نشریه پژوهش‌های علوم و فناوری چوب و جنگل
جلد بیست و سوم، ویژه‌نامه ۱، ۱۳۹۵
http://jwfst.gau.ac.ir

تولید گیاهچه‌های سرخدار (*Taxus baccata* L.) از طریق کشت جنین در شرایط درون شیشه‌ای

***سید علی رضوی[۱]، سید محمد حسینی نصر[۲]، فرامرز رستمی چراتی[۳] و حسن رضادوست[۴]**

[۱]دانشجوی دکتری، گروه جنگلداری، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، مربی گروه منابع طبیعی، دانشگاه گنبد کاووس، گنبد، ایران، [۲]دانشیار، گروه جنگلداری، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران، [۳]دانشیار، گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گنبد کاووس، گنبد، ایران، [۴]استادیار، پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی، دانشگاه شهید بهشتی تهران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹٤/۱۰/۳۰؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۳/۲۸

چکیده

سابقه و هدف: سرخدار یکی از معدود گونه‌های سوزنی‌برگ بومی ایران است که از آستارا تا علی‌آباد کتول استان گلستان و جنگل‌های ارسباران پراکنش دارد. این‌گونه از نظر حفظ ذخایر ژنتیکی، مصارف دارویی و غیره دارای ارزش بسیار می‌باشد. در حال حاضر به‌دلیل داشتن بذرهایی با دوره خواب طولانی، رشد بطئی، بهره‌برداری غیرمجاز و سایر عوامل مخرب در معرض خطر انقراض قرار دارد. به منظور حفظ رویشگاه‌های موجود و گسترش آن، تولید گیاهچه‌های سرخدار از طریق کشت جنین در شرایط درون شیشه‌ای مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: بذرها پس از جمع‌آوری از توده‌های طبیعی سرخدار در منطقه افراتخته، به دو دسته رسیده و نارس تقسیم شدند. سپس به مدت ۹ ماه در لایه‌های ماسه و در حرارت پائین لایه‌گذاری شدند. بذرها به‌مدت ٤۸ ساعت در آب روان خیسانده و سترون شدند. ۷ تیمار مختلف برای سترون‌سازی بذرها اعمال گردید. در این پژوهش جنین بذرهای سترون شده از آندوسپرم جدا شده و در محیط کشت موراشیگ و اسکوگ (MS) که توسط اسید اسکوربیک (۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر)، کازئین هیدرولیزات (۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر)، عصاره مخمر (۰/۵ و ۱ گرم در لیتر) و زغال فعال

۲ درصد غنی شده بود، کشت شد. به‌دلیل کندی رشد گیاهچه سرخدار، تأمین مواد غذایی و محیط کشت، جنین‌های روئیده شده به طور مرتب هر ۲ هفته یکبار واکشت شدند. تجزیه و تحلیل داده‌ها توسط آزمون تجزیه واریانس یکطرفه و دوطرفه و آزمون دانکن انجام شد.

یافته‌ها: نتایج پژوهش نشان می‌دهند استفاده از آب اکسیژنه ۱۰ درصد به‌مدت ۱۵ دقیقه و اتانول ۷۰ درصد به‌مدت ۱ دقیقه، مناسب‌ترین تیمار برای سترون‌سازی بذور بود به طوری‌که در این تیمار هیچ‌گونه آلودگی مشاهده نگردید. سایر نتایج نشان می‌دهند که جنین‌ها بعد ۱۰ روز شروع به جوانه‌زنی کردند. بیشترین درصد جوانه‌زنی و رویش گیاهچه‌های نرمال به تیمار ۱ تعلق داشت که شامل کشت بذرهای رسیده در محیط MS حاوی اسید اسکوربیک و کازئین هیدرولیزات ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر، مخمر ۱ گرم در لیتر و زغال فعال ۲ درصد غنی شده بود.

نتیجه‌گیری: محیط کشت MS حاوی اسید اسکوربیک و کازئین هیدرولیزات ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر، مخمر ۱ گرم در لیتر و زغال فعال ۲ درصد، که جنین بذرهای رسیده سرخدار جوانه‌زنی مناسبی در آن داشتند، به عنوان پروتکلی مناسب برای تولید گیاهچه‌های سرخدار پیشنهاد می‌شود.

واژه‌های کلیدی: سرخدار، جنین، کشت درون شیشه‌ای، لایه‌گذاری سرد

مقدمه

سرخدار (Common yew) با نام علمی *Taxus baccata* L. یکی از گونه‌های بومی ایران و باقیمانده دوران سوم زمین‌شناسی می‌باشد (۱۵). این‌گونه در جنگل‌های شمال (آستارا تا علی‌آباد کتول استان گلستان) و حوزه ارسبارن پراکنش دارد (۷). توده‌های سرخدار ایران انبوه‌ترین و قدیمی‌ترین جنگل‌های دنیا به شمار می‌روند که به‌دلیل بی‌توجهی و بهره‌برداری‌های بی‌رویه در معرض انقراض قرار گرفته است (۵، ۷ و ۲۱). بذر درختانی نظیر *T. baccata* و *Taxus chinensis* var. *mair*ei علاوه بر داشتن خواب فیزیکی (پوسته سخت)، دارای خواب فیزیولوژیکی[1] نیز می‌باشند (۱۳ و ۳۰) که گاهی بیش از ۲ سال به طول می‌انجامد (۲۲ و ۲۸). خواب بذر به دو گروه فیزیکی (داشتن پوسته سخت، وجود ترکیبات مختلف در پوسته) و فیزیولوژیکی تقسیم می‌شود (۳۰). عواملی نظیر جنین

1- Physiological dormancy

نارس[1]، وجود مواد شیمیایی بازدارنده[2] از جمله اسید آبسیزیک[3] در بخش‌های مختلف بذر مانند پوسته، ذخیره دانه[4] و جنین باعث ایجاد خواب فیزیولوژیک می‌شوند (۳۰). اسید آبسیزیک در بسیاری از فرایندها نظیر آبزدایی[5] و رسیدگی بذر[6] نقش دارد. این ماده در تمام اجزای بذر وجود داشته و جوانه‌زنی آن‌را در کلیه مراحل قبل و بعد از رسیدگی کنترل می‌کند (۱۳). شکستن خواب بذر سرخدار در شرایط آزمایشگاهی و کشت درون شیشه‌ای آن یکی از روش‌های تکثیر انبوه این‌گونه بوده که ضمن حفاظت از رویشگاه‌های در حال انقراض آن، می‌توان به استخراج ماده با ارزش تاکسول پرداخت، که کاربرد وسیع آن در علم پزشکی و درمان انواع سرطان به اثبات رسیده است (۲۱ و ۲۹). تاریخچه کشت جنین به بیش از یک قرن باز می‌گردد. هانینگ (۱۹۰٤) اولین محققی بود که توانست جنین گیاه *Cochlearia armoracia* L. از خانواده شب‌بو[7] را در محیط کشت ساده حاوی نمک‌های معدنی و قند پرورش دهد (۹). اولین ریزازدیادی سوزنی‌برگان با کشت جنین *Pinus palustris* Mill. انجام شد (۲۵). محیط کشت‌های متعددی نظیر White، B5، MS، DCR و LV برای رویش بذر و نجات جنین سرخدار، توسط پژوهشگران مختلف مورد بررسی قرار گرفت (۱۹). لی‌پیج و گارلو (۱۹۷۳) علت خواب جنین *T. baccata* را نارس بودن جنین و وجود بازدارنده‌های درونی نظیر اسید آبسیزیک بیان نمودند و برای رشد جنین نارس سرخدار استفاده از مکمل‌های رشد را ضروری دانسته و به‌منظور از بین بردن بازدارنده‌های درونی، خیساندن بذر در آب روان[8]، جیبرلین و حرارت پائین را پیشنهاد کردند (۱۸). فلوریس و همکاران (۱۹۹۳)، DCR (۱۲) را بهترین و B5 (۱۱) را نامناسب‌ترین محیط کشت برای رشد جنین سرخدار معرفی کردند (۱۰). چی (۱۹۹٤) به‌منظور بررسی جوانه‌زنی جنین‌های سرخدار در شرایط درون شیشه‌ای، رسیدگی بذرها را بر اساس رنگ و میزان رشد آریل[9] به سه گروه شامل بذور به طول حدود ۲ میلی‌متر، سبز کم‌رنگ و آریل سبز رنگ و کوچک، بذوری با طول حدود ٤ میلی‌متر، سبز تیره یا قهوه‌ای کم‌رنگ و با آریل کمی رشد یافته و به رنگ

1- Immature embryo
2- Chemical inhibitor
3- Abscisic acid
4- Endosperm
5- Dehydration
6- Seed ripeness
7- Brassicaceae
8- Running water
9- Aril

صورتی کم‌رنگ و بذرهایی به طول ٦ میلی‌متر، قهوه‌ای رنگ و با آریل رشد یافته و قرمز رنگ تقسیم کرد. نتایج نشان داد که بذور با رسیدگی بیشتر در مراحل دوم و سوم برای جوانه‌زنی در شرایط درون شیشه‌ای مناسب‌تر بوده و درصد جوانه‌زنی آن‌ها به‌ترتیب ۲۱ و ۵۲ درصد بوده است (٤). چانگ و یانگ (۱۹۹٦) با بررسی رویش جنین *Taxus mairei* (Lemee and H.Lev) S.Y. Hu. در شرایط درون شیشه‌ای، محیط کشت MS (۲۰) با نصف غلظت به‌همراه ۰/۸ میلی‌گرم در لیتر PVP[1] را بهترین شرایط برای رویش آن معرفی کردند (۳). مارسین (۲۰۰۷) با کاشت جنین‌های نارس و رسیده *T. baccata* در شرایط درون شیشه‌ای نشان داد که جنین بذرهای رسیده در محیط کشت MS به‌همراه ۵ گرم در لیتر زغال فعال کشت از شرایط جوانه‌زنی بهتری برخوردارند و بهترین درصد جوانه‌زنی در شرایط تاریکی و بهترین نهال‌ها در ١٦ ساعت روشنایی و به مدت دو هفته بعد از کشت حاصل شد (۱۹). سونگ و همکاران (۲۰۱٤) جوانه‌زنی جنین و رشد گیاهچه‌های *Taxus chinensis* var. *mairei* از دو منطقه آنهویی[2] و ژجیانگ[3] را در شرایط درون شیشه‌ای مورد بررسی قرار دادند. جنین‌ها در شرایط تاریکی و ١٤ ساعت روشنایی قرار داشتند. نتایج نشان داد درصد جوانه‌زنی جنین‌هایی که در ١٤ ساعت روشنایی قرار داشتند از مناطق آنهویی و ژجیانگ به‌ترتیب ٥٤/٣ و ۸۰ درصد بود ولی تقریباً هیچ یک از این جنین‌ها به گیاهچه تبدیل نشدند ولی در مقابل ۲۳/۳ و ۳٦/۳ درصد از جنین‌های مناطق آنهویی و ژجیانگ که در تاریکی جوانه زده بودند به گیاهچه کامل تبدیل شدند. بنابر نتایج آن‌ها تاریکی در طی جوانه‌زنی برای رشد بعدی گیاهچه ضروری است و بذرهای نارس برای کشت جنین این درخت مناسب‌ترند. ضمن این‌که افزودن تنظیم کننده‌های رشد نظیر GA3[4]، IAA[5] و BA[6] با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر و مکمل‌های آلی مانند کازئین هیدرولیزات و عصاره مخمر (۰/۵ گرم در لیتر) و زغال فعال (۱ گرم در لیتر) باعث افزایش جوانه‌زنی و رشد گیاهچه شدند (٢٦). نراقی (۲۰۰۵) برای سترون نمودن جنین‌های بالغ سرخدار از طریق کشت درون شیشه‌ای، ابتداء بذرهای رسیده را به‌مدت ۱۵ روز در جریان آب جاری قرار داد و سپس با محلول هیپوکلریت

1- Polyvinylpyrrolidone
2- Anhui
3- Zhijiang
4- Gibberelic acid
5- Indole-3-acetic acid
6- 6- benzylaminopurine

سدیم ۳ درصد سترون نمود. سپس پوسته بذرها شکافته شده و جنین‌های کامل در محیط کشت MS حاوی کازئین هیدرولیزات و اسید اسکوربیک هر یک به میزان ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر، ۱ گرم در لیتر عصاره مخمر و ۵ گرم در لیتر زغال فعال کشت گردیدند. پس از ٦ هفته ٦٥ درصد جنین‌ها جوانه زده و تشکیل گیاهچه دادند (۲۲). نیک‌وش و همکاران (۲۰۰٦) جهت تولید گیاهچه‌های سرخدار با استفاده از کشت درون شیشه‌ای، جنین بذرها را پس از استخراج در محیط کشت MS غنی شده با کازئین هیدرولیزات و اسید اسکوربیک ۰/۱ گرم در لیتر و زغال فعال ۵ گرم در لیتر کشت داده که پس از مدت ۳ تا ٤ هفته، حدود ٦٧ درصد آن‌ها جوانه زدند (۲۳). حسینی تفرشی و همکاران (۲۰۱۱) با بررسی کشت جنین سرخدار در شرایط درون شیشه‌ای و رشد نونهال‌ها با استفاده از روش هیدروپونیک، قرار دادن بذور در آب روان به‌مدت ۷ روز و استفاده از زغال فعال به‌جای PVP را در تسریع جوانه‌زنی جنین‌های سرخدار مؤثر دانستند (۱۵). داورپناه و همکاران (۲۰۱٤) با بررسی درون شیشه‌ای جنین‌های سرخدار معمولی نقش زغال فعال را در رشد جنین‌های این‌گونه ضروری تشخیص دادند (٦). هدف از این پژوهش پیشنهاد پروتکلی مناسب، جهت تولید گیاهچه‌های بذری سرخدار در بازه زمانی کوتاه است. گیاهچه‌هایی که برای اهداف مختلف نظیر تولید انبوه نهال، حفاظت از رویشگاه‌های طبیعی، استخراج تاکسول و غیره مورد استفاده قرار می‌گیرند.

مواد و روش‌ها

منطقه مورد مطالعه: در این پژوهش بذرهای مورد نیاز سرخدار از رویشگاه افراتخته به وسعت ۳۵۲ هکتار در ۳۰ کیلومتری جنوب شرقی شهرستان علی‌آباد کتول استان گلستان در مجاورت روستای ییلاقی افراتخته با مختصات جغرافیایی ٥٤ درجه ٥٥ دقیقه ٤٨ ثانیه تا ٥٤ درجه ٥٧ دقیقه ۱۲ ثانیه طول شرقی و ۳٦ درجه ٤٥ دقیقه ۲٤ ثانیه تا ۳٦ درجه ٤٧ دقیقه ۳ ثانیه عرض شمالی و در محدوده ارتفاعی ۱۳۵۰ تا ۲۰۰۰ متر از سطح دریا جمع‌آوری گردید. متوسط بارندگی رویشگاه سرخدار افرا تخته ۹۵۰ میلی‌متر و متوسط دمای سالیانه منطقه ۱۰/۳ درجه سانتی‌گراد می‌باشد. در طبقه‌بندی اقلیمی به روش دومارتن اقلیم منطقه از نوع خیلی مرطوب نوع الف می‌باشد (۸).

روش‌ها

آماده‌سازی و تقسیم‌بندی بذور: بذرهای جمع‌آوری شده در نیمه آبان ماه، بر اساس رنگ و میزان تکامل و رنگ آریل به دو دسته بذور نارس و کاملاً رسیده تقسیم شدند. بذور نارس دارای رنگ

قهوه‌ای کم‌رنگ و آریل نسبتاً توسعه یافته و صورتی رنگ و بذور کاملاً رسیده دارای رنگ قهوه‌ای تیره و آریل کاملاً رشد یافته و قرمز رنگ می‌باشند. سپس قسمت گوشتی دانه از دو گروه بذور جدا شد. قابل ذکر است که جدا کردن آریل، زمانی که هنوز سبز رنگ بوده و رشد کافی نکرده است بسیار آسان بوده و با فشار اندک از دانه جدا می‌شود. در صورتی‌که آریل پس از رسیدن نسبی (رنگ صورتی) و رسیدگی کامل (رنگ قرمز) کاملاً لزج شده که جدا کردن آن بسیار مشکل است. برای جدا شدن راحتر آریل از دانه باید بذرها را در ظرفی مشبک ریخته و آریل را با فشار دست له کرد. پس از خشک کردن بذور در شرایط نیم‌سایه، به راحتی می‌توان آریل را از دانه جدا نمود. بذرها پس از جدا شدن از قسمت گوشتی، به‌مدت ۹ ماه در میان ماسه مرطوب و دمای ٤ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند (۱۷).

سترون‌سازی بذور: برای سترون‌سازی بذرها ۷ تیمار در نظر گرفته شد (جدول ۱). ابتداء کلیه بذرها توسط ۲ قطره مایع ظرفشویی و آب مقطر معمولی شسته شدند.

جدول ۱- تیمارهای سترون‌سازی بذرهای *Taxus baccata*.

Table 1. Sterilization treatments of *Taxus baccata* seeds.

شماره تیمار Treatment No.	تیمارهای سترون‌سازی Sterilization treatments
1	کلرید جیوه ۰/۵ درصد به مدت ۱۰ دقیقه، اتانول ۷۰ درصد به مدت ۱ دقیقه HgCl2 0.5% (10 min), Ethanol 70% (1 min)
2	کلریت جیوه ۱ درصد به مدت ۵ دقیقه، اتانول ۷۰ درصد به مدت ۲ دقیقه HgCl2 1% (5 min), Ethanol 70% (2 min)
3	کلریت جیوه ۰/۱ درصد به مدت ۱۵ دقیقه، اتانول ۷۰ درصد به مدت ۱ دقیقه HgCl2 0.1% (15 min), Ethanol 70% (1 min)
4	هیپوکلریت سدیم ۱/٤ درصد به مدت ۱۵ دقیقه و اتانول ۷۰ درصد به مدت ۱ دقیقه NaClO 1.4% (15 min), Ethanol 70% (1 min)
5	هیپوکلریت سدیم ۱ درصد به مدت ۲۵ دقیقه و اتانول ۷۰ درصد به مدت ۱ دقیقه NaClO 1% (25 min), Ethanol 70% (1 min)
6	آب اکسیژنه ۱۰ درصد به مدت ۱۵ دقیقه و اتانول ۷۰ درصد به مدت ۱ دقیقه H2O2 10% (15 min), Ethanol 70% (1 min)
7	آب اکسیژنه ۱۲ درصد به مدت ۱۰ دقیقه و اتانول ۷۰ درصد به مدت ۱ دقیقه H2O2 12% (10 min), Ethanol 70% (1 min)

در کلیه تیمارها، پس از حذف پوسته بذر، آندوسپرم به‌همراه جنین به مدت ۵ دقیقه در هیپو کلریت سدیم ۱ درصد خیسانده شد.

نحوه استخراج جنین: بعد از سترون‌سازی بذرها باید جنین از آندوسپرم جدا شده و برای کاشت آن اقدام کرد. قابل ذکر است که جنین سرخدار در بذرهای رسیده بسیار کوچک بوده و اندازه آن حدود ۱ میلی‌متر است که جدا کردن آن بسیار مشکل است. به همین دلیل برای جدا کردن آسانتر جنین، استفاده از بذور لایه‌گذاری شده ترجیح دارند. به همین منظور ابتداء بذور به مدت ۹ ماه در لایه‌های ماسه و حرارت پائین (٤ درجه سانتی‌گراد) نگه‌داری شدند که در این صورت اندازه جنین دو برابر جنین رسیده در زمان جمع‌آوری بذر می‌باشد (شکل ۱). سپس به مدت ٤٨ ساعت در آب روان قرار داده شدند. سپس با استفاده از پنس پوسته بذر شکسته و جنین خارج شد. قابل ذکر است که جنین سرخدار در یک سوم بالایی بذر در جهت طولی، قرار دارد. برای جداسازی جنین ابتدا توسط اسکالپل برش عرضی در یک سوم پائینی بذر ایجاد کرده و سپس با یک برش طولی در دوسوم باقی‌مانده بذر که حاوی جنین می‌باشد برشی ایجاد کرده و با فشاری ملایم جنین قابل جدا شدن می‌باشد (۲۳).

شکل ۱- جنین بذر رسیده در زمان جمع‌آوری (چپ) و جنین بذر رسیده پس از ۹ ماه لایه‌گذاری سرد (راست).
Figure 1. Mature seed embryo in collection time (left) and mature seed embryo after 9 months cold stratification (right).

محیط کشت و مکمل‌های مورد استفاده: جنین بذرهای رسیده و نارس پس از جدا شدن از آندوسپرم در محیط کشت MS حاوی زغال فعال، اسید سکوربیک، کازئین هیدرولیزات و مخمر کشت شدند (جدول ۲) و به مدت ۱ هفته در شرایط تاریکی در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند.

جدول ۲- تیمارهای مختلف جوانه‌زنی جنین سرخدار.

Table 2. Different treatments of *Taxus baccata* embryo germination.

شماره تیمار Treatment N.	رسیدگی بذر Seed ripeness	مکمل‌های رشد Growth supplements	محیط کشت Medium
1	رسیده Mature	اسید اسکوربیک و کازئین هیدرولیزات ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر، مخمر ۱ گرم در لیتر، زغال فعال ۲ درصد Ascorbic acid and casein hydrolysate (100 mgl^{-1}) Yeast extraction (1 $g\ l^{-1}$), Activated charcoal (2%)	MS
2	نارس Immature	اسید اسکوربیک و کازئین هیدرولیزات ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر، مخمر ۱ گرم در لیتر، زغال فعال ۲ درصد Ascorbic acid and casein hydrolysate (100 mgl^{-1}) Yeast extraction (1 $g\ l^{-1}$), Activated charcoal (2%)	MS
3	رسیده Mature	اسید اسکوربیک و کازئین هیدرولیزات ۵۰ میلی‌گرم در لیتر، مخمر ۰/۵ گرم در لیتر، زغال فعال ۲ درصد Ascorbic acid and casein hydrolysate (50 mgl^{-1}) Yeast extraction (0.5 $g\ l^{-1}$), Activated charcoal (2%)	MS
4	نارس Immature	اسید اسکوربیک و کازئین هیدرولیزات ۵۰ میلی‌گرم در لیتر، مخمر ۰/۵ گرم در لیتر، زغال فعال ۲ درصد Ascorbic acid and casein hydrolysate (50 mgl^{-1}) Yeast extraction (0.5 $g\ l^{-1}$), Activated charcoal (2%)	MS

به‌دلیل رشد بطئی سرخدار، جهت تأمین مواد غذایی و محیط کشت، جنین‌های روئیده شده به‌طور مرتب هر ۲ هفته یکبار واکشت[1] شدند.

تجزیه و تحلیل آماری

در این پژوهش برای دستیابی به مناسب‌ترین تیمار سترون‌سازی بذرها، تنها از بذرهای رسیده استفاده شد. بنابراین آزمایش مربوط به سترون‌سازی بذرها در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. جنین‌های سرخدار پس از سترون شدن بذرها و جدا شدن از آندوسپرم به صورت آزمایش فاکتوریل و در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با دو عامل بذر در ۲ سطح (رسیده و نارس) و غلظت مکمل‌های رشد در ۲ سطح و در ۳ تکرار ۱۰ تایی کاشته شدند. بعد از گذشت ۳ هفته داده مورد آنالیز قرار گرفتند. جهت سازماندهی داده‌ها از نرم‌افزار Excel و برای آنالیز آن‌ها از نرم‌افزار SPSS 18 استفاده شد. نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کلوموگروف اسمیرنوف و همگنی واریانس‌ها توسط آزمون لون مورد بررسی قرار گرفت. سپس توسط آزمون تجزیه واریانس یک و دو طرفه اختلاف بین میانگین‌ها تعیین و برای مقایسه آن‌ها از آزمون دانکن استفاده شد.

1- Subculture

نتایج و بحث

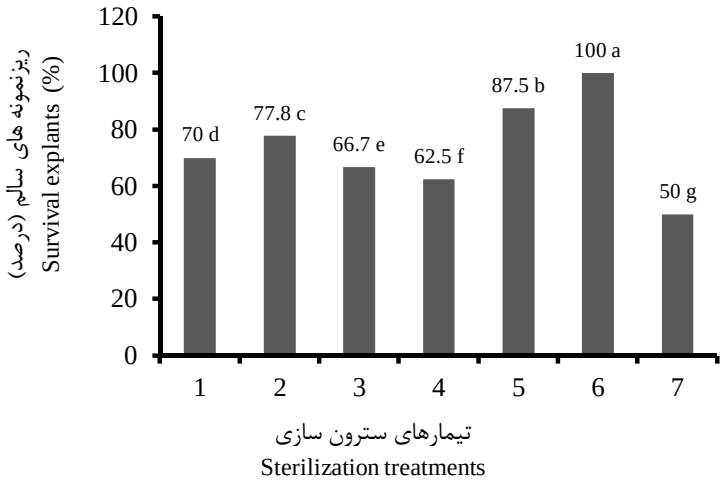
مقایسه تیمارهای کنترل آلودگی بذرها توسط آزمون‌های آنالیز واریانس و دانکن نشان می‌دهد که بین کلیه تیمارها در سطح آماری یک درصد اختلاف معنی‌داری وجود دارد (جدول ۳ و شکل ۲).

جدول ۳- تجزیه واریانس تیمارهای سترون‌سازی در کنترل آلودگی بذرهای سرخدار بر اساس آزمون F.

Table 3. Sterilization treatments for control of *Taxus baccata* seed contamination by F test.

Sig.	F	میانگین مربعات MS	درجه آزادی Df	مجموع مربعات SS	منبع تغییرات S. O.V
0.000**	961.613	824.24	6	4945.44	تیمارهای سترون‌سازی Sterilization treatment
		0.857	14	12	خطای آزمایش Test error
			20	444957	کل Total

** اختلاف آماری در سطح یک درصد معنی‌دار است.



شکل ۲- مقایسه میانگین درصد ریزنمونه‌های سالم تحت تأثیر سترون‌سازی بذرهای سرخدار توسط آزمون دانکن.

Figure 2. Comparison between mean of survival explants percentage in *Taxus baccata* seeds sterilization using Duncan test.

قابل ذکر است که حروف بالای شکل‌ها مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون دانکن را نشان می‌دهد. در کلیه اشکال حروف مشترک بین میانگین‌ها نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین آن‌ها می‌باشد. در کشت‌های درون شیشه‌ای یکی از سخت‌ترین و مهمترین مسئله، کنترل آلودگی می‌باشد، به‌طوری که هر نوع پژوهش در این خصوص باید در شرایط کاملاً سترون شده صورت گیرد، در غیر این صورت هیچ نتیجه‌ای به‌دست نخواهد آمد (۹). در این پژوهش در تیمار ٦ (آب اکسیژنه ۱۰ درصد به مدت ۱۵ دقیقه و اتانول ۷۰ درصد به‌مدت ۱ دقیقه) هیچ‌گونه آلودگی مشاهده نشد. بنابراین از تیمار مذکور برای سترون‌سازی کلیه بذرها استفاده شد. به‌نظر می‌رسد استفاده از اتانول که باعث از بین رفتن میکرواورگانیسم‌های سطحی و جذب بهتر ماده سترون‌کننده می‌شود مؤثر واقع شده است. کاهش غلظت آب اکسیژنه از ۱۲ به ۱۰ درصد و افزایش زمان خیساندن بذر در ماده سترون‌کننده مذکور از ۱۰ به ۱۵ دقیقه نتیجه بسیار مطلوبی را به‌همراه داشت. ضمن این‌که خیساندن آندوسپرم پس از حذف پوسته بذر در محلول ۱ درصد هیپوکلریت سدیم به‌مدت ۵ دقیقه در کنترل آلودگی ریزنمونه‌ها مفید بود. چانگ و یانگ (۱۹۹٦) نتایج مشابهی را در سترون‌سازی بذور *Taxus mairei* (Lemee and H.Lev) S.Y. Hu به‌دست آورده‌اند (۳).

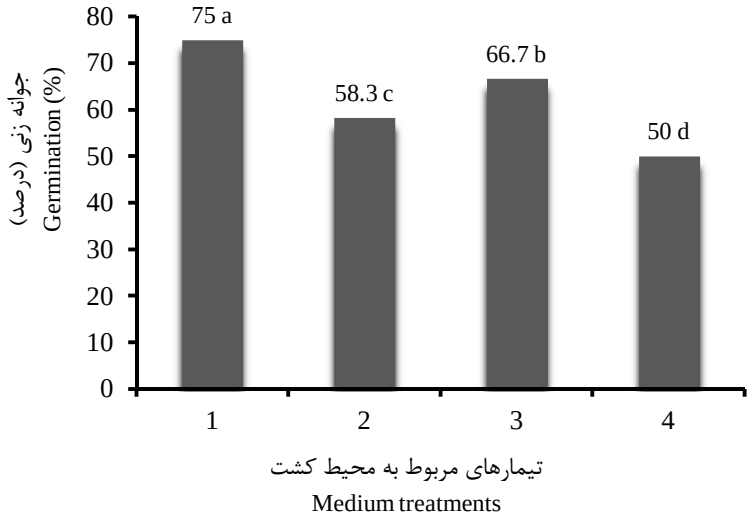
پس از گذشت ۱۰ روز بذرها شروع به جوانه‌زنی کردند. نتایج مقایسه میانگین جوانه‌زنی بذرها توسط آزمون‌های آنالیز واریانس دو طرفه و دانکن نشان می‌دهند که بین تیمارهای مورد بررسی اختلاف معنی‌داری وجود دارد (جدول ٤ و شکل ۳).

جدول ٤- آنالیز واریانس درصد جوانه‌زنی جنین و گیاهچه‌های نرمال سرخدار با استفاده از آزمون F.

Table 4. ANOVA analysis of embryo germination percentage and normal plantlet of *Taxus baccata* by F test.

F		میانگین مربعات MS		درجه	منابع
گیاهچه‌های نرمال (درصد)	جوانه‌زنی (درصد)	گیاهچه‌های نرمال (درصد)	جوانه‌زنی (درصد)	آزادی	تغیرات
Normal plantlet (%)	Germination (%)	Normal plantlet (%)	Germination (%)	Df	S. O.V
1757.5**	177.64**	4310.4	836.67	1	A
1442.1**	43.88**	3536.7	206.67	1	B
1069.2**	2.22E-12	2622.3	105E-11	1	A*B
		2.45	4.71	8	خطا Error
				11	کل Total

** وجود اختلاف معنی‌دار در سطح یک درصد (غلظت) B= Concentration، (رسیدگی بذر) A= Seed ripeness



شکل ۳- اثر محیط کشت بر درصد جوانه‌زنی بذرهای سرخدار توسط آزمون دانکن.

Figure 3. Effect of medium on germination percentage in *Taxus baccata* seeds using Duncan test.

کشت جنین عبارت از جدا نمودن و رشد یک جنین نارس یا رسیده استریل در شرایط درون شیشه‌ای می‌باشد (۲). در کشت جنین نابالغ، اساساً هدف جلوگیری از سقط جنین است. این پدیده ممکن است به‌دلیل ناسازگاری ژنتیکی بین جنین درحال رشد و آندوسپرم در تلاقی‌های دور (بین‌گونه‌ای و بین‌جنسی) و یا خودگشنی اجباری اتفاق افتد و یا در میوه‌های هسته‌دار به‌دلیل قطع ارتباط جنین با سیستم آوندی بوجود آید. در کشت جنین بالغ، هدف رفع موانع جوانه‌زنی است (۱٤). در این پژوهش که از جنین‌های نارس و رسیده سرخدار استفاده شد، جنین‌ها بعد از ۱۰ روز شروع به جوانه‌زنی کردند. مقایسه آماری درصد جوانه‌زنی بذور در تیمارهای مختلف مورد بررسی توسط آزمون‌های آنالیز واریانس و دانکن نشان می‌دهد که کلیه تیمارها از نظر آماری در سطح یک درصد دارای اختلاف معنی‌داری با یکدیگر می‌باشند (جدول ٤ و شکل ۳). به‌طوری که تیمار ۱ (بذور رسیده، اسید اسکوربیک و کازئین هیدرولیزات ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر، مخمر ۱ گرم در لیتر و زغال فعال ۲ درصد) دارای بیشترین درصد جوانه‌زنی (۷۵ درصد) و تیمار ٤ (بذور نارس، اسید اسکوربیک و کازئین هیدرولیزات ۵۰ میلی‌گرم در لیتر، مخمر ۰/۵ گرم در لیتر و زغال فعال ۲ درصد) دارای کمترین مقدار (۵۰ درصد) می‌باشد (شکل ۳). نتیجه این پژوهش با نتایج چی (۱۹۹٤)، چانگ و یانگ (۱۹۹٦)

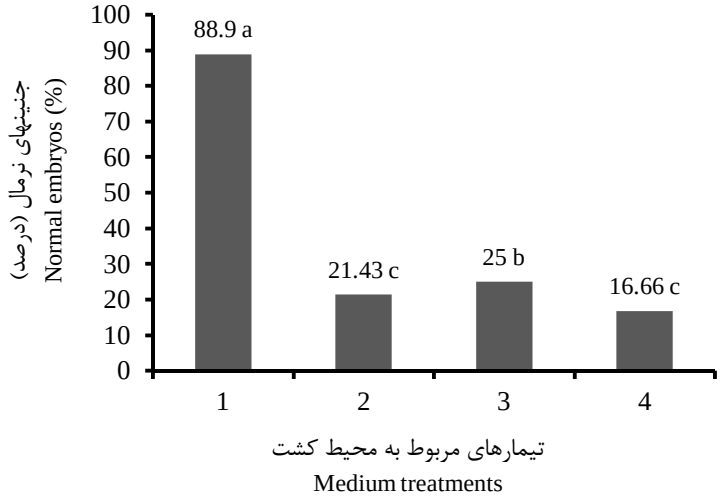
و مارسین (۲۰۰۷) مبنی جوانه‌زنی بیشتر بذور رسیده همسو می‌باشد (٤، ۱۹ و ۲۰)، این در حالی است که سونگ (۲۰۱٤) جنین‌های نارس را برای جوانه‌زنی در شرایط درون شیشه‌ای پیشنهاد می‌کند (۲٦). شاید یکی از دلایل این اختلاف نوع گونه و یا محیط کشت و مکلمل‌های مورد استفاده باشد. نکته قابل توجه این‌که طبق نتایج پژوهشگرانی نظیر نراقی (۲۰۰۵) و نیک‌وش و همکاران (۲۰۰٦) جنین برای جوانه‌زنی حداقل به ٤ هفته زمان نیاز داشته‌اند ولی در این پژوهش زمان مذکور به حدود ۱۰ روز تقلیل یافت. به‌نظر می‌رسد نگه‌داری بذور در لایه‌های ماسه مرطوب و دمای پائین[1] به‌مدت نه ماه باعث حصول این نتیجه شده است. جنین بالغ بذور رسیده سرخدار که بلافاصله از درخت جمع‌آوری شده‌اند حدود یک میلی‌متر طول دارد (شکل ۱). مارسین (۲۰۰۷) نیز در پژوهشی اندازه جنین رسیده سرخدار را یک میلی‌متر ذکر نموده است (۱۹). این اندازه پس از نه ماه لایه‌گذاری سرد به حدود ۲ میلی‌متر رسیده است که نشان‌دهنده رشد و تکامل بیشتر جنین‌های مذکور است. در واقع فرایند لایه‌گذاری سرد باعث از بین رفتن مواد بازدارنده‌ای[2] شده است که از رشد جنین جلوگیری می‌کنند. قابل ذکر است در هیچ یک از منابع مورد بررسی در این مطالعه از روش مذکور برای رفع خواب فیزیولوژیکی بذور *T. baccata* استفاده نشده است.

جنین‌های بسیار کوچک و نابالغ هتروتروفیک بوده و نسب به جنین‌های بالغ که اتوتروف هستند به محیط کشت پیچیده‌تری نیاز دارند (۲۷). با این وجود هر دو گروه به عناصر کم‌مصرف، پرمصرف و قندها نیازمند هستند. به‌طور معمول منبع تغذیه جنین آندوسپرم می‌باشد بنابراین زمانی که جنین از آندوسپرم جدا می‌شود باید در محیطی قرار گیرد که به شرایط طبیعی بسیار نزدیک باشد (۲٤). به همین منظور محیط کشت توسط ترکیباتی نظیر کازئین هیدرولیزات، پپتون، تریپتون، عصاره مخمر، زغال فعال، اسید اسکوربیک، بیوتین، شیر نارگیل، آب پرتقال و غیره غنی می‌شود (۲۷). در این پژوهش محیط کشت MS توسط زغال فعال، اسید اسکوربیک، کازئین هیدرولیزات و مخمر غنی گردید، که تیمار اول ضمن داشتن بیشترین درصد جوانه‌زنی، بیشترین درصد نهال‌های نرمال را نیز تولید کرد (اشکال ۳، ٤ و ۵). نتیجه این تیمار که شامل جنین‌های بالغ و مکمل‌های اسید اسکوربیک و کازئین هیدرولیزات ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر، مخمر ۱ میلی‌گرم در لیتر و زغال فعال ۲ درصد بوده است، با نتایج نراقی (۲۰۰۵) با تاکید بر تاثیر مثبت کازئین هیدرولیزات، اسید اسکوربیک، عصاره مخمر و

1- Cold stratification
2- Inhibitors

زغال فعال در رویش بهتر جنین‌های بالغ سرخدار (۲۲)، نتایج حسینی تفرشی و همکاران (۲۰۱۱) مبنی بر تأثیر مثبت آب روان و زغال فعال در جوانه‌زنی بهتر جنین‌های سرخدار (۱۵) و داورپناه و همکاران (۲۰۱٤) مبنی بر نقش مؤثر زغال فعال در جوانه‌زنی جنین‌های سرخدار (٦) همسو بوده و تائیدی بر نتایج پژوهش حاضر می‌باشد.

نتایج مقایسه میانگین گیاهچه‌ها با رویش طبیعی و نرمال توسط آزمون‌های آنالیز واریانس و دانکن نشان می‌دهند که بین تیمارهای مورد بررسی اختلاف معنی‌داری وجود دارد (جدول ٤ و شکل ٤). هر چند درصد جوانه‌زنی در هر یک از تیمارهای مورد بررسی قابل توجه بوده، ولی رویش جنین‌ها در همه تیمارها به صورت نرمال نبوده است. به طوری که در تیمار اول (بذور رسیده، اسید اسکوربیک و کازئین هیدرولیزات ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر، مخمر ۱ گرم در لیتر و زغال فعال ۲ درصد)، بیشترین درصد جنین‌ها با رویش نرمال مشاهده شد (شکل ۵). تیمارهای دوم، سوم و چهارم به ترتیب ۲۱/٤۳، ۲۵ و ۱٦/٦٦ درصد نهال‌های نرمال تولید کرده‌اند (شکل ٤). قابل ذکر است که در وضعیت غیرنرمال، جنین‌ها به صورت توده‌ای از کالوس بی‌شکل درآمدند (شکل ٦).



شکل ٤- مقایسه میانگین درصد گیاهچه‌های نرمال سرخدار در تیمارهای مختلف توسط آزمون دانکن.

Figure 4. Comparison between mean of *Taxus baccata* normal Plantlet in different treatments using Duncan test.

شکل ۵- گیاهچه‌های نرمال و در حال رشد سرخدار در تیمار ۱.

Figure 5. Normal and growing plantlet of *Taxus baccata* in treatment 1.

شکل ٦- رشد غیرنرمال جنین سرخدار در تیمارهای دوم (چپ)، سوم (وسط) و چهارم (راست).

Figure 6. Abnormal growth of *Taxus baccata* embryo in treatments 2 (left), 3 (Center) and 4 (right).

به‌نظر می‌رسد رسیدگی بیشتر بذور و غلظت بالاتر مکمل‌های رشد در تیمار ۱ باعث رشد قابل ملاحظه جنین‌های سرخدار و رویش نرمال آن‌ها شده است. ضمن این‌که عوامل متعددی نظیر ژنوتیپ، مرحله نمو جنین در هنگام جداسازی، شرایط رشد درختان مادری، ترکیب محیط کشت، اکسیژن، نور و درجه حرارت از جمله عوامل تأثیرگذار در رشد جنین می‌باشند (۹ و ۲).

نتیجه‌گیری کلی

با توجه به نتایج، می‌توان استنباط کرد که پروتوکل جنین‌های بالغ و محیط کشت MS که توسط مکمل‌های اسید اسکوربیک و کازئین هیدرولیزات ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر، مخمر ۱ میلی‌گرم در لیتر و زغال فعال ۲ درصد غنی شده است، روشی مناسب برای رسیدن به گیاهچه‌های سرخدار در زمانی نسبتاً کوتاه خواهد بود.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از زحمات بیدریغ جناب آقای دکتر مجتبی رنجبر، دکتر صادق پورمرادی و خانم‌ها مهندس مرضیه ولی‌زاده و ستاره حبیبی در مراحل مختلف این پژوهش تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

1.Bagheri, A., Ziaratnia, M., and Hosseini, M. 2004. In Vitro Culture of Trees. Ferdowsi University of Mashhad press. 245p. (In Persian)
2.Bagheri, A., and Saffari, M. 2011. In Vitro Culture of Higher Plants. Ferdowsi University of Mashhad press. 406p. (In Persian)
3.Chang, S.H., and Yang, J.C. 1996. Enhancement of plant formation from embryo culture of Taxus *mairei* (Lemee and H.Lev) S.Y. Hu.using suitable culture medium and PVP. Botanical Bulletin of Academia Sinica. 37: 35-40.
4.Chee, P.P. 1994. In vitro culture of zygotic of *Taxus* species. Plant Cell Reports. 14: 695-697.
5.Dargahi, D. 2001. Ecological investigation of societies Yew (*Taxus baccata* L.) in North forests of Iran. Thesis of Ph.D. Tarbiat Modarres University. 185p. (In Persian)
6.Davarpanah, S.J., Lahouti, M., and Karimian, R. 2014. Micropropagation of common yew using embryo culture. Journal of Applied Biotechnology Reports. 1(2): 77- 80.
7.Ebadi, A., and Omidvar, A. 2011. Relationship between some ecological factors and distribution of yew tree (Taxus baccata L.) in Arasbaran forests (Case study: Ilganechay and Horand regions). Iranian Journal of Forest and Poplar Research. 19(3): 327- 339. (In Persian)
8.Esmailzadeh, O., Hosseini, M., and Oladi, J. 2005. A phytosociological study of English yew (*Taxus baccata* L.) in Afratakhteh reserve.). Journal of Pajouhesh and Sazandegi. 68: 66-76. (In Persian)
9.Esna Ashari, M., and Zokaee khosroshahi, M.R. 2013. Plant Tissue Culture a Comprehensive Guide. Bu-Ali Sina University press. 475p. (In Persian)

10.Flores, T., Wagner, L.J., and Flores, H.E. 1993. Embryo culture and taxane production in *Taxus spp*. In vitro Cell Dev Boil Plant. 29: 160- 165.
11.Gamborg, O.L., Miller, R.A., and Ojima, K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Experimental Cell Research. 50: 148-151.
12.Gupta, P.K., and Durzan, D.J. 1986. Isolation and cell regeneration of protoplasts from sugar pine (*Pinus lambertiana* Dougl.). Plant cell reports. 5: 346-348.
13.Henk, W.M.H. 1995. A critical update on seed dormancy. I. Primary dormancy. Seed Science Reaserch. 5: 61-73.
14.Hosseini Nasr, S.M. 2015. Plant Cell Tissue and Organ Culture. Aeeizh press. 378p. (In Persian)
15.Hosseini Tafreshi, S.A., Shariati, M., Mofid, M.R., and Khayam Nekui, M., 2011. Rapid generation and development of *Taxus baccata* L. by in vitro embryo culture and hydroponic growth of seedling. In vitro culture and development biology plant. 47(5): 561-568.
16.Jalili, A., and Jamzad, Z. 1999. Red Data Book of Iran. Research Institute of Forests and Rangelands. 748p.
17.Khoshkhui, M. 2010. Plant propagation, principles and practices. Shiraz University Press. 1: 373p.
18.Le Page Degivry, M.T., and Garello, G. 1973. Embryo dormancy in *Taxus baccata* L: Influence of culture medium on initiation of germination. Physiologia Plantarum. 29(2): 204-207.
19.Marcin, Z. 2007. A practical method for overcoming the dormancy of *Taxus baccata* L. isolated embryos under in vitro conditions. In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant. 43: 623-630
20.Murashige, T., and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Plant Physiology. 15: 473- 479.
21.Nandi, S.K., Palni L.S., and Rikkari, H.C. 1996. Chemical induction of adventitious root formation in *Taxus baccata* L. cuttings. Plant growth regulation, 19: 117- 122.
22.Naraghi, T.S. 2005. Invitro propagation of *Taxus baccata* L. The 4th International conference of biotechnology. Iran. (In Persian)
23.Nikvash, N., Asareh, M.H., Ghorbanli, M., and Ghambari Zare, A. 2006. Mass production of common yew (*Taxus baccata* L.) plantlets by in vitro culture. Pajouhesh and Sazandegi. 71: 26-32. (In Persian)
24.Sharifi, A., Moshtaghi, N., and Bagheri, A. 2010. Practical Plant Tissue Culture. Jahad Daneshghahi Mashhad press. 479p. (In Persian)
25.Sommer, H.E., Brown, C.L., and Kormanik, P.P. 1975. Differentiation of plantlets in longleaf pine (Pinus palustris Mill.) tissue cultured in vitro. Botanic Gaz. 136: 169-200.

26. 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. Journal of Agricultural Science and Technology. 16: 1355-1363.
27. Suarez, M.F., and Bozhkov, P.V. 2008. Plant Embryogenesis. Humana press. 184p.
28. Sujata, S., and Laishram, J.M. 2012. In vitro micropropagation of English Yew (*Taxus baccata* L.) from Manipur, India. Ne BIO. 3(3): 12-15.
29. Zocher, R., Weckwerth, W., Hacker, C., Kammer, B., Hornbogen, T., and Ewald, D. 1996. Biosynthesis of *Taxus*: Enzymatic acetyleation of 10-deacetylbaccatin- III in crude extracts from roots of *Taxus baccata* L. Biochemical and Biophysical Research communications. 229(1): 16- 20.
30. Zun- Ling, Zhu., Yuan- yuan, Xu., and Wang, Sa. 2014. The causes of European hornbeam seed dormancy and methods of breaking dormancy. Journal of Food, Agriculture and Environment. 12(2): 1149- 1152.

Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources
J. of Wood & Forest Science and Technology, Vol. 23 (1), 2016
http://jwfst.gau.ac.ir

Production of common yew (*Taxus baccata* L.) seedlings by embryo culture under in vitro conditions

***S.A. Razavi[1], S.M. Hosseini Nasr[2], F. Rostami Chrati[3] and H. Reza Doost[4]**

[1]Ph.D. Student, Dept. of Forestry, Sari University of Agricultural Science and Natural Resources, Lecturer, Dept., of Natural Resource, Gonbad Kavous University, Gonbad, Iran, [2]Associate Prof., Dept., of Forestry, Sari University of Agricultural Science and Natural Resources, Sari, Iran, [3]Associate Prof., Dept., of Chemistry, Faculty of Science, Gonbad Kavous University, Gonbad, Iran, [4]Assistant Prof., Medicinal Plant and Drugs Research Institute, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

Received: 01/20/2016 ; Accepted: 06/17/2016

Abstract

Background and objectives: *Taxus baccata* L. is one of the rare native coniferous species of Iran which its distribution is from Astara to Ali Abad Katoul (Golestan province) and Arasbaran forests. This species is highly valuable for preservation of genetic resources, medicinal uses and etc. At present, it is an endangered species for long seed dormancy, slow growth, illegal utilization and other disturbance factors. In order to conservation of present sites and their extension, production of yew seedlings by embryo culture under *in vitro* conditions was considered.

Materials and methods: Seeds after collection from the natural site in Afra Takhteh region, divided into 2 mature and immature groups. Then seeds stratified in sand layers and low temperature for 9 months. Seeds were soaked for 48 hours in running tap water and then disinfected. In order to sterilization of seeds, 7 treatments were considered. In this study, the embryo of sterilized seeds split from endosperm and was cultured in Murashige and Skoog (MS) medium that it was enriched with ascorbic acid (50, 100 mg L^{-1}), casein hydrolysate (50, 100 mg L^{-1}), yeast extraction (0.5, 1 g L^{-1}) and activated charcoal (2%). For slow growth of yew seedlings, providing of nutrients and medium, all the grown embryos were sub cultured biweekly. Data were analyzed with one and two ways ANOVA and Duncan tests.

Results: The results show that the best method for seed sterilization was H_2O_2 10% (for 15 min), and ethanol 70% (for 1 min) that any infection was observed. Other

*Corresponding author: razaviseyedali@yahoo.com

results show that the embryos started to regeneration about 10 days. The maximum of regeneration and normal seedlings was belonged to treatment 1 that it was consisted of mature seed, ascorbic acid and casein hydrolysate (100 mg L^{-1}), yeast extraction (1 g L^{-1}) and activated charcoal (2%).
Conclusion: MS medium containing 100 mg L^{-1} ascorbic acid and casein hydrolysate, 1 g L^{-1} yeast extraction and 2% activated charcoal, that the embryo of mature seeds had suitable regeneration, is suggested as suitable protocol for production of *Taxus baccata* L. seedlings.

Keywords: *Taxus baccata* L., Embryo, In vitro culture, Cold stratification