علوم و تحقیقات بذر ایران
سال هشتم/ شماره اول/ ۱۴۰۰ (۸۹ - ۷۷)
مقاله پژوهشی
DOI: 10.22124/jms.2021.5212

بهینه‌سازی رشد گیاهچه و بررسی تولید تاکسان در کشت درون‌شیشه‌ای سرخدار (*Taxus baccata* L.)

مهسا بام‌نشین[۱]، عبداله حاتم‌زاده[۲*]، محمدرضا نقوی[۳]، محمدحسین میرجلیلی[۴]

تاریخ دریافت: ۹۹/۸/۵ تاریخ پذیرش: ۹۹/۱۰/۱۹

چکیده

سرخدار (*Taxus baccata* L.) به‌علت دارا بودن ترکیبات دی‌ترپنوئیدی با اثرات ضد سرطان، از مهم‌ترین گیاهان دارویی شناخته شده در جهان است که در معرض انقراض قرار دارد. در این تحقیق که در پژوهشکده گیاهان دارویی دانشگاه شهید بهشتی صورت پذیرفت، ابتدا اثر نوع محیط کشت (MS,MS ۱/۲ و NN)، جاذب‌های فنولی (زغال فعال و PVP) و تنظیم کننده‌های رشد گیاهی (IBA، GA_3 و BA) در قالب طرح فاکتوریل با سه تکرار، با هدف بهبود جوانه‌زنی و رشد گیاهچه‌های سرخدار در کشت درون‌شیشه‌ای بررسی گردید. در ادامه تولید تاکسان در گیاهچه‌هایی که طی ده ماه در محیط انتخابی رشد کرده بودند، اندازه‌گیری شد. محیط کشت NN به‌دلیل غلظت نمک‌های پایه کم‌تر در محیط کشت تأثیر معنی‌داری بر درصد جوانه‌زنی نداشت، ولی منجر به افزایش طول ریشه و درصد رویش عادی گیاهچه گردید. همچنین استفاده از جاذب‌های فنولی موجب افزایش بیش‌تر طول ریشه و ساقه و بهبود نرخ رویش عادی گیاهچه گردید. به‌علاوه ترکیب هورمونی $IBA \times GA_3$ (۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر جیبرلیک اسید × ۰/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر ایندول بوتیریک اسید) بیش‌ترین تأثیر را بر میزان رویش عادی گیاهچه‌ها داشته و بیش‌ترین طول ریشه با ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر ایندول بوتیریک اسید و حداکثر ارتفاع ساقه از ترکیب هورمونی $BA \times GA_3$ (۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر جیبرلیک اسید × ۲ میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آدنین) به‌دست آمد. همچنین میزان تاکسان‌ها در اندام هوایی بیش‌تر از ریشه بوده و بیش‌ترین تاکسان در اندام هوایی ۱۰- دی استیل باکاتین III و در ریشه تاکسول و ۱۰- دی استیل تاکسول بود که حداکثر مقدار آن‌ها در هفته چهلم به‌دست آمد. در کل نتایج این تحقیق حاکی از تأثیر مثبت استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد، زغال فعال و کاهش غلظت نمک‌های محیط کشت بر رشد ریشه و توسعه عادی گیاهچه به‌منظور بهینه‌سازی تکثیر گیاهچه‌های سرخدار در کشت درون‌شیشه‌ای بود. همچنین نشان داده شد کشت سلولی حاصل از اندام هوایی نسبت به کشت ریشه‌های مویین گزینه بهتری در جهت تولید تاکسان‌ها در شرایط آزمایشگاهی است.

واژه‌های کلیدی: تاکسان؛ تاکسول؛ سرخدار؛ محیط کشت

۱-دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی کشاورزی، پردیس دانشگاهی دانشگاه گیلان، رشت، ایران mahsabamneshin@yahoo.com
۲. استاد گروه علوم باغبانی، دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان، رشت، ایران hatamzadeh@guilan.ac.ir
۳. استاد گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران mnaghavi@ut.ac.ir
۴. دانشیار گروه کشاورزی، پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران m-mirjalili@sbu.ac.ir
*نویسنده مسئول: hatamzadeh@guilan.ac.ir

مقدمه

درختان سرخدار (*Taxus spp*, Taxaceae; $2n=2x=24$) بازدانگانی هستند که عموماً به شکل درختچه‌هایی با رشد آهسته و همیشه سبز در عرض‌های میانی نیمکره شمالی با کمی نفوذ به مناطق گرمسیری گسترده شده‌اند (Wang *et al*., 2011). جنس تاکسوس شامل نه گونه است که تنها یک گونه آن به نام سرخدار اروپایی (*Taxus baccata* L.) بومی ایران می‌باشد و در ارتفاع ۹۰۰ تا ۲۰۰۰ متری رشته کوه‌های البرز از آستارا تا جنگل‌های علی‌آباد استان گلستان پراکنده گردیده است. افزایش تقاضا برای استفاده از چوب، رشد آهسته درخت و خواب طولانی بذر (ناشی از مواد بازدارنده رشد) این گونه را در معرض انقراض قرار داده و استفاده از شیوه‌های جدید جهت حفاظت و تکثیر این گونه‌ی ارزشمند را ضروری ساخته است (Gracia, 2000; Mysterud and Qstby, 2004). در این زمینه استفاده از روش‌های آزمایشگاهی نظیر کشت جنین برای غلبه بر خواب بذر و رشد سریع جنین‌های جوانه‌زده، بسیار مورد توجه قرار گرفته است (Nasiry *et al*., 2015; Davarpanah, 2014). سرخدار قادر به تولید گروهی از دی‌ترپنوئیدها به نام تاکسان (Taxane) می‌باشد. تاکسول (Taxol) همراه با ۲ پیش‌ماده مهم آن یعنی باکاتین III (BAC III) و۱۰- دی استیل باکاتین III (DABIII - ۱۰) مهم‌ترین تاکسان‌هایی هستند که تاکنون شناخته شده‌اند (Cragg and Newman, 2005). غلظت تاکسان‌ها در درخت به‌حدی کم است که استخراج از پوسته درخت مقرون به‌صرفه نمی‌باشد. طی دو دهه گذشته کشت درون‌شیشه‌ای به‌ویژه کشت سلول، مطلوب‌ترین روش در زمینه تولید تاکسان‌ها شناخته شده است.

خواب بذر سرخدار ناشی از مواد بازدارنده رشد مانند آبسزیک اسید (ABA) بوده و قرار دادن جنین جدا شده بر روی محیط کشت و استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد در رفع این خواب موثر است (Chee, 1994). محیط کشت‌های متعدد در کشت درون‌شیشه‌ای جنین سرخدار مورد بررسی قرار گرفته و محیط کشت DCR بیش‌ترین تأثیر و B_5 کم‌ترین تأثیر را بر جوانه‌زنی داشته‌اند (Flores *et al*., 1993). به‌علاوه مشخص شده که اگر جنین جداسازی و بر روی محیط کشت MS در ترکیب با زغال فعال قرار گیرد، میزان جوانه‌زنی در حد قابل توجهی بهبود می‌یابد (Zhiri *et al*., 1994). قابل ذکر است مطالعات در زمینه تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر رشد عادی گیاهچه سرخدار محدود می‌باشد (Liao, 2006; Majada, 2000; Chee, 1994; Datta and Jha, 2004).

با وجود این‌که پژوهش‌های زیادی بر روی بهینه‌سازی جوانه‌زنی بذر سرخدار از طریق جداسازی جنین در شرایط آزمایشگاهی صورت گرفته اما مطالعه در زمینه‌ی غلبه بر رشد غیر عادی گیاهچه‌های نوظهور, که در سرخدار بسیار متداول است، ناچیز می‌باشد. برای این منظور در این مطالعه محیط‌های کشت، مواد تنظیم‌کننده رشد و جاذب‌های فنولی برای بهبود رشد و تکثیر گیاهچه‌های نوظهور سرخدار همزمان با بررسی میزان جوانه‌زنی جنین مورد مقایسه قرارگرفتند. از سوی دیگر، گرچه منبع اصلی تاکسان‌ها پوسته داخلی درخت می‌باشد، ولی در گیاهچه، ریشه، ساقه و برگ نیز وجود دارند که مقدار آن‌ها به ژنتیک، اپی‌ژنتیک و شرایط محیطی متفاوت وابسته است. در این راستا در این مطالعه ارزیابی میزان تاکسان‌ها (۱۰- دی استیل باکاتین III، باکاتین III' ۱۰- دی استیل تاکسول و تاکسول) در اندام هوایی و ریشه گیاهچه‌های رشدیافته در محیط کشت بهینه نیز صورت پذیرفت.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: میوه‌های بالغ و رسیده سرخدار در اواخر آبان سال ۹۴ از درختان کهنسال جنگل‌های افراتخته در جنوب شرقی شهرستان علی‌آباد کتول استان گلستان با مختصات جغرافیایی ۵۴ درجه، ۵۵ دقیقه، ۴۸ ثانیه تا ۵۴ درجه، ۵۷ دقیقه، ۱۲ ثانیه طول شرقی و ۳۶ درجه، ۴۵ دقیقه، ۲۴ ثانیه تا ۳۶ درجه، ۴۷ دقیقه، ۳ ثانیه عرض شمالی در محدوده ارتفاعی ۱۳۰۰ تا ۲۰۰۰ متر از سطح دریا جمع‌آوری و تا زمان انجام آزمایش در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شدند. از توده بذر نمونه‌هایی انتخاب و با مخلوطکردن آن‌ها یک نمونه معرف تهیه شد (ISTA, 1999).

آماده‌سازی و کشت بذر: تمامی مراحل این مطالعه در پژوهشکده گیاهان دارویی دانشگاه شهید بهشتی صورت

پذیرفت. در ابتدا جهت آزمون زنده‌مانی بذرها از ۵ و۳ و ۲ تری فنیل تترازولیوم کلراید در سه تکرار (هر تکرار حاوی۵۰ عدد بذر) استفاده گردید (ISTA, 2003) که قابلیت زیستی بذرها را بیش از ۳±۹۶ درصد نشان داد. پیش از استریل‌کردن برای حذف بازدارنده‌های جوانه‌زنی، کاهش احتمال آلودگی و تسهیل جداسازی جنین از آندوسپرم، شستشوی بذرها به‌مدت هفت روز با آب جاری و سپس به‌مدت یک دقیقه در اتانول ۷۰ درصد و بیست دقیقه در هیپوکلریت ۵ درصد قرار گرفتند (Zhiri *et al.*, 1994). بذور ضدعفونی‌شده سه مرتبه با آب مقطر استریل شسته شده و در شرایط کاملاً استریل در زیر هود میکروبیولوژی، بذر توسط پنس و اسکارپل شکسته شده، جنین از آندوسپرم جدا و روی محیط کشت قرار گرفت.

تیمار در کشت درون‌شیشه‌ای: در این مطالعه چند فرضیه به‌طور جداگانه بررسی شد و بهترین نتیجه از هر قسمت در مرحله بعدی استفاده گردید. ابتدا سه محیط MS (Murashige and Skoog, 1962), ۱/۲ MS (حاوی نیمی از غلظت نمک‌های پایه در محیط MS) و NN جهت بررسی تأثیر غلظت نمک‌های پایه و تعیین بهترین محیط کشت برای جوانه‌زنی جنین و رشد گیاهچه‌های سرخدار مورد بررسی قرار گرفت. در ادامه استفاده از دو جاذب فنولی زغال فعال (با غلظت ۵ گرم بر لیتر) و پلی وینیل پیرولیدون (PVP) (با غلظت ۰/۸ گرم بر لیتر) در محیط کشت NN (انتخاب شده از آزمایش اول) به‌منظور تعیین اثر آن‌ها بر روی بهبود نرخ جوانه‌زنی و رشد گیاهچه مورد مقایسه قرار گرفت. در نهایت در محیط NN حاوی زغال فعال (گزینش شده از دو آزمون قبلی) از سه تنظیم‌کننده رشد ایندول بوتیریک اسید (IBA)،بنزیل آدنین (BA) و جیبرلیک اسید (GA_3) جهت شناخت ترکیب و سطوح بهینه آن‌ها برای رویش جنین و توسعه گیاهچه استفاده شد. برای این منظور سه نوع ترکیب تیماری در نه سطح مختلف در سه تکرار تهیه شد (جدول۱). سطوح و غلظت هورمون‌های مورد استفاده بر اساس مطالعات پیشین تعیین گردید (Majada *et al.*, Flores, 1993; 2000). در تمامی محیط‌ها از ۲۵ گرم بر لیتر ساکاروز و ۸ گرم بر لیتر آگار استفاده شد. محیط‌های کشت پس از تنظیم pH بر روی ۵/۷ ±۰/۵، توسط اتوکلاو با دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس و kp ۱/۰۵ به‌مدت ۲۰ دقیقه استریل گردیدند. جنین‌ها ابتدا در میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتر حاوی ۰/۸ میلی‌لیتر محیط کشت جامد، کشت شده و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس در تاریکی قرارگرفتند. ظهور ریشه‌چه همراه با بازشدن لپه‌ها به‌عنوان جوانه‌زنی در نظر گرفته شده و نرخ جوانه‌زنی توسط درصد جنین‌های جوانه‌زده نسبت به کل جنین‌ها دو هفته بعد از کشت تعیین گردید. پس از دو هفته جوانه‌ها به تیوب‌های شیشه‌ای بزرگ‌تر حاوی محیط کشت تازه و یکسان با محیط قبلی منتقل و تحت فتوپریود ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفتند. پس از جوانه‌زنی دو نوع پاسخ رشدی مشاهده گردید. حالت اول رویش عادی گیاهچه که شامل توسعه مناسب گیاهچه، هیپوکوتیل و کوتیلدون بود و حالت دوم رویش غیرعادی گیاهچه که توسعه نامناسب گیاهچه، کالوس‌زایی، نکروزه‌شدن و مرگ گیاهچه را در برداشت (شکل ۱).

جدول ۱- ترکیبات و سطوح مختلف هورمون‌ها در تیمار تنظیم‌کننده‌های رشد

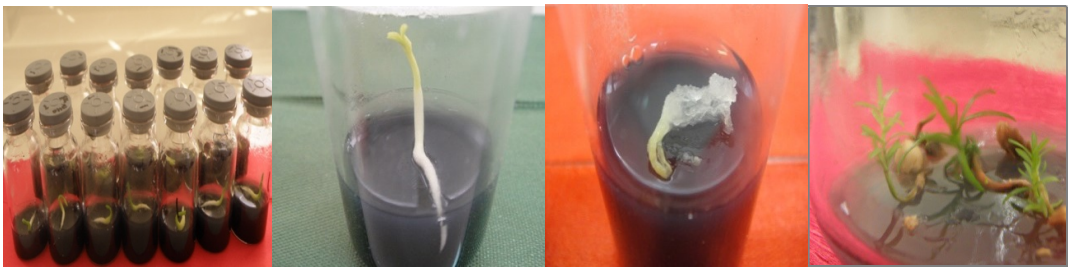
Table 1. Different components and levels of hormones in plant growth regulators treatment

ترکیبات هورمون Hormone Combination	IBA × BA		IBA × GA3		BA × GA3	
سطح هورمون (میلی‌گرم بر لیتر) Hormone level (mg/l)	IBA	BA	IBA	GA3	BA	GA3
1	0	0	0	0	0	0
2	0	0.2	0	0.2	0	0.2
3	0	2	0	2	0	2
4	0.01	0	0.01	0	0.2	0
5	0.01	0.2	0.01	0.2	0.2	0.2
6	0.01	2	0.01	2	0.2	2
7	0.1	0	0.1	0	2	0
8	0.1	0.2	0.1	0.2	2	0.2
9	0.1	2	0.1	2	2	2

تمامی مقادیر بر حسب mg/l (میلی‌گرم بر لیتر Miligram/ liter)

رویش عادی گیاهچه توسط تعداد گیاهچه‌های سالم و عادی نسبت به کل جنین‌های جوانه‌زده پنج هفته بعد از کشت اولیه محاسبه گردید. همچنین دو صفت طول ریشه و ارتفاع ساقه درگیاهچه‌ها با رشد عادی اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری میزان تاکسان‌ها: جنین‌ها در محیط کشت بهینه بالا قرار گرفته و برداشت گیاهچه‌ها پس از پنج, ده, بیست و چهل هفته صورت پذیرفت (n=۱۵). گیاهچه‌ها به دو قسمت هوایی و ریشه تقسیم شدند. جهت استخراج تاکسان بافت‌ها توسط فریزدرایر خشک و درون ترکیب متانول: آب (به نسبت ۱:۹) شیک گردیدند. پس از فیلترشدن، استخراج با ۴۰ میلی‌لیتر دی‌کلرومتان در قیف جداکننده صورت پذیرفت. در نهایت فاز دی‌کلرومتان جداشده از فاز آبی درون روتاری تبخیر گردید و عصاره خشک باقیمانده در یک میلی‌لیتر استونیتریل حل شد. برای آنالیز HPLC از دستگاه کروماتوگرافی مایع واترز (Waters,USA)' دکتور جذبی دوگانه مدل ۲۴۸۷ (Waters,USA), ستون تحلیلی C18 (Eurospher 100-5 C18) استفاده شد. سرعت جریان یک میلی‌لیتر بر دقیقه، دما ۲۵ درجه سلسیوس و مقدار نمونه تزریق‌شده ۲۰ ماکرولیتر بود. پیک‌ها در طول موج ۲۳۰ نانومتر نمایان شدند که شناسایی آن‌ها با مقایسه زمان خروج پیک (Retention time) و طیف جذبی UV با استانداردهای تاکسان‌ها صورت پذیرفت. در نهایت سطح پیک متناسب با میزان تاکسان در نظر گرفته شد.



A B C D

شکل ۱- رشد گیاهچه‌های *T. baccata* در محیط کشت NN حاوی زغال فعال. A و B: رشد عادی گیاهچه پس از دو هفته، C: رشد غیرعادی گیاهچه پس از دو هفته و D: رشد عادی گیاهچه پس از پنج هفته

Figuer 1. Growth of *T.baccata* plantlets in NN culture medium containing activated charcoal. A and B: Normal growth plantlets after two weeks, C: Abnormal growth plantlets after two weeks, D: Normal growth plantlets after five weeks

آنالیز داده‌ها: جهت ساماندهی داده‌ها از نرم‌افزار اکسل و برای آنالیز آن‌ها از نرم‌افزار SPSS 24 استفاده گردید. نرمال‌بودن داده‌ها و همگنی واریانس‌ها به‌ترتیب توسط آزمون کلوموگروف اسمیرنوف و آزمون لون مورد بررسی قرار گرفت. سپس توسط آزمون تحلیل واریانس (ANOVA) اختلاف میانگین‌ها تعیین و برای مقایسه آن‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن استفاده گردید.

نتایج و بحث

آزمایش اول: تأثیر نوع محیط کشت و غلظت نمک‌های پایه: در این مطالعه، سه محیط MS, MS ۱/۲ و NN مورد مقایسه قرار گرفتند. هرسه محیط ترکیبات یکسانی را دارا بوده ولی محیط کشت MS ۱/۲ حاوی نصف نمک‌های پایه در محیط کشت MS می‌باشد. در محیط کشت NN، غلظت نیترات آمونیوم (NH_4NO_3) و فسفات پتاسیم (KH_2PO_4) تقریبا ۲۰ درصد کم‌تر از MS ۱/۲ می‌باشد. نتایج تجزیه واریانس نشان داد گرچه تفاوت بین سه محیط کشت از لحاظ درصد جوانه‌زنی معنی‌دار نیست ولی در صفات رویش عادی گیاهچه، طول ریشه و ارتفاع ساقه، این تفاوت معنی‌دار بود (جدول۲).

مطابق با نتایج حاصل از مقایسه میانگین، بیش‌ترین ارتفاع ساقه (۲۴/۸۴ میلی‌متر) مربوط به محیط کشت MS بود درحالی‌که طول ریشه و درصد رویش عادی گیاهچه در محیط کشت MS ۱/۲ از MS بیش‌تر بوده و حداکثر طول ریشه (۱۹/۳۳ میلی‌متر) و درصد رویش عادی گیاهچه (۳۵/۲۶ درصد) در محیط کشت NN به‌دست آمد (شکل۲). بر طبق این نتایج گرچه کاهش غلظت نمک‌های پایه موجب بهبود رشد ریشه و رویش عادی گیاهچه‌های *T. baccata* گردید ولی تأثیری بر جوانه‌زنی آن‌ها نداشت.

جدول ۲- تجزیه واریانس درصد جوانه‌زنی و رویش عادی گیاهچه, طول ریشه و ارتفاع ساقه گیاهچه‌های سرخدار تحت محیط کشت‌های مختلف

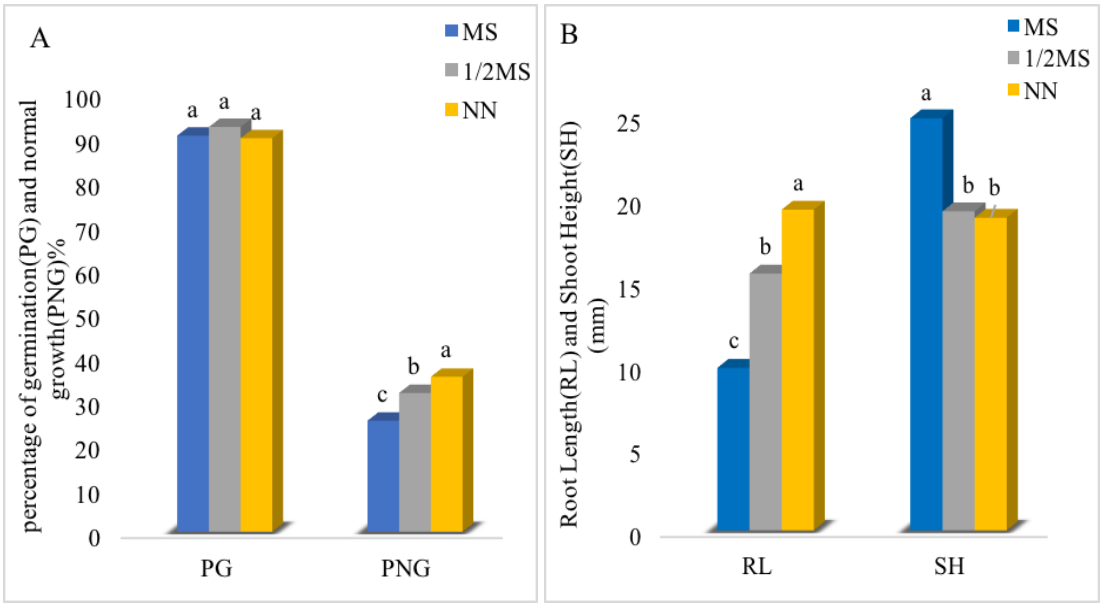
Table 2. Variance analysis for percentage of germination and normal growth, root length and shoot height of *Taxus baccata* plantlets in culture medium treatment

منبع تغییر Source of variaton	درجه آزادی df	میانگین مربعات صفات Mean Square of Trait			
		درصد جوانه‌زنی Germination percentage	درصد گیاهچه‌های عادی Normal plantlets percentage	طول ریشه Root length	ارتفاع ساقه Shoot Height
محیط کشت In Vitro Culture Medium	2	5.25 ns	76.78**	66.25**	33.81*
خطا Error	4	2.25	1.22	1.40	4.25
ضریب تغییرات (درصد)(CV)		1.65	3.6	7.90	9.82

ns ’ * و **: به‌ترتیب غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد

ns, *, **: Not Significant and significant at 5% and 1%, respectively

ترکیب محیط کشت در کشت درون‌شیشه‌ای سرخدار تأثیرگذار است و در این بین، غلظت نمک‌ها اهمیت زیادی دارد (Datta and Jha, 2004). برخی محققین با کاهش غلظت نمک‌های پایه، بهبود همزمان جوانه‌زنی و رویش عادی گیاهچه‌های سرخدار را گزارش نموده‌اند (Chee, 1995; Choi, 2000). با این وجود برخی دیگر بیان داشته‌اند که کاهش مقدار نمک‌های پایه تأثیری بر جوانه‌زنی این گونه نداشته اما بهبود رشد گیاهچه را در پی دارد (Chang and Yang, 1996; Tafreshi, 2011).



شکل ۲- مقایسه میانگین تیمار محیط کشت در گیاهچه‌های سرخدار. A- درصد جوانه‌زنی و رویش عادی گیاهچه B- طول ریشه و ارتفاع ساقه (برحسب mm)

Figure 2. Mean comparison of culture medium treatment in *Taxus baccata* plantlet. A- percentage of germination and normal growth B- Root length and shoot height (mm)

کاهش میزان نمک به نصف در محیط کشت WPM (Woody Plant Medium) سبب افزایش طول ریشه و کاهش نکروزه شدن گیاهچه‌های سرخدار شده است (Abbasin, 2010; Liguo *et al*., 1999). تاکنون استفاده از محیط NN در سرخدار گزارش نشده اما نتایج ما مبنی بر تأثیر مثبت کاهش غلظت نمک‌ها بر رشد گیاهچه همسو با نتایج سایر محققین می‌باشد. از آن-جایی‌که بسیاری از محققین رشد ناکافی ریشه را دلیل عدم رویش عادی گیاهچه‌های سرخدار دانسته‌اند (Thomas and Polwart, 2003; Patil *et al*., 2014) و پتانسیل اسمزی بالا مانعی در تشکیل ریشه و نفوذ آن

به محیط کشت می‌باشد, شاید بتوان با کاهش اسمولیت‌هایی چون نمک از آن اجتناب نمود.

آزمایش دوم: تأثیر زغال فعال و پلی‌وینیل-پیرولیدون (PVP): برای مطالعه و مقایسه دو جاذب فنولی زغال فعال و PVP در کشت درون‌شیشه‌ای جنین‌های سرخدار، از محیط کشت NN حاوی پنج گرم بر لیتر زغال فعال، مقدار ۰/۸ گرم بر لیتر PVP و بدون استفاده از ماده جاذب استفاده گردید. انتخاب محیط NN بر اساس نتایج آزمایش اول بود و غلظت زغال فعال و PVP نیز بر اساس بهترین نتایج حاصل از بررسی‌های پیشین تعیین گردید (Zarek, 2007; Majada *et al*., 2000; Tafreshi, 2011). داده‌های حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که در صفت درصد جوانه‌زنی تفاوت معنی‌داری در ترکیب‌های متفاوت جاذب محیط کشت وجود ندارد درحالی‌که در صفات درصد رویش عادی گیاهچه، طول ریشه و ارتفاع ساقه تفاوت بین سه محیط کشت معنی‌دار بود (جدول ۳). افزودن هر یک از دو ماده جاذب به محیط کشت NN منجر به افزایش درصد رشد عادی گیاهچه، طول ریشه و ارتفاع ساقه شد (جدول ۴). درکل حداکثر مقدار درصد رویش عادی گیاهچه (۴۸/۲۲ درصد) و بیش‌ترین میزان طول ریشه (۳۰/۴۹ میلی‌متر) و ارتفاع ساقه (۳۱/۹۵ میلی‌متر) در محیط NN حاوی پنج گرم بر لیتر زغال فعال به‌دست آمد. رشد غیر طبیعی گیاهچه به‌علت اکسیداسیون فنول‌ها، مشکل اصلی در ریزازدیادی درختان سرخدار می‌باشد (Jiaru *et al*., 1999; Chang *et al*., 2001). در پژوهش‌های بسیاری به تأثیر مثبت استفاده از زغال فعال یا PVP جهت اتصال به مواد فنولی در کشت درون‌شیشه‌ای سرخدار اشاره شده است (Tafreshi, 2011; Abbasin, 2010). در برخی بررسی‌ها بهترین نتیجه در استفاده از PVP به‌دست آمده است (Chang and Yang, 1996) درحالی‌که برخی دیگر زغال فعال را گزینه بهتری دانسته‌اند (Tafreshi, 2011; Abbasin, 2010). پیش‌تر گزارش شده بود که زغال فعال ریشه و ساقه بزرگ‌تری را نسبت به PVP ایجاد می‌کند (Tafreshi, 2011). در این مطالعه نیز اگرچه زغال فعال نسبت به PVP تأثیر بهتری در افزایش طول ریشه داشت ولی در صفت ارتفاع ساقه تفاوت معنی‌داری بین استفاده از PVP یا زغال فعال وجود نداشت. همچنین در تضاد با نتایج (Chang and Yang, 1996) که PVP را موثرترین آنتی‌اکسیدانت جهت غلبه بر رشد غیرطبیعی گیاهچه گزارش کردند، مطالعه حاضر نشان داد که زغال فعال بسیار موثرتر از PVP در این زمینه می‌باشد. در نهایت محیط NN حاوی پنج گرم در لیتر زغال فعال، برای بررسی تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد که در ادامه به آن اشاره می‌گردد، انتخاب گردید.

آزمایش سوم: تأثیر تنظیم کننده‌های رشد: در این آزمایش اثر سطوح متفاوت ترکیبات دوتایی هورمون‌های IBA، GA_3 و BA (جدول ۱) جهت غلبه بر خواب جنین و بهبود رشد گیاهچه‌های *T. baccata* مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور ترکیبات هورمونی مورد نظر پس از فیلترشدن به محیط کشت NN حاوی پنج گرم در لیتر زغال فعال اضافه شدند

جدول ۳-تجزیه واریانس درصد جوانه‌زنی و رویش عادی گیاهچه, طول ریشه و ارتفاع ساقه گیاهچه‌های سرخدار در تیمار زغال فعال و PVP

Table 3. Variance analysis of percentage of germination and normal growth, root length and shoot height of *Taxus baccata* plantlets in activated charcoal and PVP treatment

منبع تغییر Source of variaton	درجه آزادی df	میانگین مربعات صفات Mean Square of Trait			
		درصد جوانه‌زنی Germination percentage	درصد گیاهچه‌های عادی Normal plantlets percentage	طول ریشه Root length	ارتفاع ساقه Shoot Height
ماده جاذب Absorbent material	2	4.78^{ns}	175.77^{*}	110.93^{**}	160.16^{*}
خطا Error	4	1.53	13.78	5.86	7.21
ضریب تغییرات (درصد)(CV)		1.35	9.32	9.93	10.03

ns، * و **: به‌ترتیب غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد

ns, *, **: Not Significant and significant at 5% and 1%, respectively

جدول ۴- مقایسه میانگین درصد رویش عادی گیاهچه، طول ریشه و ارتفاع ساقه گیاهچه‌های سرخدار در تیمار زغال فعال و PVP

Table 4. Mean comparison for percentage of normal growth, root length and shoot height of *Taxus baccata* plantlets in activated charcoal and PVP treatment

محیط کشت Culture Medium	درصد گیاهچه‌های عادی Normal plantles percentage (%)	طول ریشه Root length (mm)	ارتفاع ساقه Shoot Height (mm)
محیط کشت NN بدون جاذب NN without absorbent	33.26b	18.33c	17.84b
محیط کشت NN با ۰/۸ گرم بر لیتر PVP NN with PVP (0.8 g/l)	37.93b	24.22b	28.2a
محیط کشت NN با ۵ گرم بر لیتر زغال فعال NN with activated charcol (5 g/l)	48.22a	30.49a	31.95a

تجزیه واریانس صفات نشان داد اثر متقابل ترکیب × سطح هورمون، برای صفات درصد رویش عادی گیاهچه، طول ریشه و ارتفاع ساقه معنی‌دار است (جدول ۵). ازآنجایی‌که اثر متقابل معنی‌دار بود، میانگین اثرات اصلی فاکتورها مورد مقایسه میانگین قرار نگرفت و فقط به تجزیه و تحلیل اثرات متقابل پرداخته شد. زیرا اولویت در این آزمایش انتخاب ترکیب و غلظت بهینه به‌طور همزمان بود. در مقایسه میانگین اثر متقابل ترکیب هورمون × سطح هورمون نشان داده شد، بیش‌ترین میزان درصد رویش عادی گیاهچه (۶۰/۷۹ درصد) مربوط به ترکیب (۰/۰۱ mg L^{-1} IBA × ۰/۲ mg L^{-1} GA_3) می‌باشد (جدول ۶). در مجموع داده‌ها نشان‌داد که این تنظیم-کننده‌های رشد اگرچه تأثیری بر جوانه‌زنی جنین سرخدار ندارند، اما موجب بهبود رویش عادی گیاهچه می‌شوند. در این بین IBA و GA_3 در مقایسه با BA تأثیر بیش‌تری داشته و استفاده همزمان از غلظت حد وسط هر دو هورمون (سطح ۵) بهترین تأثیر را دارا بود.

خواب جنین در بذر سرخدار ناشی از بازدارنده‌هایی چون اسید آبسزیک یا ترکیبات مشابه با آن می‌باشد (Le Page-Degivry, 1973). با استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد می‌توان تا حدی این خواب نهفته در بذور سرخدار را رفع نمود (Hu *et al*., 1992; Zarek, 2007; Flores *et al*., 1993). هورمون‌های BA، GA_3، KIN و TDZ در جوانه‌زنی *T. wallichiana* موثر نیستند (Datta and Jha, 2004). اما استفاده از BA، GA_3، IAA موجب بهبود جوانه‌زنی در *T. chinensis* گردیدند (Song *et al*., 2014). بر این اساس بیان شد که تأثیر هورمون‌ها در جوانه‌زنی جنین به نوع گونه سرخدار وابسته است. از سوی دیگر استدلال گردید که بازدارنده‌ها در مرحله رشد گیاهچه‌های تاکسوس نهفته‌اند (Chang and Yang, 1996). تأثیر مثبت هورمون GA_3 در *T.mairei* (Chang and Yang, 1996; Chein *et al.,* 1997) و اکسین‌هایی مانند IBA و NAA در *T.media* و *T. Bravifoia* (Choi ,2000) بر رویش عادی گیاهچه نشان داده شد. این مطلب تأییدی است بر یافته‌های تحقیق حاضر، مبنی بر این‌که تنظیم‌کننده‌های رشد نه در مرحله جوانه‌زنی بلکه در مرحله توسعه گیاهچه اثرگذار هستند. در مقایسه میانگین اثر متقابل ترکیب هورمون × سطح هورمون بیش‌ترین میزان طول ریشه در استفاده از ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر ایندول بوتیریک اسید (سطح هفت ترکیب هورمونی IBA × BA) به‌دست آمد (جدول ۶). تأثیر مثبت IBA بر رشد ریشه *T. brevifolia* و *T. mairei* (Change *et al*., 2001 ;) و سایر گیاهان مانند *Olea europaea* (Binet *et al*., 2007) نیز مشاهده شده است. همچنین اثبات گردید پاسخ ریشه‌دهی در حضورIBA بسیار بیش‌تر از سایر اکسین‌ها است (Abbasin *et al*., 2010). همان‌گونه که در این مطالعه مشاهده گردید استفاده از BA تأثیر مثبتی بر رشد ریشه نداشت. پیش‌تر نیز گزارش شده بود که گرچه غلظت‌های پایین BA تأثیرچندانی بر رشد ریشه ندارند ولی در غلظت‌های بالا رشد ریشه متوقف گردید (Chee *et al*., 1994). در مقایسه میانگین اثر متقابل ترکیب هورمون × سطح هورمون برای صفت ارتفاع ساقه، حداکثر ارتفاع ساقه (۴۵/۲۹ میلی‌متر) در ترکیب (۰/۲ mg L^{-1} GA_3 × ۲ mg L^{-1} BA) به‌دست آمد (جدول ۶). با توجه به این‌که

سایتوکنین‌ها روی تقسیم و رشد سلول‌ها تأثیر دارند (Thomas and Polwart, 2003)، تأثیر مثبت BA بر ارتفاع ساقه دور از انتظار نیست. علاوه بر این جیبرلین‌ها اثر تحریک‌کننده هورمون‌های گروه سایتوکنین (مانند BA) را افزایش دادند (Flores, 1993).

جدول ۵- تجزیه واریانس درصد جوانه‌زنی و رویش عادی گیاهچه، طول ریشه و ارتفاع ساقه گیاهچه‌های سرخدار در تیمار ترکیبات و سطوح هورمونی

Table 5. Variance analysis for percentage of germination and normal growth, root length and shoot height of *Taxus baccata* plantlets in hormonal compounds and levels treatment

منبع تغییر Source of variation	درجه آزادی df	میانگین مربعات صفات Mean Square of Trait			
		درصد جوانه‌زنی Germination percentage	درصد گیاهچه‌های عادی Normal plantlets percentage	طول ریشه Root length	ارتفاع ساقه Shoot Height
ترکیبات هورمون Hormone Combination	2	6.43 ns	34.83**	3277.77**	215.97*
سطح هورمون Hormone Level	8	232.96**	224.29**	606.60**	344.205**
ترکیب هورمون ×سطح هورمون Hormone combination × Hormone level	16	95.24 ns	113.46**	466.100**	98.09**
خطاError	52	55.62	4.09	7.76	9.02
ضریب تغییرات(CV)		8.23	4.08	11.54	9.77

ns، * و **: به‌ترتیب غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد

ns, *, **: Not Significant and significant at 5% and 1%, respectively

جدول ۶- مقایسه میانگین اثر متقابل ترکیب × سطح هورمون برای درصد رویش عادی گیاهچه، طول ریشه و ارتفاع ساقه

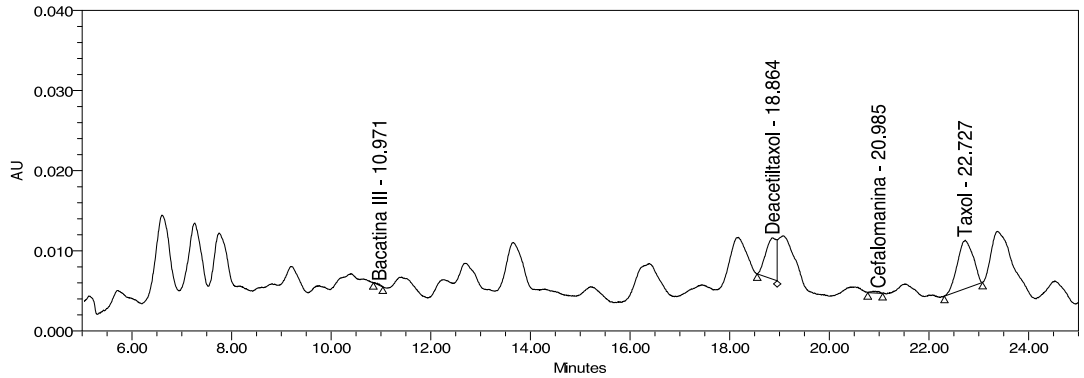
Table 6. Mean comparison of hormone combination × hormone level for percentage of normal growth, root length and shoot height

ترکیب Combination / سطح Level	IBA × BA			IBA × GA3			BA × GA3		
	PNG(%)	RL(mm)	SH(mm)	PNG(%)	RL(mm)	SH(mm)	PNG(%)	RL(mm)	SH(mm)
1	39.91l	19.22ghi	20.22g	35.26m	17.8ghi	20.04g	52.34efg	21.1g	23.12g
2	45.38jk	11.12jkl	33.37cdef	55.60abcde	18.2ghi	37.34bcd	46.25ij	17.55ghi	37.83bc
3	47.25ghij	6.03lm	41.09ab	47.70ghij	15.41ghi	30.55ef	47.74ghij	20.63gh	30.38f
4	52.11efgh	36.12d	20g	54.87bcde	35.08d	21.5g	41.36kl	11.02jkl	30.04f
5	54.13cdef	28.08f	31.5ef	60.79a	38.12d	38.5bc	59.29abc	13.97ijk	39.143b
6	55.93abcde	15.16ij	40ab	50.70efghi	33.20de	31.5ef	59.55ab	10.34jkl	30.65ef
7	54.32cdef	55.13a	20g	53.61def	50.02bc	19.41g	40.25l	6.98lm	40.12ab
8	58.88abcd	45.12c	32.08def	53.70def	53.12ab	36.17bcde	58.54abcd	5.01m	45.29a
9	46.98hij	30.11ef	39.8b	60.14a	49.11bc	29.61f	49.130fghij	8.90klm	37.29bcd

PNG: درصد رویش عادی گیاهچه; **RL:** طول ریشه (برحسب mm); **SH:** ارتفاع ساقه (برحسب mm)

PNG, Percentage of Normal Growth; SH, Shoot Height (mm); RL, Root lenght (mm)

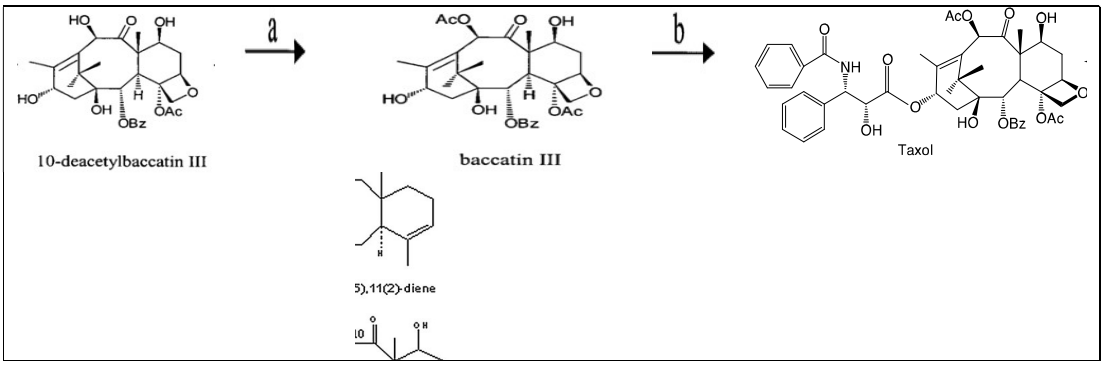
آزمایش چهارم: مقایسه میزان تاکسان‌ها در اندام هوایی و ریشه: منبع استخراج تاکسان‌ها در طبیعت اندام هوایی می‌باشد. کشت جنین‌ها در محیط کشت NN حاوی زغال فعال و ترکیب هورمونی $BA \times GA_3$ (mg ۲ $mg\ L^{-1}\ BA \times ۰/۲ L^{-1}\ GA_3$) که بزگترین طول ساقه را ایجاد نمودند، انجام شد و میزان ۱۰- دی استیل باکاتین III (DABIII), باکاتین III (BACIII)' ۱۰-دی استیل تاکسول (DAT) و تاکسول در طی یک دوره ده ماهه در اندام هوایی و ریشه گیاهچه‌های *T. baccata* توسط آنالیز HPLC تعیین گردید (شکل ۳). DABIII و BACIII واسطه‌های تولید تاکسول هستند که پس از اتصال حلقه جانبی فنیل‌آلانین تبدیل به تاکسول می‌گردند.



شکل ۳- کروتوگرام HPLC :شناسایی پیک‌ها از طریق مقایسه با استانداردهای تاکسان

Figure 3. HPLC chromatogram: Identification of peaks by comparing with taxane standards

گرچه مسیر بیوسنتز DAT تاکنون مشخص نشده است ولی واضح است که این متابولیت تفاوت مختصری با تاکسول داشته و تبدیل این دو به یکدیگر به سهولت رخ می‌دهد (شکل ۴). نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که تفاوت میزان متابولیت‌ها در اندام هوایی و ریشه گیاهچه‌های سرخدار معنی‌دار می‌باشد (جدول ۷). مقایسه میانگین‌ها (شکل ۵) نشان داد تاکسان‌ها در قسمت هوایی بیش‌تر از ریشه می‌باشند. گرچه میزان تمامی تاکسان‌ها در قسمت هوایی و ریشه در هفته پنجم ناچیز است اما به مرور زمان و با رشد ریشه و ساقه به‌تدریج افزایش یافته و در هفته چهلم به اوج خود رسید. بیش‌ترین میزان تاکسان‌ها به‌ترتیب مربوط به DABIII، تاکسول و DAT در اندام هوایی بود که در نقطه پیک تولید در چهل هفتگی مقدار آن‌ها به‌ترتیب به ۳۰۹، ۱۵۰ و ۱۳۰ میکروگرم در لیتر رسید.



شکل ۴- تبدیل پیش‌سازهای ۱۰- دی‌استیل‌باکاتین III و باکاتین III به تاکسول و ۱۰- دی‌استیل‌تاکسول

Figure 4. Conversion of 10-deacetylbaccatinIII and baccatin III precursors to taxol and 10-deacetyltaxol

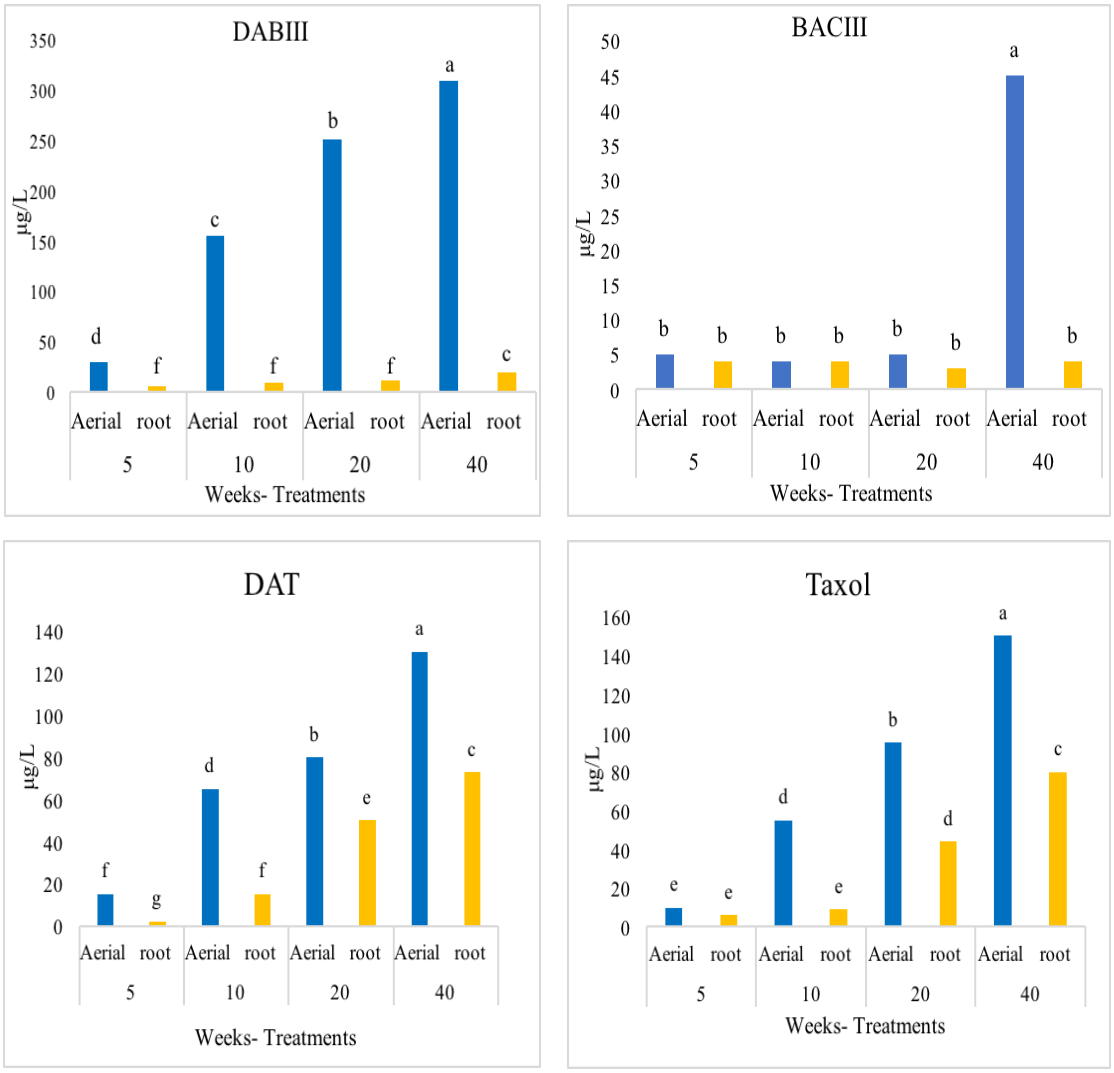
جدول ۷ - تجزیه واریانس میزان Taxol, DAT, BACIII, DABIII طی زمان در اندام هوایی و ریشه گیاهچه‌های سرخدار

Table 7. Variance analysis of DABIII, BACIII, DAT, Taxol during time in aerial part and root part of *Taxus baccata* plantlets

منبع تغییر Source of variation	درجه آزادی df	میانگین مربعات صفات Mean Square of Trait			
		DABIII	BACIII	DAT	Taxol
ریزنمونه Explant	1	182701.5 **	726**	8437.5**	10965.37**
زمان Time	3	24393**	620.5**	9286.4**	13086.33**
زمان× ریزنمونه Explant × Time	3	20366.5**	601**	596.3**	1161.30**
خطا Error	14	16.79	2.84	14.5	45.70
ضریب تغییرات (درصد)(CV%)		4.13	11.16	7.06	12.04

**: معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد

**: significant at 1%



شکل ۵- مقایسه میانگین میزان Taxol, DAT, BACIII, DABIII طی زمان در اندام هوایی و ریشه گیاهچه‌های سرخدار

Table 5. Mean comparison for DABIII, BACIII, DAT, Taxol during time in aerial and root parts of *Taxus baccata* plantlets

برخلاف قسمت هوایی بیش‌ترین میزان تاکسان در ریشه مربوط به DAT و تاکسول بود و DABIII در سطح بعدی قرارگرفت، به‌طوریکه در پیک تولید متابولیت در هفته چهلم میزان تاکسول و DAT به‌ترتیب به ۸۰ و ۷۳ میکروگرم در لیتر رسید درحالی‌که DABIII به‌میزان ۲۰ میکروگرم در لیتر بود. مقدار BACIII تا هفته بیستم ناچیز بوده و در هفته چهلم در اندام هوایی به ۴۵ میکروگرم در لیتر رسید. همچنین مشاهده گردید که مقدار DAT و تاکسول تقریبا در تمامی مراحل اندازه‌گیری بسیار نزدیک به‌هم بوده که می‌تواند به‌علت تبدیل این دو متابولیت به یکدیگر باشد. در کل می‌توان بیان داشت که در قسمت هوایی بیش‌ترین تاکسان، DABIII بوده که با رشد گیاهچه میزان آن افزایش یافت که حاکی از تبدیل کم این پیش‌ساز به تاکسان‌های انتهای مسیر بیوسنتز یعنی DAT و تاکسول بوده و می‌تواند دلیلی برای میزان کم این دو متابولیت در قسمت هوایی باشد. درحالی‌که در ریشه میزان بالای DAT و تاکسول نسبت به DABIII می‌تواند نتیجه تبدیل DABIII به این دو متابولیت باشد. ریشه‌ها در بسیاری از موارد مرکز اصلی تولید متابولیت‌های ثانویه هستند. متابولیت‌های ساخته-شده در ریشه می‌توانند از طریق آوند چوبی به قسمت هوایی انتقال یابند. قبلاً نیز وجود تاکسول در آوندهای چوبی گزارش شده است (Zhiri *et al.*, 1994). متابولیسم تاکسان در ریشه و انتقال آن به اندام هوایی

می‌تواند دلیلی بر میزان کم آن در ریشه باشد (Tafreshi, 2011). قابل تصور است که با افزایش سن گیاهچه و افزایش تعداد سلول‌ها میزان تاکسان‌ها نیز افزایش یابد.

نتیجه‌گیری

بر طبق نتایج به‌دست‌آمده در این تحقیق کاهش غلظت نمک‌های پایه به‌ترتیب در سه محیط کشت MS, MS ۱/۲ و NN موجب بهبود رشد ریشه و رویش عادی گیاهچه‌های *T. baccata* شد. از آن‌جایی‌که تفاوت بین این محیط‌های کشت بیش‌تر در غلظت نمک‌های NH_4NO_3 و KH_2PO_4 می‌باشد، می‌توان استنباط نمود که این دو ماده مطلوب رشد ریشه و رشد عادی گیاهچه‌های *T. baccata* نیستند. همچنین استفاده از زغال فعال یا PVP موجب افزایش بیش‌تر طول ریشه و ساقه و به دنبال آن بهبود نرخ رویش عادی گیاهچه گردید که بیانگر این است که فنول‌ها نقش مهمی در نکروزه‌شدن گیاهچه داشته و مانعی در جهت رویش عادی گیاهچه می‌باشند. تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی نیز گرچه موجب بهبود رویش عادی گیاهچه شدند ولی تأثیر معنی‌داری بر جوانه‌زنی نداشتند که تاییدی است بر این‌که بازدارنده‌ها نه در مرحله جوانه‌زنی بلکه در مرحله رشد گیاهچه‌های تاکسوس نهفته‌اند. از سوی دیگر در اندام هوایی بر خلاف ریشه بیش‌ترین تاکسان DABIII بود که با رشد گیاهچه میزان آن افزایش یافت که حاکی از تبدیل کم این پیش‌ساز به تاکسان‌های انتهای مسیر بیوسنتز یعنی DAT و تاکسول می‌باشد. میزان بالای تاکسان‌ها در اندام هوایی نسبت به ریشه می‌تواند بیانگر این مطلب باشد که که استفاده از کشت ریشه‌های مویین در سرخدار گزینه مناسبی برای تولید تاکسان‌ها نبوده و بهتر است در این زمینه از کشت سوسپانسیون حاصل از اندام هوایی استفاده گردد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از مسئولین پژوهشکده گیاهان دارویی دانشگاه شهید بهشتی قدردانی می‌گردد.

منابع

Abbasin, Z., Zamani, S., Movahedi, S., Khaksar, G. and Sayed Tabatabaei, B.E. 2010. In Vitro Micropropagation of Yew (*Taxus Baccata*) and Production of Plantlets. Biotechnology, 9(1):45-48. **(Journal)**

Binet, M.N., Lemoine, C., Chambon, C. and Gianinazzi, S .2007. Micropropagation of olive (*Olea europaea l)* and application of mycorrhiza to improve plantlet establishment. In vitro cellular and development biology-plant, 43: 473-478. **(Journal)**

Chang, S.H. and Yang, J.C. 1996. Enhancement of plant formation from embryo cultures of *Taxus maieri* using suitable culture medium and PVP. Academia sinica, 37: 35–40. **(Journal)**

Chang, S.H., Ho, C.K., Chen, Z.Z. and Tsay, J.Y. 2001. Micropropagation of *Taxus mairei* from mature trees. Plant cell reports, 20: 496-502. **(Journal)**

Chee, P.P. 1994. In vitro culture of zygotic embryos of *Taxus* species. Horticultural science ,29: 695–697. **(Journal)**

Chee, P.P. 1995a. Organogenesis in *Taxus brevifolia* Tissue Cultures. Plant cell reports, 14: 560–565. **(Journal)**

Chee, P.P. 1995b. Stimulation of adventitionus rooting of *Taxus* species by thiamine. Plant cell reports, 14: 753–757. **(Journal)**

Chein, C.T., Kuo-Huang L.L. and Lin, T.P. 1997. Changes in Ultrastructure and Abscisic Acid Level, and Response to Applied Gibberellins in *Taxus mairei* Seeds Treated with Warm and Cold Stratification. Annals of botany, 81: 41-47. **(Journal)**

Choi, M.S. 2000. In vitro germination and propagation by embryo culture of *Taxus cuspidata* for the taxol production. Plant biotech, 2: 29-33. **(Journal)**

Cragg, G.M. and Newman, D.J. 2005. Plants as a source of anti-cancer agents. Ethnopharmacolojy,100:72–79. **(Journal)**

Datta, M.M. and Jha, S. 2004. Embryo culture of *Taxus wallichiana*. Plant biotechnology, 6(4): 213-219. **(Journal)**

Davarpanah, S.J., Lahouti, M. and Karimian, R. 2014. Micropropagation of common yew using embryo culture. Applied biotechnology reports, 1(2): 77- 80. **(Journal)**

Flores, T., Wagner, L.J. and Flores, H.E. 1993. Embryo culture and taxane production in *Taxus* spp. In vitro cellular and development biology-plant, 29: 160– 165. **(Journal)**

Garcia, D., Zamora, R., Hodar, J.A., Jose, Gomez., J.M. and Castro, J. 2000. Yew (*Taxus baccata L*.) regeneration is facilitated by fleshy-fruited shrubs in mediterranean environments. Biological conservation, 95(1): 31– 38. **(Journal)**

Hu, C.Y., Wang, L. and Wu, B. 1992. In vitro culture of immature *Taxus* embryos. Horticultural science, 27(6):210-214. **(Journal)**

ISTA, M. 2003. International Rules for Seed Testing. Working sheets on tetrazolium testing. Seed science and technology, 2:149 pp. **(Journal)**

ISTA, M. 1999. International Seed Testing Association. International Rules for Seed Testing, seed science and technology, 27:180 pp. **(Handbook)**

Jiaru, L., Manxi, C.H. Zhenbin., W. and Junjian, W. 1999. Callus initation and subculture of Taxus chinensis. Plant cell reports, 10:11-14. **(Journal)**

Le Page-Degivry, M.T. 1973. An embryo-culture study of embryo dormancy in *Taxus baccata*. Biologia plantarum, 15: 264–269. **(Journal)**

Liao, Z., Gong, Y., Pi, Y., Chen, M. and Tan, Q. 2006. Rapid and efficient in vitro germination of embryos from *Taxus media Rehender*. Assian journal of plant sciences, 5(1):139-141. **(Journal)**

Liguo, F., Nan, L., Mill, R.R. and Raven, P.H. 1999. Taxaceae in Zhengyi Flora China. Science press and missouri botanical garden, 14: 89-96. **(Journal)**

Majda, J.P., Sierra, M.I. and Sanchez-Tames, R. 2000. One step more towards taxane production through enhanced *Taxus* propagation. Plant cell reports, 19: 825–830. **(Journal)**

Mysterud, A. and Østbye, E. 2004. Roe Deer (Capreolus capreolus) Browsing pressure affects yew (*Taxus baccata*) recruitment within nature reserves in Norway. Biological conservation, 120: 545–548. **(Journal)**

Murashige, T. and Skoog F.A. 1962. Revised medium for rapid growth and bioassays with Tobacco cultures. Physiologia plantarum, 15: 473–497. **(Journal)**

Nasiri, J., Naghavi, M.R., Alizadeh, H., Moghadam, M.R.F., Mashouf, A. and 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 physiologia plantarum, 37:1–15. **(Journal)**

Patil, R.A., Lenka, S.K., Normanly, J., Walker, E.L. and Roberts, S.C. 2014. Methyl jasmonate represses growth and affects cell cycle progression in cultured *Taxus* cells. Plant cell reports, 33:1479–1492. **(Journal)**

Song, L.L., Zhang, H.N., Zhao, H.Q., Jiang, Y.L. and Hou, M.F. 2014. In vitro germination and seedling development of *Taxus chinensis* var. mairei by embryo culture. Agricultural science and technology, 16: 1355-1363. **(Journal)**

Tafreshi, S.A., Shariati. M., Mofid, M. and Nekui, M.K. 2011. Rapid germination and development of *Taxus baccata L*. by in vitro embryo culture and hydroponic growth of seedlings. In vitro cellular and developmental biology-plant, 47:561–568. **(Journal)**

Thomas, P.A. and Polwart, A. 2003. *Taxus baccata* L. Journal of ecology, 91:489-524. **(Journal)**

Wang, Y.F., Shi, Q.W., Dong, M., Kiyota, H., Gu, Y.C. and Cong, B. 2011. Natural taxanes: developments since 1828. Chemical reviews, 111:7652–7709. **(Journal)**

Zarek, M. 2007. A practical method for overcoming the dormancy of *Taxus baccata* isolated embryos under in vitro conditions. In vitro cellular and developmental biology-plant, 43: 623-630. **(Journal)**

Zhao, C., Song, G., Fu, C., Dong, Y., Xu, H., Zhang, H. and YuL, J. 2015. A systematic approach to expound the variations in taxane production under different dissolved oxygen conditions in *Taxus chinensis* cells. Plant cell reports, 29: 1–19. **(Journal)**

Zhiri, A., Jaziri, M., Homes, J., Vanhaelen, M. and Shimomura, K. 1994. Factors affecting the in vitro rapid germination of *Taxus* embryos and the evaluation of taxol content in the plantlets. Plant cell tissue organ culture, 39: 261–263. **(Journal)**

Seedling growth optimization and investigation of taxane production in *Taxus baccata L.* via in vitro culture

Mahsa Bamneshin[1], Abdollah Hatamzadeh[2*], MohammadReza Naghavi[3], Mohammad Hosein Mirjalili[4]

Received: October 26, 2020 Accepted: January 8, 2021

Abstract

Yew (*Taxus baccata* L.) has diterpenoid compounds with anti-cancer effects therefore it is one of the most well known medicinal plants that is in danger of extinction. In this study, which was conducted at the Research Institute of Medicinal Plants of Shahid Beheshti University, the effect of culture medium (MS, 1/2MS and NN), phenolic absorbents (PVP and activated charcoal) and plant growth regulators (IBA, GA_3 and BA) was investigated in a factorial design with three replications, with the aim of improving germination and growth of seedlings in in vitro culture. In the following, taxane production was measured in plantlets that were grown in select medium for ten months. According to our results, NN culture medium due to lower concentration of basal salts had no significant effect on germination percentage but increased root length and normal seedling growth percentage. Also supplementing the media with phenolic absorbent extended root length and shoot height as well as increasing normal seedling growth rate. In using PGRs, the highest normal seedling growth rate, shoot height and root length was obtained respectively from IBA × GA3 (0.2 mg/l gibberellic acid × 0.01 mg/l indole butyric acid), IBA × BA (0.2 mg/l gibberellic acid × 2 mg/l benzyl adenine) and 0.1 mg/l indole butyric acid, while PGRs had no significant differences in germination rate. Also, the amount of taxan in the aerial part was higher than the root and the highest taxan in the aerial part was 10-deacetylbaccatinIII and in the root were taxol and 10-deacetyltaxol, the maximum of all was achieved at the end of the experiment. Overall, the results indicate the positive effect of activated charcoal, PGRs and reducing culture medium macronutrients on root length, shoot height and the normal growth process of *Taxus baccata* seedling, in order to increase the yeild of yew propagation under in vitro culture condition. The cell culture obtained from the aerial part is much better than the hairy root cell culture.

Keywords: Culture medium; Taxan; Taxol; Yew

How to cite this article

Bamneshin, M., Hatamzadeh, A., Naghavi, M.R. and Mirjalili, M.H. 2021. Seedling growth optimization and investigation of taxane production in *Taxus baccata L.* via in vitro culture. Iranian Journal of Seed Science and Research, 8(1): 77-89. (In Persian)**(Journal)**

DOI: 10.22124/jms.2021.5212

COPYRIGHTS

Copyrights for this article are retained by the author(s) with publishing rights granted to the Iranian Journal of Seed Science and Research

The content of this article is distributed under Iranian Journal of Seed Science and Research open access policy and the terms and conditions of the Creative Commons Attribution 4.0 International (CC-BY4.0) License. For more information, please visit http://jms.guilan.ac.ir/

1. Ph.D. Student, Agricultural Biotechnology, University Campus, University of Guilan, Rasht, Iran. mahsabamneshin@yahoo.com
2. Professor., Department of Horticultural Sciences, College of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran. hatamzadeh@guilan.ac.ir
3. Professor., Department of Agronomy and Plant Breeding, Agricultural and Natural Resources Campus, University of Tehran, Karaj, Iran. mnaghavi@ut.ac.ir
4. Associate Professor., Department of Agriculture, Medicinal Plant and Drugs Research Institute, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran. m-mirjalili@sbu.ac.ir

*Corresponding author: hatamzadeh@guilan.ac.ir