینتین استفاده شد و میزان تاکسول موجود با استفاده از تکنیک HPLC اندازه‌گیری شد. میزان تاکسول بافت‌های طبیعی شامل پوست، ساقه و برگ نیز پس از انجام مراحل عصاره‌گیری، اندازه‌گیری و مورد مقایسه قرار گرفت. نتایج نشان داد که میزان تاکسول در بافت‌های طبیعی هر دو گونه دارای روند مشابهی بود، به‌طوری‌که در برگ بیشتر از ساقه و بعد پوست بود اما مقادیر آن در دو گونه با هم متفاوت و در گونه *T. baccata* بیشتر بود. همچنین میزان تاکسول محاسبه شده در کالوس هر دو گونه *T. baccata* و *T. berevifolia* بیشتر از بافت‌های طبیعی بود.

واژه‌های کلیدی: تاکسول، کالوس، کشت بافت، سرخدار ایرانی، سرخدار برگ ریز.

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۸۳۴۵۳۲۴۷، پست الکترونیکی: z.rahmati65@yahoo.com

مقدمه

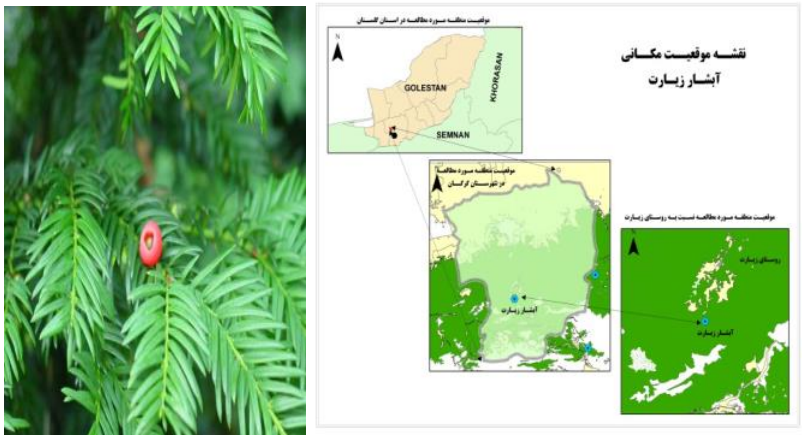
تاکسول (Taxol) یک نوع آلکالوئید دی‌ترپن است که از گونه‌های مختلف جنس *Taxus* بدست می‌آید و یکی از مهمترین داروهای ضد سرطانی است که تاکنون شناسایی شده است و امروزه بعنوان یکی از امید بخش‌ترین داروهای ضد سرطان در علم پزشکی مطرح می‌باشد (۱۶). نام علمی آن پاکلی تاکسول است (۱۸) و فرمول شیمیایی آن به صورت $C_{47}H_{51}NO_{14}$ و وزن مولکولی **آن** ۸۵۳/۹۲ دالتون می‌باشد که دارای نقطه ذوب ۱۵۸-۱۶۰ درجه سانتیگراد است (۱۳). ساختمان شیمیایی این ماده دارویی دارای دو بخش است و شامل هسته باکاتین و یک زنجیره جانبی مشتق شده از فنیل آلانین که به کربن ۱۳ متصل شده است (۱۳).

تاکسول برای اولین بار در سال ۱۹۷۱ توسط وانی و همکاران از پوست، ریشه و سایر بخش‌های درخت *T. brevifolia* و دیگر گونه‌های جنس سرخدار یافت شد (۱۹). تولید تاکسول بوسیله کالوس‌های کشت شده سرخدار اولین بار توسط کریستن و همکاران در سال ۱۹۸۹ گزارش شد و پس از آن محققان دیگری فعالیت خود را در این زمینه آغاز کردند (۱۱). تاکسول در تمامی بخش‌های درخت سرخدار بجز میوه تازه آن وجود داشته و مقادیر آن در اندام‌های مختلف و حتی گونه‌های متفاوت یکسان نیست و از ۰/۰۱ تا ۰/۰۳ درصد وزن خشک متفاوت است (۱۵). در اندام‌های مختلف اکثر گونه‌های سرخدار مقادیر متفاوتی از تاکسول وجود دارد که این مقدار می‌تواند علاوه بر گونه تحت تأثیر عواملی مانند سن و جنس گیاه، شرایط اقلیمی و آب و هوایی، وضعیت خاک محل رویش و میزان دسترسی گیاه به نور باشد (۱۷). دلاور (۱۳۷۷) به بررسی و مقایسه غلظت تاکسول در اندام‌های مختلف *T. baccata* در دو منطقه گرگان و نور با لحاظ کردن تغییرات فصلی پرداخت. نتایج بدست آمده نشان داد که بالاترین غلظت تاکسول در بین بخش‌های مختلف درخت در برگ‌ها (بین ۰/۰۲۸۵ تا ۰/۰۵۵ درصد وزن خشک) و ریشه‌ها (۰/۰۲۳ تا ۰/۰۴۷ درصد وزن خشک) وجود دارد و پوست ساقه‌های جوان در مرتبه بعدی قرار دارند. کمترین غلظت تاکسول هم در شاخه‌ها (بین۰/۰۰۱۳ تا ۰/۰۰۵درصد وزن خشک) مشاهده شد. قربانلی و دلاور (۱۳۸۰) محتوای تاکسول در جداکشت-های ساقه (بین۰/۰۲۱ تا ۰/۰۵۶ درصد وزن خشک) بطور مشخصی از کشت برگ‌ها (۰/۰۱۸ تا ۰/۰۳۴ درصد وزن خشک) بیشتر می‌باشد. Ahadi و همکاران (۸) مقدار کمی تولید تاکسول را در کشت کالوس و سوسپانسیون سلولی گونه‌های *T. baccata* و *T. berevifolia* مورد بررسی قرار دادند و با توجه به نتایج بدست آمده بیان کردند که گونه *T. baccata* دارای پتانسیل و توانایی بیشتری نسبت به گونه *T. berevifolia* برای تولید داروی ضد سرطان، تاکسول است.

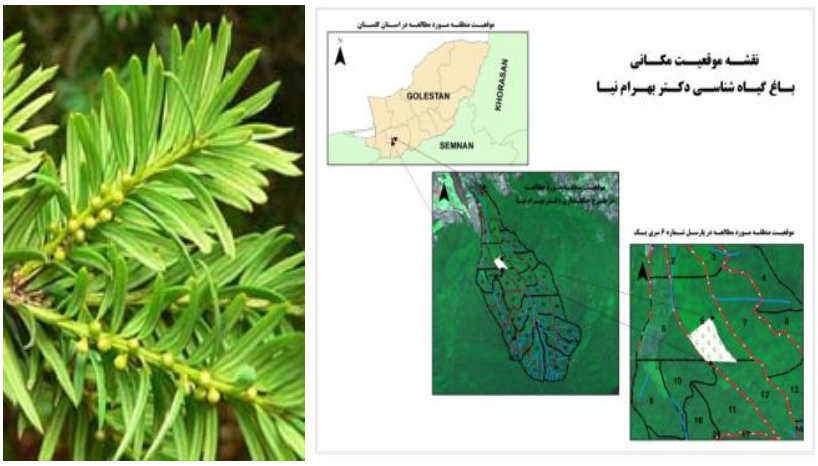
با توجه به کند رشد و رو به انقراض بودن درختان سرخدار، تولید و عرضه تاکسول خالص و مطمئن‌تر به بازار با هزینه کمتر و سرعت بالا، همچنین عدم تأثیرپذیری از محیط، قدرت تنظیم، کنترل و امکان مکانیزه کردن و همچنین کیفیت پایدار فرآورده حاصل باعث شده است که کشت سلولی سرخدار یکی از مهمترین راه‌کارهای تولید بلند مدت و پایدار تاکسول باشد (۲۲). با وجود آن که مواد تولیدی توسط سلول‌های کشت شده در بیورآکتورها یا کشت‌های سوسپانسیون سلولی لزوماً مشابه مواد تولیدی توسط گیاه کامل نخواهد بود ولی معمولاً عملکرد آنها بیشتر است (۲۰). امروزه برای تولید تاکسول از کالوس‌های حاصل از شرایط درون شیشه‌ای یا سوسپانسیون سلولی استفاده می‌شود (۱۲). با توجه به اهمیت موضوع، این تحقیق با هدف مقایسه میزان تاکسول موجود در کالوس-های حاصل از شرایط درون شیشه‌ای با برخی از بافت‌های طبیعی *T. baccata* (سرخدار ایرانی) و *T. berevifolia* (سرخدار برگ ریز) انجام شد.

مواد و روشها

مراحل آماده‌سازی ریز نمونه‌ها، کشت کالوس و عصاره‌گیری: این تحقیق در آزمایشگاه کشت بافت دانشکده علوم جنگل، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان در سال ۱۳۹۱ انجام شد. نمونه برداری از ساقه و برگ قسمت‌های جوان و سالم درختان *Taxus baccata* واقع در دره زیارت گرگان با مختصات طول جغرافیایی ″۳۵ ′۲۷ °۵۴ و عرض جغرافیایی ″۱۲ ′۴۰ °۳۶ (شکل۱) و درختان *T. berevifolia* واقع در باغ گیاه شناسی جنگل آموزشی- پژوهشی گرگان با مختصات طول جغرافیایی ″۳۰ ′۲۲ °۵۴ و عرض جغرافیایی ″۱۲ ′۴۶ °۳۶ (شکل۲) بصورت تصادفی از درختان بالغ ۳۵ ساله انجام شد.



شکل ۱- موقعیت مکانی آبشار زیارت و گونه *T. baccata*



شکل ۲- موقعیت مکانی باغ گیاهشناسی و گونه *T. berevifolia*

شستشوی اولیه ریز نمونه‌ها با آب معمولی حاوی چند قطره مایع ظرفشویی بمدت سه تا چهار دقیقه انجام شد. پیش سترون سازی ریز نمونه‌ها با قرار دادن در محلول قارچ کش بنومیل به غلظت چهار گرم در لیتر بمدت ۲ ساعت انجام گردید. سترون سازی نهایی ریز نمونه‌ها با استفاده از محلول کلرید جیوه یک دهم درصد بمدت ۵ دقیقه و در نهایت چندین مرتبه شست‌وشو با آب مقطر استریل در زیر هود لامینار فلو انجام شد. برای القای کالوس ریزنمونه‌های استریل شده در محیط کشت جامد WPM با تیمار هورمونی ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر کینتین کشت شده و برای القای کالوس در شرایط تاریکی و دمای ۲±۲۴ درجه سانتی‌گراد در انکوباتر قرار داده شدند. ریزنمونه‌ها پس از تشکیل کالوس، هر ۲۰ روز یکبار واکشت شده و پس از گذشت ۲ ماه از زمان کشت برای انجام مراحل عصاره‌گیری مورد استفاده قرار گرفتند. برای انجام مراحل عصاره گیری از روش یاری خسروشاهی و همکاران (۲۰۱۱) با اندکی تغییر استفاده شد (۲۱). ابتدا میزان ۵ گرم از کالوس‌ها بمدت ۳ روز در آون با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا خشک شود و در شرایط نسبتاً تاریک در هاون چینی تمیز ریخته شد و میزان ۵۰ میلی‌لیتر متانول مخصوصHPLC به آن اضافه و کوبیده شد، بطوری‌که در نهایت عصاره غلیظ و یکنواختی از کالوس بدست آمد. عصاره برای حباب‌زدایی بمدت ۱۵ دقیقه در دمای۲۰ درجه سانتی‌گراد در دستگاه

اولتراسوند و بمدت ۲ ساعت بر روی شیکر مغناطیسی بدون حرارت قرار داده شد و بعد بمدت ۱۰ دقیقه با ۴۰۰۰ دور در دقیقه بر روی دستگاه سانتریفیوژ قرار گرفت. عصاره نمونه‌ها از کاغذ صافی عبور داده شد و برای تبخیر حلال نمونه، در دستگاه روتاری قرار گرفت. حجم عصاره کاراملی شکل با اضافه کردن متانول به ۳ میلی‌لیتر رسانده شد و بعد از فیلتر ۰/۴۲ میکرون عبور داده شد.

مراحل آماده سازی و عصاره‌گیری از بافت‌های طبیعی: بافت‌های طبیعی شامل پوست، ساقه و برگ از درختان مورد نظر جدا گردیدند. نمونه‌ها برای خشک شدن بمدت ۲ هفته در دستگاه آون با درجه حرارت ۴۰ درجه سانتی-گراد قرار داده شدند. پس از خشک شدن، نمونه‌ها خرد شده و به ذراتی به اندازه کمتر از یک میلی‌متر تبدیل شدند. ۹ گرم از قطعات پودر شده خشک، وزن شده و با ۹۰ میلی‌لیتر متانول مخصوصHPLC مخلوط و بمدت ۱۵ دقیقه در دستگاه اولتراسوند قرار داده شدند و بمدت ۲ ساعت بر روی شیکر مغناطیسی بدون حرارت قرار گرفته و پس از آن بمدت ۱۰ دقیقه بر روی دستگاه سانتریفیوژ با ۴۰۰۰ دور در دقیقه قرار گرفتند. برای جداسازی فاز مایع که روی نمونه‌ها قرار گرفته بود، نمونه‌ها از کاغذ صافی عبور داده شدند و برای تبخیر حلال نمونه، در دستگاه روتاری قرار داده شدند تا عصاره کاملاً خشک شده و ماده کاراملی شکلی باقی بماند (مدت زمان لازم برای خشک شدن نمونه‌ها ۴۰ تا۶۰ دقیقه بود). عصاره به جای مانده با اضافه کردن متانول مخصوصHPLC به حجم ۵ میلی‌لیتر رسانده و از فیلتر ۰/۴۲ میکرون عبور داده شد.

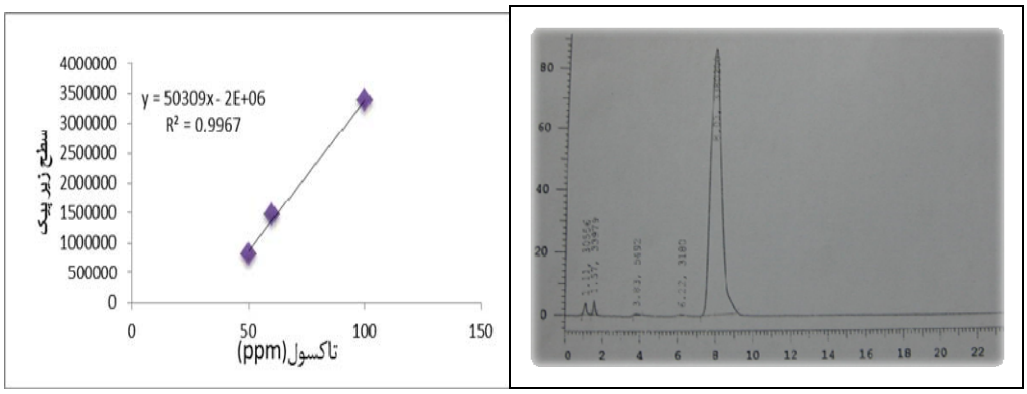
اندازه‌گیری محتوای تاکسول موجود در نمونه‌ها: برای سنجش تاکسول موجود در نمونه‌ها از روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا یا HPLC (Germany، Merck) استفاده شد. سنجش‌ها با استفاده از ستون C۱۸ با ابعاد ۴/۶×۲۵۰ و فاز متحرک شامل متانول و آب به نسبت ۵۰ به ۵۰ و با شدت جریان یک میلی‌متر بر دقیقه انجام شد. طول موج UV مورد استفاده ۲۷۰ نانومتر و میزان تزریق برای استاندارد و نمونه ها ۲۰ میکرولیتر بود. نمونه‌ها قبل از تزریق با استفاده از فیلتر ۰/۴۲ میکرون دو بار صاف شدند. استاندارد تاکسول با کمک شرکت ایرانی پژوهش خزر از شرکت Sigma تهیه گردید. پس از کالیبره کردن ستون‌ها، میزان تاکسول موجود در هر نمونه با استفاده از تزریق محلول استاندارد و بدست آمدن منحنی کالیبراسیون و با مقایسه زمان بازداری ظاهر شدن پیک تاکسول خالص تزریق شده با غلظت‌های مختلف و پیک‌های حاصل از عصاره‌های تزریقی انجام شد. برای تعیین میزان تاکسول هر یک از عصاره‌ها، سطح زیر پیک مربوطه در زمان مورد نظر اندازه‌گیری شد و با قرار دادن این سطح در معادله حاصل از منحنی کالیبراسیون، میزان تاکسول موجود بر حسب میلی‌گرم در یک گرم وزن خشک از هر نمونه تخمین زده شد. تعداد دفعات تزریق برای هر نمونه۳ تکرار در نظر گرفته شد و استاندارد تاکسول نیز بصورت روزانه به دستگاه تزریق شد.

آنالیز داده‌ها و محاسبات آماری: داده‌های بدست آمده بر اساس آزمایش فاکتوریل دو عامله مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. رسم نمودار در Excel، مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن و آنالیز داده‌ها نیز با استفاده از نرم افزار SPSS انجام شد.

نتایج

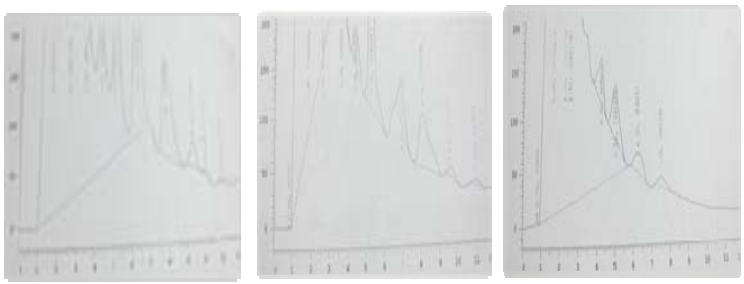
با تزریق استوک استاندارد تاکسول (شکل ۳- الف) به دستگاه HPLC، پس از گذشت مدت زمان ۵ تا ۱۵ دقیقه پیک‌هایی ظاهر شدند که این پیک‌ها بیانگر غلظت تاکسول بودند. معادله حاصل از منحنی کالیبراسیون حاصل از تزریق استاندارد تاکسول به صورت ($y=0.5031x-16.341$ و $R^2=0.9967$) بدست آمد. نمونه‌های عصاره-گیری شده از بافت‌های طبیعی پوست، ساقه و برگ گونه *T. baccata* (شکل ۴- الف، ب و ج) و بافت‌های طبیعی پوست، ساقه و برگ گونه *T. berevifolia* (شکل ۵- الف،

ب و ج) به دستگاه HPLC تزریق و با استفاده از معادله بدست آمده (شکل۳- ب)، میزان تاکسول موجود بصورت میلی‌گرم در یک گرم وزن خشک برای هر نمونه تعیین گردید.



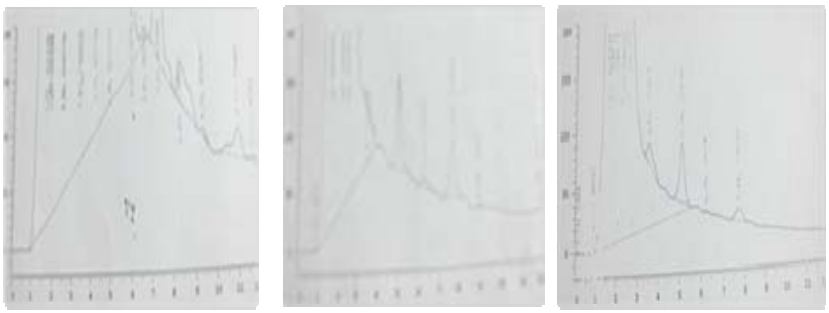
ب الف

شکل ۳- کروماتوگرام حاصل از تزریق استاندارد تاکسول (الف) و منحنی کالیبراسیون حاصل از تزریق استاندارد تاکسول (ب)



ج ب الف

شکل ۴- کروماتوگرام حاصل از تزریق عصاره پوست (الف)، ساقه (ب) و برگ (ج) گونه *T. baccata*



ج ب الف

شکل ۵- کروماتوگرام حاصل از تزریق عصاره پوست (الف)، ساقه (ب) و برگ (ج) گونه *T.berevifolia*

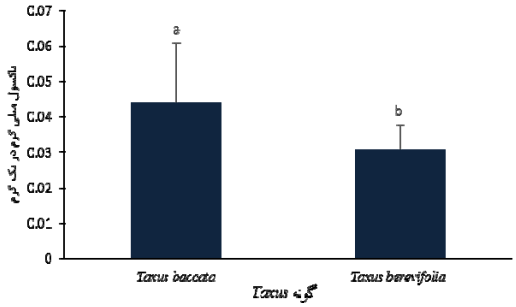
نتایج تجزیه واریانس حاصل از بررسی تأثیر داده‌های مربوط به نوع گونه *Taxus* و نوع بافت طبیعی در جدول ۱ ارائه شده است. نتایج نشان داد که اثر هریک از عوامل گونه *Taxus*، نوع بافت طبیعی و همچنین اثر متقابل دو فاکتور گونه *Taxus* × نوع بافت طبیعی در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود.

نتایج مقایسه میانگین حاصل از گونه *Taxus* بر میزان تاکسول در شکل ۶ ارائه شده است. با توجه به نتایج حاصل بین مقدار تاکسول موجود در گونه *T. baccata* با

گونه *T. berevifolia* اختلاف معناداری وجود دارد. همان گونه که مشاهده می‌شود، مقدار تاکسول موجود در گونه *T. baccata* (۰/۰۴۴) میلی‌گرم در یک گرم و مقدار آن در گونه *T. berevifolia* (۰/۰۳۱) میلی‌گرم در یک گرم بود.

جدول ۱- تجزیه واریانس تأثیر گونه *Taxus*، نوع بافت طبیعی و اثر متقابل آنها بر میزان تاکسول (میلی‌گرم در یک گرم)

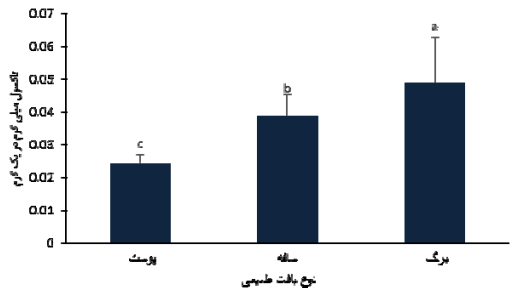
منبع تغییرات (SOV)	درجه آزادی (df)	میانگین مربعات (MS)	مقدارF	سطح معنی‌داری
گونه *Taxus*	۱	۰/۰۰۱	۵۱/۳۳۷	۰/۰۰۰
نوع بافت طبیعی	۲	۰/۰۰۱	۶۸/۲۸۸	۰/۰۰۰
گونه *Taxus* × نوع بافت طبیعی	۲	۰/۰۰۰	۱۸/۰۳۷	۰/۰۰۰
اشتباه	۱۲	۰/۰۰۰۰۱۳۳۳		
کل	۱۸			



شکل ۶- نتایج مقایسه میانگین میزان تاکسول تحت تأثیر فاکتور نوع گونه *Taxus*

نتایج مقایسه میانگین حاصل از نوع بافت طبیعی بر میزان تاکسول در شکل۷ ارائه شده است. بر اساس این نتایج، از نظر میزان تاکسول بین بافت‌های طبیعی مورد مطالعه اختلاف معنی‌داری وجود دارد. بر این اساس بیشترین میزان تاکسول در برگ (۰/۰۴۹ میلی‌گرم در یک گرم) وجود داشت، در حالی که بافت پوست با مقدار (۰/۰۲۴ میلی‌گرم در یک گرم) دارای کمترین مقدار تاکسول بود و بافت ساقه نیز با مقدار(۰/۰۳۹ میلی‌گرم در یک گرم) در حالتی بین این دو قرار داشت. بطور کلی میزان تاکسول در بافت‌های طبیعی پوست، ساقه و برگ *بدین* ترتیب پوست < ساقه < برگ می‌باشد.

نتایج مقایسه میانگین حاصل از اثر متقابل گونه *Taxus* و نوع بافت طبیعی در جدول ۲ و شکل ۸ ارائه شده است.



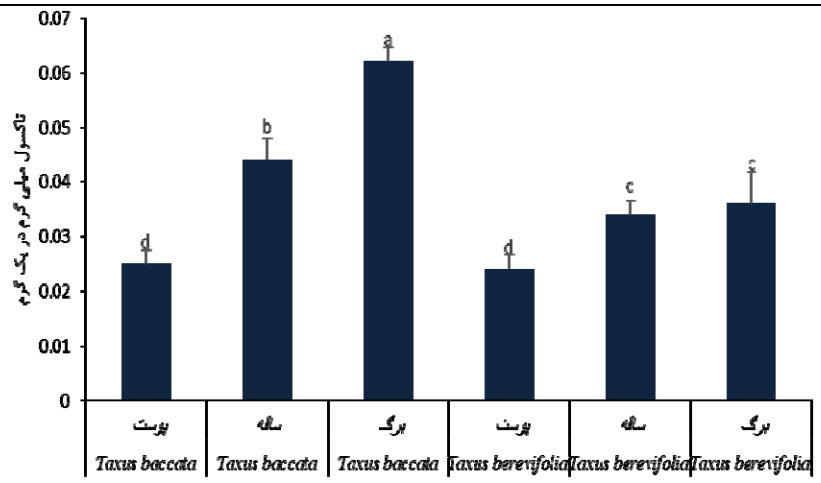
شکل ۷- نتایج مقایسه میانگین میزان تاکسول تحت تأثیر فاکتور نوع بافت طبیعی

بر اساس این نتایج در هر دو گونه مورد مطالعه *T. baccata* و *T. berevifolia* بیشترین میزان تاکسول در بافت برگ وجود دارد. با وجود این بافت پوست دارای مقدار تاکسول کمتری بوده و بافت ساقه نیز بین این دو قرار دارد. بطور کلی میزان تاکسول در بافت‌های طبیعی پوست، ساقه و برگ گونه *T. baccata* و *T. berevifolia* به ترتیب پوست < ساقه < برگ می‌باشد.

متأسفانه بدلیل آلودگی فراوان و طولانی بودن زمان کالوس‌دهی ریز نمونه‌های برگ و رشد بسیار کم آنها، مراحل عصاره‌گیری و تخمین میزان تاکسول موجود در کالوس‌های برگ انجام نشد.

جدول ۲- درصد تاکسول موجود در بافت‌های طبیعی درخت *T. baccata* و *T. berevifolia*

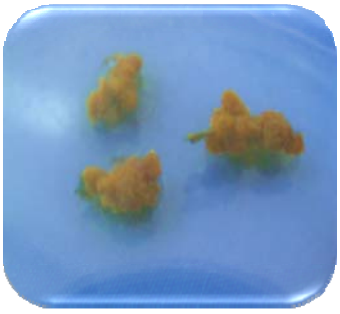
گونه *Taxus*	نمونه	تاکسول میلی‌گرم در یک گرم بافت خشک
T. baccata	پوست	۰/۰۲۵
	ساقه	۰/۰۴۴
	برگ	۰/۰۶۲
T. berevifolia	پوست	۰/۰۲۴
	ساقه	۰/۰۳۴
	برگ	۰/۰۳۶



و نوع بافت طبیعی *Taxus* اثر متقابل گونه

شکل ۸ – نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل گونه *Taxus* و نوع بافت طبیعی بر میزان تاکسول

بدین جهت از کالوس ریزنمونه ساقه هر دو گونه (شکل ۹) برای عصاره‌گیری و تخمین میزان تاکسول موجود در آن استفاده گردید.



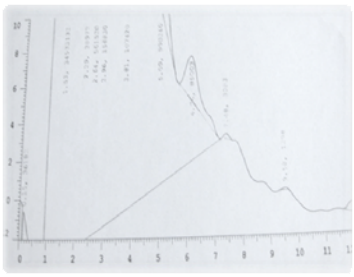
شکل ۹- کالوس ریزنمونه ساقه *T. baccata*

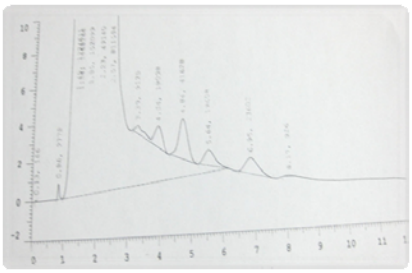
با انجام آنالیز کروماتوگرام کالوس ساقه گونه *T. baccata* (شکل ۱۰- الف) و گونه *T. berevifolia* (شکل ۱۰- ب) و محاسبه داده‌های مرتبط، بر اساس نتایج بدست آمده، میزان تاکسول موجود در کالوس گونه *T. berevifolia* (۰/۲۴۱) میلی‌گرم در یک گرم وزن خشک کالوس، بیشتر از کالوس گونه *T. baccata* (۰/۲۳۹) میلی گرم در یک گرم وزن خشک بود (جدول ۳).

بحث و نتیجه گیری

با توجه به افزایش جمعیت کره زمین و عدم کفایت وسعت اراضی کشاورزی برای کشت انواع گیاهان بمنظور تأمین مواد اولیه دارویی، استفاده از روش‌های کشت بافت

می‌تواند روش جایگزین مناسبی باشد (۱). توسعه روش-های بیوتکنولوژی مانند ریزازدیادی، کشت بافت، کشت سلول و ریشه‌های موئین یکی از مهمترین شیوه‌های حل مشکلات مربوط به اثرات مخرب قطع گیاهان و درختان با خصوصیات غذایی، صنعتی و دارویی است (۷).





الف ب

شکل ۱۰- کروماتوگرام حاصل از تزریق عصاره کالوس ساقه *T.baccata* (الف) و *T.berevifolia* (ب)

جدول ۳- درصد تاکسول موجود کالوس ریزنمونه ساقه محیط کشت WPM در گونه *T. baccata* و *T .berevifolia*

نمونه کالوس	تاکسول میلی‌گرم در یک گرم بافت خشک
T. baccata	۰/۲۳۹
T. berevifolia	۰/۲۴۱

با توجه به اینکه در طبیعت سرعت تولید متابولیت‌های ثانویه کند می‌باشد، استفاده از روش‌های بیوتکنولوژی در شرایط درون شیشه‌ای این موقعیت را فراهم می‌سازد که تولید در شرایط کنترل شده و در زمان کوتاه‌تری انجام شود (۳). در این راستا توسعه سیستم‌های سریع کشت و تکثیر درون شیشه‌ای فرصتی بی‌نظیر برای تولید محصولات مختلف متابولیت ثانویه در آزمایشگاه و بدون نیاز به محدودیت زمانی و زمین‌های قابل کشت و عرصه‌های جنگلکاری خواهد بود. اصولاً ساده‌ترین روش دستیابی به تاکسول، استخراج آن از منابع گیاهیست (۲۰). درختان مناسب برای استخراج تاکسول درختان چند صد ساله هستند. با توجه به محدود بودن تعداد درختان سرخدار و حتی در معرض خطر انقراض بودن این درختان و پائین بودن عملکرد این روش بدلیل مقدار اندک تاکسول موجود در آنها، می‌تواند منجر به نابودی این منبع طبیعی گردد (۶). از این رو بنظر می‌رسد که کشت سلولی سرخدار یکی از مهمترین روش‌های جایگزین برای تولید تاکسول در دنیا باشد (۴). زیرا جداسازی تاکسول و دیگر تاکسوئیدهای مفید از کشت سلولی گیاه سرخدار به مراحل کمتری نسبت به جداسازی آن از بافت‌های طبیعی نیاز دارد و میزان ترکیبات تداخل کننده در سلول‌های حاصل از کشت سلولی کمتر است (۱۴). در این تحقیق کالوس‌زایی در شرایط درون شیشه‌ای نمونه‌های گیاهی در محیط کشت WPM، القا و میزان تاکسول آنها با مقادیر موجود در بافت‌های طبیعی در دو گونه *T. baccata* و *T .berevifolia* مقایسه گردید. بر اساس نتایج بدست آمده میزان تاکسول تولید شده از کالوس جدا کشت‌های ساقه دو گونه مورد مطالعه بین ۰/۲۳۹ تا ۰/۲۴۱ میلی‌گرم در یک گرم بافت خشک کالوس در نوسان بود که این مقادیر در مقایسه با میزان تاکسول بدست آمده از بخش‌های مختلف درخت سرخدار قابل توجه می‌باشد. با ارزیابی مقدار تاکسول موجود در کالوس‌های درون شیشه‌ای، میزان تاکسول موجود در کالوس‌های ساقه حاصل از محیط کشت WPM در گونه *T. berevifolia* بیشتر از گونه *T. baccata* بود. با این حال این مقدار در هر دو گونه بیشتر از میزان تاکسول در بافت‌های طبیعی بدست آمد. نوع محیط کشت پایه یا به عبارت دیگر نوع و غلظت عناصر غذایی می‌تواند بر میزان

تولید تاکسول اثر قابل توجهی داشته باشد. علاوه بر آن، می‌تواند بر میزان ترشح و مبادله محصولات از غشای سلول نیز مؤثر باشد (۱۰). Ahadi و همکاران (۹) میزان تاکسول موجود در کالوس‌های حاصل از کشت سوسپانسیون گونه *T. baccata* با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا را برابر با ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر بدست آوردند. محیط کشت WPM نسبت به محیط کشت‌های پایه دیگر، دارای مقادیر بالاتری از پتاسیم به شکل K_2SO_4 و نیز مقادیر قابل توجهی نیترات آمونیوم [$(NH_4)NO_3$] است که ممکن است بطور مستقیم یا غیرمستقیم بر مسیر متابولیکی تاکسول و سنتز آن مؤثر باشد و به همین دلیل باعث افزایش تاکسول در کالوس‌های این دو گونه نسبت به بافت‌های طبیعی شده باشد. Ahadi و همکاران (۸) اعلام کردند که گونه *T. baccata* دارای پتانسیل و توانایی بیشتری در تولید تاکسول نسبت به گونه *T. berevifolia* است که با این نتایج متفاوت می‌باشد. از دلایل ایجاد این اختلاف می‌توان به محیط کشت پایه و غلظت‌های هورمونی مورد استفاده اشاره کرد.

نتایج بدست آمده نشان داد که مقدار تاکسول موجود در بافت‌های پوست، ساقه و برگ هر دو گونه به‌ترتیب شامل پوست < ساقه < برگ می‌باشد. اما با وجود این روند یکسان، میزان تاکسول بین دو گونه سرخدار مورد مطالعه با هم متفاوت بود. میزان تاکسول در بافت‌های طبیعی پوست، ساقه و برگ گونه *T. baccata* بیشتر از گونه *T. berevifolia* بود. تفاوت در میزان تاکسول علاوه بر تفاوت گونه‌ها ممکن است به اختلاف محل رویشگاه، فاکتورهای محیطی، سن گیاه، شرایط اقلیمی و آب و هوایی، وضعیت خاک محل رویش و میزان دسترسی گیاه به نور مرتبط باشد. حضور *T. baccata* در رویشگاه طبیعی خود و سن نسبتاً زیاد آن در مقایسه با غیر بومی بودن *T. berevifolia* و سن پایین‌تر و همچنین دست کاشت بودن آن می‌تواند از دیگر عوامل اساسی این اختلاف باشد. دلاور (۱۳۷۷) گزارش کرد که بالاترین غلظت تاکسول در بین بخش‌های مختلف درخت در برگ‌ها بین ۰/۰۲۸۵ تا ۰/۰۵۵ درصد وزن خشک بوده و ساقه‌ها در مرتبه بعدی قرار دارند. با توجه به نتایج بدست آمده مقدار تاکسول موجود در یک گرم بافت خشک برگ دو گونه مورد مطالعه بین مقادیر ۰/۰۶۲ تا ۰/۰۳۴ قرار داشت که با نتایج تحقیق فوق مطابقت دارد. Nadem و همکاران (۱۷) اعلام کردند که در بین اندام‌های مختلف اکثر گونه‌های سرخدار، بیشترین مقدار تاکسول در بافت پوست وجود دارد که با نتایج این تحقیق مغایرت دارد. با توجه به نتایج حاصل از مقایسه میزان تاکسول موجود در بافت‌های طبیعی دو گونه، در بین سه بافت مورد مطالعه کمترین مقدار تاکسول در بافت پوست مشاهده شد و بافت برگ دارای میزان بیشتری بود. با توجه به مراحل مختلف اجرای این تحقیق، بهینه سازی تیمارهای سترون‌سازی، محیط کشت و تیمارهای هورمونی برای تولید کالوس در ریزنمونه ساقه حدود ۴ تا ۵ ماه به طول انجامید. با انجام محاسبات و آنالیز داده‌ها، میزان تاکسول موجود در کالوس‌های هر دو گونه مورد مطالعه بیشتر از بافت‌های رویشی درختان بدست آمد. با در نظر قرار دادن این موضوع که سرخدار درختی همیشه سبز بوده و بدست آوردن کالوس‌های تمایز نیافته در شرایط آزمایشگاهی در تمام فصول سال بدون محدودیت امکان پذیر است، بنظر می‌رسد که استخراج تاکسول از کالوس-های حاصل از این تکنیک، جایگزین بسیار مناسب و مقرون بصرفه‌ای برای تولید این داروی ضد سرطان با ارزش در صنعت داروسازی کشور و تأمین نیاز بیماران باشد. همچنین با توجه به اینکه عوامل متعددی از جمله تیمارهای نور و تاریکی، تغییرات هورمونی، افزایش محرکهای زیستی و غیرزیستی و غیره سبب تغییراتی در میزان متابولیت ثانویه در درختان و گیاهان می‌شود، مناسب است تحقیقات تکمیلی دیگری در جهت افزایش این ماده مؤثره انجام شود تا بتوان از این منابع با ارزش طبیعی و دارویی کشورمان بصورت بهینه با استفاده از تکنولوژی روز بدون قطع آنها در جنگل بهره‌مند شد.

سپاسگزاری

از مسئولان محترم دانشکده علوم جنگل، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، به پاس فراهم کردن امکانات لازم برای اجرا و پیشبرد این تحقیق که همکاری صمیمانه‌ای با اینجانب داشته‌اند، کمال تشکر و قدردانی را دارم.

منابع

۱- آذر مهر، ب.، کریمی، ف.، تقیزاده، م.، و موسوی گرگری، ل. ۱۳۹۲. مقایسه رشد و توان تولید متابولیت‌های ثانویه در دودمان-های ریشه مویی تراریخت حاصل از کاسنی (*Cichorium intybus*). مجله پژوهش‌های گیاهی (مجله زیست شناسی گیاهی ایران)، جلد ۲۶، شماره ۴، صفحه ۴۷۶-۴۸۵.

۲- دلاور، ک. ۱۳۷۷. بررسی اثر عوامل مختلف محیطی بر روی غلظت تاکسول در گیاه کامل و کشت بافت سرخدار (*Taxus baccata*). پایان نامه دوره کارشناسی ارشد. دانشگاه تربیت مدرس.

۳- شیرازی، ز.، پیری، خ.، میرزایی اصل، ا.، حسنلو، ط و قیاسوند، ط. ۱۳۹۳. اثر محرک‌های اسید سالیسیلیک و متیل جاسمونات بر میزان تولید ماده مؤثره گلیسیریزین و ایزولیکویریتیجنین در ریشه‌های مویین شیرین بیان (*Glycyrrhiza glabra L.*). مجله پژوهش‌های گیاهی (مجله زیست شناسی ایران)، جلد ۲۷، شماره ۳، صفحه ۴۴۰-۴۴۹.

۴- عباسی کجانی، آ.، مفید، م.، و اطرشی، م. ۱۳۹۱. بررسی تأثیر نوع محیط کشت پایه بر تولید داروی ضد سرطان تاکسول در کشت سوسپانسیون سلولی سرخدار (*Taxus baccata L*). مجله زیست شناسی گیاهی، سال ۴، شماره ۱۲، صفحه ۸۳-۸۸.

۵- قربانلی، م.، و دلاور، ک. ۱۳۸۰. بررسی اثر نوع و غلظت قندها بر میزان تولید تاکسول در کشت بافت سرخدار (*Taxus baccata L*). مجله علوم کشاورزی ایران، جلد۳۲، شماره۳، صفحه ۵۷۵-۵۸۳.

۶- یاری خسروشاهی، آ . ۱۳۸۳. بررسی پاسخ به کشت بافت در سرخدار و میزان تاکسول تولیدی در شرایط in vitro. پایان نامه دوره کارشناسی ارشد. دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، ۱۳۱ صفحه.

۷- مهری راد، ن.، پیام نور، و.، و نظری، ج.۱۳۹۴. **اثر سن پایه و نور برکالزایی توس (*Betula litwinowii*) و بتولین القاء شده در شرایط درون شیشه‌ای. دو فصلنامه علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران، جلد ۲۳، شماره ۱، صفحه ۹۳-۱۰۲.**

8- Ahadi, H., Mirjalili, M.H., Farzaneh, M., shirshekan, M., and Ghassempour, A. 2013. Quantification of Taxol in wild mature and in vitro cell suspension cultures of *Taxus baccata* and *Taxus berevifolia*: A Comparatives study.2 nd National Congre on Medicinal Plants,Tehran, 1409 p.

9- Ahadi, H., Mirjalili, M.H., Farzaneh, M., shirshekan, M., and Ghassempour, A. 2013. Cell suspension culture establishment of *Taxus baccata* for the production of the anticancer drug taxol. 2nd National Congress on Medicinal Plants,Tehran, 1148 p.

10- Abbasi Kajani, A., Moghim, S., and Mofid, M.R. 2012. Optimization of the basal medium for Improving production and secretion of taxanes from suspension cell culture of *Taxus baccata L*. Darul Journal of Pharmaceutical Sciences, 1-6.

11- Christen, A.A., Bland, J., and Gibson, D.M. 1989. Cell culture as a means to produce taxol Produce taxol. Proc. Am.Axxoc .Cancer, 30: 2252.

12- Denis, J.N., Greene, E., Guenard, D., Gueritt, F., Managatal, L., and Poiter, P. 1988. A highly efficient approach to natural taxol. Journal American Chemical, 110: 5917 - 5919.

13- Jennwein, S., and Croteau, R. 2001. Taxol: biosynthesis, molecular genetics, and biotechnological applications. Applied Microbiology and Biotechnology, 57(2-1): 9-13.

14- Ketchum, R.B.E., and Croteau, R. 1998. Recent progress toward an understanding of taxol biosynthesis in plant cell cultures. Elsevier Science, Amsterdam, 339-348.

15- Lesani, MR. 1999. Yew. Tehran: Mministry of Jahade Sazandegi Publicathion. 8-17.

16- Mihaljevic, S., and Bjedow, I. 2002. Effect of explant source and growth regulators on in vitro callus growth of *Taxus baccata* L. *washingtonii*. Food Technology. Biotechnology, 40(4): 299-303.

17- Nadeem, M., Rikhari, H.C., Anil Kumar, L., Palni, M.S., and Nandi, S.K. 2002. Taxol content in the bark of Himalayan Yew in relation to tree age and sex. Phytochemistry, 60: 627–631.

18- Nicolaou, K. C., Guy, R. K., and Potier, P. 1996. Taxoids: New weapons against cancer. Journal Scientific American: 84-86.

19- Wani ,M.C., Taylor, H.L., wall, M.E., Coggon, P., and Mcphail, A.T. 1971. Plant antitumor agens The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus berevifolia* .Journal of the American Chemical Society , 93: 2325-2327.

20- Yari khosroshahi, A., Habibi khaniani, B., and Naghdi Badi, H. 2006. Review Taxol as the main anticancer natural compound. Journal of Medicinal Plants , 18 :1-9.

21- Yari Khosroushahi, A., Naderi-Manesh, H., and Toft Simonsen, H. 2011. Effect of Antioxidants and Carbohydrates in Callus Cultures of *Taxus berevifolia*: Evaluation of Browning, Callus Growth, Total Phenolics and Paclitaxel Production. BioImpacts, 1(1): 37-45.

22- Zhang, C.H., Mei, X.G., LiuaL, L., and Yu, J. 2000. Enhancend paclitaxel induced by the combination of elicitors cell suspension culture of *Taxus chinesis* Biotechnology Letters, 22: 1561–1564.

Compare production of taxol in natural tissues of *Taxus baccata L.* and *Taxus berevifolia Nutt.* with in vitro condition

Rahmati Z.[1], Payam Nour V.[1], Ghasemi Bazdi K.[2] and Ebrahimi P.[3]

[1] Forest Biology and Forest Ecology Dept.,University of agricultural sciences and natural resources of Gorgan, Gorgan, I.R. of Iran

[2] Cotton Research Institute of Iran, Gorgan, I.R. of Iran

[3] Chemistry Dept., Faculty of Sciences, University of Golestan, Gorgan, I.R. of Iran

Abstract

Taxol has been introduced as an efficient natural compound with low toxicity in the control and treatment of a wide range of cancers, including breast, uterine, ovarian and other types that its production primary source is yew trees. Indeed, the limited number of yew trees and the impossibility of direct procurement of taxol from organs natural due to the legal ban on felling of these trees have been led to use in vitro cultures as a suitable alternative for the preparation of taxol. Nowadays, plant cell, tissues and organs cultures can provide the massive and rapid propagation of many medicinal plants. The present study focused on investigating, determining and comparing the amount of produced taxol with natural tissues of *Taxus baccata* L. and *Taxus berevifolia* Nutt., in vitro. In order to induce callus, stem and leaf explants were used in WPM medium enriched with 2,4-D and Kinetin hormones. The available Taxol was measured using HPLC techniques. After the extraction process, taxol was measured and compared in normal tissues including the skin, stems and leaves. The result showed that the amount of taxol in normal tissues of both species had a similar trend so that in the leaves was more than in the stem and then in the skin, but its amounts was different in both mentioned species. It was further observed that the amount of taxol was higher in *T. baccata*. Moreover, the amount of taxol in calluses of *T. brevifolia* and *T. baccata* were higher than normal tissues.

Key words: Callus, Taxol, *Taxus baccata*, *Taxus berevifolia*, Tissue culture.