Winter (2022) 12(40): 41-48
DOI: 10.30473/cb.2023.66898.1901
Received: 30 Dec 2022 Accepted: 15 Mar 2023

Crop Biotechnology Open Access

ORIGINAL ARTICLE

Shortening the germination time of Iranian yew (*Taxus baccata sp.*) through embryo culture

Hooshang Goharchini[1*], Khadijeh Bagheri [2], Mohammad Reza Zamani [3]

[1] Lecturer, Payame Noor University, Tehran, Iran.
[2] Department Genetics and plant products, Agriculture faculty, Zanjan University, Zanjan. Iran.
[3] Prof. of Noor Danesh Institute of Higher Education, Mimeh, Isfahan, Iran.

Correspondence
Hooshang Goharchini
Email: hgohar129@pnu.ac.ir

ABSTRACT
Yew plant is the main source of Taxol drug production. Paclitaxol with the brand name Taxol is the main drug in the treatment of various cancers. This plant has a long dormancy and difficult germination and due to the, high demand and indiscriminate harvesting in some areas, there is a risk of extinction of this very important plant. According to these conditions, it is necessary to use the biotechnology tools such as tissue culture and embryo culture to produce new seedlings for propagation and use them in other laboratory studies. In this research, first in the form of a completely randomized experiment design with 48 treatments and three repetitions, it was determined that the treatment of 21 days of keeping the seeds in water and growing them on ½ WPM. cultivation environments have the highest germination. In the next step, in order to shorten the germination time, the embryos were isolated in a sterile environment kept in sterile double distilled water on a refrigerated shaker for 5 days at a temperature of 4°C and cultured in two cultivation environments ½ WPM and ½ MS Variance analysis revealed that there is no significant difference between treatments in germination speed, so it can be concluded that young and fresh seedlings can be obtained in less time with this method.

KEYWORDS
Taxol, Yew, Embryo culture, Taxol, Yew.

How to cite
Goharchini, H., Bagheri, Kh., & Zamani M.R. (2022). Shortening the germination time of Iranian yew (*Taxus baccata* sp.) through embryo culture. *Crop Biotechnology, 12*(40), 41-48.

© 2023, by the author(s). Published by Payame Noor University, Tehran, Iran.
This is an open access article under the CC BY 4.0 license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

سال دوازدهم، شماره دوم، پیاپی چهلم، اسفند ۱۴۰۱ (۴۸-۴۱)

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۰/۰۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۲/۲۵

DOI: 10.30473/cb.2023.66898.1901

نشریه علمی

زیست‌فناوری گیاهان زراعی

«مقاله پژوهشی»

کوتاه‌تر نمودن زمان جوانه‌زنی سرخدار ایرانی (*Taxus baccata sp.*) از طریق کشت جنین

هوشنگ گوهرچینی[1]*، خدیجه باقری[2]، محمدرضا زمانی[3]

[1] مربی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران.

[2] دانشیار گروه ژنتیک و تولیدات گیاهی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران.

[3] استاد، موسسه آموزش عالی نور دانش، میمه، اصفهان، ایران.

نویسنده مسئول:

هوشنگ گوهرچینی

رایانامه: hgohar129@pnu.ac.ir

چکیده

گیاه سرخدار منبع اصلی تولید داروی تاکسول است. پاکلی تاکسول با نام تجاری تاکسول داروی اصلی در درمان سرطان‌های مختلف می‌باشد. بذر این گیاه دارای خواب طولانی و جوانه‌زنی سخت است و به علت تقاضای بالا و برداشت بی‌رویه در بعضی مناطق خطر انقراض این گیاه مهم وجود دارد. با توجه به این شرایط، استفاده از ابزارهای بیوتکنولوژی همچون کشت بافت و کشت جنین برای تولید نهال‌های تازه به‌منظور تکثیر و به‌کارگیری این گیاهان تازه در سایر مطالعات آزمایشگاهی ضروری است. در این پژوهش ابتدا در قالب یک طرح آزمایش کاملاً تصادفی با ۴۸ تیمار و سه تکرار مشخص شد که تیمار ۲۱ روز نگهداری بذرها در آب و کشت آن‌ها روی محیط کشت ½ WPM تغییریافته بالاترین جوانه‌زنی را دارد. در گام بعدی برای کوتاه‌تر نمودن زمان جوانه‌زنی، جنین‌ها در محیط استریل جدا شدند و در آب مقطر دو بار استریل روی شیکر یخچال‌دار به مدت ۵ روز در دمای ۴ سانتی‌گراد نگهداری و سپس در دو محیط کشت ½WPM و ½MS کشت شدند. پس از تجزیه واریانس داده‌ها مشخص شد که اختلاف معنی‌داری بین تیمارها در سرعت جوانه‌زنی وجود ندارد پس می‌توان نتیجه گرفت با این روش می‌توان در مدت‌زمان کمتری به گیاهچه‌های جوان و تازه دست یافت.

واژه‌های کلیدی

تاکسول، سرخدار، کشت جنین، محیط کشت.

استناد به این مقاله:

گوهرچینی، هوشنگ، باقری، خدیجه و زمانی، محمدرضا (۱۴۰۱). کوتاه‌تر نمودن زمان جوانه‌زنی سرخدار ایرانی (*Taxus baccata sp.*) از طریق کشت جنین. فصلنامه علمی زیست فناوری گیاهان زراعی, ۱۲(۴۰), ۴۸-۴۱.

مقدمه

پاکلی تاکسول (با علامت تجاری تاکسول) یک ایزوپرونئد طبیعی است که از گیاه سرخدار گرفته می‌شود و دارای خاصیت ضدسرطانی قوی است. اولین‌بار در سال ۱۹۶۷ از درخت سرخدار اقیانوس آرام جدا شد (Li *et.al.* 2014). در سال‌های اخیر، این‌گونه به‌منظور تولید تاکسول که مؤثرترین و گران‌ترین داروی ضدسرطان در جهان است بسیار مورد تقاضا است (Kumar *et al*., 2010).

در محیط طبیعی، ویژگی‌هایی مانند جدا بودن گل نر و ماده، گل تک‌جنسیتی و گرده‌افشانی متقابل باعث باردهی پایین گیاه می‌شود. جوانه‌زنی طبیعی بذر سرخدار معمولاً در ۱/۵ تا ۲ سال پس از جمع‌آوری اتفاق می‌افتد که منجر به سرعت جوانه‌زنی کم، فراوانی کم بقا و کاهش فراوانی جمعیت می‌شود (Ru et al., 2008). رویکردهای جدیدی برای حفاظت و تکثیر این گیاه ارزشمند باید ایجاد کرد. تکثیر غیرجنسی یک روش مناسب برای تکثیر است، اما به یک سال زمان نیاز است (Chang and Yang; 1996;Majada.;*et.al*., 2000; sahai and Sinha, 2021).

سرخدار به‌صورت طبیعی در معرض آسیب شدید و انقراض است (Ru et al., 2008). کشت جنین، نجات جنین و به‌دست‌آوردن گیاهان از تلاقی بین ارقام بدون دانه یک روش مفید برای غلبه بر خواب بذر و کوتاه کردن چرخه پرورش است (Razi et al., 2013). در گیاهان چوبی، زمانی که بذرها برای جوانه‌زنی به دوره بهاره‌سازی ۳-۲ ماهه نیاز دارند این روش برای کاهش چرخه تولید مناسب است (Kaur et al., 2006).

با توجه به این مشکلات،کشت جنین امیدوارکننده‌ترین روش است. به‌طور طبیعی، برای شکستن خواب بذر سرخدار حداقل دو فصل انجماد طولانی قبل از جوانه‌زدن نیاز است . بهاره‌سازی در دماهای پایین می‌تواند به غلبه بر این خواب کمک کند (Hartzell, 1991). طبق مطالعات انجام‌شده، مشخص شده است که جوانه‌زنی در شرایط آزمایشگاهی به دماهای متناوب و بهاره‌سازی سرد به مدت ۸/۵ ماه برای رسیدن به ۵۰ درصد جوانه‌زنی نیاز است (Chang and Yang, 1996).

مطالعات کشت جنین در *T.mairei* , *T. Canadensis*, *T. baccata* و*T. cuspidate* نشان داده که ترکیب محیط کشت یک معیار مهم و حیاتی است. با استفاده از محیط نیمه‌موراشیگ و اسکوگ (1/2 MS) به‌همراه ۰/۸گرم در لیتر پلی وینیل پیرولیدون (PVP)، ۹۰ درصد بذرها جوانه زدند و تبدیل به گیاهچه‌های خوب و توسعه‌یافته شدند. همچنین محیط 1/2 MS به‌همراه اسیدجیبرلیک (GA3) جوانه‌زنی بذر را تا ۴۵ درصد افزایش داد (Chang and Yang.; 1996). محیط کشت چوبی WPM به‌اضافه ۵ گرم در لیتر زغال فعال و ۲۰ گرم در لیتر ساکارز بهترین محیط برای کشت جنین *T. baccata* است و باعث جوانه‌زنی ۶۵ درصد بذور می‌شود (Majada *et al*., 2000).

در بررسی کشت جنین زیگوتیک از دانه‌های نابالغ و بالغ سرخدار هیمالیا، *Taxus wallichiana* مشخص گردید که اگر جنین‌ها به مدت ۵ هفته در تاریکی نگهداری شوند به‌سرعت جوانه می‌زنند و در عرض ۱۲-۱۰ هفته به گیاهچه‌های کامل تبدیل می‌شوند. بیشترین میزان جوانه‌زنی جنین (۸۱٪) در محیط WPM 1/2 اصلاح‌شده لوید و مک کاون[1] حاوی نصف مقدار عناصر ماکرو و ریزمغذی همراه با ۱٪ زغال چوب فعال به دست آمد که بهترین رشد جنینی (۴۳٪) و همچنین رشد گیاهچه (۳۲٪) را ایجاد کرد. بهاره‌سازی بذرها بر جوانه‌زنی جنین تأثیر گذاشت. بذرهایی که به مدت ۱ هفته در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شدند، بدون توجه به مرحله بلوغ بذر، زودتر و با فراوانی بیشتری جوانه زدند، درحالی‌که سرعت جوانه‌زنی با تیمار سرد به مدت ۱ ماه در همان دما کاهش یافت.(Mukul and Sumita, 2004)

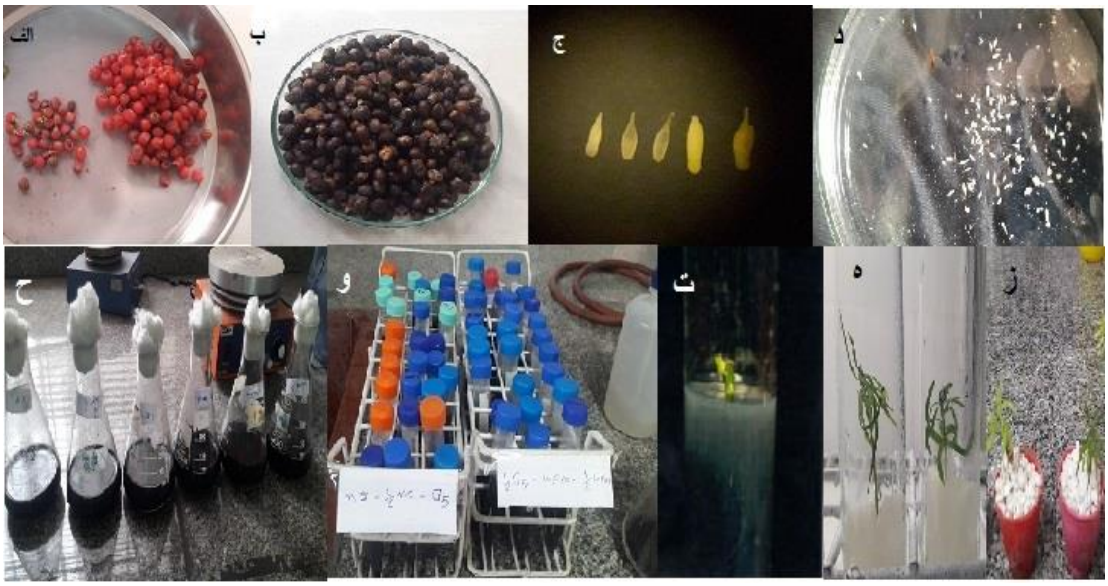
اثرات ترکیبات مختلف محیط کشت، غلظت زغال فعال و اسید جیبرلیک بر روی کشت جنین *Taxus baccata* L . مورد بررسی قرار گرفته است. از محیط کشت 1/2 MS و زغال فعال در غلظت‌های ۰، ۲، ۴ و ۶ گرم در لیتر استفاده‌شده و براساس داده‌های به‌دست‌آمده محیط کشت 1/2 MS به‌همراه ۲ گرم در لیتر زغال چوب فعال به نظر می‌رسد که محیط کشت مناسبی برای کشت جنین باشد (Davarpanah *et.al*.,.2014).

مواد و روش‌ها

از درختان سرخدار واقع در پردیس کشاورزی دانشگاه تهران بذور تازه در مهرماه جمع‌آوری شد (شکل ۱- الف)؛ چون دارای آریل قرمز و بافت گوشتی بودند؛ در زیر آب شیر اقدام به سابیدن بذور در روی غربال‌های استیل شد تا آریل‌ها کاملا جدا گردند (شکل۲- ب). در ۴ ارلن ۱۰۰ میلی‌لیتری، ۱۵۰ بذر به‌صورت تصادفی از بین بذور سالم انتخاب شدند و روی آن‌ها آب مقطر ریخته شد تا کاملا در زیر آب قرار گیرند و هر روز آب ارلن‌ها عوض شد و به‌ترتیب بعد از ۱۴،۷ و ۲۱ روز و یکی نیز بدون آب، همگی در یخچال (به‌عنوان شاهد) در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سپس برای ضدعفونی، بذور در زیر لامینار جریان هوای آرام یک دقیقه در اتیل الکل ۷۰ درصد (v/v) و سپس ۲۰ دقیقه در هیپو کلریت سدیم ۱/۵ درصد (w/v) قرار داده شدند، سپس با آب مقطر دو بار استریل سه‌بار و هربار به‌مدت یک دقیقه شستشو داده شدند و بعد از آن جنین‌ها جدا شدند. برای

1. Lloyd & McCown's Woody Plant Medium (1981)

این‌کار، ابتدا بذر به‌صورت عمود بر محور لپه در داخل پنس انبری قرار داده شد و سپس با تیغ جراحی به دو نیم تقسیم شدند. توجه داشته باشید باید بذر به دو نیمهٔ نامساوی تقسیم گردد؛ زیرا جنین در وسط قرار گرفته و اگر بذر از وسط برش بخورد به جنین آسیب خواهد رسید. سپس به‌وسیله اسکالپل نوک‌تیز، جنین از لپه‌ها جدا شد (شکل ۱. ج). جنین‌های جداشده بر روی محیط‌های کشت MS, ½MS(Murashige & Skoog 1962).B5, *al*1968) WPM(Lloyd & McCown's Woody Plant Medium (1981), ½ WPM, ½B5(Gamborg, *et* کشت شدند. لازم به ذکر است که عناصر ماکرو در محیط‌های ½ نصف مقدار اصلی بودند و همچنین به تمام محیط‌ها یک گرم در لیتر کازئین هیدرولیزات، عصاره مخمر و زغال فعال و ۲۰ گرم در لیتر ساکارز و ۰/۱ گرم در لیتر اسید اسکوربیک اضافه شد و درنهایت برای جامد شدن محیط‌ها ۴ گرم در لیتر آگار اضافه شد و pH محیط روی ۵/۸ تنظیم شد. محیط‌های کشت به دو قسمت تقسیم شدند و نیمی از آن‌ها در شرایط کاملا تاریک نگهداری شدند و نیمهٔ دیگر آن‌ها در شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. دمای محیط ۲۵ درجه سانتیگراد و رطوبت روی ۶۰ درصد تنظیم شد (شکل۱–د). به این‌ترتیب ۴۸ تیمار مختلف که شامل ۷،۱۴،۲۱ و صفر روز آبشویی و ۶ نوع محیط کشت مختلف شامل MS, ½MS, WPM, ½WPM, B5, ½B5 در دو حالت نگهداری بعد از کشت در تاریکی و روشنایی مشخص گردید و برای هر تیمار سه تکرار درنظر گرفته شد. برای مشخص‌نمودن سرعت جوانه‌زنی و تبدیل به گیاهچه به‌این‌ترتیب عمل شد که هر روز محیط‌های کشت بررسی شد؛ تعداد روزهایی که اولین نشانه‌های متورم‌شدن جنین‌ها ظاهر گردید، یادداشت شد و سپس در صورت ظاهر شدن تنها اندام هوایی یا ریشه در ۰/۵ و در صورت ظاهر شدن هر دو در عدد ۱ ضرب شدند و درنهایت در درصد جنین‌های هر واحد آزمایشی که این مراحل را طی نمودند، ضرب شدند؛ زیرا در هر محیط سه جنین وجود داشت که ممکن بود یکی یا دو یا هر سه رشد کنند. عدد به‌دست‌آمده برای هر واحد آزمایش را یادداشت نموده و سپس تجزیه واریانس آن‌ها با استفاده از نرم‌افزار اکسل و SPSS و با استفاده از آزمون دانکن مقایسه میانگین‌ها انجام شد. بعد از مشخص‌شدن نتایج، محیط کشت‌هایی که بالاترین جوانه‌زنی و تولید گیاهچه را داشتند، انتخاب شدند تا با اعمال تیمارهای جدید زمان جوانه‌زنی و تولید گیاهچه را کوتاه‌تر کرد. در این آزمایش در یکی از تیمارها بذور را به مدت ۳۰ دقیقه در اسیدسولفوریک ۶۵ درصد غوطه‌ور نموده سپس در زیر لامینار جنین بذور ضدعفونی شده را جدا کرده و در ارلن‌های استریل قرار داده شدند و روی آن‌ها آب مقطر دو بار استریل ریخته شد و روی شیکر یخچال‌دار به مدت ۵ روز با سرعت ۶۰ دور در دقیقه نگهداری شدند. همانند قبل سرعت جوانه‌زنی و تولید گیاهچه اندازه‌گیری شد و تجزیه واریانس براساس یک طرح کاملاً تصادفی با ۶ تیمار که شامل دو نوع محیط کشت ½MS, ½WPM بود و سه نوع شستشو که شامل بدون شستشو و ۲۱ روز شستشوی ساده و روش ذکر شده بود و برای هر تیمار ۱۰ تکرار در نظر گرفته شد و نمونه‌ها در شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. تجزیه واریانس نتایج به‌دست‌آمده و مقایسه میانگین‌ها انجام شد.



شکل ۱. الف: بذور رسیده جمع‌آوری‌شده با آریل قرمز. ب: بذور بعد از جدا شدن آریل گوشتی ج: جنین بذور با تیمارهای مختلف در زیر برجسته بین د: جنین‌های جدا شده برای یک تکرار ح: تهیه ۶ نوع محیط کشت مختلف و: کاشت در لوله‌های آزمایش با درپوش پیچی ت: رشد اولیه جنین در محیط کشت بعد از دو ماه ه: نهال‌های رشد کرده بعد از سه ماه ز: نهال‌های ۴–۵ ماه

نتایج و بحث

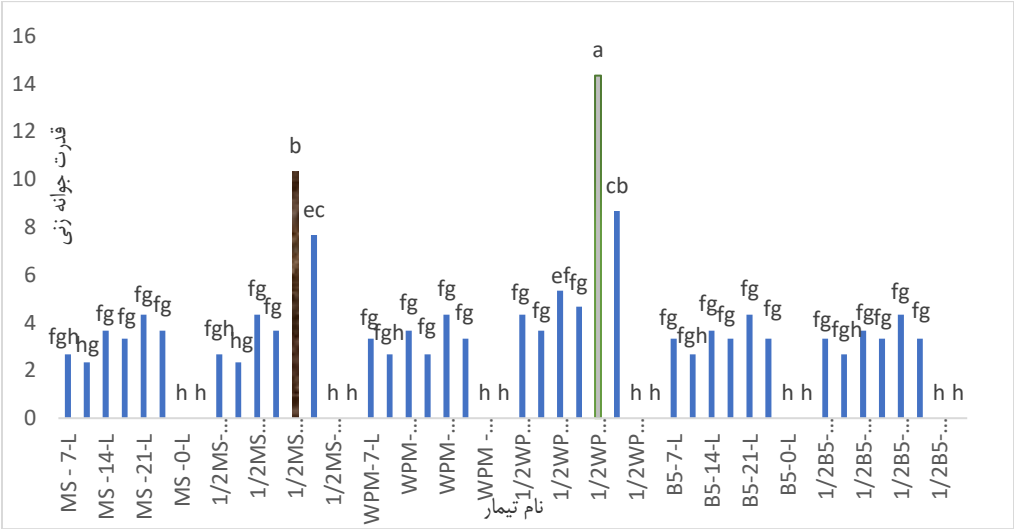
پس از جمع‌آوری داده‌ها از آزمایش اول با ۴۸ تیمار مختلف و ۳ تکرار تجزیه واریانس روی داده‌ها انجام شد. نتایج آن در جدول-۱ آورده شده است. نتایج نشان داد که بین تیمارها در سطح ۱ درصد اختلاف معنی‌داری وجود دارد. معنی‌دار شدن اختلاف بین تیمارها بیانگر این است که به‌کارگیری تیمارهای مختلف ازجمله نوع محیط کشت، شستشوی بذور با زمان‌های متفاوت و شرایط نگهداری در تاریکی و روشنایی بعد از کاشت در محیط کشت می‌تواند بر سرعت جوانه‌زنی و تولید نهال‌های جوان تأثیرگذار باشد. در مطالعات قبل نیز مشخص شد که موفقیت کشت جنین به عوامل متعددی ازجمله ژنوتیپ، مرحله رشد جنین در جداسازی، شرایط رشد گیاه مادری، ترکیب محیط‌های غذایی، دسترسی به اکسیژن، نور و دما بستگی دارد(Pierik, 1987). در این پژوهش نیز با تغییر محیط کشت ترکیبات غذایی و با تغییر شرایط نگهداری، نور و دما تغییر یافته است و این نتایج با نتایج مطالعات انجام‌شده یکسان هستند. همچنین پژوهشگران دیگری گزارش کردند که جوانه‌زنی جنین‌های سرخدار در شرایط آزمایشگاهی و تبدیل‌شدن آن‌ها به نهال به درجه رشد بذرها، اجزای محیط کشت و شرایط نوری بستگی دارد (Flores and Sgrignoli, 1991; Flores *et al*.1993; Zhiri *et al*., 1994).

جدول ۱. تجزیه واریانس آزمایش اول با ۴۸ تیمار و۳ تکرار

منابع تغییر	درجه آزادی(df)	میانگین مربعات(MS)	F
تیمار (t)	۴۷	۲۴/۴۹	۱۵/۹۹**
خطا(e)	۹۶	۱/۵۳	
CV	۳۸/۷۴		

** نشان‌دهنده این است که تیمارها در سطح ۱ درصد معنی‌دار شده‌اند.

مقایسه میانگین‌ها بر اساس آزمون دانکن نشان داد (شکل ۲) تیمار شماره ۲۹(1/2WPM-21- L) مؤثرترین تیمار برای سرعت جوانه‌زنی و تولید نهال در کشت جنین سرخدار ایرانی است. از خصوصیات این تیمار محیط کشت WPM ½ است که در بین محیط کشت‌های مورد استفاده در این آزمایش غلظت یونی پایین‌تری دارد و چون به‌صورت نیمه نیز به‌کار رفته غلظت یونی آن پایین‌تر نیز می‌آید (McCown and Sellmer,1987). خصوصیت دوم این تیمار ۲۱ روز شستشو بوده که بیشترین روز شستشو را دارد و خصوصیت سوم نیز نگهداری در روشنایی است. این تیمار با این خصوصیات بهترین عملکرد را در تولید نهال داشت که در بررسی‌های مختلف به آن‌ها اشاره‌شده است در پژوهشی دیگر مشخص گردید که محیط WPM محیطی بهینه برای جوانه‌زنی و رشد سرخدار چینی (*T. chinensis* var *mairei*) است (*Zeng et al*., 2010).



شکل ۲. نمودار مقایسه میانگین‌ها براساس آزمون دانکن. حروف مشترک نشان‌دهنده معنی‌دار نبودن اختلاف بین تیمارها در سطح ۵ درصد است. هر تیمار با سه پارامتر مشخص گردیده است؛ اول نوع محیط کشت، دوم تعداد روز شستشو و سوم L به‌معنای روشنایی و D به‌معنای تاریکی

در بررسی دیگر مشخص شد که افزودن ترکیبات آلی برای بهبود رشد و تمایز در کشت‌های گیاهی در شرایط آزمایشگاهی می‌تواند مؤثر باشد (Al-Khayri, 2011). در بررسی اثر کازئین هیدرولیزات و عصاره مخمر بر جوانه‌زنی جنین و رشد گیاهچه *T. chinensis var. mairei* اثر مثبت این ترکیبات مشخص گردید؛ ولی در مطالعه‌ای دیگر بر روی *Taxus baccata* L.، مشخص شد که هیدرولیزکازئین و عصاره مخمر هیچ تأثیری بر جوانه‌زنی جنین‌های کشت‌شده ندارند (Zarek, 2007). در بررسی ما از هیدرولیز کازئین و عصاره مخمر استفاده شد، اما مورد برسی قرار نگرفت که آیا مؤثر بوده یا نه که می‌تواند در پژوهش دیگر اثر آن‌ها مورد مقایسه قرار گیرد.

تیمار دوم به‌عنوان دومین تیمار مناسب در مقایسه میانگین دانکن تیمار 1/2MS-21-L بود که محیط کشت به‌کار رفته MS ½ و شرایط ۲۱ روز شستشو و روشنایی بود که در دو خصوصیت شتشو و شرایط نگهداری با تیمار اول مشابه هستند و بررسی سایر تیمارها این را نشان می‌دهد که شستشوی ۲۱ روزه و نگهداری در روشنایی در سرعت جوانه‌زنی و تولید نهال مؤثر بوده است. در این تیمار نیز مشاهده شده محیط کشت با غلظت یونی پایین‌تر در جوانه‌زنی و تولید گیاهچه مؤثرتر بود. به‌طور کلی در بررسی مقایسه میانگین‌ها مشخص شد شستشو و نگهداری در روشنایی و پایین‌بودن غلظت یونی محیط‌های کشت به‌کار گرفته در جوانه‌زنی و تولید گیاهچه در کشت جنین سرخدار ایرانی مؤثرتر است. در بررسی منابع مشخص گردید که ژیری و همکاران در یک مطالعه بر روی جوانه‌زنی سرخدار، بذرها را به مدت ۳، ۷، ۱۵ و ۳۰ روز زیرآب روان قرار داده و در محیط کشت‌های مختلف کشت نمودند و به دو محیط کشت تغییریافته، ۱ گرم هیدرولیزات کازئین، ۱ گرم عصاره مخمر، ۱۰/۰ گرم اسیداسکوربیک و ۵ گرم زغال فعال اضافه و به همه محیطها ۲ درصد ساکارز اضافه نمودند و اثر شستشو در زیر آب روان را بررسی نمودند. در نتایج ایشان مشخص گردید که شستشو،خواب جنین را می‌تواند از بین ببرد و جوانه‌زنی به آن وابسته است. به نظر می‌رسد شستشوی بذر و به‌دنبال آن جداسازی دانه‌ها با شکستن خواب در دانه‌های سرخدار مرتبط باشد که ممکن است با سرکوب یک مهارکننده درون‌زا در دانه‌های سرخدار ارتباط داشته باشد. همچنین بیان نمودند که جوانه‌زنی جنین به ترکیب محیط کشت بستگی دارد. در محیط کشت هلر، جوانه‌زنی پس از ۱۵ روز کشت با کارایی ۲۰ درصد آغاز شد و بعد از ۶۰ روز، جنین‌ها روی همه محیط‌های پایه جوانه زدند. در محیط کشت هلر نیز تا مقدار ۵۰ درصد جوانه زدند. در مقابل، در محیط H^+ (هلر تغییر یافته) MS^+ (MS تغییریافته) مقدار جوانه‌زنی بعد از ۷ روز شستشو ۱۰۰ درصد بود (Zhiri A.; *et.,al.*, 1994). این نتایج با نتایج به‌دست‌آمده ما یکسان هستند. البته باید یادآور شد که در این آزمایش به علت دسترسی نداشتن به آب روان دائمی،از آب روان برای شستشو استفاده نشد، و اگر هم از آب شیر استفاده می‌شد باعث مصرف بیش از حد آب شرب می‌شد، لذا روزانه آب روی بذور تازه می‌شد و در آب تازه شستشو می‌شدند و به نظر می‌رسد همین موضوع باعث شد که بذور در این آزمایش در زمان طولانی‌تری به جوانه‌زنی برسند. نهال‌های مناسب که در شکل ۱ مشاهده می‌شود تقریبا بعد از ۵ ماه به دست آمدند و نهال‌های به‌دست‌آمده دارای توانایی رشد اندام هوایی و ایجاد ریشه‌های مناسب بودند.

برای بررسی راه‌های کوتاه‌نمودن زمان تولید گیاهچه و جوانه‌زنی سریع‌تر، آزمایشی با ۶ تیمار و ۱۰ تکرار اجرا شد که در این آزمایش دو محیط کشت 1/2WPM و 1/2MS که در آزمایش قبل بیشترین تأثیر را داشتند، انتخاب شدند و در سه وضعیت بدون شستشو (شاهد) و ۲۱روز شستشو ساده (قرارگیری در آب و تازه‌نمودن آن در هر روز) و در حالت سوم جنین بذور استریل روی شیکر یخچال‌دار در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ روز نگهداری شدند و داده‌ها ثبت گردید و بعد از تجزیه واریانس نتایج جدول ۲ به‌دست آمد.

جدول ۲. جدول تجزیه واریانس آزمایش دوم با ۶ تیمار و ۱۰ تکرار

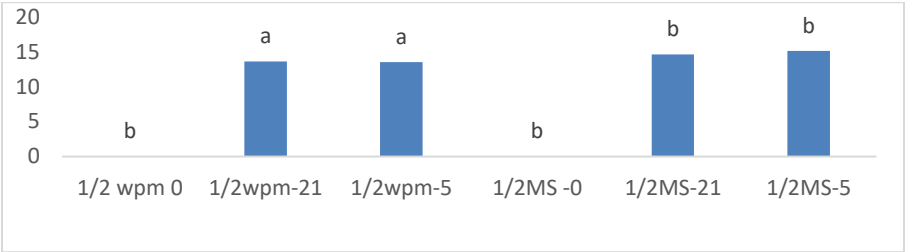
منابع تغییر	درجه آزادی(df)	میانگین مربعات(MS)	F
تیمار (t)	۵	۵۴۱/۳۵	۱۹/۳۱**
خطا(e)	۵۴	۲۸/۰۴	
CV		۴۱/۶۹	

** نشان‌دهنده این است که تیمارها در سطح ۱ درصد معنی‌دار شده‌اند

با توجه به معنی‌دار شدن اثر تیمارها می‌توان نتیجه گرفت که اعمال این رفتارها باعث تغییر در واحدهای آزمایش‌شده، پس به‌کارگیری تیمار شستشو با سرمادهی باعث ایجاد تغییر نسبت به شاهد شده و در سرعت جوانه‌زنی مؤثر بوده است. در پژوهشی، فلورس و همکاران. تا ۷۰ درصد جوانه‌زنی را از رویان‌های جداشده از

بذرهای کاملا بالغ پس از یک تیمار انجماد طولانی‌مدت گزارش کردند (Flores *et al.*,1993).

بعد از آزمون دانکن جهت بررسی میانگین تیمارها مشخص شد (شکل-۳) که فقط بین شاهد و سایر تیمارها اختلاف معنی‌دار وجود دارد.



شکل ۳. نمودار مقایسه میانگین‌های آزمایش دوم براساس آزمون دانکن. حروف مشترک نشان‌دهنده معنی‌دار نبودن اختلاف بین تیمارها در سطح ۵ درصد است. هر تیمار با دو پارامتر مشخص گردیده است اول نوع محیط کشت و دوم تعداد روز شستشو

نتایج نشان داد که بین ۵ روز شستشو و ۲۱ روز شستشو از نظر سرعت جوانه‌زنی و تولید نهال اختلاف معنی‌داری وجود ندارد و این نشان‌دهنده آن است که می‌توان به‌جای ۲۱ روز شستشو از ۵ روز شستشو با شرایطی که ذکر شد، استفاده کرد تا زمان جوانه‌زنی کوتاه‌تر شود. در بعضی مطالعات نشان داده شد که نگهداری کشت‌ها در تاریکی برای ایجاد جوانه‌ها و گیاهچه‌ها مناسب هستند و گیاهچه‌های به‌دست‌آمده در تاریکی ضعیف هستند و از بین می‌روند (Tay et al., 1988)، اما با تحقیق در شرایط روشنایی گیاهچه‌های بهتری به‌دست آمد. این تفاوت نتایج می‌تواند به تفاوت ژنتیک نمونه‌های مورد استفاده مربوط باشد زیرا در این مطالعات ذکر شده، واریته‌های متفاوتی از سرخدار استفاده شده است.

در پایان نتیجه‌گیری شد که محیط WPM ½ و MS ½ می‌تواند محیط کشت مناسبی برای کشت جنین سرخدار ایرانی باشد و ۵ روز شستشو و نگهداری در دمای ۴ درجه سانتیگراد و در حال چرخش و نگهداری کشت‌ها در روشنایی درصد بالایی جوانه‌زنی در نمونه‌ها را به دنبال دارد.

سپاسگزاری

از مدیریت محترم دانشگاه پیام نور مرکز تهران شرق و مسئول آزمایشگاه و کارشناس آزمایشگاه که در اجرای این پایان‌نامه با اینجانب کمال همکاری و مساعدت را داشتند کمال تشکر و قدردانی را دارم.

References

Al-Khayri, J. M. (2011). Influence of yeast extract and casein hydrolysate on callus multiplication and somatic embryogenesis of date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *Scientia horticulturae*, *130*(3), 531-535.

Davarpanah, S. J., Lahouti, M., & Karimian, R. (2014). Micropropagation of common yew using embryo culture. *Journal of Applied Biotechnology Reports*, *1*(2), 77-80.

Chang, S. H., & Yang, J. C. (1996). Enhancement of plant formation from embryo cultures of Taxus mairei using suitable culture medium and PVP. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, *37*.

Flores, H. E., & Sgrignoli, P. J. (1991). *In vitro* culture and precocious germination of Taxus embryos. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, *27*, 139-142.

Flores, T., Wagner, L. J., & Flores, H. E. (1993). Embryo culture and taxane production in Taxus spp. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, *29*, 160-165.

Hartzell, H. (1991). *The yew tree: a thousand whispers: Biography of a species*. Hulogosi Communications, Incorporated.

Kumar, S., Mahdi, H., Bryant, C., Shah, J. P., Garg, G., & Munkarah, A. (2010). Clinical trials and progress with paclitaxel in ovarian cancer. *International journal of women's health*, 411-427.

Li, Y., Zhang, G., Pefifer, B., A., (2014). Current and Emerging Options for Taxol Production. *Advances in Biochemical Engineering/biotechnology*, 148**.,** DOI: 10.1007/10_2014_292.

McCown, B. H., & Sellmer, J. C. (1987). General media and vessels suitable for woody plant culture. *Cell and tissue culture in forestry: general principles and biotechnology*, 4-16.

Majada, J. P., Sierra, M. I., & Sánchez-Tamés, R. (2000). One step more towards taxane production through enhanced Taxus propagation. *Plant cell reports*, *19*, 825-830.

Pierik, R. L. M. (1987). In vitro culture of higher plants, Martinus, Nijhoff Pub. *Dordrecht, Boston, Lancaster*, 66-79.

Sahai, P., & Sinha, V. B. (2022). Development of hairy root culture in *Taxus baccata* sub sp wallichiana as an alternative for increased Taxol production. *Materials Today: Proceedings*, *49*, 3443-3448.

Razi, M., Jalili Marandi, R., Doulati Baneh, H., Hosseini, B., & Darvishzadeh, R. (2013). Effect of Paternal Genotypes Sprays with BA and IAA Concentration on Embryo Rescue of F1 Progenies from'Askari'(*Vitis vinifera* L.) Cultivar. *Journal of Agricultural Science and Technology*, *15*(5), 1023-1031.

Ru, W. M. (2008). Genetic diversity of rare and endangered plant Taxus chinensis var. mairei. *Bull Bot Res*, *28*, 698-704.

Tay, L. J., Takeno, K., & Hori, Y. (1988). Culture conditions suitable for *in vitro* seed germination and development of seedlings in Paphiopedilum. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, *57*(2), 243-249.

Mukul, M. D., & Sumita, J. (2004). Embryo Culture of Taxus wallichiana (Zucc.). *Journal of Plant Biotechnology*.

Zarek, M. (2007). A practical method for overcoming the dormancy of Taxus baccata isolated embryos under in vitro conditions. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, *43*, 623-630.

Zeng, Y. L., Lin, X. C., Gui, R. Y., Zhang, C. P. and Huang, L. C. 2010. Regeneration of Taxus chinensis var. mairei from Adventitious bud Formation Using an In vitro Embryo Culture. J. Zhejiang Forest. College, 27(4): 614-619.

Zeng, Y., Lin, X., Gui, R., Zhang, C., & Huang, L. (2010). Regeneration of Taxus chinensis var. mairei from adventitious bud formation using an in vitro embryo culture. *Journal of Zhejiang Forestry College*, *27*(4), 614-619.

Zhiri, A., Jaziri, M., Homes, J., Vanhaelen, M., & 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 and Organ Culture*, *39*, 261-263.