

Research Paper

Selection of high-yielding cell line and establishment of high Taxol-producing cell suspension culture in European yew tree (*Taxus baccata* L.)Aida Javanmard¹ and Morad Jafari^{*,2}

1- PhD Student of Molecular Genetics and Genetic Engineering, Department of Genetics and Plant Production, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, I. R. Iran. (ai.javanmard@urmia.ac.ir)

2,*- (Corresponding author) Associate Professor, Department of Genetics and Plant Production, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, I. R. Iran. (m.jafari@urmia.ac.ir)

Received: 07 January 2025

Accepted: 09 April 2025

Extended Abstract

Background and Objective: European yew (*Taxus baccata* L.) is a slow-growing, evergreen conifer native to northern Iran with high medicinal value due to its production of paclitaxel (Taxol), a vital anticancer drug. However, the extremely low concentration of paclitaxel in yew tissues (0.001–0.02% of dry weight) poses a major barrier to sustainable exploitation. Producing just one kilogram of paclitaxel requires about 10,000 kg of bark or the felling of 3,000 trees, while treating a single cancer patient needs approximately 3 g of paclitaxel—equivalent to eight 60-year-old trees. Such demand threatens the survival of natural yew forests. Consequently, biotechnologists seek alternative strategies, such as cell and tissue culture, for large-scale production of secondary metabolites without environmental damage. Cell suspension culture is considered an effective approach for producing medicinal metabolites under controlled laboratory conditions. Establishing high-yield, selected cell lines can significantly enhance biomass and paclitaxel production. This study aimed to develop efficient paclitaxel-producing suspension cultures of *T. baccata* by selecting high-yield cell lines through small cell aggregate cloning.

Material and Methods: Stem explants from one-year-old yew seedlings were cultured on B5 medium supplemented with various auxins (2,4-D, PIC, NAA) and cytokinins (BAP, KIN) to induce callus formation. Successful induction and optimal phytohormone combinations were determined based on induction time, callus morphology (texture and color), and callogenic response. Selected calli were used to establish primary cell suspension cultures. High-yield cell lines were isolated by cloning small cell aggregates. Resulting suspension cultures from selected lines were analyzed for growth kinetics, paclitaxel accumulation, growth stability, and metabolite production. All experiments were conducted in a completely randomized design with three replicates, repeated twice, and analyzed using SAS 9.4.

Results: Phytohormones significantly influenced callogenesis, with PIC and KIN producing friable, fast-growing callus. Four single-cell-derived clones with superior growth performance were selected from *T. baccata* suspension cultures. Growth profiling revealed an exponential phase up to day 21, followed by a stationary phase until day 28. Paclitaxel production peaked at the late exponential phase (day 21), coinciding with maximum cell growth. The best-performing line produced the highest paclitaxel yield (26.07 mg/L) and biomass (33.68 g DW/L), about 15-fold and 2.05-fold higher, respectively, than the low-yield line. Cell population dynamics indicated that the

superior line predominantly consisted of spherical cell aggregates with rapid division rates and high viability. Stability analysis showed significant differences among lines across subcultures, with only line TbCL-J1 maintaining high productivity and stability in biomass and paclitaxel yield after five successive subcultures.

Conclusion: This study successfully established a high-yield cell line and developed efficient *T. baccata* cell suspension cultures for paclitaxel production. Paclitaxel yield in the selected line (0.77% of dry biomass) was dramatically higher than that reported for natural yew trees (0.001–0.02%). The cell line selection strategy not only boosted paclitaxel yield but also enhanced biomass accumulation. The small-aggregate cloning method offers potential for application in other plant culture systems. Moreover, the homogeneous cultures derived from single-cell selection in *T. baccata* proliferate more rapidly than wild trees, making them suitable for scale-up, metabolic engineering, and industrial bioreactor applications—without destructive harvesting of Iran’s native forests.

Keywords: B5 medium, Callus induction, Cell aggregate cloning, Hyrcanian forests, Secondary metabolites.

How to Cite This Article: Javanmard, A., and Jafari, M. (2025). Selection of high-yielding cell line and establishment of high Taxol-producing cell suspension culture in European yew tree (*Taxus baccata* L.). Forest Research and Development, 11(2), 183-204. DOI: [10.30466/jfrd.2025.55868.1749](https://doi.org/10.30466/jfrd.2025.55868.1749)



Copyright ©2024 Javanmard and Jafari Published by Urmia University.

This work is licensed under a [Creative Commons Attribution 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which allows users to read, copy, distribute, and make derivative works for non-commercial purposes from the material, as long as the author of the original work is cited properly.

گزینش لاین سلولی پربازده و ایجاد سوسپانسیون سلولی تولیدکننده بالای تاکسول در درخت سرخدار (*Taxus baccata* L.)

آیدا جوانمرد^۱ و مراد جعفری^{۲*}

۱- دانشجوی دکتری ژنتیک مولکولی و مهندسی ژنتیک، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

(ai.javanmard@urmia.ac.ir)

۲- دانشیار، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران. (m.jafari@urmia.ac.ir)

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۱/۲۰

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۰/۱۸

چکیده

مقدمه و هدف: سرخدار (*Taxus baccata* L.) از درختان سوزنی‌برگ کندرشد و همیشه‌سبز جنگل‌های هیرکانی ایران است که به دلیل تولید تاکسول، داروی حیاتی ضد سرطان، ارزش دارویی فراوانی دارد. با این حال، غلظت بسیار پایین تاکسول در گونه‌های سرخدار (۰/۰۱ تا ۰/۰۲ درصد وزن خشک) مانع اصلی بهره‌برداری پایدار است. برای تهیه تنها یک کیلوگرم تاکسول به حدود ۱۰ هزار کیلوگرم پوست یا قطع سه هزار درخت سرخدار نیاز است، درحالی‌که درمان یک بیمار سرطانی به سه گرم تاکسول معادل هشت درخت ۶۰ ساله نیاز دارد. این مسئله خطر جدی برای بقای جنگل‌های طبیعی ایجاد می‌کند. از این‌رو، پژوهشگران زیست‌فناوری به دنبال روش‌های جایگزین مانند کشت سلول و بافت برای تولید متابولیت‌های ثانویه در مقیاس‌های بزرگ و بدون آسیب به محیط‌زیست هستند. کشت سوسپانسیون سلولی یکی از رویکردهای مؤثر برای تولید متابولیت‌های دارویی در شرایط آزمایشگاهی محسوب می‌شود. استفاده از لاین‌های سلولی پرتوان و گزینش شده می‌تواند منجر به افزایش چشمگیر تولید زیست‌توده و تاکسول شود. در این پژوهش، با بهره‌گیری از روش کلونینگ توده‌های سلولی کوچک، لاین‌های سلولی با بازده بالا شناسایی و کشت‌های سوسپانسیون همگن برای تولید کارآمد تاکسول در سرخدار ایجاد شد.

مواد و روش‌ها: ریزنمونه‌های ساقه جوان درختچه‌های سرخدار یک ساله در محیط کشت B5 حاوی غلظت‌ها و ترکیبات مختلف اکسین (NAA، PIC، 2,4-D) و سیتوکینین (KIN، BAP) برای القای کالوس کشت داده شدند. القای موفقیت‌آمیز کالوس و بهترین ترکیبات فیتوهورمونی توسط عوامل متعددی مانند زمان القای کالوس، مقدار کالزایی و مورفولوژی کالوس (بافت و رنگ) تعیین شد. کالوس‌های مناسب گزینش شدند و برای ایجاد کشت سوسپانسیون سلولی اولیه مورد استفاده قرار گرفتند. پس از ایجاد

کشت‌های سوسپانسیون مختلف، لاین‌های سلولی پربازده با استفاده از روش کلونینگ توده‌های سلولی کوچک گزینش شدند. سوسپانسیون‌های سلولی به‌دست آمده از لاین‌های برتر گزینش شده از نظر سینتیک رشد، تجمع تاکسول، پایداری رشد و تولید متابولیت مورد آنالیز قرار گرفتند. همه آزمایش‌ها دو بار تکرار شدند و آزمایش‌ها بر پایه طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار تنظیم شدند. آنالیز واریانس داده‌ها و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS 9.4 انجام شد.

یافته‌ها: تأثیر فیتوهورمون‌ها بر روی کالزایی، انواع مورفولوژی کالوس را، بسته به نوع فیتوهورمون و غلظت، نشان داد که ترکیب PIC و KN برای القای کالوس نرم، شکننده و تندرشد مؤثرتر بود. چهار کلونی مشتق از تک سلول با ویژگی‌های رشدی خوب از کشت‌های مختلف سوسپانسیون سلولی *T. baccata* با استفاده از روش کلونینگ توده‌های سلولی گزینش و کشت‌های سوسپانسیون سلولی از لاین‌های سلولی گزینش شده ایجاد شدند. پروفیل زمانی رشد سلول‌ها در کشت‌های سوسپانسیون نشان داد که مرحله رشد نمایی تا روز ۲۱ ادامه داشت و به دنبال آن فاز ساکن، که از روزهای ۲۱ تا ۲۸ سیکل رشد ادامه داشت، طی آن رشد سلولی به‌طور محسوسی تغییر نکرد. با توجه به منحنی رشد، بهترین زمان برای تولید تاکسول در فاز نمایی نهایی، یعنی تا روز ۲۱ام با بیشینه مقدار رشد سلولی، است. لاین برتر بیشترین مقدار تاکسول ($26/07 \text{ mg/l}$) را با تولید قابل توجهی زیست‌توده ($33/68 \text{ g DW/l}$) تولید کرد که به‌ترتیب تقریباً ۱۵ و $2/05$ برابر بیشتر از لاین کم بازده بود. در بررسی دینامیک جمعیت سلولی لاین برتر مشخص شد که اغلب از فراکسیون‌های توده‌های سلولی کروی شکل هستند که توانایی سریع تقسیم و با مقدار زنده‌مانی بالا هستند. آنالیز پایداری لاین‌های گزینش شده نشان داد در بین لاین‌ها از نظر پایداری در تولید زی‌توده و متابولیت در طی واکنش‌های متوالی تفاوت معنی‌دار وجود دارد، که فقط لاین TbCL-J1 از نظر رشد و تجمع زی‌توده و تولید تاکسول پس از پنج نسل واکنش، پربازده و پایدار باقی ماند.

نتیجه‌گیری: این پژوهش موفق به گزینش یک لاین سلولی پربازده و ایجاد کشت سوسپانسیون سلولی پرتوان برای تولید تاکسول، داروی ارزشمند ضد سرطان شد. میزان تولید تاکسول در لاین منتخب به‌طور چشمگیری ($0/77$ درصد زی‌توده خشک) بالاتر از مقادیر گزارش‌شده در درختان سرخدار جنگلی ($0/01$ تا $0/02$ درصد) بود. راهبرد انتخاب لاین سلولی علاوه بر افزایش تولید تاکسول، موجب رشد بیشتر زیست‌توده نیز شد. این روش مبتنی بر کلونینگ توده‌های سلولی، قابلیت کاربرد در سایر سیستم‌های کشت گیاهی را دارد. همچنین، کشت همگن حاصل از انتخاب تک‌سلول در سرخدار با سرعتی بیشتر از درختان جنگلی تکثیر می‌شود و برای مقیاس‌پذیری، مهندسی متابولیک و صنعتی‌سازی در بیوراکتور مناسب است، بدون آنکه نیاز به بهره‌برداری مخرب از جنگل‌های بومی ایران باشد.

واژه‌های کلیدی: القاء کالوس، کلونینگ توده‌های سلولی، متابولیت‌های ثانویه، محیط کشت B5.

خطر انقراض است (Yazdani et al., 2005; Razavi

et al., 2018).

کشت بافت گیاهی یکی از روش‌های نوین زیست‌فناوری برای تولید متابولیت‌های ثانویه دارویی در مقیاس وسیع است (Habibi Khaniani et al., 2005; Vidal-Limon et al., 2018). این روش می‌تواند جایگزین روش‌های مخرب مانند قطع درختان با ارزش شود (Fathollahi Qarachoboogh et al., 2025). کشت سلول و بافت گیاهان دارای مزیت‌های بسیاری نسبت به روش‌های استحصال و تولید در شرایط طبیعی است که علاوه بر حفاظت از ژرم‌پلاس، عاری بودن از هر گونه آلودگی پاتوژنی، بدون وابستگی به شرایط آب‌وهوایی، جغرافیایی و تغییرات فصلی و در تمام فصول سال، تولید محصول مورد نظر را امکان‌پذیر می‌سازد (Habibi Khaniani et al., 2005). با توجه به اهمیت اقتصادی متابولیت‌های ثانویه دارویی و افزایش روز افزون تقاضای داروهای حاصل از متابولیت‌های ثانویه، پژوهشگران به دنبال افزایش تولید این ترکیبات ارزشمند در شرایط کشت درون-شیشه‌ای (*in vitro*) می‌باشند. سوسپانسیون سلولی سلول‌های تمایز نیافته‌ای هستند که در یک محیط کشت مایع و در حال حرکت (shake) به‌منظور جداسازی متابولیت‌های ثانویه در محیط آزمایشگاهی و کنترل شده کشت می‌شوند. کشت سلول و بافت در سرخدار از روش‌های مهم تولید تاکسول، بدون خطر از بین بردن و انقراض این گونه مهم گیاهی در سطح جهان است، از آنجایی که برای تهیه یک گرم تاکسول لازم است سه درخت صد ساله سرخدار قطع شود (Witherup et al., 1990). برای اولین بار در سال ۱۹۸۹ تولید تاکسول از طریق کشت سلولی این گیاه گزارش شد و عنوان شد تمام بخش‌های این گیاه به جز میوه دارای مقادیر مختلفی تاکسول است (Christen et al., 1989). بررسی مقدار

در حال حاضر یکی از شایع‌ترین بیماری‌ها در سطح جهان سرطان است. طبق گزارشات آژانس بین‌المللی تحقیقات سرطان (LARC) در سال ۲۰۲۲، حدود ۲۰ میلیون مورد جدید ابتلا به سرطان و ۹/۷ میلیون مرگ ناشی از سرطان در جهان به ثبت رسیده است (Bray et al., 2024). تقریباً یک چهارم داروهای تولیدی در جهان حاوی عصاره‌های گیاهی یا ترکیباتی هستند که از مواد گیاهی به‌دست آمده‌اند و یا براساس ترکیبات گیاهی مدلسازی شده‌اند (Hasanlou et al., 2009). گیاهان دارویی منبع غنی از متابولیت‌های ثانویه می‌باشند. تاکسول یک ترکیب طبیعی است که دارای قابلیت درمانی بسیاری از سرطان‌هاست مانند سرطان‌های خون، کبد، سینه، تخمدان، پروستات، ریه و (Zhang et al., 2007; Nirmala et al., 2011). یکی از منابع اصلی تولید تاکسول در طبیعت درخت سرخدار (*Taxus* sp.) است. تاکسول یک آلکالوئید دی‌ترپنوئیدی است و برای اولین بار در پوست سرخدار اقیانوس آرام (*Taxus brevifolia*) در سال ۱۹۷۱ گزارش شد و در سال ۱۹۹۳ به عنوان یک داروی ضد سرطان وارد بازار شد (Nirmala et al., 2011). این دارو از طریق اتصال به میکروتوبول‌ها و تشکیل دوک تقسیم غیرطبیعی در طی فرایند تقسیم، مانع از میتوز صحیح سلول‌های سرطانی می‌شود و در شیمی درمانی کاربرد دارد (Nirmala et al., 2011). سرخدار با نام علمی *T. baccata* از درختان دارویی بومی ایران است. این درخت از سوزنی‌برگان همیشه‌سبز و کندرشد و یکی از منابع اصلی تولید تاکسول در طبیعت است. سرخدار در جنگل‌های هیرکانی در شمال کشور یافت می‌شود ولی در حال حاضر با تغییر شرایط آب‌وهوایی و از بین بردن روز افزون جنگل‌های شمال در معرض

در *T. baccata*، محیط کشت B5 را موثر تشخیص دادند و ترکیب هورمونی 2,4-D و KIN را مناسب‌ترین تیمار معرفی کردند. (Rahmati et al., 2016) با بررسی نوع محیط‌های کشت و ترکیب هورمونی محیط کشت WPM و ترکیب هورمونی 2,4-D با KIN را برای القاء کالوس در ریزنمونه‌های ساقه سرخدار معرفی کردند. در پژوهشی دیگر محیط کشت B5 و ریز نمونه ساقه درختچه سرخدار را بهترین محیط و ریزنمونه برای القاء کالوس‌های نرم و شکننده برای تهیه سوسپانسیون سلولی مناسب‌تر معرفی شده است (Ahadi et al., 2018). کشت سوسپانسیون سلولی از موفق‌ترین و کارآمدترین روش‌های تولید تاکسول در درخت سرخدار است (Denis et al., 1998; Malik et al., 2018). به‌طور کلی هدف اصلی این بررسی تولید کالوس و ایجاد کشت سوسپانسیون سلولی کارآمد برای تولید تاکسول بیشتر است.

تاکسول تولیدی در کشت کالوس دو گونه *T. baccata* و *T. berevifolia* نشان داد که گونه *T. baccata* دارای قابلیت و توانایی بیشتری نسبت به گونه *T. berevifolia* برای تولید تاکسول است (Ahadi et al., 2018). پژوهش‌های پیشین نشان داد که ساقه‌های سرخدار ریز و جوان ریزنمونه بهتری برای القاء کالوس می‌باشند (Zhang et al., 2007) و از محیط کشت B5 به عنوان محیط کشت پایه در تعداد زیادی از پژوهش‌ها در کشت بافت سرخدار استفاده شده است (Malik et al., 2018; Ahadi et al., 2011). بررسی و مقایسه دو محیط کشت MS و B5 برای میزان القاء کالوس در برگ و ساقه *T. baccata* محیط کشت B5 را مناسب‌تر و کاربردی‌تر گزارش کرده است (Bagheri Toulabi et al., 2015). (Brunakova et al., 2004). برای کالزایی در ساقه سرخدار مناسب گزارش کرده‌اند. طی پژوهش (Ashrafi et al., 2010) مقدار اثرگذاری هورمون‌های گیاهی بر القاء کالوس



شکل ۱- درختچه سرخدار گلدانی استفاده‌شده در پژوهش (A) از منشاء جنگل‌های هیرکانی، استان مازندران، تنکابن، عزیزآباد (B)

Figure 1. The potted european yew shrub used in the research (A) are from Hirkani forests, Mazandaran province, Tankabon, Azizabad (B)

انجام گرفت. برای اجرای آزمایش‌ها، مواد اولیه گیاهی شامل درختچه‌های سرخدار از جنگل‌های هیرکانی در شمال کشور، استان مازندران، تنکابن، شهرستان خرم‌آباد، عزیزآباد تهیه شد (شکل ۱).

مواد و روش‌ها

تهیه مواد گیاهی

این پژوهش در سال ۱۴۰۳-۱۴۰۰ در آزمایشگاه کشت سلول و بافت گیاهی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه

ساقه‌های سبز رنگ و جوان یک ساله گیاه به اندازه حدودی ۱-۰/۵ سانتی متری به عنوان ریزنمونه استفاده شد. ابتدا برای پیش سترون سازی سرشاخه‌های جوان را به مدت ۲۰ دقیقه با آب حاوی چند قطره مایع ظرفشویی شست و شو داده شد و سپس یک ساعت زیر آب روان قرار گرفت. سپس از محلول بنومیل دو درصد به مدت ۲۰ دقیقه برای ضد عفونی و حذف آلودگی‌های احتمالی قارچی استفاده شد و در آخر سترون سازی نهایی در زیر هود لامینار با استفاده از الکل ۷۰ درصد به مدت دو دقیقه، سپس محلول هیپوکلریت سدیم چهار درصد به مدت ۱۵ دقیقه و سه بار آبکشی با آب مقطر استریل انجام شد.

القاء کالوس

برای القاء کالوس از محیط کشت پایه B5 (Gamborg et al., 1968) غنی شده با ویتامین‌های B5 (2x) و ترکیب‌های مختلف هورمونی (جدول ۱)، ۱۰۰ mg/l، اسید اسکوربیک و ۳۰ g/l ساکارز استفاده شد. ریزنمونه‌های ساقه جوان سترون شده بر روی محیط حاوی سطوح مختلف هورمونی کشت شد و کشت‌ها

در اتاق رشد با دمای °C ۲۵ تحت شرایط تاریکی نگهداری شدند و درصد کالزایی و مدت زمان لازم برای القاء کالوس مورد رصد قرار گرفت. رنگ و نوع بافت سلولی کالوس‌های القاء شده به صورت کیفی بررسی شد. برای رشد بیشتر و بهتر کالوس‌های القاء شده، هر دو هفته یک بار واکشت در محیط کشت تازه انجام شد. برای شناسایی کالوس‌های بهتر برای تهیه سوسپانسیون سلولی، مورفولوژی کالوس‌ها شامل رنگ و نوع بافت آنها با استفاده از استریومیکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفت و صفات زمان تا آغاز کالزایی و درصد کالزایی نیز یادداشت برداری شد. برای اندازه‌گیری زی‌توده، دو هفته پس از ظهور کالوس، پنج توده کالوس از هر تکرار به صورت تصادفی گزینش و زی‌توده تر یا وزن تر (FW) اندازه‌گیری شد و میانگین وزن کالوس برای هر تکرار ثبت شد. کالوس‌های وزن-شده به مدت ۲۴ ساعت در آون با دمای °C ۶۰ نگهداری شدند و سپس وزن‌گیری انجام و به عنوان زی‌توده خشک یا وزن خشک (DW) یادداشت شد.

جدول ۱- ترکیبات مختلف فیتوهورمونی استفاده شده برای کالزایی در سرخدار

Table 1. Different combinations of phytohormone used for callus induction in *T. baccata*

Phytohormones (mg/l)					شماره تیمار
BAP	KIN	2,4-D	PIC	NAA	Treatment no.
-	0.1	0.5	-	1	T1
-	0.25	0.25	-	2	T2
0.1	-	0.2	-	3	T3
-	-	2	-	1	T4
-	0.2	-	3	-	T5
-	-	4	-	1	T6

BAP, 6-Benzylaminopurine; KIN, Kinetin; 2,4-D, 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid; PIC, Picloram; NAA, 1-Naphthaleneacetic acid

زنده‌مانی سلولی

برای تعیین زنده‌مانی سلول‌ها از رنگ تریپان بلو استفاده شد (Hazrati Jahan et al., 2017). برای تهیه محلول رنگ آمیزی چهار درصد (w/v) رنگ تریپان بلو در بافر

فسفات تهیه و حجم مساوی از سلول‌ها از هر یک از کشت‌های سوسپانسیونی با محلول رنگی به مدت پنج دقیقه رنگ‌آمیزی شد و سپس از لام هموسیتومتر برای شمارش سلولی (سلول‌های زنده و مرده) در زیر

میکروسکوپ استفاده شد. سلول‌های زنده بی‌رنگ یا رنگ روشن و سلول‌های مرده آبی رنگ هستند (شکل D-F-۵).

گزینش کالوس و کلونی‌های سلولی برای کشت سوسپانسیون

برای ایجاد سوسپانسیون سلولی حدود دو گرم کالوس نرم و شکننده (شکل A-۳) به ارلن‌های ۱۰۰ ml حاوی ۱۵ ml محیط کشت اضافه شد و ارلن‌ها بر روی شیکر انکوباتور با سرعت ۱۰۰ rpm و دمای $25 \pm 2^\circ\text{C}$ و تحت شرایط تاریکی نگهداری شدند (Palazon et al., 2003). با توجه به اینکه سلول‌های تشکیل‌دهنده توده کالوس از نظر پتانسیل تکثیر و رشد می‌توانند متفاوت باشند، از این‌رو، برای گزینش سلول‌های با پتانسیل بالای رشد و ایجاد کشت سوسپانسیون سلولی پربازده و هموزن ژنتیکی گزینش لاین سلولی پرتوان (high-yielding cell line) با استفاده از روش کلونینگ توده سلولی کوچک (Small cell aggregate cloning) استفاده شد (Deepthi and Satheeshumar, 2017). بدین منظور کشت‌های سوسپانسیون سلولی پس از دو هفته انکوباسیون بر روی شیکرانکوباتور با استفاده از یک مش آزمایشگاهی شماره ۵۰ ($300 \mu\text{m}$) فیلتر شدند تا توده‌های سلولی با اندازه بزرگتر حذف شوند و یک سوسپانسیون نرم و هموزن حاصل شود (شکل C-۳). سوسپانسیون فیلتر شده شامل تک سلول‌ها (Single cells) و توده‌های سلولی کوچک (Small cell aggregates) (شکل A-۵ و C) بود. یک میلی‌لیتر (تقریباً $10^5 \times 2$ سلول) از سوسپانسیون فیلتر شده در پتری‌دیش‌های یکبار مصرف استریل حاوی محیط کشت جامد B5 حاوی ترکیب هورمونی T5 (جدول ۱) به صورت کشت سطحی (Spread plating) کشت شد و کشت‌ها به مدت چهار هفته تحت شرایطی که قبلاً توضیح داده شد انکوبه شدند. کشت‌ها در زیر

استریومیکروسکوپ مشاهده شدند و تعداد کلنی‌های تشکیل شده قابل مشاهده در هر پتری شمارش شد و میانگین پنج شمارش به عنوان میانگین تعداد کلنی‌ها (توده‌های سلولی کوچک) در هر پتری در نظر گرفته شد. کارایی کشت (Plating efficiency) به صورت درصدی از تعداد کلونی‌های تشکیل شده به تعداد سلول‌های کشت شده محاسبه شد (Zaranek et al., 2023). رشد کلنی‌ها در هر پتری به صورت دوره‌ای زیر استریومیکروسکوپ مشاهده شد و قطر آن پس از چهار هفته با استفاده از نرم‌افزار NIH ImageJ 1.53v (آمریکا) اندازه‌گیری شد. سلول‌هایی که قابلیت ایجاد کلونی‌های بزرگ‌تر را داشتند به عنوان لاین‌های سلولی پرتوان رشدی گزینش و در ایجاد سوسپانسیون سلولی پربازده استفاده شدند.

استخراج تاکسول و آنالیز HPLC

برای سنجش تاکسان‌ها به روش Bonfill و همکاران (۲۰۰۷) عمل شد. بدین منظور از کشت‌های سوسپانسیون سلولی در روز ۲۱ام کشت سلول‌ها (شروع فاز رشد ایستایی) برداشته شد و استخراج انجام گرفت. عصاره استخراج شده با اضافه کردن متانول به حجم پنج میلی‌لیتر رسانده شد و پس از عبور از فیلتر $0.22 \mu\text{m}$ در آنالیز HPLC با استفاده از ستون C18 ($4.6 \times 250 \text{ mm}$, 10 mm) و فاز مایع استونیتریل/آب (۶۰:۴۰) انجام گرفت. پس از کالیبره کردن ستون، مقدار تاکسول موجود در نمونه‌ها در مقایسه با نمونه استاندارد (Sigma-Aldrich, T7402، آمریکا) در زمان بازداری ۲۲۷ nm با استفاده از دتکتور مبتنی بر UV بدست آمد.

آنالیز پایداری لاین‌های سلولی گزینش شده

برای تعیین پایداری در رشد و تولید تاکسول در لاین‌های سلولی پرتوان گزینش شده، کشت سوسپانسیون سلولی آنها طی پنج سیکل رشدی متوالی ۴۲ روزه مورد بررسی قرار گرفتند. هر دو هفته یکبار

واکشت سلول‌ها انجام گرفت و مقدار تجمع زی‌توده خشک و محتوی تاکسول در هر سیکل رشدی لاین‌های سلولی در اواخر فاز نمائی انتهایی انجام گرفت.

آنالیزهای آماری

آزمایش‌های القاء کالوس و اندازه‌گیری صفات مرتبط با کالزایی، گزینش لاین‌های سلولی، سنجش تاکسول و آنالیز پایداری در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی و با سه تکرار انجام گرفت. آزمایش‌ها دو بار تکرار شد. آنالیزهای آماری با کمک نرم افزار SAS 9.4 انجام پذیرفت. مقایسه میانگین داده‌ها بر اساس آزمون تفاوت معنی‌دار قابل اعتماد توکی انجام شد. نمودارها نیز توسط نرم‌افزار Excel 2021 رسم شد.

نتایج

محیط کشت مناسب کالزایی

کالزایی در ریز نمونه‌های ساقه یک ساله گیاه سرخدار تحت تاثیر تیمارهای هورمونی مختلف در محیط پایه B5 بررسی شد. کالزایی در تمامی ترکیبات هورمونی جز ترکیب هورمونی T6 (NAA 1 mg/l + 2,4-D 4 mg/l) مشاهده شد. در تیمار T6 القاء کالوس جزئی در پایه ریزنمونه و بیشتر رشد ساقه (شکل F-2) مشاهده شد، از این‌رو، این تیمار از آنالیزها حذف شد. نتایج تجزیه واریانس داده‌های مربوط به شاخص‌های مختلف کالزایی (جدول ۲) نشان داد بین ترکیبات هورمونی مختلف از نظر شاخص‌های مورد اندازه‌گیری شامل مدت زمان لازم برای تشکیل کالوس، نرخ کالزایی، مورفولوژی کالوس و تولید زی‌توده خشک و تر (FW و DW) اختلاف معنی‌دار ($P \leq 0.01$) وجود دارد. سریع‌ترین زمان القاء کالوس در ریزنمونه‌های ساقه در محیط کشت B5 غنی شده با تیمار هورمونی T5 حاوی ترکیب KIN 0.2 mg/l + PIC 3 mg/l مشاهده شد که پس از شش روز کالوس‌ها تشکیل شدند و مقدار القاء

کالوس ۱۰۰ درصد بود (جدول ۳). تحت تاثیر این ترکیب هورمونی کالوس‌ها بافتی شکننده و به‌نسبت نرم و رنگ زرد روشن داشتند (شکل E-2). از نظر رشد و تولید زی‌توده نیز کالوس‌های تشکیل شده در محیط کشت حاوی ترکیب PIC+KIN بیشترین (mg/l FW ۴۷۸/۲۰) و (DW ۳۶/۸۰ mg/l) را بعد از دو هفته از آغاز کالوس‌دهی نشان دادند (جدول ۳). کالوس‌های نرم و شکننده با توجه به بافت مناسب و سرعت رشد بالا برای استقرار کشت سوسپانسیون سلولی گزینش شدند.

استقرار کشت سوسپانسیون سلولی و کلونینگ تک سلول‌های پرتوان رشدی

کشت سوسپانسیون صاف و نرم از طریق غوطه‌ور کردن کالوس‌های شکننده و نرم حاصل از تیمار T5 در محیط مایع B5 غنی شده با همان ترکیب هورمونی (T5) ایجاد شد (شکل A-C-۳). این کشت‌ها (شکل C-۳) منبعی مناسب برای کلونینگ توده‌های سلولی برای غربال تک سلول‌های با پتانسیل رشدی بالا فراهم کردند. برای غربالگری اولیه کلون‌های تک سلولی با بازده رشدی بالا کشت به روش اسپرید پلیت انجام شد (شکل D-۳). در هر پتری، به‌طور متوسط بین $65 \pm 4/86$ کلنی سلولی تشکیل شد و کارایی تشکیل کلونی (Plating efficiency) $6/23 \pm 62/54$ درصد محاسبه شد. توده‌های سلولی کوچک بسیار سریع تقسیم شدند و کلنی‌های سلولی را در ۱۴ روز توسعه دادند. اندازه کلنی‌های سلولی از $6/34 - 0/41$ mm متغیر بود. بیش از ۷۰ کلونی سلولی در مدت ۱۴ روز به بالاترین قطر رسیدند. میکروکلونی‌های تندرشد به محیط کشت B5 تازه حاوی ترکیب فیتورمونی T5 انتقال داده شدند. از این تعداد، پنج میکروکلونی به رشد قابل توجه با بافت مناسب (شکنند و نرم) رسیدند و بقیه کلونی‌ها با وجود

رشد مناسب، مورفولوژی نامناسب مانند قهوه‌ای شدن با شدت‌های مختلف و بافت کمتر شکننده و بیشتر آبکی تا به نسبت سخت نشان دادند. از این‌رو، از بین این کلونی‌ها، تعداد پنج کلونی (TbCL-1J – TbCL-5J) با سرعت رشد بالا و مورفولوژی عالی (شکننده و نرم) گزینش شد و کشت سوسپانسیون سلولی با استفاده از کلون‌های گزینش شده ایجاد شد.

سیتیک رشد در کشت‌های سوسپانسیونی لاین‌های سلولی گزینش شده

سیتیک رشد لاین‌ها در یک دوره کشت ۳۵ روزه ارزیابی شد و فازهای رشدی مشخص شد (شکل ۴). روز پنجم فاز تاخیر رشد تقریباً ۱/۵ روز بود. با توجه به استفاده از مقدار بالای اینوکولوم (پنج گرم کالوس تندرشد) این مدت زمان کم برای فاز تاخیر طبیعی بود. پس از فاز تاخیر، رشد با سرعت بالا شروع شد که منجر به افزایش سریع زی‌توده شد، به‌طوری که تا روز ۱۱ام DW به ۲۳/۷۶ g/l رسید که ۴/۷۵ برابر زی‌توده در فاز تاخیر بود و رشد در فاز نمائی اولیه قرار گرفت. پس از این فاز، آهنگ رشد به نسبت ملایم شد و به‌صورت خطی ادامه یافت و تا روز ۲۱ام مقدار زی‌توده DW g/l ۲۸/۹۶ بود که نسبت به به فاز نمائی اولیه افزایش ۱/۲۱ برابری داشت. این مرحله رشدی به‌عنوان فاز نمائی نهایی در نظر گرفته شد. فاز ایستائی رشد پس از روز ۲۱ام آغاز شد و تا روز ۲۸ام ادامه داشت. رشد در این مرحله تقریباً به ثبات رسید و افزایش معنی‌داری در DW (۳۰/۱۸ g/l) در مقایسه با مرحله نمائی نهایی مشاهده نشد. از روز ۲۸ام رشد رو به کاهش بود، به‌طوری که در روزهای بعدی کاهش معنی‌داری در زی‌توده تولیدی (۲۶/۱۶ g/l) اتفاق افتاد، به عبارتی سلول‌ها وارد فاز مرگ شدند. از زمان شروع رشد تا مرحله ایستائی مقدار تولید زی‌توده خشک (DW) ۶/۰۴ برابر افزایش نشان داد.

محتوای تاکسول در کشت سوسپانسیون سلولی چهار لاین سلولی گزینش شده در اوایل رشد ایستائی یعنی روز ۲۱ام کشت پیگیری شد. رنگ و بافت کشت سوسپانسیون سلولی (شکل ۴-۸) نیز قابل توجه بود، با گذشت زمان و افزایش رشد و تولید زیست‌توده رنگ سوسپانسیون سلولی از زرد روشن به قهوه‌ای روشن، قهوه‌ای مایل به قرمز تغییر نشان داد، به‌طوری که در اواخر فاز نمایی و همچنین فاز ایستائی رنگ کشت قهوه‌ای تیره همراه با تجمع زیست‌توده در محیط کشت و دیواره ارلن مشهود بود، با اینحال با شروع فاز مرگ رنگ سوسپانسیون به قهوه‌ای بسیار تیره تغییر یافت که با کاهش معنی‌دار زی‌توده همراه بود.

عملکرد تاکسول در لاین‌های پررشد گزینش شده

مقدار تاکسول تولید شده در کشت سوسپانسیون سلولی پنج لاین پررشد گزینش شده متغیر بود و بین لاین‌ها از نظر محتوی تاکسول تفاوت معنی‌داری مشاهده شد (جدول ۴). شکل ۶، نمونه‌ای از کروماتوگرام تاکسول تشخیص داده شده در عصاره متانولی لاین پررشد TbCL-1J را نشان می‌دهد. بیشینه عملکرد تاکسول (۲۶/۰۷ mg/l) در لاین TbCL-1J (شکل ۷) به‌دست آمد که تقریباً ۱۵ برابر تاکسول تولید شده در لاین TbCL-4J و ۰/۷۷ درصد ماده خشک برداشت شده در انتهای فاز نمائی (شکل ۴-۸) بود.

پایداری لاین‌های سلولی گزینش شده

برای تعیین پایداری رشد و تولید تاکسول در لاین‌های گزینش شده، مقدار رشد و تجمع زی‌توده و محتوای تاکسول لاین‌ها در کشت‌های سوسپانسیون سلولی طی پنج سیکل رشدی توالی با واکشت‌های دو هفته‌ای تعیین شد. همانطور که در شکل ۸-۸ نشان داده شده است لاین TbCL-1J از نظر رشد و تولید زی‌توده (DW) در پایداری بالا و رشد سریعتری داشت و لاین‌های TbCL-2J، TbCL-3J و TbCL-5J، اگرچه در

سیکل‌های اولیه روند کاهشی در رشد نشان دادند، اما سپس به پایداری نسبی رسیدند، لاین TbCL-4J روند به نسبت کاهشی در رشد و نوسان در تولید زی توده خشک نشان داد که می توان گفت از نظر رشدی ناپایدار بود.

شکل ۸-B تغییر در تولید تاکسول را برای لاین‌های سلولی گزینش شده در کشت سوسپانسیون سلولی را نشان می دهد. تولید تاکسول در لاین TbCL-1J نسبت به دیگر لاین‌های سلولی خیلی بالا بود. در لاین‌های دیگر (TbCL-2J, -3J, -4J, -5J) روند تولید تاکسول به صورت کاهشی بود و از نظر تولید نیز تقریباً ناپایدار بودند، اگرچه در لاین TbCL-4J برگشت به حالت پایداری نسبی مشاهده شد. به طور کلی لاین TbCL-1J از نظر رشد سلولی و تجمع زی توده و تولید تاکسول نوسانات کمتری در طی پنج نسل کشت متوالی نشان داد و از پایداری بالایی رشدی و تولید تاکسول برخوردار بود.

جدول ۲- جدول تجزیه واریانس اثر تیمار فیتوهورمونی بر شاخص‌های مختلف کالزایی بعد از دو هفته از کشت ریزنمونه ساقه سرخدار

Table 2. Analysis of variance (ANOVA) of effect of phytohormone treatment on different parameters of callusing after two weeks of yew stem explant culture

میانگین مربعات Mean of square				درجه آزادی df	منابع تغییرات Source of variation
وزن خشک Dry weight	وزن تر Fresh weight	نرخ کالزایی Rate of callusing	زمان تا آغاز کالزایی Time to callus formation		
341.26**	89885.70**	1267.76**	157.66**	4	تیمار فیتوهورمونی Phytohormonal treatment
19.54	1358.96	22.68	1.34	20	خطای آزمایشی Experimental error
20.01	13.12	6.02	8.08	-	ضریب تغییرات Coefficient of variation

**اختلاف معنی دار در سطح احتمال یک درصد

**Significant difference at 1% probability level

جدول ۳- اثر تیمار ترکیبات هورمونی مختلف بر زمان آغاز کالزایی، درصد کالزایی، رنگ، کیفیت، وزن تر و وزن خشک کالوس در ریزنمونه ساقه سرخدار

Table 3. Effect of different hormonal treatments on times of callus induction, callus fresh weight, callus dry weight, callus color and callus type

وزن خشک (میلی گرم) Dry weight (mg)	وزن تر (میلی گرم) Fresh weight (mg)	مورفولوژی کالوس Callus morphology	نرخ کالزایی (درصد) Callusing rate (%)	زمان آغاز کالزایی (روز) Time to callus formation (day)	تیمار هورمونی Phytohormone treatment
18.11± 1.76 ^b	252.21± 16.91 ^c	سبز روشن، شکننده Light green, friable	66.19± 3.79 ^c	17 ^d	T1

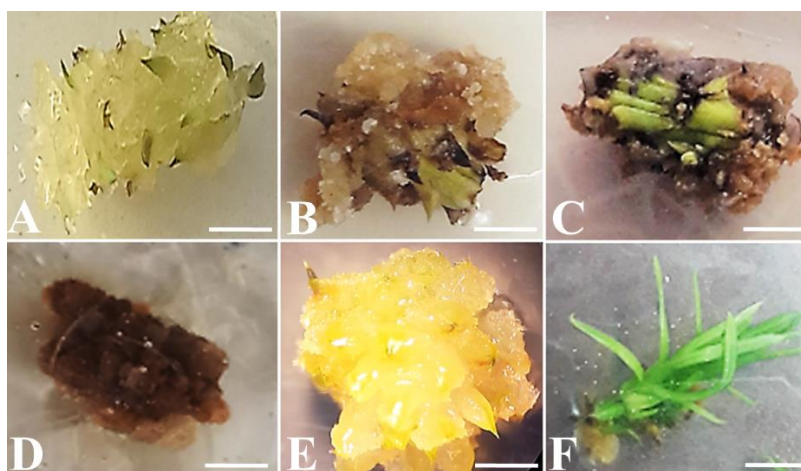
حروف مختلف در هر ستون نشان دهنده تفاوت معنی داری ($P \leq 0.05$) بر اساس آزمون توکی است.

Different letters in each column indicate significant differences at $P \leq 0.05$ according to Tukey's test.

ادامه جدول ۳.

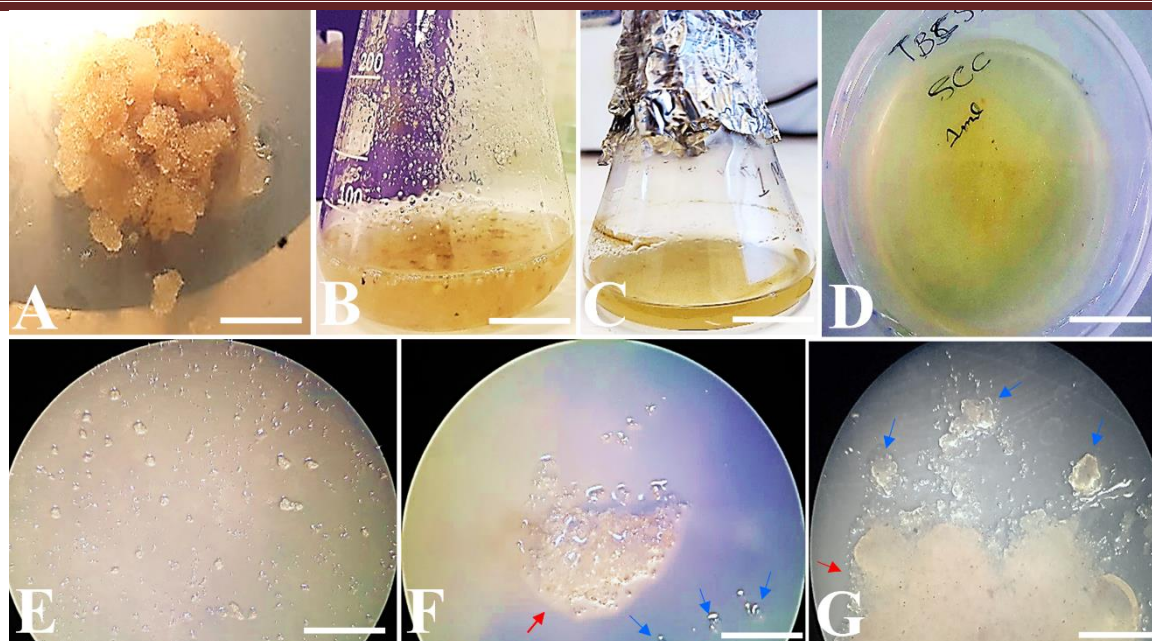
Continued table 3.

وزن خشک (میلی گرم) Dry weight (mg)	وزن تر (میلی گرم) Fresh weight (mg)	مورفولوژی کالوس Callus morphology	نرخ کالزایی (درصد) Callusing rate (%)	زمان آغاز کالزایی (روز) Time to callus formation (day)	تیمار هورمونی Phytohormone treatment
19.20± 1.03 ^b	334.60± 12.27 ^b	زرد مایل به قهوه‌ای، نسبتاً شکننده Brownish yellow, relatively friable	89.32± 5.49 ^b	14 ^c	T2
17.41± 1.54 ^b	143.60± 9.08 ^d	قهوه‌ای روشن، نرم Light brown, soft	56.80± 3.05 ^d	20 ^e	T3
18.26± 1.07 ^b	185.40± 6.32 ^d	قهوه‌ای، نرم Brown, soft	81.29± 6.38 ^b	12 ^b	T4
36.80± 2.18 ^a	478.20± 21.38 ^a	زرد روشن، شکننده و نسبتاً نرم Light yellow, friable and relatively soft	97.80± 5.67 ^a	6 ^a	T5

حروف مختلف در هر ستون نشان‌دهنده تفاوت معنی‌داری ($P \leq 0.05$) بر اساس آزمون توکی است.Different letters in each column indicate significant differences at $P \leq 0.05$ according to Tukey's test.

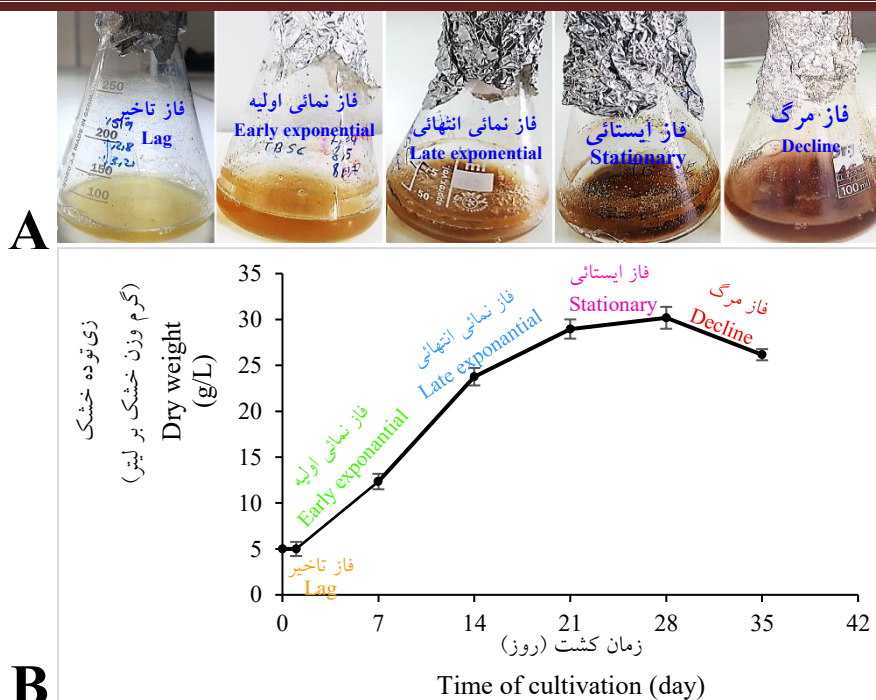
شکل ۲- اثر ترکیبات مختلف فیتوهورمون‌ها بر تشکیل، بافت و رنگ کالوس از ریزنمونه‌های ساقه جوان سرخدار در محیط کشت B5. A: کالوس سبز روشن و شکننده در تیمار T1 (2,4-D 0.5 mg/l+KIN 0.1 mg/l)، B: کالوس کرم مایل به زرد و نسبتاً شکننده در تیمار T2 (2,4-D 0.25 mg/l+KIN 0.25 mg/l)، C: کالوس قهوه‌ای روشن و نرم در تیمار T3 (2,4-D 0.2 mg/l+BAP 0.1 mg/l)، D: کالوس قهوه‌ای و نرم در تیمار T4 (2,4-D 2 mg/l+NAA 1 mg/l)، E: کالوس زرد روشن، شکننده و به نسبت نرم در تیمار T5 (PIC 3 mg/l+KIN 0.2 mg/l)، F: کالوس بسیار جزئی در پایه ریزنمونه ساقه با شاخه‌های جانبی رشد یافته در تیمار T6 (2,4-D 4 mg/l+NAA 1 mg/l). اندازه علامت بار: تقریباً ۵ mm

Figure 2. Effect of different combination of phytohormones on callus formation, texture, and color from young stem explants of yew in B5 medium. A: Pale green and friable callus in treatment T1 (2,4-D 0.5 mg/l+KIN 0.1 mg/l), B: Yellowish cream and relatively friable callus in treatment T2 (2,4-D 0.25 mg/l+KIN 0.25 mg/l), C: Pale brown and soft callus in treatment T3 (2,4-D 0.2 mg/l+BAP 0.1 mg/l), D: Brown and soft callus in treatment T4 (2,4-D 2 mg/l+NAA 1 mg/l), E: Pale yellow, friable and relatively soft callus in treatment T5 (PIC 3 mg/l+KIN 0.2 mg/l), F: Very little callus at the base of stem explant with developed lateral branches in treatment T6 (2,4-D 4 mg/l+NAA 1 mg/l), Scale bar: Ca. 5 mm



شکل ۳- کلونینگ توده‌های سلولی کوچک و گزینش لاین‌های سلولی پرتوان رشدی در سرخدار. A: توده کالوس تکثیر یافته به عنوان اینکولوم برای ایجاد کشت سوسپانسیون سلولی اولیه، B: سوسپانسیون کردن توده کالوس A در محیط کشت مایع B5 حاوی ترکیب فیتوهورمونی PIC 3 mg/l + KIN 0.2 mg/l و نگهداری کشت روی شیکرانکوباتور با دور ۱۱۰ rpm در دمای ۲۵ °C تحت شرایط تاریکی، C: تهیه سوسپانسیون سلولی صاف و هموژن با عبور سوسپانسیون ناصاف و هتروژن B از مش ۳۰۰ μ m، D: کشت اسپرید (۱ ml) از سوسپانسیون B در محیط جامد B5 با همان ترکیب فیتوهورمونی فوق‌الذکر برای کلونینگ تک‌سلول‌های پرتوان رشدی، E, F, G: تصویر استرئو میکروسکوپی از توده‌های کوچک سلولی کلون شده برای گزینش لاین‌های سلولی با نرخ رشد سریع. توده‌های سلولی با توان رشدی سریع کلونی‌های بزرگی (پیکان‌های قرمز) در مقایسه با توده‌های سلولی با توان رشدی پایین (پیکان‌های آبی) تشکیل دادند. اندازه علامت‌های بار: A, B, C, D: تقریباً ۵ cm، E: تقریباً ۱۰ mm، F, G: تقریباً ۲ mm

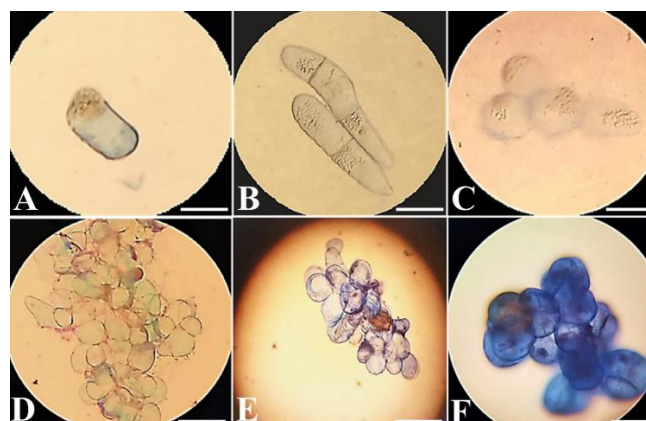
Figure 3. Cloning of small cell aggregates and selection of high-growth potential cell lines in yew. A: Proliferated callus mass used as inoculum to establish primary cell suspension culture; B: Suspending callus mass A in liquid B5 medium containing a combination of PIC 3 mg/l + KIN 0.2 mg/l and incubating the culture on a shaker incubator at 110 rpm and 25°C under darkness; C: Preparation of fine and homogeneous cell suspension by sieving heterogeneous suspension B using a sterile standard sieve with an aperture of 300 μ m; D: Culturing 1 ml of suspension B on solid B5 medium containing the same phytohormone composition as mentioned above for cloning single cells with high growth potential; E, F, G: Stereomicroscopic images from the cloned small cell aggregates and selecting cell lines with fast growth rates. Fast-growing cell aggregates developed huge colonies (red arrows) in contrast to slow-growing cell aggregates with small colonies (blue arrows). Scale bars: A, B, C, D: Ca. 5 cm, E: Ca. 10 mm, F, G: Ca. 2 mm



شکل ۴- سینتیک رشد و فازهای مختلف رشدی در کشت سوسپانسیون سلولی *T. baccata*: A: وضعیت کشت‌های

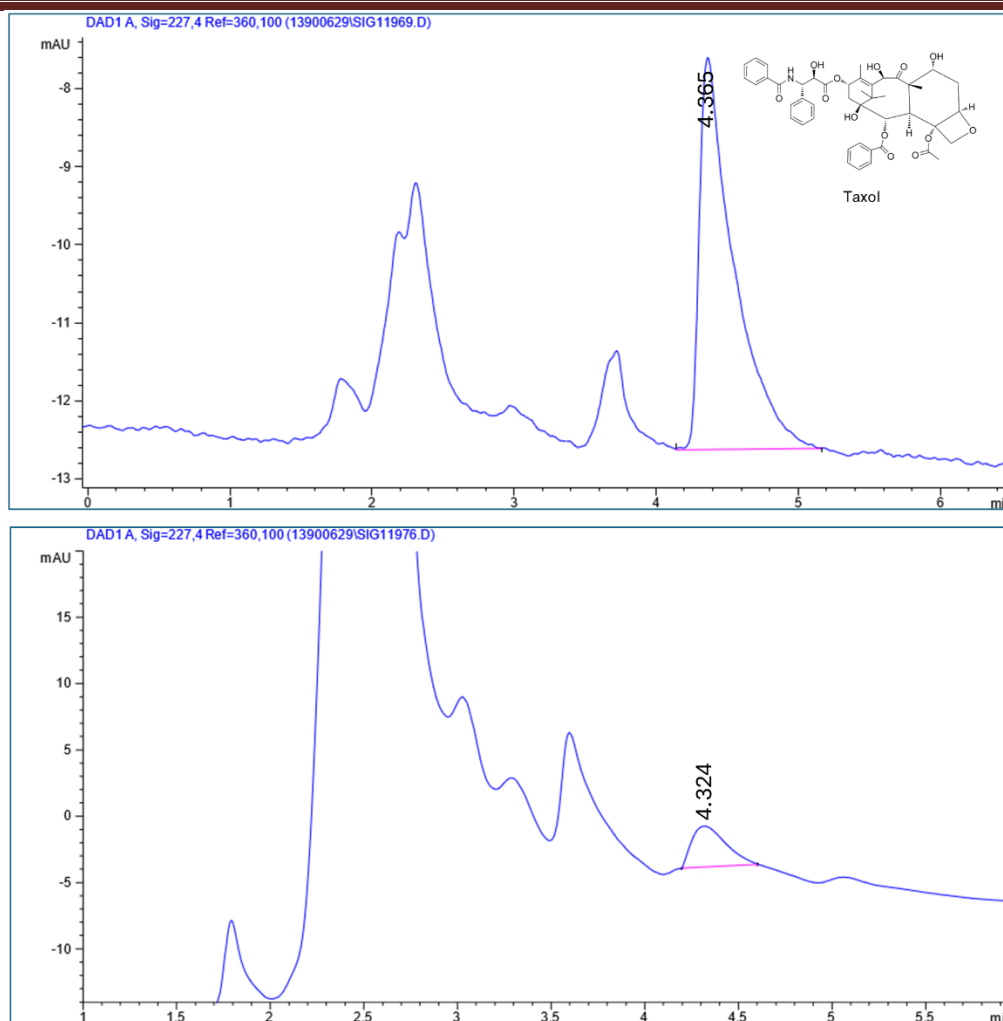
سوسپانسیون سلولی در فازهای مختلف رشد، B: منحنی رشد در یک دوره ۴۲ روز

Figure 4. Growth kinetics and different growth phases in cell suspension culture of *T. baccata*. A: The state of cell suspension cultures in different phases of growth; B: Growth curve during a growth period of 42 days



شکل ۵- دینامیک سلولی در کشت سوسپانسیون سلولی سرخدار. A) تک سلول آزاد، B) گروهی از سلول‌های با موفولوژی نخ‌نی شکل که از تقسیمات پی‌درپی تک سلول‌های پیر حاصل می‌شوند، C) توده کوچک سلولی حاوی سلول‌های با فعالیت تقسیم بالا، D) توده سلولی یا میکروکلاستر سلولی حاوی تعدادی زیاد سلول زنده با پتانسیل تقسیم بالا، E) توده سلولی حاوی تعداد زیادی سلول زنده (سلول‌های بی‌رنگ) و تعداد اندکی سلول مرده (سلول‌های آبی‌رنگ)، F) توده سلولی شامل سلول‌های مرده (آبی‌رنگ). اندازه بار در A، B و C: تقریباً ۱۰۰ μm، اندازه بار در D، E و F: تقریباً ۰/۵ mm

Figure 5. Cell dynamics in yew cell suspension culture. A) Free single cell, B) A group of cells with thread-like morphology resulting from successive divisions of old single cells, C) Small cell aggregate containing cells with high division activity, D) Cell aggregate or cell microcluster containing a large number of living cells with high division activity, E) cell aggregate containing a large number of living cells (colorless cells) and a low number of dead cells (blue cells), F) cell aggregate including all dead cells (blue). Scale bars of A, B and C: Ca. 100 μm; Scale bars of D, E and F: Ca. 0.5 mm



شکل ۶- نمونه‌ای از کروماتوگرام HPLC محلول استاندارد (A) و عصاره حاصل از کشت سوسپانسیون لاین سلولی گزینش شده TbCL-1J

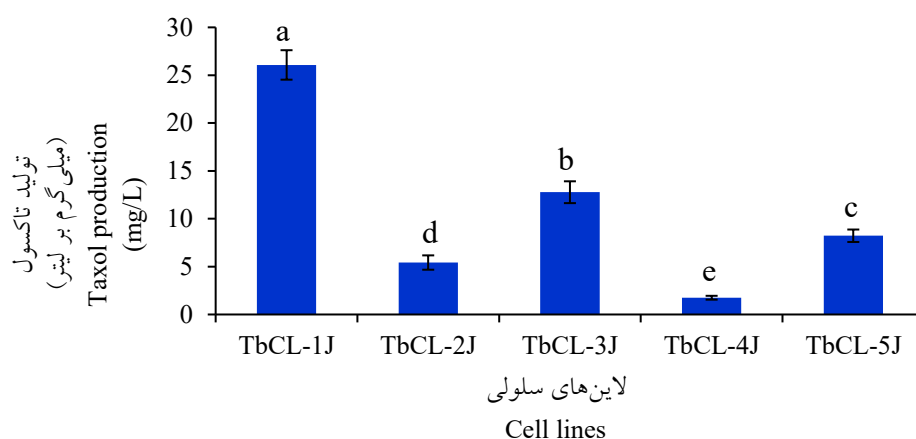
Figure 6. Representative HPLC chromatograms of Taxol in standard solution (A) and extract from suspension culture of the selected cell line TbCL-1J

جدول ۴- جدول تجزیه واریانس مقدار تولید تاکسول در کشت‌های سوسپانسیون لاین‌های سلولی گزینش شده سرخدار
Table 4. Analysis of variance (ANOVA) of taxol production rate in suspension cultures of selected *T. baccata* cell lines

میانگین مربعات Mean of squares	درجه آزادی df	منابع تغییرات Source of variation
تولید تاکسول Taxol production		
85.84 **	4	لاین‌های سلولی گزینش شده Selected cell lines
0.1899	10	خطای آزمایشی Experimental error
6.79	-	ضریب تغییرات Coefficient of variation

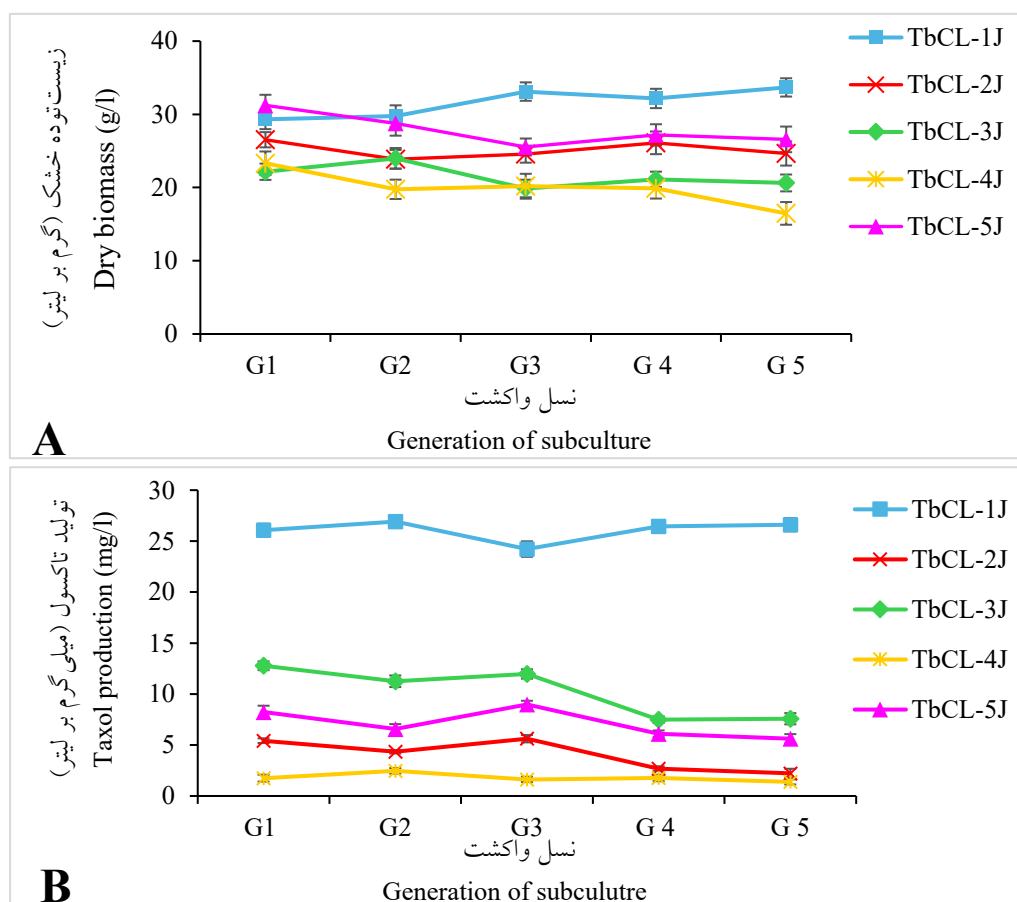
**اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد

**Significant difference at 1% probability level



شکل ۷- عملکرد تاکسول در کشت سوسپانسیون سلولی لاین های سلولی گزینش شده سرخدار. داده ها نشان دهنده مقادیر میانگین $\pm$ SE از سه تکرار یک آزمایش است، هر آزمایش سه بار تکرار شد. حروف مختلف بر اساس آزمون توکی نشان دهنده تفاوت معنی داری ($P \leq 0.05$) است

Figure 7. Taxol yield in suspension culture of the selected cell lines of *T. baccata*. The data represents mean values $\pm$ SE of three replicates of the experiment; each experiment was repeated three times. Different letters indicate significant differences at $P \leq 0.05$ according to Tukey's test



شکل ۸- تغییرات در رشد و تجمع زی توده (A) و محتوی تاکسول (B) در کشت های سوسپانسیون سلولی لاین های گزینش شده در طی ۵ نسل متوالی واگشت

Figure 8. Changes in growth and accumulation of biomass (A) and taxol content (B) in suspension cultures of selected cell lines during 5 successive generations of subculture

بحث

با توجه به اهمیت داروی تاکسول در درمان انواع سرطان‌ها و اشاره به این نکته که یکی از منابع اصلی تاکسول در طبیعت درخت سرخدار است، که درختی کند رشد و رو به انقراض است. دستیابی به روش‌های جایگزین استحصال تاکسول از این رخت به جای قطع درختان چندین ساله تنومند امری ضروری است. تکنولوژی کشت بافت و استفاده از سیستم‌های درون شیشه‌ای مانند کشت سوسپانسیون سلولی یک آلترناتیو بسیار کمک کننده برای حفظ رژیم پلاسما طبیعی و تولید کارآمد متابولیت‌های دارویی است (Malik et al., 2011; Chandran et al., 2020; Fathollahi Qarachoboogh et al., 2020). یکی از اهداف اساسی بررسی حاضر ایجاد سوسپانسیون سلولی هموژن پرتوان رشدی و قابلیت بالای تاکسول در سرخدار بومی جنگل‌های ایران بود. برای رسیدن به سیستم سوسپانسیون پرتوان، القاء کالوس مناسب با سرعت رشد و قابلیت تولید زی‌توده بالا در محیط کشت B5 با ترکیبات هورمونی مختلف مورد بررسی و مقایسه شد. نتایج این بررسی نشان داد بهترین ترکیب هورمونی در القاء کالوس از ریزنمونه ساقه جوان در محیط کشت پایه B5 غنی شده با 0.2 mg/l KIN در ترکیب با 3 mg/l PIC است. در بعضی از پژوهش‌های قبلی (Brunakova et al., 2001; Ashrafi et al., 2010) هورمون 2,4-D در القاء کالوس سرخدار *T. baccata* موثرتر گزارش شده است که در تضاد با نتایج پژوهش حاضر است. در این بررسی استفاده از هورمون 2,4-D در غلظت چهار mg/l موجب رشد ریزنمونه ساقه با انشعابات جانبی شد و کالوس قابل استفاده‌ای القاء نشد. کالوس‌های ایجاد شده با ترکیب هورمونی T5 (mg/l)

0.2 mg/l KIN + 3 mg/l PIC) علاوه بر القاء سریع کالوس (تقریباً یک هفته) و بالاترین درصد کالزایی (۱۰۰ درصد)، کالوس‌های القاء شده دارای بافت مناسب (نرم و شکننده) از سرعت رشد و تولید زی‌توده بالاتری برخوردار بودند. ریزنمونه‌های مختلف سرخدار *T. baccata* یعنی کوتیلدون، هیپوکوتیل، ریشه‌های گیاهچه‌های جوان، ساقه‌های جوان و بالغ، گامتوفیت‌ها و سوزن‌ها برای القاء کالوس استفاده شدند. مشاهده شده است که بافت جوان نسبت به قسمت‌های گیاه بالغ یا بافت جوان درختان بالغ پاسخگوتر یا مستعد برای القاء و تولید کالوس است و در بیشتر پژوهش‌ها ریزنمونه ساقه جوان بهترین ریزنمونه برای القاء کالوس و تولید تاکسول معرفی شده است (Brunakova et al., 2004; Malik et al., 2011). در این بررسی نیز بهترین‌ها کالوس با استفاده از ترکیب هورمونی T5 بدست آمد که ویژگی‌های مورفولوژی (بافت نسبتاً نرم و شکننده با رنگ زرد روشن) و رشدی مناسبی را نشان دادند. در دیگر تیمارهای هورمونی کالوس‌های تیره رنگ با بافت و رشد نامناسب همراه بود. پژوهش‌ها نشان داده است رنگ تیره کالوس در سرخدار، با وجود احتمال تولید ترکیبات فنلی و تاکسول بالا، با کندی رشد و عدم تولید زی‌توده کافی همراه است، که ترکیبات انباشت ترکیبات فنلی موجب مرگ سلول‌ها می‌شود (Brunakova et al., 2004; Cusidó et al., 1999; Yari Khosroushahi et al., 2011). چنین فنوتیپی در اوایل القاء و توسعه کالوس ویژگی مطلوبی نیست، در حالی که تغییر رنگ تدریجی کالوس‌ها به سمت قهوه‌ای مایل به قرمز در طی زمان با تولید ترکیبات فنلی و تاکسول همراه است، یک روند طبیعی بوده و مناسب

آوردن لاین سلولی در مقایسه با روش کلونینگ توده‌های کوچک سلولی بسیار دشوار است (Deepthi and Satheeshkumar, 2017). کلنی‌های حاصل از توده‌های سلولی را می‌توان کلنی‌های واقعی در نظر گرفت؛ زیرا هنگامی که یک سلول گیاهی تقسیم می‌شود، دیواره سلولی جدید در داخل سلول موجود قرار گرفته و سلول‌های دختر به شکل توده‌های سلولی به هم متصل می‌شوند و تنها با اعمال تنش یا برش از هم جدا می‌شوند (Dougall, 1987).

گزینش با استفاده از تجزیه و تحلیل رشد سیستم کشت در کشت‌های سوسپانسیون و تعیین کمیت متابولیت ثانویه مورد نظر نسبت به تکنیک‌های گزینش بصری (visual) برتری دارد (Murthy et al. 2014; Deepthi and Satheeshkumar, 2017). در بررسی حاضر، پنج لاین سلولی با ایجاد کشت سوسپانسیون سلولی و پایش کردن سینتیک رشد سلولی بهترین لاین گزینش شد و محتوی تاکسول در کشت‌های سوسپانسیونی لاین‌های گزینش شده مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. در بین پنج لاین سلولی، لاین سلولی TbCL-1J بسیار پررشد با توان تولید تاکسول بالا بود. تفاوت در توان رشد و پتانسیل بالای تولید متابولیت‌های ثانویه در بین لاین‌های سلولی مختلف می‌تواند ناشی از تنوع ژنتیکی از قبل موجود در ریزنمونه‌ها و یا در نتیجه تنوع سوماکلونال القاء شده در شرایط درون شیشه‌ای با منشا ژنتیکی یا اپی‌ژنتیکی ناشی از تاثیر فیتوهورمون‌ها، شرایط کشت در طی القاء و کشت کالوس و کشت سوسپانسیون سلولی باشد (Matsumoto et al., 1981; Rana et al., 2012; Wang et al., 2018). پژوهش‌های گذشته مقدار تاکسول در کشت‌های سوسپانسیون *T. baccata* بدون اعمال تیمار محرک، $1/5 - 12/04$ mg/l (Bonfill et al., 2007; Yari) و $1/5 - 12/04$ mg/l (Khosroushahi et al., 2011; Malik et al., 2011; Wickremesinhe and Arteea, 1993; Malik et al., 2011; Wang et al., 2018).

برای توسعه سیستم سوسپانسیون سلولی برای تولید تاکسول است (Wickremesinhe and Arteea, 1993; Malik et al., 2011; Wang et al., 2018).

هدف کلی این بررسی، توسعه کشت سوسپانسیون مبتنی بر تک سلول‌های پرتوان رشدی با پتانسیل تولید تاکسول بالا و پایدار بود. گزینش لاین‌های سلولی بسیار پربازده در کشت‌های سوسپانسیون سلولی مختلف به دلیل ناهمگونی در فعالیت بیوشیمیایی سلول‌ها در کشت سوسپانسیون امکان پذیر است (Larkin and Scowcroft, 1981; Deepthi and Satheeshkumar, 2017). در بررسی حاضر برای به دست آوردن سلول‌های پرتوان رشدی و ایجاد کشت سوسپانسیون سلولی همگن با بازده تولید بالای زی‌توده و تاکسول در سرخدار *T. baccata*، گزینش تک سلول بر اساس روش کلونینگ توده‌های سلولی انجام شد و کشت سوسپانسیون سلولی همگن و با بازده بالا با استفاده از پنج لاین سلولی پرتوان TbCL-1J-5J گزینش شده ایجاد شد. گزینش لاین سلولی پربازده و ایجاد بیشتر کشت سوسپانسیون سلولی با موفقیت در بسیاری از پژوهش‌ها برای تولید متابولیت‌های ثانویه مفید مانند گونه *T. cuspidata* (Naill, and Roberts, 2005; Wang et al., 2018) و دیگر گونه‌های گیاهی (Matsumoto et al., 1981; Fujita et al., 1985; Liang et al., 2006; Dong et al., 2010; Deepthi and Satheeshkumar, 2017) به کار گرفته شده است. برای گزینش لاین سلولی روش‌هایی مختلفی شامل گزینش بصری، گزینش کلونال و گزینش جهش‌یافته‌ها است (Linag et al., 2006; Dong et al., 2010; Deepthi and Satheeshkumar, 2017). گزینش کلونی شامل دو تکنیک، کلونینگ توده‌های کوچک سلولی و کلونینگ تک‌سلولی است. محدودیت کلونینگ تک‌سلولی این است که جداسازی تک سلول و کشت آن برای به دست

(Perez-Matas et al., 2024) گزارش شده است، در این پژوهش محتوای تاکسول در کشت سوسپانسیون لاین پرتوان گزینش شده TbCL-1J خیلی بالا (mg/l) ۲۶/۰۷ بود. مقدار تاکسول در درختان سرخدار ۰/۰-۰۰۱/۰۰۵ درصد ماده خشک گزارش شده است (Malik et al., 2011).

در تجزیه و تحلیل پایداری، لاین سلولی TbCL-1J با عملکرد بالا و پایداری در هر دو رشد زی توده و تولید تاکسول بود. در دیگر لاین ها به دنبال واكشت های بعدی رشد سلولی و تولید تاکسول پایدار نبود. دلایل متعددی می تواند این بی ثباتی را تبیین کند. یکی از دلایل، القاء تنوع سوماکلونال در طی واكشت های متعدد در کشت های درون شیشه ای است که می تواند منجر به پایداری برخی از سلول ها و یا ناپایداری سلول های دیگر شود (Larkin et al., 1981; Rana et al., 2012; Wang et al., 2018). از طرفی، از آنجایی که توده های کوچک مورد استفاده برای کلونینگ تک سلولی شامل چندین سلول اگرچه با تعداد کم باشد، تفاوت در ویژگی های این سلول ها می تواند با زیرکشت متوالی تشدید شود و موجب ناپایدار شدن لاین های سلولی شود. علاوه بر این، قهوه ای شدن، یک عامل رایج در کشت بافت گیاهی به خصوص در سیستم کشت سوسپانسیونی است، که در برخی از لاین های سلولی با شدت بیشتری می تواند رخ دهد و موجب از بین رفتن سلول ها و کندی رشد در سیستم کشت و کاهش در عملکرد تولید متابولیت های ثانویه شود. اگرچه در پژوهش های متعددی گزارش شده است که تغییر در محتوای تاکسول اجتناب ناپذیر است (Bonfill et al., 2007; Malik et al., 2011; Yari Khosroushahi et al., 2011)، اما می توان لاین های سلولی پایدار و تولید کننده تاکسول را در واكشت های متوالی گزینش کرد. تکنیک فراسرد

(Cryopreservation) نیز می تواند در تثبیت پتانسیل رشدی و عملکرد تولید و نگهداری طولانی مدت لاین های پایدار کمک کند (Markowski et al., 2024). در بررسی سینتیک رشد در کشت سوسپانسیون سلولی مبتنی بر لاین های گزینش شده سرخدار مشخص شد که رشد صعودی کشت های سوسپانسیونی تا روز ۲۱ ادامه دارد و می توان با توجه به منحنی رشد سلولی به این مهم دست یافت که بهترین زمان افزودن الیستورها برای القاء تولید تاکسول، ۲۱ روز پس از کشت یعنی انتهای فاز رشد نمایی رشد یا اوایل فاز ساکن رشد می تواند باشد، که سلول ها در وضعیت بیشینه رشد و تولید زی توده قرار دارند.

نتیجه گیری کلی

کشت های سوسپانسیون سلولی هموژن مبتنی بر تک سلول می توانند به عنوان پلت فرمی برای پژوهش های مختلف مانند مهندسی ژنتیک (مانند ویرایش ژنومی)، ژنومیکس عملکردی، پژوهش ترانسکریپتوم، موتاسیون زایی و همچنین به عنوان مدل های سلولی برای تعیین مسیرهای تکاملی سلول ها مورد استفاده قرار گیرند (Dong et al., 2010; Zhang et al., 2024). با توجه به بازده بالای لاین سلولی TbCL-1J گزینش شده در این پژوهش، می توان این لاین سلولی را در پژوهش های مهندسی متابولیک و استراتژی اعمال الیستورها برای بهینه سازی تولید تاکسول در یک سیستم بیوراکتوری مناسب برای امکان تولید تاکسول در مقیاس صنعتی استفاده کرد. بررسی مقدار تاکسول در سوسپانسیون سلولی سرخدار در مقایسه با مقدار تاکسول موجود در بافت طبیعی این گیاه بیانگر این موضوع مهم است که با توجه به مقدار بالای تاکسول تولیدی در کشت سوسپانسیون سلولی، کشت های درون شیشه ای و کشت سوسپانسیون سلولی را می توان به عنوان

روشی مطمئن و کم‌هزینه‌تر در مقایسه با قطع درختان کند رشد و بسیار ارزشمند سرخدار برای دستیابی به داروی بسیار مهم ضد سرطان تاکسول معرفی کرد.

References

- Ahadi, H.; Mirjalili, M. H.; Farzaneh, M.; rezadoos, H., Quantification of taxol and 10-deacetyl baccatin III in the leaf and cell suspension cultures of two *taxus* species. *Journal of Plant Productions* **2018**, 41 (3), 95-105. (In Persian)
- Ashrafi, S.; Mofid, M. R.; Otroshi, M.; Ebrahimi, M.; Khosroshahli, M., Effect of plant growth regulators on the callogenesis and taxol production in cell suspension of *Taxus baccata* L. *Trakia Journal of Sciences* **2010**, 8(2), 36-43.
- Bagheri Toulabi, S.; Moieni, A.; Ghanati, F.; Emami, F., Investigation of the effects of the basal medium, auxin and antioxidants on the induction and maintenance of callus and taxol production in yew (*Taxus baccata*). *Journal of Advances in Biology & Biotechnology* **2015**, 3(2), 58-67.
- Bonfill, M.; Bentebibel, S.; Moyano, E.; Palazon, J.; Cusido, R.M.; Eibl, R.; Pinol, M.T., Paclitaxel and baccatin III production induced by methyl jasmonate in free and immobilized cells of *Taxus baccata*. *Journal of Biologia Plantarum* **2007**, 51 (4), 647-52.
- Bray, F.; Laversanne, M.; Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R. L.; Soerjomataram, I.; Jemal, A., Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer Journal for Clinicians* **2024**, 74(3), 229-263.
- Brunakova, K.; Babincova, Z.; Takác, M.; Cellárová, E., Selection of callus cultures of *Taxus baccata* L. as a potential source of paclitaxel production. *Engineering in Life Sciences* **2004**, 4 (5), 465-9.
- Chandran, H.; Meena, M.; Barupal, T.; Sharma, K.; Plant tissue culture as a perpetual source for production of industrially important bioactive compounds. *Biotechnology Reports* **2020**, 26:e00450.
- Christen, A.A.; Bland, J.; Gibson, D.M., Cell culture as a means to produce taxol. *Journal of Proceedings of the American Association for Cancer Research* **1989**, 30:2252.
- Cusidó, R. M.; Palazón, J.; Navia-Osorio, A.; Mallol, A.; Bonfill, M.; Morales, C.; et al., Production of Taxol and baccatin III by a selected *Taxus baccata* callus line and its derived cell suspension culture. *Plant Science* **1999**, 146, 101-7.
- Deepthi, S.; Satheeshkumar, K., Cell line selection combined with jasmonic acid elicitation enhance camptothecin production in cell suspension cultures of *Ophiorrhiza mungos* L. *Journal of Applied Microbiology Biotechnology* **2017**, 101(2), 545-558.
- Denis, J.N.; Greene, A.E.; Guenard, D.; Gueritt-Voegelein, F.; Managatal, L.; Poiter, P., Highly efficient approach to natural taxol. *Journal of the American Chemical Society* **1998**, 110 (17), 5917-5919.
- Dong, J.; Bowra, S.; Vincze, E., The development and evaluation of single cell suspension from wheat and barley as a model system; a first step towards functional genomics application. *BMC Plant Biology* **2010**, 5 (10), 239.
- Dougall, K. D., Cell cloning and selection of high yielding strains. In *Cell culture and somatic cell genetic of plants*; Constabel, F.; Vasil, I. K., Ed.; Academic Press, INC: San Diego, CA, **1987**; pp117-123.
- Fathollahi Qarachoboogh, A.; Alijanpour, A.; Hosseini, B.; Banj Shafiei, A., The effects of different plant growth regulators on micropropagation of *Juniperus foetidissima* Willd. *Forest Research and Development* **2020**, 6(4), 573-591. (In Persian)
- Fathollahi Qarachoboogh, A.; Alijanpour, A.; Hosseini, B.; Banj Shafiei, A., The effects of different plant growth regulators on micropropagation of *Juniperus excelsa* L. *Forest Research and Development* **2025**, doi: 10.30466/jfrd.2024.55374.1728. (In Persian)
- Fujita, Y.; Takahashi, S.; Yamada, Y., Selection of cell lines with high productivity of shikonin derivatives by protoplast culture of *Lithospermum erythrorhizon* cells. *Agricultural and Biological Chemistry* **1985**, 49, 37-41.
- Gamborg, O. L.; Miller R. A.; Ojima K, Nutrient requirements of suspension cultures of

- soybean root cells. *Experimental Cell Research* **1968**, 50:151-158.
- Habibi Khaniani, B.; Moieni, A.; Abdollahi, M., Production of secondary metabolites and pharmaceutical constituents through tissue and cell culture. *Journal of Medicinal Plants* **2005**, 4 (14), 1-6. (In Persian)
- Hasanloo, T.; rezazadeh, S.; Rahnama, H.; Hairy roots as a Source for Production of Valuable Pharmaceutical materials. *Journal of Medicinal Plants* **2009**; 8 (29), 1-17. (In Persian)
- Hazrati Jahan, R.; Zare, N.; Dezhsetan, S.; Shikhzadeh Mosaddeg, P., Enhanced Taxol production in cell suspension cultures of hazelnut (*Corylus avellana* L.) by combination of elicitor and precursor. *Journal of Medicinal and Aromatic Plants* **2017**, 33 (1), 73- 89. (In Persian)
- Larkin, P. J.; Scowcroft, W. R., Somaclonal variation - a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theoretical and Applied Genetics*, **1981**, 60(4), 197-214.
- Liang, L. F.; Keng, C. L.; Lim, B. P., Selection of cell lines for the production of rosmarinic acid from cell suspension cultures of *Orthosiphon stamineus* benth. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* **2006**, 42, 538- 542.
- Malik, S.; Cusido, R. M.; Mirjalili, M. H.; Moyano, E.; Palazon, J.; Bonfill, M., Production of the anticancer drug taxol in *Taxus baccata* suspension cultures: A review. *Journal of Process Biochemistry* **2011**, 46, 23-34.
- Markowski, M.; Czarnomska, Z.; Tomiczak, K.; Mikuła, M.; Granica, S.; Podwyszyńska, M.; Szypuła W.J., The influence of cryopreservation via encapsulation-dehydration on growth kinetics, embryogenic potential and secondary metabolite production of cell suspension cultures of *Gentiana capitata* Buch.-Ham. ex D. Don and *Gentiana decumbens* L.f. *Industrial Crops and Products* **2024**, 212, 11834.
- Matsumoto, T.; Kanno, N.; Ikeda, T.; Obi, Y.; Kisaki, T.; Noguchi, M., Selection of cultured tobacco cell strains producing high levels of ubiquinone 10 by a cell cloning technique. *Agricultural and Biological Chemistry* **1981**, 45, 1627-1633.
- Naill, M. C.; Roberts, S. C., Culture of isolated single cells from *Taxus* suspensions for the propagation of superior cell populations. *Biotechnology Letters* **2005**, 27, 1725-1730.
- Nirmala, M. J.; Samundeeswari, A.; Sankar, P. D., Natural plant resources in anti-cancer therapy-A review. *Journal of Research in Plant Biology* **2011**, 1 (3), 1-14.
- Palazon, J.; Cusido, R. M.; Bonfill, M.; Morales, C.; Pinol, M. T., Inhibition of paclitaxel and baccatinIII accumulation by mevinolin and fosmidomycin in suspension cultures of *Taxus baccata*. *Journal of Biotechnology* **2003**, 101 (2), 157-163.
- Perez-Matas, E.; Hidalgo-Martinez, D.; Moyano, E.; Palazon, J.; Bonfill, M., Overexpression of *BAPT* and *DBTNBT* genes in *Taxus baccata* in vitro cultures to enhance the biotechnological production of paclitaxel. *Plant Biotechnology Journal* **2024**, 22 (1), 233-247.
- Rahmati, Z.; Payam nouri, V.; Ghasemi Bezdi, K.; Ebrahimi, P., Optimization of culture medium for in vitro callogenesis in *Taxus baccata* L. and *T. brevifolia* Nut. *Journal of Forest and wood products* **2017**, 70 (3), 381-391. (In Persian).
- Rana, S.; Dhar, N.; Bhat, W. W.; et al., A 12-deoxywithastramonolide-rich somaclonal variant in *Withania somnifera* (L.) Dunal-molecular cytogenetic analysis and significance as a chemotypic resource. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* **2012**, 48, 546-554.
- Razavi, S.A.; Hosseini Nasr, S. M.; Valizadeh, M., Effect of cutting type and plant growth regulators (IBA, NAA, 2, 4-D) on rooting of *Taxus baccata* L. cuttings. *Forest Research and Development* **2018**, 4(1), 73-83. (In Persian)
- Vidal-limon, H. R.; Almargo, L.; Moyano, E.; Palazon, J.; Perdreno, M.A.; cusido, R.M., Perfluorodecalins and hexenol as inducers of secondary metabolism in *Taxus media* and *Vitis vinifera* cell cultures. *Journal of Frontiers in Plant Science* **2018**, 9, 335-349.
- Wang, S.; Wang, H.; Li, T.; et al., The selection and stability analysis of stable and high Taxol-producing cell lines from *Taxus cuspidata*. *Journal of Forest Research* **2018**, 29, 65-71.
- Wickremesinhe, E. R. M.; Arteea, R. N., *Taxus* callus cultures: Initiation, growth optimization, characterization and taxol production. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* **1993**, 35, 181-193.

- Witherup, K. M.; Look, S. A.; Stasko, M. W.; Ghiorzi, T. J.; Muschik, G. M.; Cragg, G. M., *Taxus* spp. needles contain amounts of taxol comparable to the bark of *Taxus brevifolia*: analysis and isolation. *Journal of Natural Products* **1990**, 53 (5), 1249-1255.
- Yari Khosroushahi, A.; Naderi-Manesh, H.; Toft Simonsen, H., Effect of antioxidants and carbohydrates in callus cultures of *Taxus brevifolia*: Evaluation of browning, callus growth, total phenolics and paclitaxel production. *Bioimpacts* **2011**, 1(1), 37-45.
- Yazdani, D.; Shahnazi, S.; Rezazadeh, S.; Pirali Hamadani, M., Review on yew tree (*Taxus spp.*). *Journal of Medicinal Plants* **2005**, 4 (15), 1-8. (In Persian)
- Zhang, C. H.; Fevreiro, P. S.; He, G.; Chen, Z., Enhanced paclitaxel productivity and release capacity of *Taxus chinensis* cell suspension cultures adapted to chitosan. *Journal of Plant Science* **2007**, 172, 158-163.
- Zhang, D.; Li, Z.; Htwe, Y. M.; Shi, P.; Wei, X.; Nie, H.; Nin, J.; Wu, L.; Khan, F. S.; Yu, Q.; et al., Insights into the developmental trajectories of zygotic embryo, embryogenic callus and somatic embryo in coconut by single-cell transcriptomic analysis. *Industrial Crop and Products* **2024**, 212, 118338.
- Zaranek, M.; Pérez-Pérez, R.; Milewska-Hendel, A.; et al., Efficient and rapid system of plant regeneration via protoplast cultures of *Fagopyrum esculentum* Moench. *Plant Cell and Tissue Organ Culture* **2023**, 154, 673-687.