

تأثیر محرک سولفات مس بر بیان ژن‌های TXS, DBAT, BAPT, DBTNB و بیوسنتز برخی تاکسان‌ها در کشت سلول سرخدار (*Taxus baccata* L.)

- مهسا بام نشین^۱، عبدالله حاتم زاده^{۲*}، محمد رضا نقوی^۳ و محمدحسین میرجلیلی^۴
 ۱. دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه گیلان، رشت
 ۲. استاد گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه گیلان، رشت
 ۳. استاد گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج
 ۴. دانشیار گروه کشاورزی، پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی دانشگاه شهید بهشتی، تهران
 (تاریخ دریافت: ۹۶/۰۸/۲۷ - تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۶/۲۱)

چکیده

تاکسان‌ها ترکیبات دی‌ترپنوئیدی با اثرات ضدسرطانی شناخته شده می‌باشند. از مهمترین تاکسان‌ها تاکسول می‌باشد. از آنجایی که روش سنتی استخراج تاکسول از پوسته درخت، ناکارآمد و غیراقتصادی بود، تلاش‌ها برای یافتن روشی کارآمد در این زمینه گسترش یافت و در نهایت روش آزمایشگاهی کشت بافت و سلول مطلوب‌ترین شیوه در این زمینه معرفی گردید. استفاده از محرک‌ها از بهترین راهکارهای بهبود عملکرد و افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در کشت‌های سلولی می‌باشد. از این رو در این مطالعه، اثر دو غلظت ۰/۱۲۵ و ۰/۶۲۵ میلی‌گرم بر لیتر از محرک سولفات مس، طی زمان‌های دو و هفت روز بر میزان تاکسول و ۱۰-دی استیل باکاتین III در کشت سوسپانسیون سلولی سرخدار مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد درحالی که غلظت ۰/۱۲۵ میلی‌گرم بر لیتر طی هفت روز باعث افزایش معنی‌دار (۴۳٪) ۱۰-دی استیل باکاتین III می‌گردد، غلظت ۰/۶۲۵ میلی‌گرم بر لیتر در همان مدت، منجر به کاهش معنی‌دار تاکسول (۲۳٪) و 10-DAB (۱۶٪) می‌گردد. همچنین مطالعه اثر غلظت انتخابی ۰/۱۲۵ میلی‌گرم بر لیتر سولفات مس بر بیان چهار ژن دخیل در بیوسنتز تاکسول (*dbtnbt* *bapt* *dbat* *txs*) طی ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت نشان داد که گرچه رونوشت ژن *dbat* در ساعت ۱۲ افزایش پنج برابری داشته، اما میزان بیان سایر ژن‌ها بسیار کم و در حد شاهد بوده و حتی در مورد ژن *txs* در ساعت ۲۴، سرکوب بیان مشاهده می‌گردد. گرچه افزایش معنی‌دار مشاهده شده در میزان ۱۰-دی استیل باکاتین III ناچیز است ولی همین میزان نیز با توجه به اهمیت این ماده به‌عنوان پیش‌ساز تولید تاکسول می‌تواند قابل‌تأمل باشد.

واژه‌های کلیدی: سرخدار، سولفات مس، کشت سوسپانسیون، تاکسول و ۱۰-دی استیل باکاتین III

The effect of copper sulphate elicitor on gene expression of TXS, DBAT, BAPT, DBTNB and biosynthesis of some taxanes in *Taxus baccata* L. cell culture

M. Bammeshin¹, A. Hatamzadeh^{2*}, M.R. Naqavi³ and M.H. Mirjalili⁴

1. Ph.D. Student, Department of Biotechnology, Guilan University, Rasht, Iran, 2. Department of Horticultural Sciences, Guilan University, Rasht, Iran, 3. Department of Agronomy and Plant Breeding, University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran, 4. Department of Agriculture, Medicinal Plant and Drugs Research Institute, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

(Received: November 18, 2017- Accepted: September 12, 2017)

ABSTRACT

Taxanes are dipropenoid compounds with known anti-cancer effects. One of the most important Taxanes is Taxol. Since the traditional method of Taxol extraction from the yew bark was inefficient and non-economic, attempts expanded to find an effective method. The tissue culture and cell culture was known as the most desirable method in this field. Using elicitors is one of the best ways to improve the production of secondary metabolites. Therefore, in this study, the effect of 0.125 and 0.625 mg/L of copper sulfate during two and seven days on the amount of Taxol and 10-Deacetylbaaccatin III (10-DAB) in the cell suspension culture of *T. baccata* was studied. The results showed that the concentration of 125.0 mg / L over seven days resulted in a significant increase (43%) of 10-DAB, while the concentration of 0.625 mg / L over the same period resulted in a significant reduction of Taxol (23%) and 10-DAB (16%). Also, the effect of selective concentration of copper sulfate (0.125 mg/L) on the expression of *txs*, *dbat*, *bapt* and *dbtnbt* over 12, 24 and 48 hours were studied. The results declared that the expression level of *dbat* increased five times after 12 hours but the expression of other genes is very low and as the same as control, even expression of *txs* after 24 hours suppressed. Although this significant increase in 10-DAB is negligible, but for the importance of this material as a taxol precursor, these results could be notable.

Key words: *Taxus baccata* L, copper sulfate, Taxol, 10- Deacetylbaaccatin III and suspension culture.

* Corresponding author E-mail: hatamzadeh@guilan.ac.ir

مقدمه

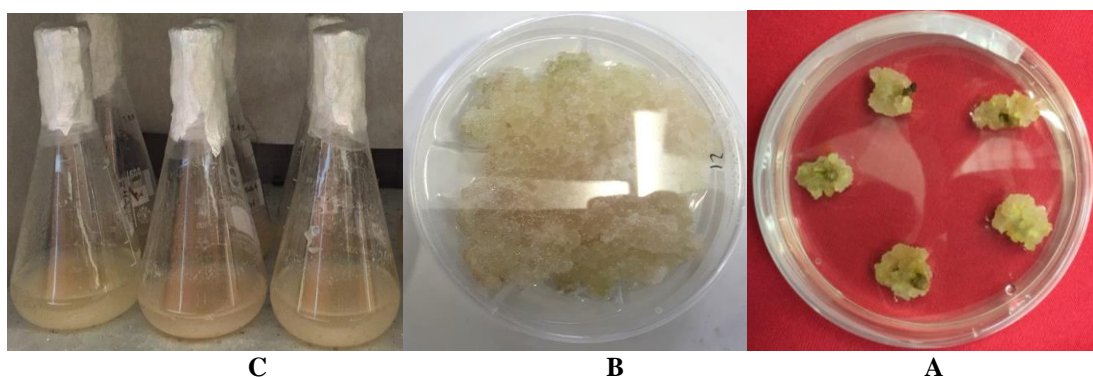
درخت سرخدار (*Taxus spp*, Taxaceae) از خانواده بازدانگان است که عموماً به شکل درختچه‌هایی کند رشد، همیشه‌سبز در عرض های میانی نیمکره‌ی شمالی با کمی نفوذ به مناطق گرمسیری گسترده شده است (Wang et al., 2011). جنس تاکسوس شامل ۹ گونه است؛ که تنها گونه‌ی سرخدار اروپایی (*Taxus baccata L.*) به‌طور گسترده در ایران یافت می‌شود و در ارتفاع ۹۰۰ تا ۲۰۰۰ متری رشته کوه‌های البرز از آستارا تا جنگل‌های علی‌آباد استان گلستان پراکنده گردیده است (Nasiry et al., 2015; Davarpanah, 2014). این جنس قادر به تولید گروهی از دی‌ترپنوئیدها به نام تاکسان (*Taxane*) می‌باشد. پرستفاده‌ترین داروی ضد سرطان یعنی تاکسول (*Taxol*) همراه با ۲ پیش‌ساز مهم در ساخت نیمه‌صنعتی آن یعنی باکاتین تری (III BAC) و ۱۰- دی استیل باکاتین تری (DAB - ۱۰) مهم‌ترین تاکسان‌هایی هستند که تاکنون شناخته شده‌اند (Zhao et al., 2015; Cragg & Newman, 2005). غلظت تاکسول و پیش‌سازهای آن در درخت به‌حدی کم است که استخراج به‌طور مستقیم از پوسته درخت و یا نیمه‌سنتز از پیش‌سازها مقرون به‌صرفه نمی‌باشد و سنتز کامل تاکسول نیز به‌علت پیچیدگی مولکول و مسیر بیوسنتز مقدور نمی‌باشد (Malik et al., 2011). طی دو دهه گذشته، کشت درون‌شیشه‌ای به‌ویژه کشت سلول، مطلوب‌ترین روش در این زمینه شناخته شده است و روش‌هایی چون غربال لاین‌های سلولی با عملکرد بالا، بهینه‌سازی شرایط کشت، استفاده از محرک‌ها و پیش‌سازها، کشت دو فاز، مهندسی متابولیت و ... منجر به بهبود عملکرد در کشت سلول گردیده است (Ranisree et al., 2004). استفاده از محرک‌ها یکی از موثرترین تکنیک‌هایی است که در حال حاضر برای بهینه‌سازی تولید بیوتکنولوژیکی متابولیت‌های ثانویه به‌کار می‌رود (Ramirez-Estrada et al., 2016). محرک‌ها با تحریک سیگنال‌های سلولی، به‌صورت مستقیم و غیرمستقیم، بیان ژن‌های مرتبط با مسیر را تحریک

کرده و موجب افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه می‌گردند (Gorelick & Bernstin, 2014). همچنین از محرک‌ها برای شناسایی مسیرهای سیگنال‌دهی در تولید متابولیت‌های ثانویه استفاده شده است (Zhao et al., 2003) گرچه نحوه عمل محرک‌ها به‌خوبی شناخته نشده است اما عوامل متعددی چون پیام رسان‌های یون کلسیم، فسفریلاسیون پروتئین‌ها، فعال‌سازی پروتئین کینازها و ... در این زمینه نقش دارند (Angelova et al., 2006). محرک‌ها دارای منشاء زیستی و غیرزیستی می‌باشند. محرک‌های غیرزیستی شامل عوامل فیزیکی یا ترکیبات معدنی مانند نمک یا یون‌های فلزی می‌باشند که می‌توانند تولید متابولیت ثانویه را در کشت سلول و ریشه موئین گونه‌های مختلف گیاهی افزایش دهند (Baenas et al., 2014).

از محرک‌های مختلف برای مشاهده تاثیر آنها بر افزایش تاکسان‌ها در سرخدار استفاده گردیده است. در بررسی اثر محرک‌های غیرزیستی در میزان تجمع تاکسان‌ها در *T. media* حداکثر تولید در حضور متیل جاسمونات و وانادیل سولفات به‌دست آمد و نشان داده شد که تولید تاکسان‌ها علاوه بر نوع محرک، به مرحله رشدی سلول‌ها نیز وابسته است (Bonfill et al., 2003). همچنین اعمال متیل-جاسمونات بر *T. cuspidata* موجب افزایش متفاوتی در بیان ژن‌های مسیر تولید تاکسول گردید که نشان داد رونوشت ژن‌هایی که در انتهای مسیر قرار دارند بسیار کمتر از رونوشت ژن‌های ابتدای مسیر افزایش می‌یابد که حاکی از اهمیت این ژن‌ها برای مهندسی متابولیت بود (Nims et al., 2006). به‌علاوه نشان داده شد که دو محرک سالیسیلیک‌اسید و متیل جاسمونات فعالیت دو آنزیم ۱۰- دی استیل باکاتین III - ۱۰-O- استیل ترانسفراز و سیتوکروم P450 را افزایش و تولید تاکسول را القا می‌کنند و در واقع سنتز تاکسول با فعالیت این آنزیم‌ها رابطه مستقیم دارد (Zhang et al., 2011). گرچه در *T. yunnanensis* یون لنتانوم باعث القا تولید و آزادسازی تاکسول گردید اما در *T. chinensis* تأثیر چندانی بر تولید تاکسول

زیستی قارچ باعث افزایش ده برابری سنگوئینارین (*Sanguinarine*) در خشخاش گردید (Balazová et al., 2008). همچنین استفاده از سولفات مس در کشت سلولی *Thalictrum rugosum* نه تنها باعث افزایش تولید متابولیت بربرین (*Berberine*) گردید، بلکه با تغییر نفوذپذیری غشاء موجب افزایش ترشح بربرین از سلول به محیط کشت شد (Kim et al., 1991). سولفات مس در گیاه پنیر باد نیز موجب افزایش بیان ژنهای مسیر تولید ویتافرین (*Withaferin*) گردیده و میزان این متابولیت به چهارده برابر شاهد رسید (Baldi et al., 2008). در پژوهش حاضر با توجه به اهمیت ویژه تاکسانها در صنعت داروسازی جهان، با هدف افزایش این ترکیب دارویی ارزشمند، اثر محرک غیرزیستی سولفات مس بر میزان تولید تاکسول و ۱۰-دی استیل باکاتین III (10-DAB) در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت. همچنین به منظور بررسی مکانیسم عمل محرک بر بیان ژنهای درگیر در چرخه تولید آنها در کشت سوسپانسیون سلولی *T. baccata* مورد مطالعه قرار گرفت.

نداشت که نشان داد اثر محرک به لاین سلولی نیز وابسته است (Wu et al., 2001). به طور جالبی استفاده از سه محرک کیتوزان، متیل جاسمونات و نقره برکشت *T. chinensis* نشان داد که استفاده ترکیبی از این سه محرک باعث افزایش تاکسول به چهل برابر کنترل، ده برابر استفاده تنها از نقره، شش برابر استفاده تنها از کیتوزان و دو برابر استفاده تنها از متیل جاسمونات می باشد که استدلال شد محرکهای مختلف، پاسخهای دفاعی متفاوتی را القا می کنند. اثر هم افزایی محرکها بر افزایش بیان ژنها بعدها نیز مورد تایید قرار گرفت (Zhang et al., 2000; Sabater-Jara & Pedrene, 2013). استفاده از ترکیب وانادیل سولفات، نیترات نقره و کلرید کبالت در *T. baccata* میزان تاکسول را به ۵/۶ برابر کنترل رساند؛ در حالی که استفاده از ترکیب سالیسیلیک اسید، متیل جاسمونات و محرک قارچی آن را به شانزده برابر کنترل رساند (Yari Khosroushahi et al., 2005). نمکهای مس نیز به صورت موفقیت آمیزی در برخی سلولهای گیاهی مورد استفاده قرار گرفته اند. در این زمینه استفاده از سولفات مس همراه با ترکیب محرک



شکل ۱. کشت های سرخدار (A) القا پینه در محیط جامد، (B) پینه های رشد یافته پس از پنج واكشت در محیط کشت جامد، (C) سوسپانسیون سلولی پس از پنج واكشت در محیط کشت مایع

Figure 1. *Taxus baccata* cell cultures A) Callus induction in solid medium B) Calluse after five subcultures in a solid culture medium C) Cell suspension after five subcultures in a liquid medium

دانشگاه تهران جمع آوری گردید. ریزنمونه ها ابتدا به مدت ۳ ساعت آبشویی شده سپس با اتانول ۷۰٪ به مدت ۳۰ ثانیه و سدیم هیپوکلریت ۵٪ به مدت ۱۴ دقیقه ضد عفونی سطحی شده و سپس سه بار شستشو

مواد و روشها

مواد گیاهی و شرایط کشت

سرشاخه های جوان گیاه *T. baccata* از گیاه مادری کاشته شده در پردیس کشاورزی و منابع طبیعی

مدل کنوئر آلمان (Knauer) همراه پمپ کنوئر (k-1001)، دتکتور کنوئر (k-2800)، ستون C8 (250×46 mm, Perfectsil) و سیستم پردازش اطلاعات با نرم افزار کرومگت (Chrom-Gate) استفاده گردید. ترکیب استونیتریل: آب (۵۵:۴۵) حجمی/حجمی) به عنوان فاز متحرک، سرعت جریان ۱ میلی لیتر بر دقیقه و مقدار نمونه تزریق شده ۲۰ میکرو لیتر بود. شناسایی پیک ها با مقایسه زمان خروج پیک (Retention time) و طیف جذبی UV با استانداردهای تاکسول (سیگما) و باکاتین III (سیگما) که در غلظت های متفاوت، پیش تر به دستگاه تزریق شده بود صورت گرفت. در نهایت سطح پیک متناسب با میزان تاکسان در نظر گرفته شد.

استخراج RNA، سنتز cDNA و تکثیر ژن
جهت استخراج RNA از ترکیبی از روش های استخراج با CTAB (Liao et al., 2004; Kai et al., 2006; Jaakola et al., 2001; Chang et al., 1993) استفاده گردید که با این روش، کیفیت و کمیت RNA بسیار مناسب بود. به اختصار ۲ گرم از سلول پودر شده با ازت مایع، با ۱۰ میلی لیتر بافر استخراج توسط ورتکس مخلوط و ۱۰ دقیقه در بن ماری ۶۵ درجه سانتی گراد قرار گرفت. سپس با حجم مناسبی از کلروفرم: ایزوآمیل (۱:۲۴ حجمی/حجمی) مخلوط و ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ با ۱۳۰۰ دور در دقیقه در ۴ درجه سانتی گراد صورت گرفت (دو بار تکرار). در ادامه فاز روپی با ۱/۲ حجم از سدیم استات ۳ مولار مخلوط و ۳۰ دقیقه در -۲۰ درجه سانتی گراد قرار گرفت. سپس مایع روپی با ۱/۴ حجم از کلراید لیتیوم ۱۰ مولار مخلوط و ۱۶ ساعت در ۴ درجه سانتی گراد قرار گرفت. در نهایت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ با ۱۴۰۰ دور در دقیقه در ۴ درجه سانتی گراد صورت گرفته و پلیت RNA توسط اتانول ۷۰٪ شسته شده و پس از خشک شدن در آب دیس DEPC حل شد. سپس جهت تایید کمیت و کیفیت، غلظت RNA توسط نانودراپ (Nano Drop) بررسی و از الکتروفورز ژل آگاروز ۱٪ برای تایید کیفیت و یکپارچگی RNA هر نمونه

با آب مقطر استریل در زیر هود صورت گرفت. قطعات ساقه به طول ۰/۵ سانتی متر بریده شده و روی محیط (B5 (Gamborge et al., 1968) با ۲ میلی گرم بر لیتر نفتالین استیک اسید، ۰/۲ میلی گرم بر لیتر کینیتین، ۰/۲ میلی گرم بر لیتر توفوردی، ۵۰۰ میلی گرم بر لیتر پی وی پی، ۳۰ گرم بر لیتر ساکاروز و ۸ گرم بر لیتر آگار در تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی گراد برای القاء پینه نگهداری شده و هر سه هفته یکبار واکشت کردن در محیط یکسان با قبل صورت پذیرفت. پس از حداقل پنج واکشت، ایجاد سوسپانسیون سلولی، با قرار دادن ۲/۵ گرم پینه شفاف در ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت در ارلن های ۲۵۰ میلی لیتر آغاز شده و ارلن ها بر روی شیکر با سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه در تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی گراد قرار گرفتند (شکل ۱). پس از حداقل سه واکشت و همسان سازی سلول ها، در فاز نمایی رشد سلول ها (روز هفتم)، سوسپانسیون ها با محلول سولفات مس با دو غلظت ۰/۱۲۵، ۰/۶۲۵ میلی گرم بر لیتر (به ترتیب معادل با ۵ و ۲۵ برابر سولفات مس در محیط کشت B5) تیمار شدند. برای هر بازه زمانی یک شاهد در نظر گرفته شد و به ارلن های شاهد در حجم برابر با محرک آب مقطر اضافه گردید. پینه های رشد یافته در بازه های زمانی، دو روز و هفت روز بعد از اعمال تیمار با استفاده از کاغذ صافی جمع -آوری و در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

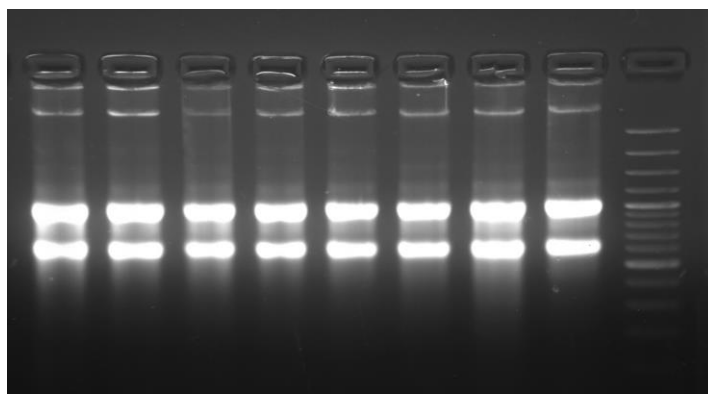
اندازه گیری تاکسول و ۱۰-دی استیل باکاتین III
ابتدا جهت عصاره گیری، نمونه های سلولی توسط فریز درایر، خشک و پس از ۱۶ ساعت شیک شدن در محلول متانول: آب (۹:۱ حجمی/حجمی) و ۱۰ دقیقه اولتراسونیک، با کمک ارلن خلاء و فیلتر ۰/۲۲ میکرو متر صاف شده و جداسازی تاکسان ها از سایر مواد با استفاده از قیف جداکننده و حلال دی کلرومتان صورت پذیرفت. در نهایت حلال توسط روتاری تبخیر گردیده و عصاره خشک در ۱ میلی لیتر استونیتریل HPLC حل شد. برای اندازه گیری تاکسول و ۱۰-دی استیل باکاتین III (10-DAB) از دستگاه HPLC

استفاده شد (شکل ۲). برای ساخت cDNA از کیت فرمنتاز (Fermentas) بر طبق پروتکل شرکت سازنده استفاده شد و کیفیت cDNA با واکنش PCR و ژل آگاروز ۱٪ چک گردید. آنالیزهای Real time PCR چهار ژن *dbat*, *ts*, *bapt*, *dbtbnbt* که توسط *Onrubia et al. (2010)* از جمله ژن‌های کلیدی در مراحل اولیه و انتهایی بیوسنتز تاکسول عنوان شده‌اند و ژن خانه‌دار اکتین (*Actin*)، با استفاده از پرایمرهای اختصاصی (جدول ۱) و کیت سایبرگرین (SYBER) Green PCR Mastermix توسط دستگاه کایژن (QIAGEN real time PCR system) انجام شد. داده‌های خام به صورت چرخه آستانه یا Ct

به دست آمده و با در نظر گرفتن سه تکرار برای هر نمونه، تفاوت در مقدار Ct بین یک نمونه و کنترل به صورت سطح تغییر نسبت به کنترل بیان گردید. سطوح نسبی رونویسی با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ محاسبه گردید.

آنالیز آماری

تمامی آزمایش‌ها با سه تکرار مستقل در قالب یک طرح کاملاً تصادفی انجام شدند. میانگین داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS توسط آزمون دانکن با در نظر گرفتن سطح اطمینان $P \leq 0.05$ مورد تجزیه واریانس یک عاملی قرار گرفت.



شکل ۲. نمونه‌ای از RNA کل استخراج شده از نمونه‌های تیمار شده با سولفات مس. در ژل، دو باند مربوط به ۲۸S rRNA و ۱۸S به وضوح قابل مشاهده می‌باشند.

Figure 2. A sample of total RNA extracted from samples, which treated with copper sulfate. In the gel, 2 rRNA bands; 28s and 18s are clearly revealed.

نتایج در مطالعه حاضر نتایج حاصل از اندازه‌گیری میزان تاکسول و 10-DAB در زمان‌ها و غلظت‌های متفاوت توسط دستگاه HPLC نشان داد که تاثیر هر دو عامل زمان و غلظت معنی‌دار می‌باشد (جدول ۲). در ارتباط با تغییر 10-DAB نسبت به کنترل، غلظت متعادل (۰/۱۲۵ میلی‌گرم بر لیتر) سولفات مس پس از هفت روز باعث افزایش ۴۳٪ در میزان 10-DAB گردید، اما غلظت بالاتر (۰/۶۲۵ میلی‌گرم بر لیتر) گرچه پس از دو روز، افزایش جزیبی را در برداشت اما پس از هفت روز منجر به کاهش ۲۳٪ گردید. در ارتباط با تغییر تاکسول نسبت به کنترل، غلظت متعادل سولفات مس

نتایج

در هر دو زمان (دو و هفت روز) تاثیر معنی‌داری را ایجاد نکرد؛ اما غلظت بالاتر پس از هفت روز منجر به کاهش ۱۶٪ در میزان تاکسول گردید، گرچه طی دو روز اول تاثیر معنی‌داری را ایجاد نکرد. از این رو بهترین غلظت ۰/۱۲۵ میلی‌گرم بر لیتر و بهترین زمان هفت روز شناسایی شد و بهترین نتیجه از این تیمار در 10-DAB حاصل گردید (شکل ۳). در ادامه تحقیق از این غلظت مناسب (۰/۱۲۵ میلی‌گرم بر لیتر) جهت اعمال تیمار به منظور بررسی بیان ژن‌ها استفاده گردید. برای اولین بار *Nimes et al. (2006)* نشان داد که گرچه افزایش بیان در ژن‌های درگیر در مسیر تولید تاکسان‌ها در سرخدار به سرعت بعد از استفاده

ساعت پس از اعمال تیمار مشاهده گردید که با روند کندتری (۱/۳ برابر کنترل) تا زمان ۲۴ ساعت ادامه پیدا کرده و در زمان ۴۸ ساعت هم سطح با کنترل به صفر نزدیک می شود. به طور جالبی در ارتباط با ژن *txs* کاهش بیان نسبت به کنترل مشاهده گردید، گرچه میزان این کاهش در زمان ۱۲ ساعت تفاوت معنی داری با کنترل نداشت ولی در زمان ۲۴ ساعت، به طور جدی باعث سرکوب میزان بیان (۰/۳ برابر کمتر از کنترل) گردید و همچنان مانند *dbat* در زمان ۴۸ ساعت هم سطح با کنترل به صفر نزدیک شد. در ارتباط با دو ژن *bapt* و *dbtnbt* میزان بیان بسیار کمتر از دو ژن *dbat* و *txs* و در حد کنترل بود و در هیچ یک از زمان های مورد مطالعه (۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت) تفاوت معنی داری بین نمونه تیمار و کنترل مشاهده نگردید.

محرک رخ می دهد، ولی حداکثر میزان تاکسان ها با فاصله طولانی تر از این زمان و معمولا در انتهای فاز ثابت رخ می دهد. این نتایج بارها توسط محققین دیگر نیز تایید گردید (Exposito et al., 2009; Onrubia et al., 2013a; Sabater-Jara & Pdreno, 2013). در توضیح این مطلب در تحقیقی توسط Onrubia et al. (2009) نشان داده شد که آنزیم های حاصل از این ژن ها، مدت ها پس از حذف رونوشت پایدار و فعال باقی می ماندند. از این رو مطالعات بررسی بیان ژن ها در سرخدار، معمولا در طی ۴۸ ساعت اول پس از اعمال تنش صورت می گیرد. در تحقیق حاضر نیز از همین اصل جهت بررسی بیان ژن استفاده و ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از اعمال تیمار (۰/۱۲۵ میلی گرم بر لیتر سولفات مس) برداشت سلول ها صورت پذیرفت. در آنالیز حاصل از بررسی بیان ژن (شکل ۴) افزایش قابل توجهی (۵/۳ برابر کنترل) در میزان بیان ژن *dbat* ۱۲

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده برای تکثیر ژن های مورد مطالعه.

Table 1. Sequences of the primers used to amplify the genes under study

Designation	Primer sequence	Product size (bp)
ACTIN	F: 5'-GCCGTGAAATTGTCCGCGATG-3' R: 5'-CCGTTCTGCACCAATCGTGA-3'	148
TXS	F: 5'-CCGTGTACCCTACAACCAATAC-3' R: 5'-TTGTTAGTCGCCAGCTCAAG-3'	118
DBAT	F: 5'-CTCTCCACCCTGACAATCTAC-3' R: 5'-GAGAGAGCCTGCCGAATTAC-3'	119
BAPT	F: 5'-TGTGGGAGCGAATGTGTATG-3' R: 5'-CTAGCTTACCAGTCTCTATTCC-3'	137
DBTNBT	F: 5'-GAGGTTAAGCCCTACTAGAAC-3' R: 5'-GGAGGTGGGCATATCGAATC-3'	104

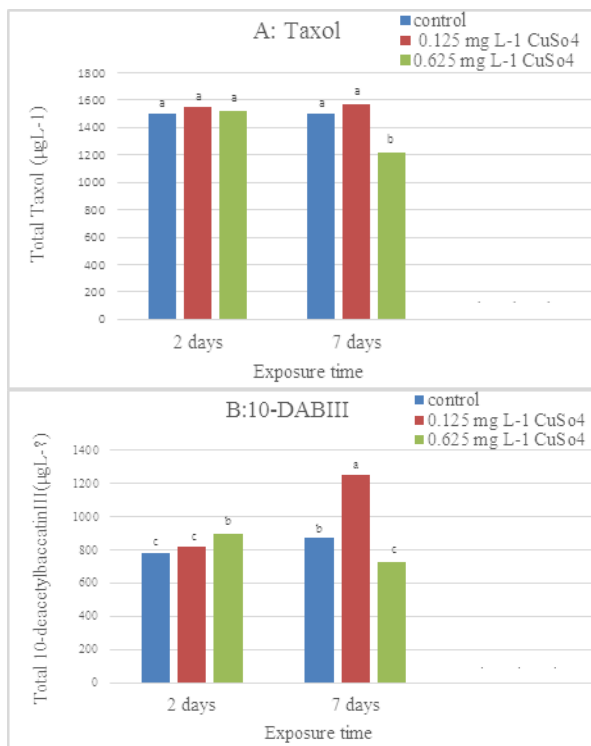
جدول ۲. تجزیه واریانس میزان تاکسان ها

Table 2. Variance analysis of Taxan

MS			
10-DAB	taxol	Df	S.O.V.
68820.50**	56000**	1	Time
69168.72**	54780**	2	Concentration
111078.16**	131052**	2	Concentration *Time
251.25	689	10	error
1.01	1.23		%(CV)

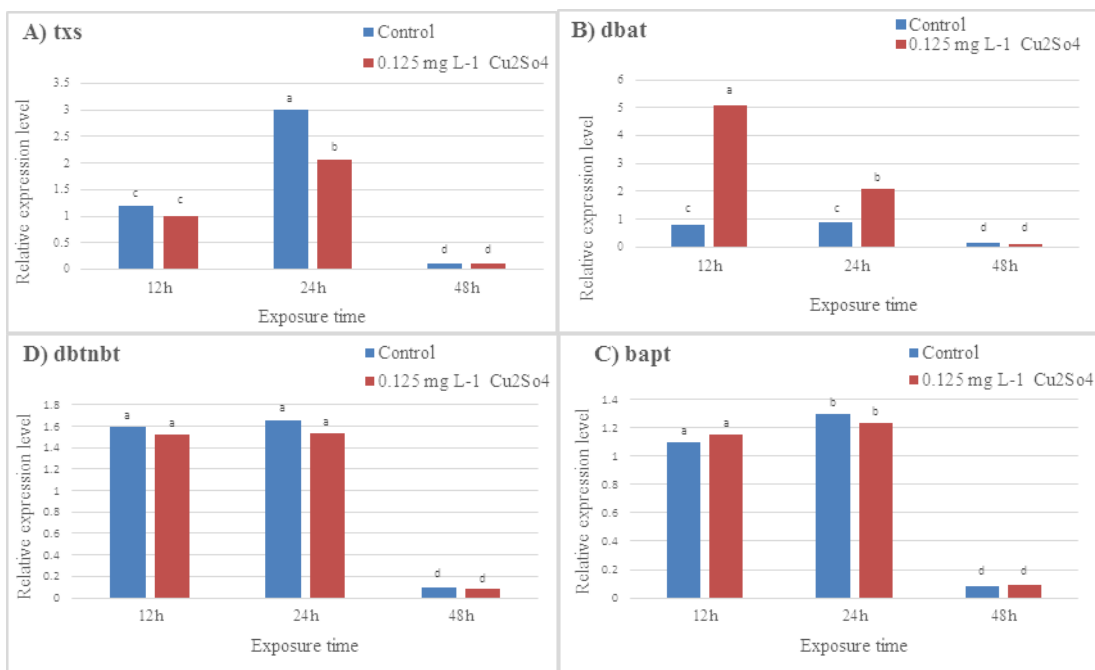
ns و **: به ترتیب غیر معنی دار و معنی دار در سطح احتمال یک درصد

** , ns: significantly different at 1% and nonsignificant, respectively



شکل ۳. مقایسه اثر غلظت و مدت زمان تیمار با سولفات مس بر میزان (A) تاکسول (B) 10-DAB سرخدار. حروف متفاوت بالای نمودارها نشان دهنده معنی دار بودن در سطح ۵ درصد است.

Figure 3. Comparison the effect of exposure time and concentration of copper sulfate on A) Taxol B) 10-DAB production. Signs with different letters indicate significant differences at $p \leq 0.05$



شکل ۴. سطوح بیان نسبی ژنهای (A) txs (B) dbat (C) bap1 (D) dbtntb در کشت سوسپانسیون سلولی سرخدار تیمار شده با غلظت ۰/۱۲۵ میلی گرم بر لیتر سولفات مس. حروف متفاوت بالای نمودارها نشان دهنده معنی دار بودن در سطح ۵ درصد است.

Figure 4. Relative expression level of A) txs, B) dbat, C) bap1, D) dbtntb genes in *T. baccata* cell suspension cultures treated with 0.125 mg/L copper sulfate. Signs with different letters indicate significant differences at $p \leq 0.05$

(Ciddi et al., 1995).

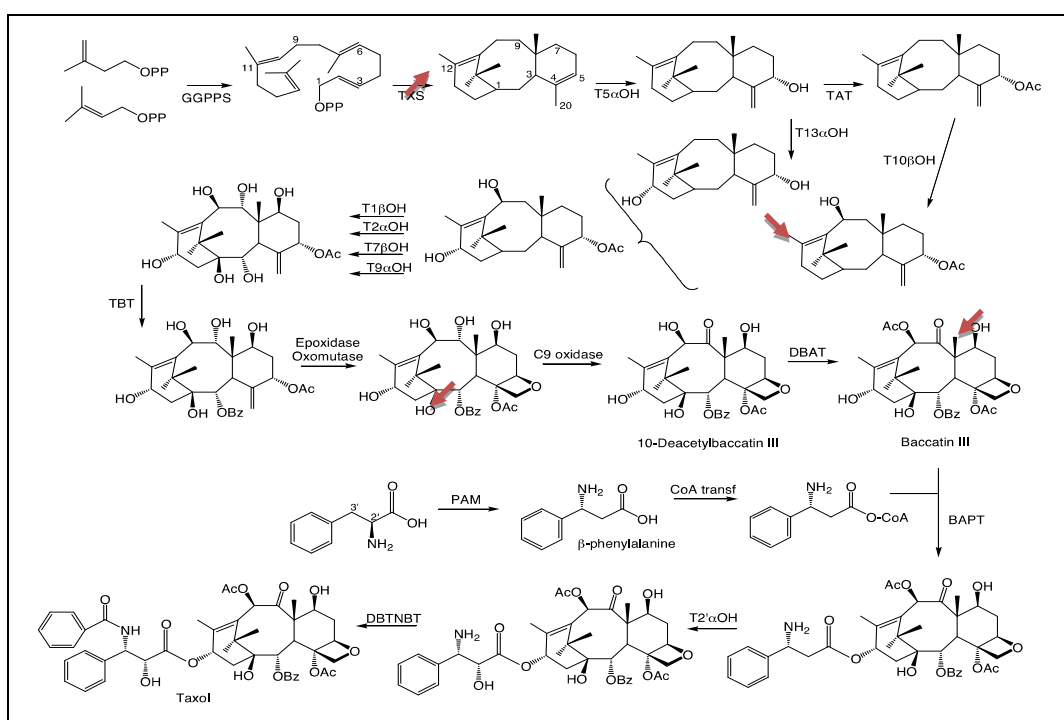
در مطالعه حاضر نیز نشان داده شد که یون مس نه تنها تاثیری مثبتی بر میزان تاکسول ندارد حتی در غلظت ۰/۶۲۵ میلی‌گرم بر لیتر موجب کاهش این متابولیت نسبت به کنترل می‌گردد. گرچه تاکنون گزارشی در زمینه تاثیر مس بر سایر تاکسان‌های سرخدار وجود ندارد، مطالعه حاضر نشان داد که غلظت پایین‌تر ۰/۱۲۵ میلی‌گرم بر لیتر در زمان طولانی‌تر (هفت روز) موجب افزایش در میزان 10-DAB می‌گردد. گرچه میزان این افزایش در مقایسه افزایش چندین برابری حاصل از برخی محرک‌ها مانند متیل جاسمونات، کوروناتین، سیکلودکستین ناچیز می‌باشد (Onrubia et al., 2013b; Sabater-Jara & Pdreno, 2013). ولی همین میزان نیز با توجه به اهمیت سرخدار و اهمیت 10-DAB به‌عنوان یکی از پیش‌سازهای مهم در تولید تاکسول می‌تواند قابل‌تأمل باشد. اهمیت غلظت و مدت‌زمان تیمار و اثر متقابل این دو، در افزایش تاثیر محرک‌ها بر میزان تولید متابولیت‌های ثانویه توسط محققین بسیاری به اثبات رسیده است (Cho et al., 2008; Korsangruang et al., 2010). از این‌رو در مطالعات بعدی آزمون غلظت‌های دیگری از محرک سولفات‌مس در زمان‌های متفاوتی از تیمار، خالی از فایده نخواهد بود. علاوه بر این با توجه به اثرات هم‌افزایی محرک‌ها بررسی تاثیر ترکیب سولفات‌مس با سایر محرک‌های زیستی و غیرزیستی با اهمیت به‌نظر می‌رسد.

قابل ذکر است نتایج حاصل از مطالعه حاضر با نتایج (Bhuvanewari et al., 2012) همسو می‌باشد. این محققین اعلام داشتند که در تاثیر کلرید مس بر گیمنما (*Gymnema silvestre*) بیشترین میزان جیمنمیک اسید (*Gymnemic acide*) در اثر غلظت‌های پایین محرک و زمان‌های طولانی حاصل می‌گردد و در صورت استفاده از غلظت‌های بالاتر، بهتر است برداشت زودتر صورت پذیرد. این محققین همچنین بیان داشتند که غلظت‌های بالا طی زمان باعث ایجاد سمیت و کاهش بیومس و به دنبال آن کاهش متابولیت می‌گردند. در تحقیق دیگری نتایجی

استفاده از محرک‌های زیستی و غیرزیستی سبب افزایش تجمع متابولیت‌های ثانویه در بسیاری از گیاهان دارویی شده است. یون مس در مطالعات بسیاری به‌عنوان محرک بر روی گیاهان متفاوت اعمال شده است. استفاده از یون مس در شکل سولفات و کلراید موجب القا تولید کومارین در خرفه و آفتابگردان گردید (Bhuiyan & Adachi., 2006; Gutierrez- Coronado et al., 1995). همچنین استفاده از سولفات‌مس در کشت سوسپانسیون شوکران زهرآلود (*Conium maculatum L.*) افزایش تولید فورانوکومارین (Furanocoumarins) را به‌دنبال داشت (Meier et al., 2015). به‌علاوه استفاده از سولفات‌مس در غلظت مناسب باعث افزایش سطح بتالاین (Betulain) در چغندر شد (Trejo-Tapia et al., 2001). همچنین با توجه به اثرات هم‌افزایی محرک‌ها، یون مس همراه با محرک‌های زیستی و غیرزیستی دیگر نیز به‌کار رفته است (Cho et al., 2008b). استفاده از یون مس در غلظت مناسب همراه با عصاره مخمر میزان دکورزینول (*Decurinol angelete*) را در کشت سلولی سنبل ختایی (*Pueraria candollei*) افزایش داد (Korsangruang et al., 2010). همچنین تیمار برگ‌های جدا شده از انگور با سولفات‌مس همراه با محرک قارچی باعث القا تولید فیتوالکسین‌ها گردید (Aziz et al., 2003). همین محقق بعدها گزارش کرد که غلظت و زمان استفاده از یون مس، بر افزایش محتوای جینسنونید (Ginsenoide) در گیاه جینسنینگ موثر است (Aziz et al., 2006). این مطلب توسط محققین بسیاری تایید گردید. به‌عنوان نمونه غلظت ۲۰ میکرو مولار سولفات‌مس منجر به القا تولید بتالین (Betalin) در کشت سلولی گل کاغذی (*Bougainvillea*) گردید و اولین نشانه‌های افزایش پس از ده روز مشاهده گردید در حالی که در غلظت‌های بالاتر و پایین‌تر مدت بیشتری طول کشید تا نشانه‌های افزایش مشاهده گردد. در تنها تحقیق حاصل از تاثیر یون مس بر میزان تاکسول *T. media* نشان داده شد که مس تاثیری بر این تاکسان ندارد

با وجود افزایش پیش‌ساز 10-DAB تاثیر مثبتی در میزان تاکسول مشاهده نمی‌گردد، می‌توان اشاره نمود که چرخه تولید تولید تاکسول بسیار پیچیده بوده و فرایندهای شیمیایی بسیاری بر روی پیش‌ساز 10-DAB پیش از تبدیل به تاکسول اثرگذار است. قابل ذکر است که در گزارشات متعددی، با وجود افزایش قابل توجه در پیش‌سازهای تاکسول، در میزان تاکسول تغییر چندانی صورت نپذیرفته است (Exposito., 2009; Onrubia., 2010)

کاملاً مشابه با این مطالعه در تاثیر سولفات‌مس بر انگشت دانه به‌دست آمد (Bota & Deliu, 2011). گرچه به‌صورت متضادی یون مس بر شبدر قرمز و کشت ریشه موین کولتوس (*Coleus forskohlii*) در غلظت‌های بالاتر و زمان طولانی‌تر نتایج بهتری را به‌دنبال داشتند (Reddy et al., 2012). در این موارد شاید بتوان تحمل بالای این گیاهان نسبت به سولفات‌مس و یا واکنش‌های شیمیایی درونی در تجزیه ترکیبات سمی را در این زمینه موثر دانست. در توضیح این مطلب که



شکل ۵. مسیر بیوسنتز تاکسول به اختصار. آنزیم‌هایی که با ژن‌های مورد مطالعه کد می‌شوند با فلش مشخص شده‌اند. TXS (تاکسا دی ان سنتتاز)، DBAT (۱۰-دی‌استیل باکاتین III-۱۰-استیل ترانسفراز)، BAPT (۱۳-C-فنیل پروپانویل تاکسا دی ان سنتتاز)، DBTNBT (دی‌بنزوئیل تاکسول N-بنزوئیل ترانسفراز). اقتباس از Onrubia et al. (2013a)

اواسط مسیر بیوسنتز نقش دارد و تبدیل ۱۰-دی‌استیل باکاتین III به باکاتین III را عهده‌دار است. BAPT (کدکننده ۱۳-C-فنیل پروپانویل-CoA-ترانسفراز) که اتصال حلقه جانبی فنیل آلانین به باکاتین III را انجام می‌دهد و dbtnbt (کدکننده

در این مطالعه همچنین بیان چهار ژن *txs* (کدکننده تاکسا دی ان سنتتاز) که در مراحل اولیه بیوسنتز نقش دارد و تبدیل میانجی GGPP به 4,11-diene را عهده‌دار است، *dbat* (کدکننده ۱۰-دی‌استیل باکاتین III-۱۰-استیل ترانسفراز) که در

این مسیر تاکنون شناخته نشده‌اند و افزایش و کاهش بیان یک ژن، به‌طور قطع منجر به تغییر در میزان متابولیت نمی‌گردد و مسیرها و پروتئین‌های بسیاری در این زمینه نقش خواهند داشت (Ramirez-Estrada., 2014).

نتیجه‌گیری کلی

مطالعه حاضر نشان داد در حالی که غلظت پایین‌تر محرک در زمان طولانی‌تر موجب افزایش در میزان 10-DAB می‌گردد اما غلظت بالاتر در همین مدت-زمان، باعث کاهش میزان 10-DAB و تاکسول می‌گردد. با توجه به تحقیقات پیشین، ایجاد سمیت در غلظت‌های بالا و زمان طولانی می‌تواند دلیل کاهش متابولیت باشد. در بررسی بیان ژن، از آنجا که دو ژن پایانی، عوامل محدودکننده تولید تاکسول شناخته می‌شوند میزان کم بیان، دور از انتظار نیست. همچنین با توجه به سایر مطالعات، کاهش بیان *txs* نسبت به کنترل می‌تواند مرتبط با تجمع و تاثیر ترکیبات سمی تولیدشده توسط یون‌های مس بر ماکرو مولکول‌های زیستی باشد. چرخه بیوسنتز تاکسول بسیار پیچیده بوده و افزایش و کاهش بیان یک ژن به‌طور قطع منجر به تغییر میزان متابولیت نمی‌گردد و تحقیقات بیشتری در این زمینه مورد نیاز است.

دی‌بنزوئیل تاکسول (N-بنزوئیل ترانسفرز) که در آخرین مرحله تولید تاکسول نقش دارد، بررسی شد (شکل ۵). قابل ذکر است که دو آنزیم آخر به‌عنوان ترانسفرزهای پایانی شناسایی می‌شوند. در مطالعه حاضر میزان کم بیان و در حدکنترل دو ژن پایانی دور از انتظار نبوده و در مطالعات بسیاری رونوشت ترانسفرزهای پایانی (*bapt* و *dbtnbt*) بسیار کمتر از رونوشت سایر ژن‌ها گزارش شده است (Nimes et al., 2006). به‌علاوه این محققین پیشنهاد نمودند که این ترانسفرزهای پایانی محدود کننده نرخ بیوسنتز تاکسول می‌باشند. همچنین در این مطالعه کاهش بیان *txs* نسبت به کنترل مشاهده گردید. Yousefi et al. (2015) نشان داد که با افزایش غلظت محرک مس بیان ژن DXR درگیر در تولید متابولیت کاهش می‌یابد. همچنین در مطالعه دیگری استفاده از یون مس موجب کاهش بیان ژن FNS₁ مسیر تولید متابولیت گردید (Shahbazi & Riahimadvar, 2014). در نهایت محققین کاهش بیان ژن‌ها را مرتبط با تجمع و تاثیر ترکیبات سمی تولید شده توسط یون‌های مس (مانند ROS, H₂O₂ و...) بر ماکرو مولکول‌های زیستی دانستند (Adriano et al., 2001). قابل ذکر است که چرخه بیوسنتز تاکسول بسیار پیچیده بوده و بسیاری از ژن‌ها و آنزیم‌های درگیر در

REFERENCES

- Adriano, D. C. (2001). Trace elements in terrestrial environments; Biochemistry, Bioavailability and Risk of Metals. Springer-Verlag, 37: 15-20.
- Angelova, Z., Georgiev, S. & Roos, W. (2006). Elicitation of plants. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 20: 72-83.
- Aziz, A., Trotel-Aziz, P., Dhucq, L., Jeandet, P., Couderchet, M. & Vernet, G. (2006). Chitosan oligomers and copper sulfate induce grapevine defense reactions and resistance to gray mold and downy mildew. *Phytopathology*, 96: 1188-1194.
- Baenas, N., Garcia-Viguera, C. & Moreno, D. A. (2014). Elicitation: A tool for enriching the bioactive composition of foods. *Molecules*, 19: 13541-13563.
- Balažová, A., Blanáriková, V., Bilka, F. & Bilková, A. (2008). Effect of combined biotic and abiotic elicitor on the sanguinarine formation in cell suspension cultures of *Eschscholtzia californica*. *ACTA Facultatis Pharmaceuticae*, 55: 58-63.
- Baldi, A., Singh, D. & Dixit, D. K. (2008). Dual elicitation for improved production of withaferin a by cell suspension cultures of *Withania somnifera*. *Appl Biochem Biotechnol*, 151: 556-564.
- Bhuiyan, M. N. & Adachi, T. (2003). Stimulation of betacyanin synthesis through exogenous methyl jasmonate and other elicitors in suspension-cultured cells of *Portulaca*. *J. Plant Physiol*, 160: 1117-1124.
- Bhuvaneswari, C. H., Rao, K., Gandhi, S. & Giri, A. (2012). Abiotic elicitation of gymnemic acid in the suspension cultures of *Gymnema sylvestre*. *World J. Microbiol Biotechnol*. 28: 741-747.

9. Bonfill, M., Palazón, J., Cusidó, R. M., Joly, S., Morales, C. & Piñol, M. T. (2003). Influence of elicitors on taxane production and 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in *Taxus media* cells. *Plant Physiol Biochem*, 41:91-6.
10. Bota, C. & Deliu, C. (2011). The effect of copper sulphat on the production of flavnoids in *digitalis lanata* cell cultures. *Farmacia*, 59: 21-8.
11. Chang, C., Puryear, P. & Cairney, C. (1993). A Simple and Efficient Method for Isolating RNA from Pine Trees. *Plant Molecular Biology Report*, 11(2): 23-29
12. Ciddi, V., Srinivasan, V. & Shuler, M. L. (1995). Elicitation of taxus cell for taxol production. *Biotechnological level*, 17 (12): 1343-1346.
13. Cragg, G. M. & Newman, D. J. (2005). Plants as a source of anti-cancer agents. *J. Ethnopharmacol*, 100: 72-79.
14. Cho, H. Y., Son, S. Y., Rhee, H. S., Yoon, S. Y. H., Lee-Parsons, C. W. & Park, J. M. (2008b). Synergistic effects of sequential treatment with methyl jasmonate, salicylic acid and yeast extract on benzophenanthridine alkaloid accumulation and protein expression in *Eschscholtzia californica* suspension cultures. *J. Biotechnol*, 135: 117-122.
15. Exposito, O., Bonfill, M., Onrubia, M., Jane, A., Moyano, E., M. Cusido, R., Palazon, J. & Pinol, T. (2009). Effect of taxol feeding on taxol and related taxan production in *Taxus baccata* suspension culture. *New Biotechnology*, 25: 41-48
16. Davarpanah, S. J., Lahouti, M. & Karimian, R. (2014). Micropropagation of common yew using embryo culture. *Journal of Applied Biotechnology Reports*, 1(2): 77- 80.
17. Fang, Y., Smith, M. A. L. & Pépin, M. F. (1999). Effects of exogenous methyl jasmonate in elicited anthocyanin-producing cell cultures of ohelo (*Vaccinium pahalae*). *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, 35: 106-130
18. Gorelick, J. & Bernstein, N. (2014). Elicitation: An underutilized tool in the development of medicinal plants as a source of therapeutic secondary metabolites. *Adv. Agronomy*, 124: 201-230.
19. Gutierrez-Coronado, M. A., Parry, A., Tena, M., Jorin, J. & Edwards, R. (1995). Abiotic elicitation of coumarin phytoalexins in sunflower. *Phytochemistry*, 38: 1185-1191.
20. Jaakola, L., Pirttila, A. M., Halonan, M. & Hohtola, A. (2001). Isolation of high quality RNA from bilberry (*Vaccinium myrtillus L.*) fruit. *Mol Biotechnol*, 19: 201-203.
21. Kai, G., Miaoa, Z., Zhang, L., Zhao, D., Liao, Z., Sun, X. & Zhao, L. (2006). Molecular cloning and expression analyses of a new gene encoding 3-hydroxy-3methylglutaryl-CoA synthase from *Taxus media*. *Biol Plant*, 50(3): 359-366.
22. Kasparova, M., Siatka, T. & Dusek, J. (2007). Abiotic elicitation of *Trifolium pratense L.* suspension culture, *Ces. Slov. Farm*, 56: 225-229.
23. Kim, D. I., Pedersen, H. & Chinc, K. (1991). Stimulation of berberine production in *Thalictrum rugosum* suspension cultures in response to addition of cupric sulphate, *Biotechnol. Lett*, 13: 213-216.
24. Korsangruang, S., Soonthornchareonnon, N., Chintapakorn, Y., Saralamp, P. & Prathanturarug S. (2010). Effects of abiotic and biotic elicitors on growth and isoflavonoid accumulation in *Pueraria candollei* var. *candollei* and *P. candollei* var. *mirifica* cell suspension cultures. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 103: 333-342.
25. Lakhotia, P., Singh K. P., Singh, S. K., Singh, M. C., Prasad, K.V. & Swaroop K. (2014). In uence of biotic and abiotic elicitors on production of betalain pigments in bougainvillea callus cultures. *Indian J. Hort*, 71(3): 373-378
26. Liao, Z., Chen, M., Guo, L., Gong, Y., Tang, F., Sun, X. & Tang, K. (2004). Rapid isolation of high-quality total RNA from *Taxus* and *Ginkgo*. *Prep Biochem Biotechnol*, 34(3): 209-214.
27. Malik, S., Cusido, R. M., Mirjalili, M. H., Moyano, E., Palazon, J. & Bonfill, M. (2011). Production of the anticancer drug taxol in *Taxus baccata* suspension cultures: A review. *Process Biochemistry*, 46: 23-34
28. Meier, P., Hotti, H. & Rischer, H. (2015). Elicitation of furanocoumarins in poison hemlock (*Conium maculatum L.*) cell culture. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 36: 34-38
29. Nasiri, J., Naghavi, M. R., Alizadeh, H., Moghadam, M. R. F., Mashouf, A. & Nabizadeh, M. (2015a). Modified AHP-based decision-making model toward accurate selection of eligible maintenance media for production of taxanes in *Taxus baccata* callus culture. *Acta Physiol Plant*, 37: 1-15.
30. Nims, E., Dubois, C. P., Roberts, S. C. & Walker, R. (2006). Expression profiling of genes involved in paclitaxel biosynthesis for targeted metabolic engineering. *Meta-engineering*, 8: 385-

- 394.
31. Patil, R. A., Lenka, S. K., Normanly, J., Walker, E. L. & Roberts, S. C. (2014). Methyl jasmonate represses growth and affects cell cycle progression in cultured *Taxus* cells. *Plant Cell Rep*, 33: 1479–1492
 32. Onrubia, M., Moyano, E., Bonfill, M., Expósito, O., Palazón, J. & Cusidó, R.M. (2010). An approach to the molecular mechanism of methyl jasmonate and vanadyl sulphate elicitation in *Taxus baccata* cell cultures: the role of txs and bap gene expression. *Biochemical Engineering Journal*, 53: 104–11.
 33. Onrubia, M., Cusidó, R. M., Ramirez, K., Hernández-Vázquez, L., Moyano, E. & Bonfill, M. (2013a). Bioprocessing of plant in vitro systems for the mass production of pharmaceutically important metabolites: paclitaxel and its derivatives. *Current Medicinal Chemistry*, 20(7): 880–91.
 34. Onrubia, M., Moyano, E., Bonfill, M., Cusidó, R. M., Goossens, A. & Palazón, J. (2013b). Coronatine, a more powerful elicitor for inducing taxane biosynthesis in *Taxus media* cell cultures than methyl jasmonate. *Journal of Plant Physiology*, 170(2): 211–229.
 35. Ramirez-Estrada, K., Vidal-Limon., H, Hidalgo, Moyano, E., Golenioswki, M., Cusidó, R. M. & Palazon, J. (2014). Elicitation, an Effective Strategy for the Biotechnological Production of Bioactive High-Added Value Compounds in Plant Cell Factories. *Molecules*, 21: 182-189
 36. Reddy, C. S., Praveena, C. h. & Veeresham, C. (2010). Strategies to Improve the Production of Forskolin from Hairy Root Cultures of *Coleus forskohlii* Briq. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology*. 5(2): 11-28
 37. Sabater-Jara, A. B. & Pedreño, M. A. (2013). Use of α -cyclodextrins to enhance phytosterol production in cell suspension cultures of carrot (*Daucus carota* L.). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 114: 249–58.
 38. Shahbazi, A. & Riahimadvar, A. (2014). Forskolin Production and Gene Expression of 1-Deoxy-D-xylulose-5-PHosphate Reductoisomerase in Treated *Coleus forskohlii* Plant with Cu. *Plant Production Technology*. 14, 2 (In Farsi).
 39. Trejo-Tapia, G., Jimenez-Aparicio, A., Rodriguez- Monroy, M., De Jesus-Sanchez, A. & Gutierrez- Lopez, G. (2001). In uence of cobalt and other microelements on the production of betalains and the growth of suspension cultures of *Beta vulgaris*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 67: 19-23.
 40. Wang, Y. F., Shi, Q. W., Dong, M., Kiyota, H., Gu, Y. C. & Cong, B. (2011). Natural taxanes: Developments since 1828. *Chem Rev*, 111: 7652–7709.
 41. Wu, J. A., Wang, C. B. & Mei, X. (2001). Stimulation of taxol production and excretion in *Taxus* spp. cell cultures by rare earth chemical lanthanum. *Journal of Biotechnology*, 85: 67–73.
 42. Yari Khosroushahi, A., Valizadeh, M., Ghasempour, A., Khosrowshahli, M., Naghdibadi, H., Dadpour, M. R. & Omid, Y. (2005). Improved Taxol production by combination of inducing factors in suspension cell culture of *Taxus baccata*, *Cell Biology International*, 30: 262-269.
 43. Yousefi, K., Riahi-Madvar, A. & Baghizadeh, A. (2011). Investigation of the effects of Ag and Cu elicitors on flavone synthase 1 gene expression and some biochemical parameters on *Cuminum cyminum* L. endemic to Iran, *Journal of Plant Research* 28,1 (In Farsi).
 44. Zhang, C. H., Mei, X. G., Liu. L. & Yu, L. J. (2000). Enhanced paclitaxel production induced by the combination of elicitors in cell suspension cultures of *Taxus chinensis*. *Biotechnology Letters*, 22: 1561–156
 45. Zhang, J. F., Gong, S. & Guo, Z. G. (2011). Effects of different elicitors on 10-deacetylbaccatin III-10-O-acetyl transferase activity and cytochrome P450 monooxygenase content in suspension cultures of *Taxus cuspidata* cells. *Cell Biol. Int. Rep.* 18(1): art: e00009.
 46. Zhao, J. & Sakai, K. (2003). Multiple signaling pathways mediate fungal elicitor-induced beta-thujaplicin biosynthesis in *Cupressus lusitanica*. *Cell Cultures*, 4: 647-656.
 47. Zhao, C., Song, G., Fu, C., Dong, Y., Xu, H., Zhang, H. & YuL, J. (2015). A systematic approach to expound the variations in taxane production under different dissolved oxygen conditions in *Taxus chinensis* cells. *Plant Cell Rep*, 29: 1–19.