Archive of SID

مجله علوم کشاورزی ایران
جلد ۳۲، شماره ۳، سال ۱۳۸۰(۵۸۳-۵۷۵)

بررسی اثر نوع و غلظت قندها بر میزان تولید تاکسول در کشت بافت سرخدار *Taxus baccata* L.

دکتر مه‌لقا قربانلی[1]، کوروش دلاور[2]
۱- استاد گروه زیست شناسی دانشگاه تربیت معلم تهران۲- عضو هیئت علمی گروه زیست شناسی
تاریخ پذیرش مقاله ۷۹/۱۲/۱۷

خلاصه

تاکسول دی ترپنی است که از گونه‌های مختلف جنس سرخدار (Taxus) بدست آمده و دارای فعالیت ضد سرطانی موثری می باشد. کشت بافت سرخدار منبع جایگزین مناسبی برای تهیه تاکسول و سایر تاگزانهای وابسته به آن است. در این پژوهش ما اثر نوع و غلظت قندها راروی نرخ رشد کالوس و میزان تولید تاکسول در کشت بافت های سرخدار *Taxus baccata* L. بررسی و مقایسه کردیم. جهت بهینه سازی شرایط برای رشد کاسولهای سرخدار ٤٥ تیمار هورمونی مختلف شامل اکسین‌های 2,4-D و NAA در ترکیب با کینتین بررسی شدند. سپس اثر قندها روی کالزایی بررسی شد که نتایج بدست آمده نشان داد کال زایی در تیمارهای دارای ساکارز بطور مشخصی بالاتر از گلوکز است و فروکتوز با اختلاف زیادی در ردیف سوم می‌باشد. این نتایج همچنین نشان داد که حجم کال زایی توسط جدا کشت های ساقه بطور مشخصی بالاتر از جدا کشت‌های برگ می‌باشد. بررسی غلظت تاکسول در کالوس‌های بدست آمده نیز نشان داد که محتوای تاکسول در کشت ساقه‌ها (بین ۰/۲۱ تا ۰/۰۵٦ درصد وزن خشک) بطور مشخصی از کشت برگها (بین ۰/۰۱۸ تا ۰/۰۳٤ درصد وزن خشک) بیشتر است. با مقایسه اثر تیمارهای کربوهیدراتی روی تولید تاکسول در کالوس‌ها مشخص شد که ساکارز روی تولید تاکسول اثر بهتری نسبت به گلوکز و فروکتوز دارد و بین این دو قند هم فروکتوز بهتر است هر چند اختلاف در این حالت چندان قابل توجه نیست. مقایسه ارتباط بین میزان تولید تاکسول به غلظت قندها یا نرخ رشد کالوسها نشان دهنده این بود که قاعده مشخصی در این زمینه وجود ندارد. با توجه به این نتایج مشخص می شود که جداکشت‌های ساقه علاوه بر تولید کالوس بیشتر، محتوای تاکسول بالاتری هم دارند و بنابراین برای کشت بافت به منظور تولید تاکسول مناسب‌ترند. همچنین در بین قندهای بررسی شده ساکارز به عنوان بهترین قند معرفی می‌گردد زیرا ضمن تولید کالوس بیشتر محتوای تاکسول را هم در کالوس‌ها بالا می‌برند.

واژه‌های کلیدی: سرخدار، تاکسول، تاگزان، کشت بافت، ساکارز، گلوکز و فروکتوز.

مقدمه

تاکسول[1] از موثرترین داروهای ضد سرطانی است که طی ۱۵ سال اخیر شناخته شده است (۲۴). اگر چه اولین بار وال و وانی در سال ۱۹۷۱ تاکسول را از پوست درخت سرخدار اقیانوس آرام (Taxus brevinfolia) استخراج و شناسایی نمودند (۳۰) اما کشف تاکسول در حقیقت نتیجه یک پروژه عظیم است که توسط انستیتوی ملی سرطان آمریکا[2] بین سالهای ۱۹۵۸ تا ۱۹۸۰ انجام شد و طی آن بیش از ۱۱۰/۰۰۰ ترکیب استخراج شده از ۳۵ هزار گونه گیاهی در مورد فعالیت ضد سرطانی‌شان تحت بررسی قرار گرفتند (۲، ۲۰ و ۲۷).

مکاتبه کننده: مه لقا قربانلی
1 . Taxol
2 National Center Institute (NCI)

www.SID.ir

Archive of SID

استفاده بالینی از تاکسول پس از انجام فاز I و II آزمایش‌های بالینی آنها طی سالهای ۸۶-۱۹۸۳ به تصویب FDA[1] رسید (۲۸) و هم اکنون به عنوان یکی از موثرترین داروهای علیه سرطان‌های سینه و تخمدان به کار می‌رود و در مقابل سایر سرطان‌ها نظیر سرطان‌های ریه، مثانه، معده و روده و ... هم نتایج امیدبخشی بدست آمده است (۱۶ و ۲۶). تاکسول علاوه بر اثر ضد سرطانی خواص زیستی دیگری هم نشان داده است از جمله متوقف کردن پیشرفت بیماری پلی سیستیک[2] ارثی کلیه در موش، (۳۲)و اثر درمانی آن روی بیماری مالاریا (۲۳). نام علمی تاکسول پاکلی تاکسل[3] است و کمپانی بریستول مایرز اسکوب[4] نام تاکسول را به عنوان یک علامت تجاری ثبت کرد و از دانشمندن خواست که از نام علمی آن استفاده کنند (۲۱).

با توجه به اینکه غلظت تاکسول در پوست درخت سرخدار بسیار پایین است (در حدود چند صدم درصد) و نیز استخراج تاکسول موجب از بین رفتن گیاه می‌شود (۷) لذا منابع تهیه تاکسول نمی‌توانند نامحدود باشند از این رو تحقیقات گسترده‌ای برای تهیه منابع دیگری از تاکسول در جریان است. از جمله این تحقیقات می‌توان به جستجوی تاکسول در سایر گونه‌های گیاهی (۸ و ۱۸)، یافتن میکروارگانیسم‌های تولید کننده تاکسول(۲۵)، تهیه تاکسول به روش نیمه سنتزی[5] (۲۹)، تلاش در جهت سنتز کامل تاکسول[6] (۲۱ و ۲۲) و استخراج تاکسول از کشت بافت‌های سرخدار اشاره نمود (۶، ۱۰، ۱۷ و ۲۴). تولید تاکسول بوسیله کالوس‌های کشت شده سرخدار اولین بار توسط کریستین و همکاران در سال ۱۹۸۹ گزارش شد (۶) و پس از آن محققان بسیاری در این زمینه فعالیت خود را آغاز نمودند و اگر چه به موفقیت‌هایی دست یافتند اماهنوز تهیه تاکسول به این روش نیز اقتصادی نمی‌باشد. در پژوهش حاضر ما ضمن جستجوی نسبت‌های هورمونی مناسب برای رشد کالوس سرخدار اثر نوع و غلظت قندها را روی نرخ رشد و محتوای تاکسول کالوس‌ها بررسی و مقایسه نمودیم.

مواد و روشها

الف – کشت بافت: نمونه‌های گیاهی از باغ گیاه‌شناسی دانشکده کشاورزی کرج طی یک مرحله برداشت و به آزمایشگاه منتقل شدند. جهت کشت از محیط B_5 همراه با قند ساکارز (۲٪) و آگار (۰/۸٪) استفاده شد (۱۳). محیط‌های کشت در ظرف‌های شیشه‌ای در بسته ریخته شده و بعد از تنظیم pH روی ۵/۸ – ۵/۶ و اضافه کردن آگار، بمدت ۲۰ دقیقه در ۱۲۱ درجه و فشار ۱/۵ اتمسفر اتوکلاو شدند. سترون سازی جدا کشت‌ها با استفاده از الکل ۷۰٪ (۲ دقیقه) آب روان (۲۴ ساعت) و کلرید جیوه ۰/۵ درصد (۲۰ تا ۲۵ دقیقه) انجام شد و نمونه‌ها بعد از شستشو کشت شده و در تاریکی در دمای ۳±۲۵ درجه نگهداری شدند.

جهت تهیه تیمارهای هورمونی مناسب از غلظت‌های ۰، ۰/۵ ، ۱، ۲ و ۴ میلی‌گرم بر لیتر اکسین‌ها[7] (2,4-D و NAA) در ترکیب با غلظت‌های ۰، ۰/۱، ۰/۲، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر کینتین[8] استفاده شد. تعداد تکرار در هر تیمار ۲۰ جدا کشت در ۴ محیط کشت بود. جهت بررسی اثر کربوهیدرات‌ها از سه قند ساکارز، گلوکز و فروکتوز در غلظت‌های ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ گرم بر لیتر استفاده شد. تعداد جدا کشت برای هر تیمار ۴۰ عدد در ۸ محیط کشت مجزا بود.

برای اندازه‌گیری میزان کال‌زایی علاوه بر محاسبه اندکس کال‌زایی (درصد جداکشت‌هایی که کالوس تولید نمودند)، کالوس‌های تولید شده بوسیله کلیه جداکشت‌های هر تیمار بعد از ۶ هفته توسط پنس و اسکالپل جدا شده و وزن خشک و تر آنها محاسبه گردید.

ب- عصاره‌گیری و کروماتوگرافی: برای عصاره‌گیری از روش فیت – نتو و دیکوزوما استفاده شد (۱۱). اساس این روش عصاره‌گیری با مخلوط متیلن کلرید – متانول و سپس تفکیک فاز آلی از فاز غیر آلی بوسیله مخلوط متیلن کلرید – آب می‌باشد. البته‌روش‌ذکر شده را با تغییراتی جزئی بکار بردیم (۱).

1 . Food and Drug Administration (FDA)
2 . Polycistic
3 . Paclitaxel
4 . Bristol Myers Squib
5 . Semisynthesis
۶ . در اوایل سال ۱۹۹۴ دو گروه مختلف همزمان در آمریکا و فرانسه سنتز کامل تاکسول در آزمایشگاه را گزارش کردند (۲۱ و ۲۲) ولی با این وجود تهیه تاکسول با این روش هنوز مقرون به صرفه نمی‌باشد (۱۵).
7 . Auxins
8 . Kinetin

www.SID.ir

Archive of SID

جهت سنجش تاکسول در نمونه‌ها از روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا[1] استفاده شد. دستگاه‌های مورد استفاده شامل یک پمپ یونی کم[2] مدل کریستال ۲۰۰[3]. یک آشکارگر[4] یونی کم مدل ۴۲۲۵ و یک انتگراتور یونی کم[5] مدل ۴۸۱۵ جهت ثبت و تجزیه تحلیل کروماتوگرامها بود.

سنجش‌ها با استفاده از دو ستون (۵μ، 100mm × 4.6) ODS و ODS(4.6×250mm,10μm) و فاز متحرک متانول – آب به نسبت ۳۵: ۶۵ و شدت جریان ۰/۵ یا ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه انجام شد. طول موج uv مورد استفاده ۲۲۷ نانومتر و میزان تزریق برای استاندارد و نمونه‌ها هر دو ۲۰ میکرولیتر بود. نمونه‌ها قبل از تزریق با استفاده ازفیلتر۰/۴۵μm Nylon دوبار صاف شدند.

استاندارد تاکسول با کمک شرکت ایرانی متاکو از شرکت سیگما[6] خریداری شد. برای کالیبراسیون ستونها و تهیه منحنی استاندارد غلظت‌های ۰، ۰/۰۲، ۰/۰۴ ، ۰/۰۶، ۰/۰۸ و ۰/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از استاندارد تهیه و تزریق شد. برای شناسایی پیک مربوط به تاکسول در عصاره‌ها زمان بازداری[7] پیک مورد نظر با پیک استاندارد مقایسه شد. تحت این شرایط زمان بازداری تاکسول برای هر دو ستون حدود ۶/۵±۰/۴ دقیقه بود(شکل ۱). بررسی و شناسایی اولیه پیک‌ها با ستون بزرگ (۲۵ سانتی‌متری) و سنجش‌های کمی بعدی با ستون کوچک (۱۰ سانتی‌متری) انجام شد. غلظت تاکسول در عصاره‌ها با محاسبه سطح زیر نمودار منحنی‌ها و مقایسه آن با سطح زیر منحنی پیک‌های مربوط به استاندارد تاکسول بدست آمد.

ج- محاسبات آماری: تعداد دفعات عصاره‌گیری برای بیشتر تیمارها ۳ بار بود و از هر نمونه ۲ تا ۳ تزریق انجام می‌شد. جهت مقایسه میزان کال‌زایی در تیمارهای هورمونی و کربوهیدراتی به علت اینکه اهداف اصلی پژوهش سنجش غلظت تاکسول بود فقط از SE± میانگین و نمودار استفاده گردید اما جهت مقایسه غلظت تاکسول در تیمارهای مختلف قندی علاوه بر محاسبه SE± میانگین از روش آنالیز واریانس دو عاملی تا حد تفکیک اثر تیماری استفاده شد. جهت مقایسه میانگین در تیمارهای مختلف علاوه بر موارد فوق از آزمون t نیز استفاده شد.

نتایج و بحث

الف –کال‌زایی: کال‌زایی عموماً از سطوح برش یافته که در داخل محیط کشت فرو نرفته بودند آغاز می‌شد. جداکشت‌های ساقه عموماً از هفته دوم و جداکشت‌های برگ از هفته سوم شروع به کال‌زایی می‌کردند. نرخ رشد کالوس در جداکشت‌های ساقه بطور معنی‌داری (p=۰/۰۰۱) از جداکشت‌های برگ بالاتر بود که این مسئله با یافته‌های سایر محققان همخوانی دارد. موناسلی و همکاران نشان دادند که جداکشت‌های ساقه گیاه Taxus baccata کالوس بیشتری نسبت به جداکشت‌های برگی تولید می‌کنند(۱۹). بطور مشابه‌ای ویکرمزینه و آرتکا گزارش کردند که ساقه‌های جوان سرخدار در مقایسه با برگ‌ها و ساقه‌های بالغ برای کشت بافت مناسب‌تر هستند (۳۱). بطور کلی کالوس‌های سرخدار در مقایسه با سایر مخروطیان[8] رشد کندتری دارد (۹) که علت آن ممکن است مربوط به عوامل ارثی یا وجود بازدارنده‌های رشد و یا فقدان ترکیبات لازم برای رشد باشد (۱۴).

در آزمایش‌های مربوط به تنظیم کننده‌های رشد نتایج نشان داد که 2,4-D برای کال‌زایی برگها بهتر از NAA عمل می‌کند ولی در ساقه‌ها تفاوت چندانی بین این دو اکسین وجود ندارد. همچنین غلظت‌های کم کینتین (۰/۱ و ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر) بهتر از غلظت‌های بالای این هورمون (۰/۵ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر) عمل می‌کند (نتایج نشان داده نشده است). در این زمینه ویکرمزینه و آرتکا نشان دادند که در محیط‌های دارای ۲ میلی‌گرم بر لیتر از کینتین و غلظت‌های مختلف از اکسین یا هیچگونه کال‌زایی در جداکشت‌های سرخدار صورت نمی‌گیرد و یا اینکه میزان کالوس تولید شده بسیار اندک است. اما در محیط‌های حاوی ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر از کینتین درصد کال‌زایی بسیار بالا است (۳۱).

1 . High Performance Liquid Chromatography (HPLC)
2 . Unicam
3 . Crystal 200
4 . Detector
5 . Unicam Integrator
6 . Sigma Co.
7 . Retention time
8 . Conifers

www.SID.ir

Archive of SID

همچنین در این پژوهش با وجود استفاده از نسبت‌های هورمونی متنوعی برای کشت بافت هیچ‌گونه اندام‌زایی در بافت مشاهده نشد که دلیل آن ممکن است در ارتباط با استفاده از دو اکسین NAA و 2,4-D باشد زیرا چندین گزارش وجود دارد مبنی بر اینکه این هورمون‌ها عموماً موجب توقف اندام‌زایی و تمایزیابی بافتها شده و کال‌زایی را تسریع می‌کنند (۳، ۵ و ۱۲).

ب- اثر قندها روی کالزایی: با بررسی نتایج بدست آمده به روشنی اثر سه نوع قند روی میزان کال‌زایی جداکشت‌های ساقه و برگ آشکار می‌شود. بر طبق این نتایج برای هر دو نوع جداکشت مورد استفاده بهترین قند ساکارز است که بالاترین میزان کال‌زایی را نشان می‌دهد و گلوکز در رده دوم قرار دارد و فروکتوز با اختلاف زیادی در ردیف سوم می‌باشد (P=۰/۰۵) (جدول ۱). البته اختلاف بین تیمارهای ساکارز و گلوکز در مورد جداکشت‌های برگ معنی‌دار نیست. نتایج تحقیقات دیگر نیز نشان می‌دهد که ساکارز از هر دو قند گلوکز و فروکتوز جهت رشد کال‌های سرخدار مناسب‌تر می‌باشد (۳۱).

بررسی اثر غلظت قندها روی کال‌زایی نشان داد که به جز در تیمارهای حاوی ۲٪ ساکارز یا ۱٪ گلوکز که میزان کال‌زایی در آنها نسبت به سایر غلظت‌ها کمتر است در بقیه تیمارها تفاوت معنی‌داری مشاهده نمی‌شود و می‌توان گفت که تغییرات غلظت قندها در محدوده‌های ذکر شده (۱٪ تا ۴٪) اثر چندان مهمی روی نرخ رشد کالوس‌ها ندارد (جدول ۱).

ج- تولید تاکسول: میزان تاکسول تولید شده در کالوس‌های بدست آمده از جداکشت‌های ساقه و برگ بین ۰/۰۱۸ تا ۰/۰۵۶ درصد وزن خشک در نوسان بود که این مقادیر در مقایسه با میزان تاکسول بدست آمده از بخش‌های مختلف درخت سرخدار قابل توجه می‌باشد.

بررسی این نتایج نشان داد که در تیمارهای حاوی ساکارز بالاترین غلظت تاکسول در هر دو نوع جداکشت‌های ساقه و برگ در محیط‌های دارای ۱٪ ساکارز تولید می‌شود. در تیمارهای حاوی گلوکز نیز بالاترین درصد تاکسول در غلظت ۱۰ گرم بر لیتر گلوکز برای جداکشت‌های ساقه مشاهده شد اما مشابه همین حالت برای جداکشت‌های برگ بدست نیامد. در تیمارهای فروکتوز بطور کلی مقادیر تاکسول جداکشت‌ها اختلاف معنی‌داری را در غلظت‌های مختلف این قند نشان ندادند (جدول ۲). این نتایج همچنین مشخص کرد که ساکارز در مقایسه با گلوکز کربوهیدرات مناسب‌تری برای تولید تاکسول بوسیله جداکشت‌های ساقه می‌باشد زیرا در هر چهار غلظت مورد آزمایش میزان تاکسول در کالوس‌های بدست آمده از تیمارهای ساکارز بطور معنی‌داری بالاتر از غلظت آن در کالوس‌های رشد کرده در تیمارهای گلوکز می‌باشد (P=۰/۰۵). در مورد برگ‌ها نیز همانند ساقه اثر ساکارز بهتر از گلوکز بود و میانگین غلظت تاکسول در جداکشت‌های این تیمار بطور معنی‌داری (P=۰/۰۵) از جداکشت‌های تیمارهای گلوکزی بیشتر بود ولی اختلاف بین تیمارهای ساکارز با فروکتوز و گلوکز با فروکتوز در مورد این جداکشت‌ها معنی‌دار نبود. همچنین مقایسه میانگین کل غلظت تاکسول در ساقه‌ها و برگ‌ها نشان دهنده بالاتر بودن محتوی تاکسول در کالوس‌های بدست آمده از جداکشت‌های ساقه نسبت به برگ می‌باشد که این اختلاف در P=۰/۰۵ معنی‌دار است.

بررسی این نتایج همچنین نشان داد که قاعده مشخصی در زمینه ارتباط بین نرخ رشد کالوس و میزان تاکسول تولید شده در آن، وجود ندارد بطور مثال در تیمارهای حاوی ساکارز هم نرخ رشد کالوس‌ها و هم میزان تولید تاکسول بالاتر از سایر تیمارها بود اما در مقابل بالاترین غلظت تاکسول در بین محیط‌های حاوی ساکارز در تیماری که کمترین رشد کالوس را نشان می‌داد (محیط دارای ۱٪ ساکارز) بدست آمد. در این زمینه نشان داده شد که کالوس‌های مسن‌تر تاکسول بیشتری نسبت به کالوس‌های جوان‌تر تولید می‌کنند (۳۱) همچنین فیت – نتو و همکاران گزارش کردند که با افزایش نرخ رشد کالوس‌ها محتوای تاکسول آنها پایین می‌آید (۱۲). در مقابل بروخین و همکاران مشاهده کردند که محتوای تاکسول در کالوس‌هایی با نرخ رشد سریع از کالوس‌های دارای رشد کند بالاتر می‌باشد (۴).

به طور کلی با توجه به این یافته‌ها مشخص می‌شود که کالوس‌های بدست آمده از جداکشت‌های ساقه نه تنها نرخ رشد بیشتری دارند بلکه محتوای تاکسول آنها نیز بالاتر است و بنابراین جداکشت‌های مناسبی برای کشت می‌باشند. ساکارز نیز

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱- اثر نوع و غلظت قندها بر کال‌زایی جداکشت‌های ساقه و برگ سرخدار. هر عدد نشان دهنده مجموع کالوس تولید شده بوسیله ۵ جداکشت رشد داده شده در یک شیشه می‌باشد.

قند	جداکشت	غلظت قند (گرم بر لیتر) ۱۰	۲۰	۳۰	۴۰
ساکارز	برگ	۰/۱۹ ± ۰/۰۲	۰/۲۴ ± ۰/۰۷	۰/۲۶ ± ۰/۰۳	۰/۲۵ ± ۰/۰۵
	ساقه	۰/۴۲ ± ۰/۰۹	۰/۳۷ ± ۰/۰۸	۰/۴۲ ± ۰/۱	۰/۴۵ ± ۰/۱۲
گلوکز	برگ	۰/۱۵ ± ۰/۰۳	۰/۲۱ ± ۰/۰۴	۰/۲۲ ± ۰/۰۲	۰/۲۱ ± ۰/۰۵
	ساقه	۰/۱۴ ± ۰/۰۴	۰/۲۶ ± ۰/۰۶	۰/۲۸ ± ۰/۰۷	۰/۳۱ ± ۰/۰۸
فروکتوز	برگ	۰/۰۵ ± ۰/۰۳	۰/۰۷ ± ۰/۰۳	۰/۱۲ ± ۰/۰۴	۰/۱۱ ± ۰/۰۶
	ساقه	۰/۰۴ ± ۰/۰۲	۰/۰۵ ± ۰/۰۲	******	******

*** هیچگونه کال‌زایی صورت نگرفت.

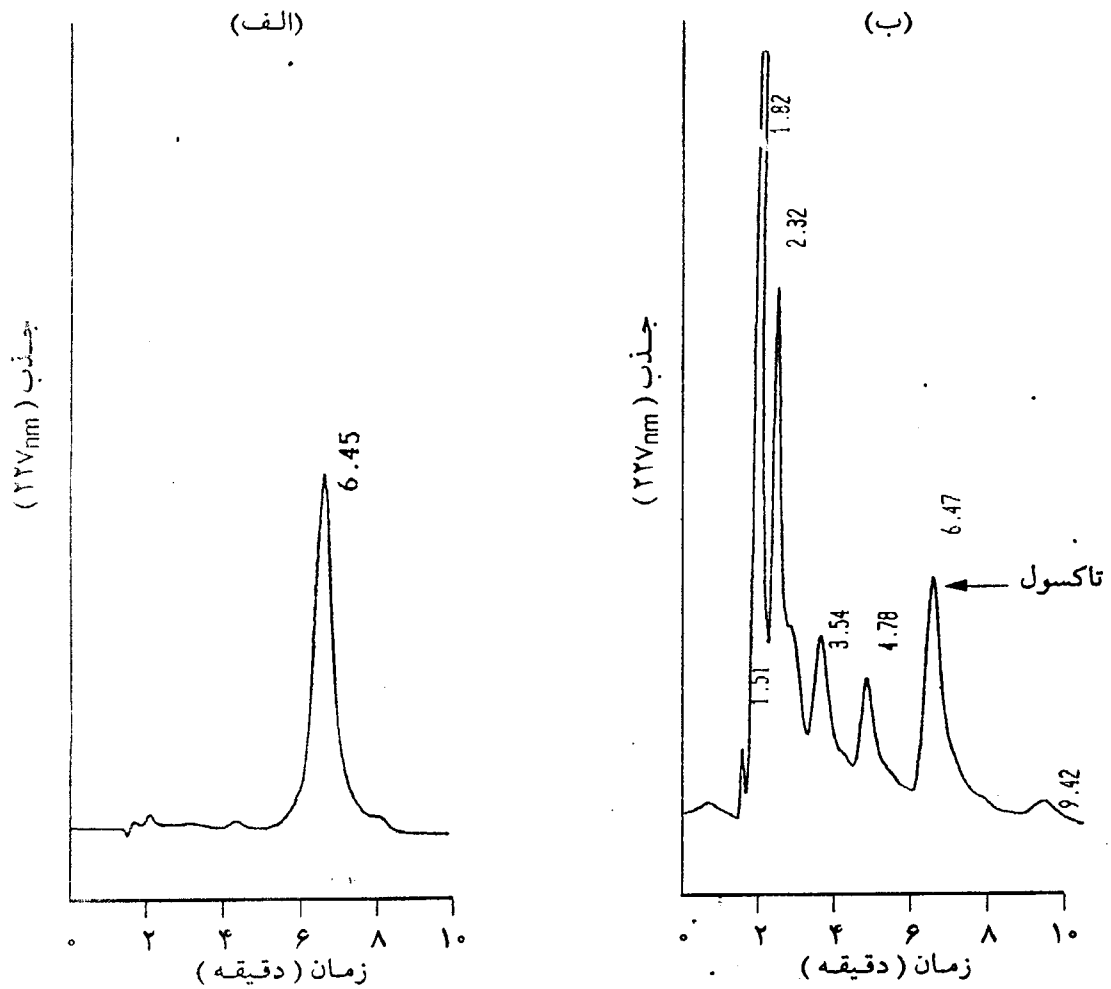
جدول ۲- اثر نوع و غلظت قندها بر محتوای تاکسول کالوس‌های بدست آمده از جداکشت‌های ساقه و برگ سرخدار (بر حسب درصد وزن خشک، SE± میانگین)

قند	جداکشت	غلظت قند (گرم بر لیتر) ۱۰	۲۰	۳۰	۴۰
ساکارز	برگ	۰/۰۳۴ ± ۰/۰۰۹۱	۰/۰۳ ± ۰/۰۰۶	۰/۰۲۵ ± ۰/۰۰۶۵	۰/۰۲۸ ± ۰/۰۰۴
	ساقه	۰/۰۵۱ ± ۰/۰۱۱۸	۰/۰۳۶ ± ۰/۰۰۷۲	۰/۰۳۴ ± ۰/۰۰۸	۰/۰۳۶ ± ۰/۰۰۴۷
گلوکز	برگ	۰/۰۱۸ ± ۰/۰۰۶۷	۰/۰۲۷ ± ۰/۰۰۵۴	۰/۰۱۹ ± ۰/۰۰۲۷	۰/۰۲۲ ± ۰/۰۰۷۲
	ساقه	۰/۰۳۲ ± ۰/۰۰۹۶	۰/۰۲۵ ± ۰/۰۰۸۵	۰/۰۲۱ ± ۰/۰۰۵۷	۰/۰۲۴ ± ۰/۰۰۵۷
فروکتوز	برگ	۰/۰۲۲ ± ۰/۰۰۴۷	۰/۰۳ ± ۰/۰۰۲۷	۰/۰۲۷ ± ۰/۰۰۵۷	۰/۰۲۴ ± ۰/۰۰۴۶
	ساقه	۰/۰۵۴ ± ۰/۰۶۹	۰/۰۵۶ ± ۰/۰۱۴۱	******	******

*** هیچگونه کال‌زایی صورت نگرفت.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱- کروماتوگرام‌های مربوط به استاندارد تاکسول (الف) و عصاره کالوس‌های بدست آمده از جداکشت‌های برگ سرخدار (ب)

بهترین منبع کربوهیدراتی به شمار می‌رود زیرا هم نرخ رشد کالوس‌ها و هم محتوای تاکسول آنها را افزایش می‌دهد.

همچنین نکته دیگری که با توجه به نتایج بدست آمده در این پژوهش می‌توان به آن اشاره کرد این است که اصولاً در کلیه تیمارهایی که تاکنون بررسی شده‌اند میزان اختلاف بین تیمارها در جداکشت‌های برگی کمتر از جداکشت‌های ساقه بوده است یا به عبارت دیگر برگ‌ها کمتر تحت تاثیر تغییر تیمارها (یا شرایط محیطی) قرار گرفته‌اند. با توجه به این مسئله می‌توان گفت که قدرت سازش برگ‌ها نسبت به تغییرات شرایط محیطی (یا تیمارهای مختلف) از ساقه‌ها بیشتر می‌باشد که این مسئله با مقایسه نقش آنها در گیاه کامل توجیه پذیر می‌نماید.

سپاسگزاری

بدین وسیله از خانم مهندس عضدی فر و آقایان دکتر عادلی و دکتر فرسام و مهندس لسانی که در طول اجرای این پژوهش از مشاورت‌ها و راهنمایی‌های ارزنده‌شان سود بردیم صمیمانه تشکر و قدردانی می‌نماییم.

مراجع مورد استفاده

REFERENCES

۱.دلاور، ک.و ۱۳۷۷. بررسی اثر عوامل مختلف محیطی بر روی غلظت تاکسول در گیاه کامل و کشت بافت سرخدار. *Taxus baccata* L. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تربیت معلم تهران.

www.SID.ir

Archive of SID

2.Appendino, G., 1993. Taxol (Paclitaxel): Historical and ecological aspects. Fitoterapia, LXIV: 5-25.
3. Borwn, J. W. & B. V. Chrlwood , 1990. Organogenesis in callus culture. P: 67-70 In: Methods in molecular biology. Vol. 6. Plant cell and tissue culture. Pollard, J. W. and Walker, J. M. eds). Humana Press, Clifton, NJ.
4.Brukhin, V. B., L. R. Moleva, L. H. Filonova, V. P. Grakhow, B. B. Ya & P. V. Bozhkov, 1996. Proliferative activity of callus culture of Taxus baccata L. in relation to anticancer diterpenoid taxol biosynthesis. Biotechnology Letter. 18(11): 1309-1314.
5.Chee, P. P. 1995. Organogenesis in Taxus brevifolia. Plant Cell Rep. 14: 560-565.
6.Christen, A. A., J. Bland, & D. M. Gibson. 1989. Cell culture as a means to produce taxol. Proc. Am. Axxoc. Cancer. Res. 30: A 2252.
7.Denis, J. N., A. E. Greene, D. Guenard, F. Gueritt, L. Managatal & P. Potier, 1988. A highly efficient practical approach to natural taxol. J. Amer. Chem. Soc. 110: 5917-5919.
8.Etouati, L., A. Ahond, O. Convert, C. Poupat & P. Potier, 1989. Plants of New Caledonia. 124. Taxanes from the trunk bark of Austrotaxus spicata Compton (Taxaceae). Bull. Soc. Chem. Fr. 687-694.
9.Ewald, D., W. Weckwerth, G. Naugoks & R. Zocher, 1995. Formation of embryo – like structure in tissue culture of different yew species. Plant Physiology. 147: 139-143.
10.Fett – Neto, A. G., F. DiCosmo, W. F. Reynold & K. Sakata, 1993. Cell culture of Taxus as a source of the antineoplastic drug taxol and related taxanes. Bio/Technology. 10: 1572-1575.
11.Fett-Neto, A. G. & F. DiCosmo, 1992. Distribution and amounts of taxol in different shoot parts of Taxus cuspidate. Planata Medica, 58: 464-466.
12. Fett – Neto, A. G., S. J. Melanson, K. Sakata & F. Dicosmo. 1993. Improved growth and taxol yield in developing calli of Taxus cuspidate by medium composition modification. Bio/Technology. 11: 731-734.
13.Gamborg, O. L., R. A. Miller & K. Ojima, 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cell. Expt. Cll Res. 50: 151-158.
14.Gibson, D. M., R. E. B. Ketchum, N. C. vance & A. A. Christen, 1993. Initiation and growth of cell lines of Taxus brevifolia (Pacific yew). Plant Cell Rep. 12: 479-482.
15.Hezari, M. & R. Croteau, 1997. Taxol biosynthesis: An update. Review . Planta Medica 63: 291-295.
16. Holmes, F. A., A. P. Kudelka, J. J. Kavanagh, M. H. Huber, J. A. Ajani & V. Valero, 1995. In: Taxane anticancer agents: Basic science and current status, (Georg GL, Chen TT, Ojima I, Vyas DM, ed.) , PP: 31-57. American Chimical Society, Washington DC.
17.Jaziri, M., A. Zhiri., Y. W. Guo, J. P. Dupont, K. Shimomura, H. Hamada, M. Vanhaelent& J. Homes, 1996. Taxus sp. Cell, tissue and organ culture as a alternative sources for taxoids production: a literature survey. Plant Cell Tiss. And Org. Cult. 46: 59-75.
18.Luo, S. D., B. M. Ning, D. C. Ruan & H. Y. Wang, 1994. HPLC analysis of taxol related compound from taxus and its related plants. J. Plant Resource and Environ, 3: 31-33.
19.Monacelli, G., G. Psaque, A. Cuteri, A. Varusio, B. Botta & G. D. Monache, 1995. Histological study of callus formation and optimization of cell growth in Taxus baccata. Cytobios 81: 159-170.
20.Nicolaou, K. C., W. M. Dai & R. K. Guy, 1994. Chemistry and biology of Taxol. Angew. Chem. Int. Engl. 33: 15-44.
21.Nicolaou, K. C., R. K. Guy & P. Potier, 1996. Taxoids: New weapons against cancer. Sci. Amer. June 1996, 84-86.
22.Persions, E. (ed). 1990. Washington Insight, Septem. 15, 1990.

www.SID.ir

Archive of SID

23.Pouvelle, B., P. J. Farley, C. A. Long & T. F. Taraschi, 1994. Taxol arrests the development of blood – stage plasmodium flaciparum in vitro and plasmodium chabaudi adami in malaria – infected mice. J. of Clinical Investigation 94(1): 413-417.

24.Srinivasan. V., L. Festchanker. S. Moser, T. G. Hirsuna, R. A. Taticek & M. L. Shuler, 1995. Taxol production in bioreactor: Kinetic of biomass accumulation, nutrient, and taxol production by cell suspension culture of taxus baccata. Biotechnology and Bioengineering. 47: 666-676.

25.Stierle, A., G. Strobel, D. Stierle, P. Grothaus & G. Bignami, 1995. The search for taxol production microorganism among the endophytic fungus of the pacific yew, Taxus brevifolia. J. Nat. Prod. 58: 1315-1324.

26.Suffness, M., Wall, M. E., 1995. Discovery and development of taxol. In: Taxol: Science and applications, (Suffness M, ed.), pp: 3-25, CRC Press, Boca Raton, FL

27.Tubbing, H. G. M. N. & B. McDowell, 1995. The yew story: past, present and future of an extraordinary tree. Taxan Journal, 1: 14-20.

28.Wall, M. E., 1993. Campotothecin and taxol. In: Lednicer D., (ed.) Chronicles of Drug Discovery , Washington DC, pp: 153-165. American Chemical Society.

29 Wall, M. E. & M. C. Wani, 1995. Camptothecin and Taxol: Discovery to clinic – Thirteenth Bruce F. Cain Memorial award Lecture. Cancer Research. 55: 753-760.

30.Wani, M. C., H. L. Taylor, M. E. wall, P. Coggon, A. T. McPhail, 1971. Plant antitumor agents. V.I. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from Taxus brevifolia. J. Am. Chem. Soc. 93: 2325-2327.

31.Wickremesinhe, E. R. M. & R. N. Arteca, 1993. Taxus callus culture: Initation. Growth optimization, characterization and taxol production. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 35: 181-193.

32.Woo, D. D. L., S. Y. P. Miao, J. C. Pelayo & A. S. Woolf, 1994. Nature, 268: 750.

www.SID.ir

Archive of SID

Iranian, J. Agric. Sci. Vol.32, No.3, 2001

Effect of The Type and Concentration of Sugars on Taxol Content in Callus Culture of *Taxus Baccata* L.

M. GHORBANLY[1] AND K. DELAVAR[2]
1, 2- Professor, Faculty Member, University of Teachers Training
Accepted March. 7, 2001

SUMMARY

Taxol, a diterpene obtained from taxus spp. exhibits significant anticancer activity. Tissue culture of taxul represents a potential altrnative source of taxol and related taxane. Analysed was the effect of the type and concentration of sugars on callus growth rate and taxol production in callus of *Taxus baccata* L. Callus was induced from needles and young stems of yew using 45 combinations of 2, 4-D or NAA combined with Kinetin. The results indicated that callus growth rate in sucrose treatment media was higher than glucose; and the rate in fructose treatment media was much lower than those in both sucrose and glucose. The calli derived from stems display faster growth rate and higher callus production than needles callus. Taxol concentration in calli derived from stems (from 0.021 to 0.056 % of dry wt.) was higher than that in needles callus (from 0.018 to 0.034% of dry wt.). For taxol production, sucrose did better than that other two types of sugar tested. There was no significant correlation observed between taxol production and callus growth or concentration of sugar. As a whole, these findings show that calli derived from stems not only have a high rate of callus growth but also produce higher levels of taxol as compared with needles callus and thus are very suitable for tissue culture. Sucrose is shown to be the best carbon source , because it increases both callus growth rate and taxol production as observed in this study.

Key words: Taxus baccata, Taxol, Taxane, Tissue culture, Sucrose, Glucose & Fructose.

www.SID.ir