

**Investigation of five important taxanes in *Taxus baccata* calluses under chitosan and jasmonic acid elicitors treatment**Azizollah Kheiri ^{1*}, Raheleh Gorzi ², Zahra Ghahremani ³, Mohsen Sanikhani ⁴^{1*}. Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Iran.². Ph.D graduate, Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Iran.³. Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Iran.⁴. Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Iran.**ARTICLE INFO****Article history**

Submitted: 2026-02-10

Revised: 2026-07-08

Accepted: 2026-07-14

ABSTRACT

Taxanes are diterpenoid compounds with medicinal properties, obtained from various yew species (*Taxus baccata*). Among them, paclitaxel (Taxol) is the most important and is widely used in cancer chemotherapy. Due to the extremely low yield of taxol in yew plants, alternative production methods are necessary. Callus and plant cell culture present an environmentally friendly alternative for producing taxol and related taxanes. To enhance taxane production in cultured callus, various strategies such as elicitation can be employed. In this study, calli were treated with the elicitors of chitosan (10, 30, and 50 mg/L) and jasmonic acid (50, 100, and 150 μ M) in triplicate. The calli were maintained in B5 medium supplemented with 2,4-D, kinetin, gibberellin, antioxidant, sucrose, and agar then incubated in darkness at 25°C condition. The levels of five major taxanes: taxol, 10-deacetylbaccatin III, baccatin III, 10-deacetyltaxol, and cephalomannine were quantified using HPLC. The results indicated that the highest taxol and 10-deacetylbaccatin III contents were achieved with 100 μ M jasmonic acid treatment. The maximum baccatin III yield was observed with 50 mg/L chitosan, while 10-deacetyltaxol production was highest with 50 μ M jasmonic acid. Interestingly, the highest cephalomannine accumulation was found in the control (untreated) calli. Although some previous studies have reported taxol production mainly in suspension cultures, the findings of this study clearly demonstrate that yew callus is also capable of producing significant amounts of taxanes under elicitor treatment and can serve as a simpler, more cost-effective alternative system. The findings indicate that the targeted application of jasmonic acid and chitosan elicitors can be an effective strategy for directing the metabolic pathway for the production of valuable taxanes in yew callus culture.

KEYWORDS

Taxanes, Yew, Anticancer, Elicitor, Callus Culture.

* Corresponding author: Azizollah Kheiri

✉ E-mail: kheiry@znu.ac.ir





بررسی پنج تاکسان مهم در کالوس‌های سرخدار تحت تیمار الیسیتورهای کیتوزان و جاسمونیک اسید

عزیزاله خیری^{۱*}، راحله گریزی^۱، زهرا قهرمانی^۱، محسن ثانی خانی^۱

۱. دکترای تخصصی، فارغ‌التحصیل مقطع دکتری، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، ایران.

۲. دکترای تخصصی، دانشیار، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران.

۳. دکترای تخصصی، دانشیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران.

۴. دکترای تخصصی، استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران.

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۴۰۴-۱۱-۲۱

بازنگری: ۱۴۰۵-۰۴-۱۷

پذیرش: ۱۴۰۵-۰۴-۲۳

واژگان کلیدی:

تاکسان‌ها، سرخدار، ضد سرطان، الیسیتور، کشت کالوس.

چکیده: تاکسان‌ها ترکیبات دی‌ترپنوئیدی با خاصیت دارویی هستند که از گونه‌های مختلف سرخدار (*Taxus baccata*) بدست می‌آیند. از بین تاکسان‌ها، تاکسول به عنوان مهم‌ترین تاکسان و در درمان بسیاری از سرطان‌ها کاربرد دارد. به علت مقدار بسیار اندک این ترکیب در گیاه سرخدار، از روش‌های جایگزین برای تولید تاکسول استفاده می‌شود. یک روش جایگزین و سازگار با محیط زیست برای تولید تاکسول و دیگر تاکسان‌ها، کشت کالوس و کشت سلول گیاهی می‌باشد. برای افزایش تولید تاکسان‌ها در کالوس‌های کشت شده از راهکارهای مختلفی از جمله استفاده از الیسیتورها می‌توان بهره برد. در این پژوهش از الیسیتورهای کیتوزان (50 mg/l و 30 و 100) و جاسمونیک اسید (150 μg و 100 و 500) در سه تکرار و در محیط کشت B5 حاوی هورمون‌های 2-4-D، کاینترین، جیبرلین و همچنین ترکیبات آنتی‌اکسیدان، ساکارز و آگار در شرایط تاریکی در اتاقک رشد تیمار شدند. میزان تاکسول، 10- استیل باکاتین III، باکاتین III، باکاتین III، باکاتین III و سفالومائین به عنوان مهم‌ترین تاکسان‌های شناخته شده با استفاده از دستگاه HPLC مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان داد بیشترین مقدار تاکسول و 10- استیل باکاتین III در تیمار جاسمونیک اسید 100 میکرومولار، بیشترین مقدار باکاتین III در تیمار کیتوزان 50 میلی‌گرم در لیتر، بیشترین مقدار 10- دی استیل تاکسول در تیمار جاسمونیک اسید 50 میکرومولار و بیشترین میزان سفالومائین در نمونه شاهد، مشاهده گردید. اگرچه برخی مطالعات پیشین تولید تاکسول را بیشتر در کشت سوسپانسیون گزارش کرده‌اند، یافته‌های این پژوهش به وضوح نشان می‌دهد که کالوس سرخدار نیز قابلیت تولید مقادیر قابل توجهی از تاکسان‌ها را تحت تیمار الیسیتورها دارد و می‌تواند به عنوان یک سامانه جایگزین ساده‌تر و کم‌هزینه مورد استفاده قرار گیرد. یافته‌ها نشان می‌دهد که کاربرد هدفمند الیسیتورهای جاسمونیک اسید و کیتوزان می‌تواند استراتژی موثری برای هدایت مسیر متابولیکی تولید تاکسان‌های بالارزش در کشت کالوس سرخدار باشد.

✉ E-mail: kheiry@znu.ac.ir

Journal homepage: jmpb.znu.ac.ir

*نویسنده مسئول: عزیزاله خیری



مقدمه

گیاه سرخدار (*Taxus baccata* L.) متعلق به خانواده تاکساسه (Taxaceae) و شامل هشت گونه مختلف است (joshi et al, 2017). متابولیت‌های ثانویه بسیار زیادی در این هشت گونه وجود دارد و مهم‌ترین آن‌ها تاکسان‌ها یا تاکسوئیدها هستند که برای اهداف دارویی از گیاه استخراج می‌شوند. تاکسول از جمله مهم‌ترین نوع تاکسان‌ها به‌شمار می‌رود. تاکسول نام تجاری پاکلی تاکسل بوده و به‌عنوان داروی ضدسرطان شناخته شده است. از تاکسول برای درمان بسیاری از سرطان‌ها، از جمله سرطان سینه، تخمدان، رحم و ریه، استفاده می‌شود (Bernabeu et al, 2017). نحوه عمل اثر ضدسرطانی تاکسول بر سلول‌های سرطانی به این صورت است که از تقسیم سلولی ممانعت می‌کند و سبب افزایش تجمع میکروتوبول‌ها و افزایش مقاومت آن‌ها در برابر دپلمیریزه شدن می‌شود. داروی تاکسول برخلاف داروی وین‌بلاستین و کلشی‌سین، باعث تثبیت میکروتوبول‌ها می‌شود و تعادل را به سوی پلیمریزاسیون سوق می‌دهد. محل اتصال تاکسول به میکروتوبول‌ها مانند محل اتصال GTP، وین‌بلاستین و کلشی‌سین نیست و جدا از محل اتصال آن‌ها است. تاکسول باعث پلیمریزاسیون توبولین در نبود GTP می‌شود و همچنین میکروتوبول‌ها را به دپلمیریزاسیون مقاوم می‌کند. تاکسول با این عملکرد خود باعث تشکیل دوک تقسیم غیرطبیعی در طی مرحله میتوز می‌شود و در نتیجه، رونویسی سلول را در مرحله G₂ و یا M تقسیم سلولی متوقف می‌کند و بدین روش سبب مرگ سلول‌های در حال تکثیر می‌شود (El et al, 2019). مقدار تاکسول در گیاه بسیار کم (۰/۰۱-۰/۰۵٪) است که با مصرف ۱۰۰۰۰ کیلوگرم پوست درخت سرخدار و یا ۳۰۰۰ درخت کامل سرخدار برای تولید تنها یک کیلوگرم داروی تاکسول ضروری است و این در حالی است که بیمار مبتلا به سرطان برای درمان تقریباً ۲/۵-۳ گرم تاکسول نیاز دارد (Bedi et al, 1996). همچنین استخراج تاکسول از درخت سرخدار بسیار مشکل است و نیاز به سیستم پیچیده و تکنیک‌های خاص تصفیه با استفاده از تکنولوژی پیشرفته و گران‌قیمت دارد. با توجه به موارد ذکر شده و همچنین غلظت متغیر تاکسان‌ها در سرخدار و تقاضای بسیار بالا برای این داروی باارزش، نیاز فوری برای یافتن روش‌های جایگزین تولید تاکسول وجود دارد (Howat et al, 2014). مسیر بیوسنتزی تاکسان‌ها بسیار پیچیده و بازده آن بسیار کم است؛ لذا کاربرد سنتز شیمیایی آن را محدود می‌کند. روش جایگزین دیگر برای تولید، روش نیمه سنتزی است که به مواد حد واسط باکاتین III و ۱۰-دی‌استیل باکاتین III موجود در سرخدار نیاز دارد. منبعی جایگزین و سازگار با محیط‌زیست برای تاکسول و ترکیبات آنالوگ، کشت کالوس و کشت سلول گیاهی سرخدار است. در سیستم‌های کشت بافت، کشت کالوس به‌عنوان پایه اولیه برای آغاز کشت سوسپانسیون سلولی و نیز به‌عنوان سیستمی مستقل، روش انتخابی مؤثر و مقرون‌به‌صرفه‌ای برای تولید تاکسول محسوب می‌شود. با این حال، سطح تولید در این سیستم‌ها نیز اغلب برای برآورد

بررسی پنج تاکسان مهم در کالوس‌های سرخدار تحت تیمار الیستورهای کیتوزان و جاسمونیک اسید/ خیری؛ عزیزاله، گریزی؛ راحله، قهرمانی؛ زهرا، ثانی خانی؛ محسن.

تقاضای بازار ناکافی است (Mutanda et al, 2021). از این رو، راهکارهای دیگری مانند استفاده از الیستورها برای افزایش بازده تولید تاکسان‌ها در این سیستم‌ها ضروری به نظر می‌رسد. الیستور ماده‌ای است که وقتی در غلظت‌های کم به یک سیستم سلولی زنده وارد می‌شود، بیوسنتز ترکیبات خاصی را القا و یا تقویت می‌کند؛ بنابراین، استفاده از الیستورها یکی از پرکاربردترین و مفیدترین روش برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان است (Luciano et al, 2017). استفاده از الیستورها می‌تواند به فعال شدن ژن‌های جدیدی در سلول‌ها منجر شود که آنزیم‌ها و در نهایت مسیرهای بیوسنتزی مختلفی راه‌اندازی و سبب تولید متابولیت‌های ثانویه می‌شوند (Patel and Krishnamurthy, 2013). جاسمونیک‌اسید و متیل‌جاسمونات ترکیباتی هستند که سبب انتقال سیگنال می‌شوند و منجر به القای مهارکننده‌های پروتئیناز و ژن‌های دفاعی و در نهایت، منجر به افزایش متابولیسم ثانویه بسیاری از گیاهان می‌شوند (Ruan et al, 2019). در کل، جاسمونات‌ها ترکیباتی هستند که باعث تجمع متابولیت‌های ثانویه در گیاه می‌شوند (Wasternack and Strnad, 2018). در کشت سوسپانسیون سلولی *T. madia*، جاسمونیک‌اسید محرک بهتری برای تولید تاکسان‌ها نسبت به متیل‌کوکوربات (دارای گروه هیدروکسیل در موقعیت C₃ متیل‌جاسمونات) است (Yukimune et al, 1996). به‌طور قابل توجهی جاسمونات‌ها و متیل‌جاسمونات‌ها در افزایش تولید تاکسول و تاکسان‌های دیگر در انواع گونه‌های سرخدار مؤثر بوده‌اند (Zhoulideh and Mashayekhi, 2022. Demidova et al, 2023). استفاده از کیتوزان به‌عنوان الیستور باعث افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در کشت‌های سوسپانسیون سلولی گیاهان مختلف می‌شود؛ برای مثال، افزودن کیتوزان در کشت سوسپانسیون سلولی *Andrographis paniculata* منجر به افزایش مقدار فلاونوئیدها شده است (Mendhulkar and Vakil, 2013). در پژوهشی مشاهده شد که کیتوهپتاز، یکی از مشتقات کیتوزان، تولید تاکسول را در کشت‌های سلولی *Taxus cuspidate* به‌طور قابل توجهی افزایش داد (Tachinbana et al, 2007). در این پژوهش استفاده از الیستورهای جاسمونیک‌اسید و کیتوزان برای افزایش تولید تاکسول، ۱۰- دی‌استیل باکاتین III، باکاتین III، ۱۰- دی‌استیل تاکسول و سفالومانین در کالوس‌های القا شده، مورد بررسی قرار گرفت. هدف از این مطالعه، با توجه به اهمیت تجاری تاکسول و تاکسان‌های مرتبط، چالش‌های موجود در تولید آن و پتانسیل اثبات‌شده الیستورها در القای متابولیت‌های ثانویه، بررسی و مقایسه اثرات الیستورهای جاسمونیک‌اسید (تنظیم‌کننده‌ای درون‌زا) و کیتوزان (الیستوری بیرونی) بر تولید و تجمع پنج تاکسان مهم (تاکسول، ۱۰- دی‌استیل باکاتین III، باکاتین III، ۱۰- دی‌استیل تاکسول و سفالومانین) در کالوس سرخدار بود تا راهبردی مؤثر برای افزایش بازده این ترکیبات ارزشمند در سیستم کشت بافت ارائه گردد.

مواد و روش‌ها

نهال‌های جوان گیاه سرخدار (*T. baccata*) از شهرستان تنکابن خریداری و در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه زنجان در شرایط دمای روز ۲۵ درجه سانتی‌گراد و دمای شب ۱۸ درجه سانتی‌گراد و نیز رطوبت ۷۵ درصد نگهداری شدند. پس از گذشت چند ماه، سرشاخه‌های جدید رشد کردند و از آن سرشاخه‌های تازه رشد کرده به علت آلودگی کمتر به‌عنوان ریزنمونه در کشت درون‌شیشه‌ای انتخاب شدند. سرشاخه‌ها به اندازه ۵ تا ۷ سانتی‌متر بریده و به آزمایشگاه کشت بافت انتقال داده شدند. ریزنمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه زیر آب جاری قرار گرفتند. سپس برگ‌ها از ساقه جدا و ساقه‌ها به مدت یک دقیقه در الکل ۷۰ درصد (V/V) قرار داده شدند. در زیر هود لامینار، ریزنمونه‌ها در هیپوکلریت سدیم ۲ درصد به مدت ۱۰-۱۲ دقیقه غوطه‌ور و سپس سه بار با آب مقطر استریل شست‌وشو شدند. در آخرین مرحله ضدعفونی، ریزنمونه‌ها با محلول کلرید جیوه ۰/۱ درصد به مدت ۸-۱۰ دقیقه ضدعفونی و سه بار با آب مقطر سترون شست‌وشو داده شدند. پس از اتمام مراحل ضدعفونی، ساقه‌ها به اندازه ۱ تا ۱/۵ سانتی‌متر برش و به شیشه‌های حاوی محیط کشت القای کالوس انتقال داده شدند.

برای القای کالوس، ساقه‌های بریده‌شده به‌صورت افقی بر محیط کشت B5 (OL, 1968) حاوی چهار میلی‌گرم در لیتر هورمون 2-4-D (دی‌کلروفنوکسی استیک‌اسید)، یک میلی‌گرم در لیتر هورمون کاینترین، نیم میلی‌گرم در لیتر هورمون جیبرلین، ۱۰ سی‌سی در لیتر آنتی‌اکسیدان، ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و هفت گرم در لیتر آگار، قرار داده شدند. به‌منظور تهیه محلول آنتی‌اکسیدان، مقادیر ۲۹/۲۳ گرم در لیتر گلوتامین، ۵/۰۱۹ گرم در لیتر آسکوربیک‌اسید و ۴/۹۹۵ گرم در لیتر اسیدسیتریک وزن شدند و در یک لیتر آب مقطر حل و سپس به محیط کشت اضافه شدند. شیشه‌های حاوی ریزنمونه در دستگاه اتافک رشد با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و نیز شرایط کاملاً تاریک برای القای کالوس به مدت یک ماه نگهداری شدند (Palazón et al, 2003).

کالوس‌های رشدیافته هر سه هفته یک بار در محیط کشت رشد کالوس‌ها (محیط کشت B5 حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر پیکلام، ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر کاینترین، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر جیبرلین، ۵ گرم در لیتر ساکارز، ۵ گرم در لیتر فروکتوز، ۷ گرم در لیتر آگار و همچنین ۱۰ سی‌سی در لیتر آنتی‌اکسیدان برای جلوگیری از اکسیداسیون ترکیبات) واکشت شدند. بعد از به دست آمدن میزان مناسبی از کالوس‌ها، تیماردهی کالوس‌ها انجام شد.

بررسی پنج تاکسان مهم در کالوس‌های سرخدار تحت تیمار الیستورهای کیتوزان و جاسمونیک اسید/ خیری؛ عزیزاله، گزری؛ راحله، قهرمانی؛ زهرا، ثانی خانی؛ محسن.

برای اعمال تیمارها به محیط کشت رشد کالوس‌ها، الیستورهای کیتوزان (CH) با غلظت‌های ۵۰، ۳۰ و ۱۰ میلی گرم در لیتر و در سه تکرار و جاسمونیک اسید (J) با غلظت‌های ۱۵۰، ۱۰۰ و ۵۰ میکرومولار در سه تکرار (طی یک آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی) اضافه شدند. نمونه‌های شاهد نیز (بدون افزودن هیچ الیستوری) در سه تکرار و تحت همان شرایط نگهداری شدند. شایان ذکر است که در این مطالعه به دلیل تمرکز بر بررسی دوز - پاسخ مجزا و مقایسه کارایی دو الیستور، از طراحی فاکتوریل برای بررسی اثرات متقابل استفاده نشد. با این حال، بدیهی است که بررسی اثرات متقابل می‌تواند منجر به یافته‌های جدیدی شود و این موضوع به‌عنوان جهتی مهم برای مطالعات آتی پیشنهاد می‌گردد. در نهایت، در زیر هود لامینار مقدار چهار گرم کالوس وزن شد و به شیشه‌های حاوی محیط کشت الیستورها انتقال داده و در دستگاه اتافک رشد و شرایط تاریکی نگهداری شد. پس از گذشت ۲۱ روز تیماردهی پایان یافت و میزان تاکسول و ۱۰- دی‌استیل باکاتین III، باکاتین III، ۱۰- دی‌استیل تاکسول و سفالومنین توسط دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) اندازه‌گیری شدند.

به‌منظور استخراج و اندازه‌گیری میزان تاکسان‌ها، ابتدا کالوس‌ها توسط دستگاه فریزدرایر خشک شدند. سپس ۳۰ میلی گرم از نمونه‌های پودر شده سلول‌ها در ۵۰ میلی لیتر متانول به مدت ۱۵ ساعت بر شیکر قرار داده شدند. نمونه‌ها در دستگاه اولتراسونیک به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شدند. از محلول هگزان و قیف جداکننده برای حذف مواد قطبی اضافی استفاده و در آخر با استفاده از دی‌کلرومتان در سه مرتبه شست‌وشو انجام شد و تاکسان‌ها در محلول دی‌کلرومتان حل شدند. دستگاه روتاری حلال را از تاکسان‌ها جدا کرد و عصاره حاصل را در دو میلی لیتر استونیتریل حل و به دستگاه HPLC تزریق کرد (Ghassempour et al, 2009). برای اندازه‌گیری مقدار تاکسان‌ها از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)

کناور ساخت کشور آلمان همراه با ستون دارای پرفکتسیل ۴/۶x۲۵۰ میلی متر C18 استفاده شد. از حلال‌های استونیتریل/ آب HPLC به‌عنوان فاز متحرک استفاده شد. سرعت جریان حلال در ستون ۱ میلی لیتر بر دقیقه، دما ۲۵ درجه سانتی گراد، طول موج UV ۲۳۰ نانومتر و مقدار نمونه تزریق‌شده ۲۰ میکرولیتر در نظر گرفته شد. میزان تاکسان‌ها بر اساس واحد میکروگرم بر گرم وزن خشک کالوس‌ها گزارش و از استاندارد تاکسان‌ها برای تعیین منحنی کالیبراسیون استفاده شد.

نتایج با استفاده از نرم‌افزار SPSS (نسخه ۲۶) و تجزیه واریانس یک‌طرفه ANOVA در سطح ۵ درصد بررسی شدند. برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون دانکن استفاده شد. همچنین نمودارها با نرم‌افزار اکسل ۲۰۱۳ رسم شدند.

Commented [c2]: واضح نیست. بررسی شود.

نتایج

پس از القای کالوس و تیماردهی کالوس‌ها با غلظت‌های مختلف کیتوزان و جاسمونیک‌اسید (شکل ۱)، نتایج حاصل از تجزیه واریانس (جدول ۱) نشان داد که مقدار تاکسان‌ها در سطح یک درصد نسبت به نمونه کنترل دارای اختلاف معنی داری هستند.

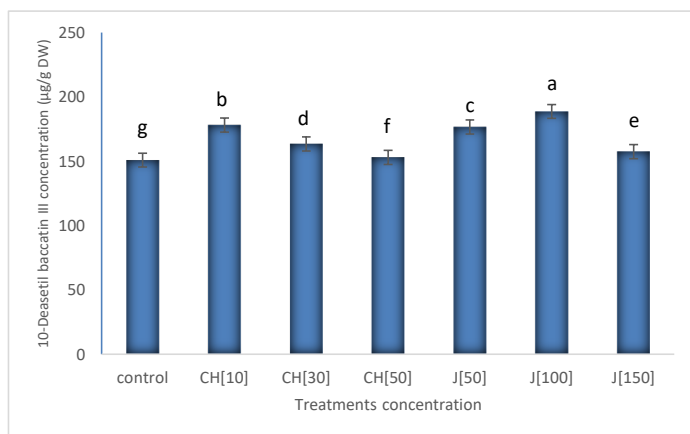


شکل ۱- مراحل القای کالوس و تیماردهی: الف) ریزنمونه‌های ساقه سرخدار کشت‌شده روی محیط القای کالوس در روز صفر؛ ب) شروع خروج و رشد کالوس از بافت ریزنمونه پس از حدود ۲ هفته؛ ج) کالوس‌های پراوری‌شده طی واکنش‌های متوالی در محیط رشد و د) کالوس‌های تیمار شده با الیسی‌تورها (کیتوزان و جاسمونیک‌اسید) در پایان دوره ۲۱ روزه، پیش از برداشت برای استخراج و آنالیز HPLC

تغییرات میزان ۱۰- دی‌استیل باکاتین III:

نتایج آماری نشان دادند که تغییرات میزان ۱۰- دی‌استیل باکاتین III در کالوس‌های تیمار شده و نمونه شاهد دارای اختلاف معنی‌داری هستند. بیشترین مقدار این تاکسان در تیمار جاسمونیک‌اسید ۱۰۰ میکرومولار و کمترین مقدار آن در نمونه شاهد مشاهده گردید. میزان افزایش ۱۰- دی‌استیل باکاتین III در حضور الیسی‌تور کیتوزان ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر در رتبه بعدی قرار گرفت (شکل ۲).

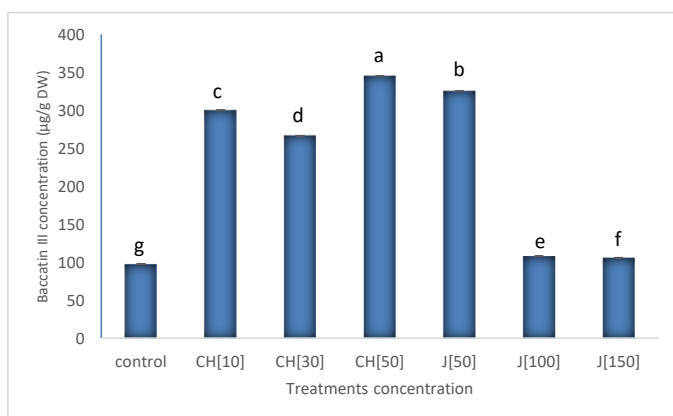
بررسی پنج تاکسان مهم در کالوس‌های سرخدار تحت تیمار الیستورهای کیتوزان و جاسمونیک اسید/ خیری؛ عزیزاله، گریزی؛ راحله، قهرمانی؛ زهرا، ثانی خانی؛ محسن.



شکل ۲- میزان ۱۰-دی‌استیل باکاتین III در کالوس‌های گیاه سرخدار تحت الیستورهای کیتوزان (CH) (۵۰، ۳۰، ۱۰ mg/l) و جاسمونیک‌اسید (J) (۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ µM) پس از گذشت ۲۱ روز. نتایج در سطح یک درصد بر اساس آزمون دانکن است.

تغییرات میزان باکاتین III :

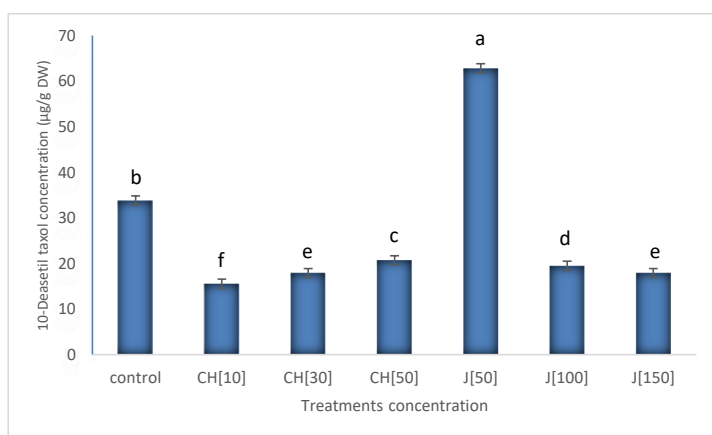
نتایج حاصل از آنالیز مقدار باکاتین III نشان داد که مقدار باکاتین III در کالوس‌های تیمار شده و نمونه شاهد دارای اختلاف معنی‌داری هستند. بر اساس شکل ۳، بیشترین مقدار باکاتین III در تیمار کیتوزان، ۵۰ میلی گرم در لیتر مشاهده گردید.



شکل ۳- میزان باکاتین III در کالوس‌های گیاه سرخدار تحت الیستورهای کیتوزان (CH) (۱۰، ۳۰، ۵۰ mg/l) و جاسمونیک‌اسید (J) (۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ µM) پس از گذشت ۲۱ روز. نتایج در سطح یک درصد بر اساس آزمون دانکن است.

تغییرات میزان ۱۰-دی استیل تاکسول:

با توجه به نتایج، مشاهده گردید مقدار ۱۰-دی استیل تاکسول در کالوس‌های تیمار شده و نمونه شاهد، اختلاف معنی‌داری از خود نشان دادند. بیشترین میزان این تاکسان در تیمار جاسمونیک‌اسید ۵۰ میکرومولار نسبت به نمونه شاهد و دیگر تیمارها است (شکل ۴).

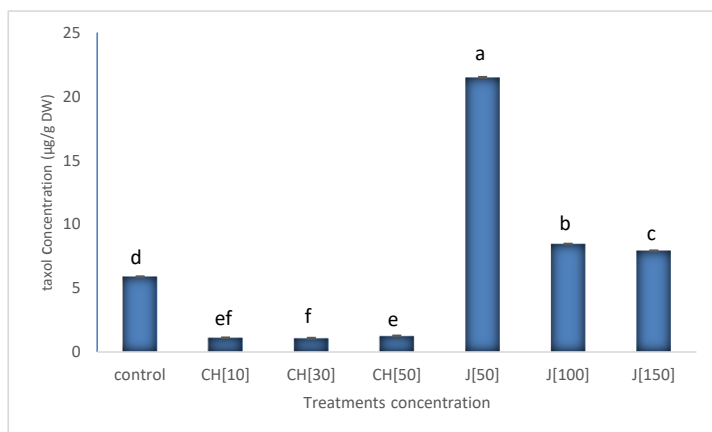


شکل ۴- میزان ۱۰-دی استیل تاکسول در کالوس‌های گیاه سرخدار تحت الیستورهای کیتوزان (CH) (۱۰۰،۳۰،۵۰ mg/l) و جاسمونیک‌اسید (J) (۵۰،۱۰۰،۱۵۰ µM) پس از گذشت ۲۱ روز. حروف مشترک نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار آماری در سطح یک درصد بر اساس آزمون دانکن است.

تغییرات میزان تاکسول:

نتایج آنالیز میزان تاکسول در کالوس‌های تیمار شده نشان داد که مقدار تاکسول نسبت به نمونه شاهد، اختلاف معنی‌داری داشت. هر سه غلظت تیمار جاسمونیک‌اسید نسبت به نمونه شاهد و سایر تیمارها، اختلاف معنی‌داری را نشان دادند. بیشترین میزان تاکسول در تیمار جاسمونیک‌اسید با غلظت ۵۰ میکرومولار نسبت به نمونه شاهد مشاهده شد. تیمار جاسمونیک‌اسید با غلظت ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرومولار به‌ترتیب بیشترین مقدار تاکسول را نسبت به شاهد نشان دادند (شکل ۵).

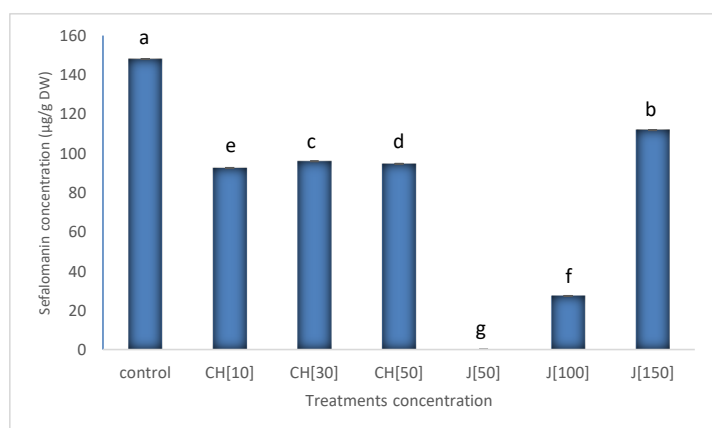
بررسی پنج تاکسان مهم در کالوس‌های سرخدار تحت تیمار الیستورهای کیتوزان و جاسمونیک اسید/ خیری؛ عزیزاله، گریزی؛ راحله، قهرمانی؛ زهرا، ثانی خانی؛ محسن.



شکل ۵- میزان تاکسول در کالوس‌های گیاه سرخدار تحت الیستورهای کیتوزان (CH) (۵۰، ۳۰، ۱۰ mg/l) و جاسمونیک‌اسید (J) (۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ µM) پس از گذشت ۲۱ روز. حروف مشترک نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار آماری در سطح یک درصد بر اساس آزمون دانکن است.

تغییرات میزان سفالومانین:

اندازه‌گیری میزان سفالومانین تحت تاثیر تیمارهای اعمال‌شده نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین تیمارها و نمونه شاهد وجود دارد. بیشترین میزان سفالومانین در نمونه شاهد نسبت به تیمارهای دیگر مشاهده شد. پس از نمونه شاهد، بیشترین میزان سفالومانین در تیمار جاسمونیک‌اسید ۱۵۰ میکرومولار مشاهده گردید (شکل ۶).



شکل ۶- میزان سفالومانین در کالوس‌های گیاه سرخدار تحت الیستورهای کیتوزان (CH) (۵۰، ۳۰، ۱۰ mg/l) و جاسمونیک‌اسید (J) (۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ µM) پس از گذشت ۲۱ روز. نتایج در سطح یک درصد بر اساس آزمون دانکن است.

جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس تاکسان‌های مورد مطالعه در کالوس‌های تیمار شده سرخدار

منابع تغییرات III	df	سفالومانیین	تاکسول	میانگین مربعات		
				۱۰-دی‌استیل تاکسول	باکاتین III	۱۰-دی‌استیل باکاتین
تیمار	۶	۷۷۰۰/۰۱**	۱۵۸/۵**	۸۶۰/۹**	۳۷۸۸/۵**	۶۲۳/۰۴**
خطا	۱۴	۰/۰۱۲	۰/۰۰۷۴	۰/۰۱۴	۰/۰۱۴	۰/۰۰۷
ضریب تغییرات (/.)	-	۰/۱۳	۱/۳۴	۰/۴۳	۰/۰۵	۰/۰۵

** اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۰/۰۱

بحث

با توجه به چالش‌های تولید صنعتی تاکسول و پتانسیل سیستم کشت کالوس، استفاده از الیستورها به‌عنوان راهبردی برای افزایش بازده متابولیت‌های بارزش این مسیر مطرح است. این مطالعه به‌منظور مقایسه اثرات دو الیستور با مکانیسم‌های متفاوت (جاسمونیک‌اسید (تنظیم‌کننده درون‌زای سیگنال‌دهی) و کیتوزان (الیستور بیرونی)) بر تولید پنج تاکسان کلیدی در کالوس سرخدار طراحی شد. تاکسول، آلکالوئیدی دی‌ترین است که از این ماده برای شیمی‌درمانی استفاده می‌شود. از این دارو برای درمان انواع مختلف سرطان، ازجمله سرطان سینه، تخمدان و ریه، استفاده می‌شود (Hanano et al, 2022). بیشترین مقدار تاکسول در گونه‌های *T. baccata*، *T. brevifolia* و *T. chinensis* یافت می‌شود (Xiong et al, 2021). مسیر بیوسنتزی تاکسول بسیار پیچیده بوده و همچنین شامل بسیاری از مراحل آنزیمی است (Kuang et al, 2019). این مسیر بیوسنتزی شامل هشت مرحله هیدروکسیلاسیون، پنج واکنش انتقال آسیل/ آرویل ترانسفراز، یک اپوکسیداسیون، یک مرحله فنیل آلانین آمینوموتاز، دو مرحله CoA استریفیکاسیون و یک N-بنزوئیل‌اسیون است (Sanchez-Muñoz et al, 2020). چندین سیتوکروم P450 در مراحل اکسیژن‌رسانی تاکسادین شرکت می‌کنند. با این حال، جزئیات دقیق مراحل ضروری در مسیر بیوسنتزی هنوز کاملاً مشخص نشده است. از طرفی، تولید صنعتی تاکسول نیازمند سنتز گیاهی است که بر بقای گونه‌های سرخدار تأثیر می‌گذارد؛ بنابراین، کاربرد روش‌های جایگزین تولید تاکسول و افزایش بازده تولید تاکسول امری ضروری است که با درک مسیر بیوسنتزی و همچنین ژن‌های دخیل در این مسیر امکان‌پذیر است (Wang et al, 2021). علتی بسیار مهم برای انتخاب روش جایگزین برای تولید تاکسول، غلظت کم (۰/۰۰۱ - ۰/۰۰۵٪) تاکسول در گیاه است. یکی از روش‌های جایگزین بسیار کارآمد، کشت کالوس است. کشت کالوس در مقایسه با جمع‌آوری مواد گیاهی از

بررسی پنج تاکسان مهم در کالوس‌های سرخدار تحت تیمار الیستورهای کیتوزان و جاسمونیک اسید/ خیری؛ عزیزاله، گرزلی؛ راحله، قهرمانی؛ زهرا، ثانی خانی؛ محسن.

طبیعت، وسیله‌ای سریع‌تر و مطمئن‌تر برای به دست آوردن متابولیت‌های دارویی است (Efferth, 2019). با پیشرفت تکنولوژی، روش‌های مختلفی برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان ابداع شده است. یکی از این روش‌ها، استفاده از الیستورها است که یکی از پرکاربردترین و مفیدترین آن‌ها است (Luciano et al, 2017). به‌طور کلی، الیستورها بر اساس منشأ و ساختار مولکولی، ترکیباتی زیستی و یا غیرزیستی هستند که باعث تحریک سیگنال‌های سلولی و همچنین برهم‌کنش‌های مولکولی بین گیرنده‌های گیاهی در سطح غشای سلول و الیستور می‌شوند و در ادامه، سیگنال‌هایی که سلول دریافت می‌کند سبب بیان ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتز ترکیبات و افزایش سنتز متابولیت‌های ثانویه در گیاهان می‌شوند (Bayraktar et al, 2016)؛ بنابراین، مؤثرترین روش برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه، فعال کردن سیستم دفاعی گیاه با استفاده از الیستور یا محرک‌های زنده و غیرزنده است (Slazak et al, 2022). جاسمونیک اسید و مشتقات آن به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های رشد و یا بازدارنده‌های رشد گیاه هستند که نقش بسیار مهمی در رشد و نمو و پاسخ به تنش‌های محیطی دارند. نتایج پژوهشی نشان داد که اثر متیل‌جاسمونات وابسته به مدت زمان اعمال تیمار بوده و بیشترین بیان ژن در ۱۸ ساعت بعد از اعمال متیل‌جاسمونات مشاهده شده است (Lenka et al, 2015). استفاده از الیستور کیتوزان باعث افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان مختلف می‌شود. کیتوزان در کشت سوسپانسیون سلولی *T. chinensis* نیز سبب بهبود تولید تاکسول شد (Zhang and Xu, 2001).

از مهم‌ترین و کلیدی‌ترین پیش‌سازهای سنتز تاکسول، دو ترکیب ۱۰-دی‌استیل باکاتین III و باکاتین III هستند که در کل، میزان آن‌ها در گیاه نسبت به ترکیب تاکسول بیشتر است. از این دو پیش‌ماده بسیار مهم در تولید نیمه سنتتیک تاکسول استفاده می‌شود (Nims et al, 2006. Cragg and Newman, 2005). ترکیب ۱۰-دی‌استیل باکاتین III توسط آنزیم ۱۰-دی‌استیل باکاتین III آکسیلاز ترانسفراز به ترکیب باکاتین III تبدیل می‌شود. ترکیب ۱۰-دی‌استیل تاکسول به‌عنوان آنالوگ تاکسول شناخته شده است. ساختار شیمیایی آن بسیار شبیه تاکسول است و قابلیت تبدیل شدن به تاکسول و بالعکس را دارد. از لحاظ ساختاری تفاوت بسیار کوچکی با تاکسول دارد. خاصیت ضدتوموری ۱۰-دی‌استیل تاکسول مورد تأیید قرار گرفته است و به‌عنوان یکی از تاکسان‌های باارزش شناخته می‌شود. ساختمان شیمیایی سفالومانین بسیار شبیه تاکسول است. این ترکیب در سال ۱۹۷۹ اولین بار در پی بررسی خاصیت ضدتوموری منابع گیاهی از گیاه *Cephalotaxus manii* شناسایی و استخراج شد. بررسی و تحقیق بر خاصیت ضدتوموری این آلکالوئید همچنان ادامه دارد و تاکنون به‌عنوان دارو وارد بازار نشده است (McLaughlin et al, 1981). بیان تمام ژن‌هایی که در مسیر بیوسنتز

Commented [c3]: واضح نیست. بررسی شود.

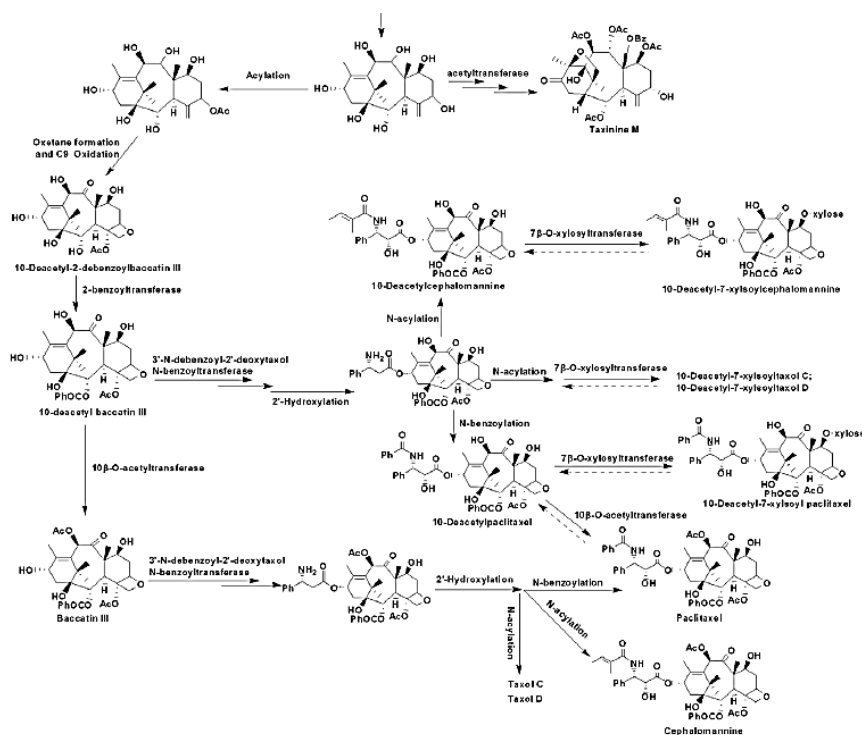
تاکسول قرار دارند، بر میزان تولید تاکسول تأثیرگذار هستند. در پاسخ به این پرسش که چرا اثرات متقابل دو الیستور بررسی نشده است، باید گفت که هدف اصلی این پژوهش، غربالگری اولیه و مقایسه دوز - پاسخ مستقل هر الیستور بر پنج تاکسان کلیدی بود. با وجود این، نگارندگان کاملاً با این نقد موافق هستند که بررسی هم‌زمان کیتوزان و جاسمونیک‌اسید در قالب یک آزمایش فاکتوریل می‌تواند نتایج متفاوت و ارزشمندی را آشکار کند؛ برای مثال، ممکن است غلظت پایین کیتوزان به همراه غلظت متوسط جاسمونیک‌اسید، اثر هم‌افزایی بر بیان ژن‌های پایانی مسیر تاکسول را داشته باشد؛ بنابراین، انجام چنین مطالعه‌ای در آینده و به‌ویژه در سیستم کشت سوسپانسیون سلولی که هم‌وزنی بیشتری دارد، به شدت توصیه می‌شود.

Commented [c4]: بررسی شود.

در مطالعه حاضر، بررسی دقیق بر تولید ۱۰- دی‌استیل باکاتین III، باکاتین III، ۱۰- دی‌استیل تاکسول، تاکسول و سفالومانین تحت تیمارهای کیتوزان با سه غلظت ۳۰، ۱۰ و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر و جاسمونیک‌اسید با سه غلظت ۱۰۰، ۵۰ و ۱۵۰ میکرومولار انجام شد. پژوهش با توجه به نتایج به دست آمده از آنالیز داده‌های دستگاه HPLC نشان داد که جاسمونیک‌اسید ۵۰ میکرومولار منجر به افزایش تاکسول و ۱۰- دی‌استیل تاکسول شده است. تیمار جاسمونیک‌اسید ۱۰۰ میکرومولار سبب افزایش تولید ۱۰- دی‌استیل باکاتین III و تیمار کیتوزان ۵۰ میلی‌گرم در لیتر منجر به افزایش تولید باکاتین III شدند. دو ترکیب ۱۰- دی‌استیل باکاتین III و باکاتین III، از ترکیبات بسیار مهم حد واسط هستند که در ادامه مسیر بیوسنتزی به ترکیبات انتهایی مسیر بیوسنتزی شامل ۱۰- دی‌استیل تاکسول، تاکسول و سفالومانین تبدیل می‌گردند (شکل ۷). وقتی افزایش در میزان ۱۰- دی‌استیل باکاتین III و باکاتین III مشاهده می‌شود، نشان‌دهنده این است که هنوز این ترکیبات به ترکیب نهایی تبدیل نشده‌اند. در واقع، رابطه‌ای بالعکس مشاهده می‌شود. میزان تاکسول و ۱۰- دی‌استیل تاکسول در تیمار جاسمونیک‌اسید ۵۰ میکرومولار افزایش چشمگیری نشان دادند. در صورتی که در این تیمار میزان ترکیبات حد واسط ۱۰- دی‌استیل باکاتین III و باکاتین III کاهش نشان دادند که نشان‌دهنده تبدیل شدن این ترکیبات حد واسط به تاکسول و ۱۰- دی‌استیل تاکسول هستند. ترکیب سفالومانین که کاملاً مشابه ترکیب تاکسول است، افزایشی در تیمارهای به کار رفته نشان نداد و بیشترین میزان آن در نمونه شاهد مشاهده گردید. عدم افزایش ترکیب سفالومانین در تیمارهای مختلف و مشاهده بیشترین میزان آن در نمونه شاهد، نشان‌دهنده آن است که تیمارهای اعمال شده مسیر بیوسنتزی تاکسان‌ها را به‌طور انتخابی به سمت تولید تاکسول و آنالوگ آن، یعنی داستیل تاکسول، هدایت می‌کنند و هم‌زمان موجب کاهش جریان متابولیکی به سمت مسیر بیوسنتزی سفالومانین می‌شوند. کاهش یا عدم تغییر در سطح

بررسی پنج تاکسان مهم در کالوس‌های سرخدار تحت تیمار الیستورهای کیتوزان و جاسمونیک اسید/ خیری؛ عزیزاله، گریزی؛ راحله، قهرمانی؛ زهرا، ثانی خانی؛ محسن.

سفالومانین در حالی که تاکسول افزایش یافته است، می‌تواند نشان‌دهنده انشعاب زودتر مسیر بیوسنتزی یا تفاوت در تنظیم آنزیم‌های اختصاصی دوشاخه باشد (شکل ۷). احتمالاً الیستورهای مورد استفاده، آنزیم‌های کلیدی مشترک در شاخه تاکسول را به طور انتخابی و رقابتی القا کرده‌اند؛ به‌طوری که سبب تبدیل ترکیبات حد واسط به متابولیت‌های نهایی تاکسول و داستیل تاکسول شده‌اند.



شکل ۷- مسیر بیوسنتز تاکسان‌های مراحل انتهایی مسیر شامل سفالومانین، ۱۰- دی‌استیل تاکسول و تاکسول (Hao et al, 2011).

در مجموع، این مطالعه نشان داد که جاسمونیک‌اسید و کیتوزان می‌توانند ابزارهای مؤثری برای دست‌کاری مسیر بیوسنتزی تاکسان‌ها در کالوس سرخدار باشند؛ اگرچه الگوهای پاسخ آن‌ها متفاوت است. جاسمونیک‌اسید به‌ویژه در افزایش تولید تاکسول و آنالوگ مستقیم آن (۱۰- دی‌استیل تاکسول) مؤثر بود، در حالی که کیتوزان تأثیر انتخابی‌تری بر افزایش پیش‌سازهای میانی (مانند باکاتین III) نشان داد. این نتایج مؤید آن است که با بهینه‌سازی ترکیبی و مرحله‌ای الیستورها می‌توان بازده تولید را به‌طور هدفمند افزایش داد. برای درک دقیق‌تر مکانیسم‌های مولکولی این پاسخ‌ها، مطالعات آینده

می‌توانند بر بررسی بیان ژن‌های کلیدی آنزیمی در این مسیر و نیز آزمون الیستورها در سیستم کشت سوسپانسیون سلولی متمرکز شوند.

نتیجه‌گیری کلی

با توجه به یافته‌های جامع این پژوهش، می‌توان نتیجه‌گیری کرد که استفاده از الیستورهای جاسمونیک‌اسید و کیتوزان راهبردی مؤثر و هدفمند برای دست‌کاری مسیر بیوسنتزی و افزایش تولید تاکسان‌های باارزش در کشت کالوس سرخدار (*Taxus baccata*) محسوب می‌شود. با این حال، الگوی پاسخ به این دو محرک به‌وضوح متفاوت و متابولیت - خاص است. همچنین تأکید می‌شود که اگرچه برخی محققین تولید تاکسول را بیشتر معطوف به کشت سوسپانسیون می‌دانند، نتایج این پژوهش و مستندات گسترده بین‌المللی، کارایی کشت کالوس را به‌عنوان سامانه‌ای مستقل و ارزشمند برای تولید تاکسان‌ها به اثبات می‌رسانند.

جاسمونیک‌اسید به‌عنوان یک مولکول سیگنال درون‌زا، به‌طور خاص بر افزایش تولید تاکسول و آنالوگ مستقیم آن (۱۰-دی‌استیل تاکسول) مؤثر بود. این امر حاکی از فعال‌سازی ترجیحی آنزیم‌های بخش پایانی مسیر بیوسنتز است. همچنین غلظت‌های مختلف این الیستور قادر به افزایش پیش‌سازهای میانی کلیدی مانند ۱۰-دی‌استیل باکاتین III نیز بود.

کیتوزان به‌عنوان الیستوری بیرونی، اثری انتخابی‌تر نشان داد و بیشترین تأثیر را در افزایش تولید باکاتین III (یکی دیگر از پیش‌سازهای حیاتی) داشت. این موضوع می‌تواند نشان‌دهنده هدف قرار گرفتن مراحل میانی مسیر توسط این محرک باشد. پاسخ سفالومانین (آنالوگی ساختاری نزدیک به تاکسول) به تیمارها متفاوت بود و بیشترین مقدار آن در نمونه‌های شاهد مشاهده شد. این نتیجه جالب، احتمال وجود تنظیم مستقل یا انشعاب زودتر در مسیر بیوسنتزی این ترکیب را مطرح می‌کند و نشان می‌دهد محرک‌های استفاده‌شده، مسیر را به سمت تولید تاکسول و مشتقات مستقیم آن هدایت کرده‌اند.

جمع‌بندی نهایی و چشم‌انداز آینده

این مطالعه به‌وضوح نشان می‌دهد که با انتخاب نوع و غلظت مناسب الیستور، می‌توان تولید متابولیت‌های هدف در کشت بافت گیاهی را به‌صورت جهت‌دار و هدفمند افزایش داد. یافته‌ها نه‌تنها بر کارایی روش کشت کالوس به‌عنوان سیستمی جایگزین و پایدار تأکید می‌کنند، بلکه راه را برای بهینه‌سازی فرایند تولید از طریق کاربرد ترکیبی یا مرحله‌ای الیستورها هموار می‌سازند. برای درک عمیق‌تر مکانیسم این تأثیرات، مطالعات آینده می‌توانند بر بررسی هم‌زمان پروفایل بیان ژن‌های آنزیمی کلیدی مسیر همراه با پروفایل‌سازی متابولیت‌ها متمرکز شوند. در نهایت، دستاوردهای این پژوهش گامی مؤثر در

بررسی پنج تاکسان مهم در کالوس‌های سرخدار تحت تیمار الیستورهای کیتوزان و جاسمونیک اسید/ خیری؛ عزیزاله، گرزلی؛ راحله، قهرمانی؛ زهرا، ثانی خانی؛ محسن.

راستای توسعه روش‌های بیوتکنولوژیک مقرون به صرفه و دوستدار محیط زیست برای تأمین داروهای ضدسرطان حیاتی مانند تاکسول و مشتقات آن است.

منابع

- Bayraktar M, Naziri E, Akgun IH, Karabey F, Ilhan E, Akyol B, Bedir E, Gurel A. Elicitor induced stevioside production, in vitro shoot growth, and biomass accumulation in micropropagated *Stevia rebaudiana*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC). 2016 Nov;127(2):289-300.
- Bedi YS, Ogra RK, Koul K, Kaul BL, Kapil RS. Yew (*Taxus spp.*). A new look on utilization, cultivation and conservation. Supplement to cultivation and utilization of medicinal plants. 1996:443-56.
- Bernabeu E, Cagel M, Lagomarsino E, Moretton M, Chiappetta DA. Paclitaxel: What has been done and the challenges remain ahead. International journal of pharmaceutics. 2017 Jun 30;526(1-2):474-95.
- Christen AA, Gibson DM, Bland J. Production of taxol or taxol-like compounds in callus cultures of *Taxus brevifolia*. Plant Cell Reports. 1989;8(2):75-77.
- Cragg GM, Newman DJ. Plants as a source of anti-cancer agents. Journal of ethnopharmacology. 2005 Aug 22;100(1-2):72-9.
- 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.
- Efferth T. Biotechnology applications of plant callus cultures. Engineering. 2019 Feb 1;5(1):50-9.
- El-Sayed AS, Ali DM, Yassin MA, Zayed RA, Ali GS. Sterol inhibitor "Fluconazole" enhance the Taxol yield and molecular expression of its encoding genes cluster from *Aspergillus flavipes*. Process Biochemistry. 2019 Jan 1;76:55-67.
- Fett-Neto AG, DiCosmo F, Reynolds WF, Sakata K. Cell culture of *Taxus* as a source of taxol and related taxanes. Bio/Technology. 1992;10(12):1572-1575.
- Ghassempour A, Rezadoost H, Ahmadi M, Aboul-Enein HY. Seasons study of four important taxanes and purification of 10-deacetylbaaccatin 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.
- Hanano A, Perez-Matas E, Shaban M, Cusido RM, Murphy DJ. Characterization of lipid droplets from a *Taxus media* cell suspension and their potential involvement in trafficking and secretion of paclitaxel. Plant cell reports. 2022 Apr;41(4):853-71.
- Hao DC, Ge G, Xiao P, Zhang Y, Yang L. The first insight into the tissue specific taxus transcriptome via Illumina second generation sequencing. PLoS one. 2011 Jun 22;6(6):e21220.
- 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.
- Joshi N, Dhakal KS, Saud DS. Checklist of CITES listed flora of Nepal. Department of Plant Resources (DPR), Thapathali, Kathmandu, Nepal. 2017.
- Kuang X, Sun S, Wei J, Li Y, Sun C. Iso-Seq analysis of the *Taxus cuspidata* transcriptome reveals the complexity of Taxol biosynthesis. BMC plant biology. 2019 May 21;19(1):210.

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.

Luciano ÁJ, Irineo TP, Virginia OV, Feregrino-Pérez AA, Hernández AC, Gerardo GG. Integrating Plant Nutrients and Elicitors for Production of Secondary Metabolites, Sustainable Crop Production and Human Health: A Review. *International Journal of Agriculture & Biology*. 2017 Jun 30;19(3).

McLaughlin JL, Miller RW, Powell RG, Smith Jr CR. 19-Hydroxybaccatin III, 10-deacetylcephalomannine, and 10-deacetyltaxol: new antitumor taxanes from *Taxus wallichiana*. *Journal of Natural Products*. 1981 May;44(3):312-9.

Mendhulkar VD, Vakil MM. Chitosan and *Aspergillus niger* mediated elicitation of total flavonoids in suspension culture of *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees. 2013:B-731.

Mutanda I, Li J, Xu F, Wang Y. Recent advances in metabolic engineering, protein engineering, and transcriptome-guided insights toward synthetic production of taxol. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*. 2021 Feb 5;9:632269.

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.

OL G. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cultures. *Exp Cell Res*. 1968;50:148-51.

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.

Patel H, Krishnamurthy R. Elicitors in plant tissue culture. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 2013 Jul 1;2(2):60-5.

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.

Sanchez-Muñoz R, Perez-Mata E, Almagro L, Cusido RM, Bonfill M, Palazon J, Moyano E. A novel hydroxylation step in the taxane biosynthetic pathway: a new approach to paclitaxel production by synthetic biology. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2020 May 13;8:410.

Slazak B, Jędrzejska A, Badyra B, Shariatgorji R, Nilsson A, Andrén PE, Göransson U. The influence of plant stress hormones and biotic elicitors on cyclotide production in *Viola uliginosa* cell suspension cultures. *Plants*. 2022 Jul 19;11(14):1876.

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.

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.

Wasternack C, Strnad M. Jasmonates: news on occurrence, biosynthesis, metabolism and action of an ancient group of signaling compounds. *International journal of molecular sciences*. 2018 Aug 27;19(9):2539.

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.

Yukimune Y, Tabata H, Higashi Y, Hara Y. Methyl jasmonate-induced overproduction of paclitaxel and baccatin III in *Taxus* cell suspension cultures. *Nature Biotechnology*. 1996;14(9):1129-1132.

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(3):189-93.

بررسی پنج تاکسان مهم در کالوس‌های سرخدار تحت تیمار الیستورهای کیتوزان و جاسمونیک اسید/ خیری؛ عزیزاله، گری؛ راحله، قهرمانی؛ زهرا، ثانی خانی؛ محسن.

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).