فصلنامه علوم محیطی، دوره شانزدهم، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۷

۲۱۳-۲۲۸

رویکرد حفاظتی به گونه در حال انقراض سُرخدار (*Taxus baccata L.*) با بهینه‌سازی کشت کالوس برای تولید تاکسول

مرضیه سرمدی[۱]، ناصر کریمی[۱] و محمدحسین میرجلیلی[۲]*

[۱] گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران

[۲] گروه کشاورزی، پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۲/۰۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۰/۰۵

سرمدی، م.، ن. کریمی و م.ح. میرجلیلی. ۱۳۹۷. رویکرد حفاظتی به گونه در حال انقراض سُرخدار (*Taxus baccata* L.) با بهینه‌سازی کشت کالوس برای تولید تاکسول. فصلنامه علوم محیطی. ۱۶(۴): ۲۲۸-۲۱۳.

سابقه و هدف: گیاه سُرخدار بعنوان مهمترین منبع تولید ترکیب ضد سرطان تاکسول، یکی از گونه‌های جنگلی بومی ایران است. این گیاه به دلیل رشد و زادآوری پایین و برداشت بی‌رویه از طبیعت در شمار گونه‌های در معرض انقراض قرار دارد. استفاده از تکنیک کشت بافت می‌تواند رویکرد بهره‌برداری از این گیاه باارزش برای تولید تاکسول را از عرصه‌های طبیعی به شرایط کنترل‌شده تغییر داده و آن را از خطر انقراض نجات دهد. بهره‌برداری پایدار از کشت‌های کنترل شده، بهینه‌سازی شرایط تولید زیست‌توده و کنترل عامل‌های بازدارنده رشد شامل ترکیب‌های فنولی و اکسایش آن‌ها در کشت کالوس و سلول سُرخدار ضرورت دارد. در این تحقیق استفاده مقایسه‌ای از مواد جاذب و ترکیبی از آنتی‌اکسیدان‌ها بمنظور بهبود رشد کالوس برای تولید تاکسول با دیدگاه حفاظت از ذخیره‌های ژنتیکی مورد مطالعه قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها: از سه تیمار زغال فعال (یک گرم در لیتر)، پلی وینیل پیرولیدون PVP (۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر) و یک ترکیب آنتی‌اکسیدانی شامل (۰/۲ گرم بر لیتر گلوتامین، ۰/۰۵ گرم بر لیتر اسید آسکوربیک و ۰/۰۵ گرم بر لیتر اسید سیتریک) در محیط رشد کالوس‌ها بمنظور تیماردهی استفاده شد. ۴ گرم از کالوس‌های ۶۰ روزه به محیط کشت کالوس حاوی هرکدام از تیمارها منتقل شدند و محیط کشت فاقد تیمار بعنوان گروه شاهد در نظر گرفته شد. بعد از گذشت ۲۱ روز میزان قهوه‌ای شدن کالوس‌ها، میزان وزن‌تر، وزن خشک و درصد زنده‌مانی بعنوان فاکتورهای رشدی و مورفولوژیک و محتوای پراکسید هیدروژن، محتوای مالون دی‌آلدئید، میزان فنول کل، فعالیت آنزیم پلی‌فنول اکسیداز و میزان تاکسول بعنوان فاکتورهای فیتوشیمیایی مورد مطالعه و بررسی قرار گرفتند.

نتایج و بحث: نتایج حاصل از تغییرپذیری‌های مورفولوژیکی و فیتوشیمیایی کالوس‌ها تحت تاثیر تیمارها نشان داد که تیمار ترکیب آنتی‌اکسیدانی با کاهش معنی‌دار محتوای پراکسید هیدروژن و کاهش استرس اکسیداتیو سبب کاهش میزان پراکسید اسیون لیپیدی و کاهش میزان قهوه‌ای‌شدن بافت‌ها گردید. همچنین تحت تاثیر این تیمار با کاهش میزان فنول کل و کاهش فعالیت آنزیم پلی‌فنول اکسیداز از اکسایش ترکیب‌های فنولی جلوگیری شده و درصد زنده‌مانی و میزان وزن تر و خشک آن‌ها افزایش یافت و از شدت قهوه‌ای‌شدن کالوس‌ها نسبت به نمونه شاهد بطور معنی‌داری کاسته شد. تیمار های PVP و زغال فعال نیز با اتصال به ترکیب‌های فنولی و کاهش تمرکز آن‌ها در سلول‌ها سبب کاهش فعالیت آنزیم پلی‌فنول اکسیداز شدند و به این ترتیب موجب افزایش معنی‌دار میزان زنده‌مانی و کاهش میزان قهوه‌ای

* Corresponding Author. *E-mail Address*: m-mirjalili@sbu.ac.ir

شدن کالوس‌ها گردیدند. در حالی‌که تغییر معنی‌داری در محتوای پراکسید هیدروژن، محتوای مالون دی‌آلدئید، میزان وزن تر، وزن خشک و محتوای تاکسول تحت تیمارهای PVP و زغال فعال مشاهده نشد. نبود افزایش وزن تر و خشک کالوس‌ها تحت تاثیر ترکیب‌های جاذب PVP و زغال فعال می‌تواند به‌دلیل جذب هورمون‌ها و ویتامین همراه با جذب ترکیب‌های سمی از محیط کشت توسط این ترکیب‌ها باشد.

نتیجه‌گیری: همه تیمارهای بکاربرده شده در کاهش میزان قهوه‌ای‌شدن و افزایش زنده‌مانی کالوس‌ها موثر بودند ولی تیمار ترکیب آنتی‌اکسیدانی به دلیل بیشترین تأثیر در بهبود رشد و افزایش میزان وزن تر و خشک همراه با افزایش تاکسول بعنوان بهترین تیمار برای بهینه‌سازی کشت کالوس سُرخدار پیشنهاد می‌شود.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌اکسیدان، انقراض، تاکسول، سُرخدار، کالوس.

مقدمه

گیاه سُرخدار[1] از بازدانگان متعلق به خانواده سرخدار[2] می‌باشد (Price, 1990). این گونه در بیشتر کشورهای اروپای معتدله تا عرض ۶۳ درجه در شمال و روسیه سفید در شرق، غرب آسیا (جنگل‌های قفقاز و هیرکانی) و شمال آفریقا گسترش یافته است (Svenning and Magård, 1999) و یکی از گونه‌های بومی ایران است که در ارتفاعات ۹۰۰ تا ۱۸۰۰ متری از سطح دریا در جنگل‌های شمال آستارا تا علی‌آباد کتول، استان گلستان و حوزه ارسبارن پراکنش دارد (Zare, 2001). تاکسول بعنوان مهمترین ماده ضدسرطان طبیعی از پوست تنه گونه‌های مختلف سُرخدار استخراج می‌شود (Mousavi *et al.*, 2011; Woo *et al.*, 1994). این ماده یک ترکیب دی‌ترپنوئیدی است که ویژگی درمانی آن برای انواع سرطان‌ها از جمله سرطان‌های سینه، تخمدان، کبد، خون و کاپوزی سارکومای وابسته به ایدز تائید شده‌است (Expósito *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2007). از آن‌جا که سُرخدار مهمترین منبع تولید این ماده با ارزش محسوب می‌شود و به دلیل اثربخشی بالا و استقبال گسترده و روزافزون به تهیه این ماده باارزش، گونه‌های سُرخدار از جمله (*T. baccata*) بسیار مورد توجه هستند (Woo *et al.*, 1994). میزان تولید تاکسول در درختان سُرخدار بسیار پایین است بطوری‌که برای تهیه یک گرم تاکسول نیاز به قطع سه درخت سُرخدار بالغ صدساله است (Witherup *et al.*, 1990). به‌همین دلیل با بهره‌برداری غیرقانونی و قطع بی‌رویه این درختان و با توجه به رشد خیلی کند و بذرآوری طولانی و نامنظم آن‌ها، زیستگاه‌های طبیعی سُرخدار به‌شدت مورد تهدید است و این گونه در فهرست گونه‌های در معرض انقراض قرار گرفته‌است (Alemi *et al.*, 2013; Behera *et al.*, 2000; Golalizadeh, 2010; Zare, 2001). محققان از طرفی در تلاش برای یافتن روش‌های جایگزین تولید تاکسول بمنظور افزایش بیشتر تولید و از سوی دیگر به‌دنبال جلوگیری از تخریب این گونه با ارزش هستند. به‌دلیل ساختار پیچیده شیمیایی تاکسول و پیچیدگی مسیر بیوسنتزی آن (حضور بیش از ۲۰ آنزیم در مسیر بیوسنتز) تولید شیمیایی و کاملا سنتتیک این ماده بسیار دشوار و مقرون به‌صرفه نیست (Hoffman and Shahidi, 2009; Witherup *et al.*, 1990). یکی از روش‌های پیشنهادی برای تولید تاکسول و بسیاری از متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی استفاده از تکنولوژی کشت بافت و سلول است (Fett-Neto *et al.*, 1993; Lan *et al.*, 2003; Zhang and Wu, 2003). بر این اساس در محیط آزمایشگاه از جداکشت‌های گیاهی، توده‌ای بی‌شکل و تمایزنیافته از سلول‌های گیاهی تحت عنوان کالوس تولید می‌شود که به‌خاطر رشد و تکثیر سریع منبع خوبی برای تولید متابولیت‌های ثانویه محسوب می‌شود (Filova, 2014). هرچند تولید متابولیت‌های ثانویه در کشت کالوس و سلول گیاهی پایین است ولی امروزه با بهینه‌سازی مرحله‌های کشت،

استفاده از القاءکننده‌های مختلف زیستی و غیرزیستی تحت عنوان الیسیتورها و همچنین با دست‌کاری‌های ژنتیکی و استفاده از تکنیک‌های مهندسی متابولیت تولید متابولیت‌های ثانویه در سیستم‌های کشت بافت و سلول گیاهی افزایش قابل ملاحظه‌ای یافته است (Zhao *et al.*, 2005). بطوری‌که استفاده از تکنیک کشت بافت و سیستم‌های بیوراکتوری مهمترین و کارآمدترین روش تولید تاکسول به‌شمار می‌آید (Lan *et al.*, 2003; Zhang and Wu, 2003). افزون بر تولید متابولیت‌های ثانویه، همچنین استفاده از سیستم کشت بافت در باززایی و تکثیر گیاهان از بافت کالوس آن‌ها بسیار مورد توجه است (Rajewski *et al.*, 2000) از آن‌جا که بذردهی درختان سُرخدار از سن ۳۰ سالگی شروع می‌شود و دوره کمون بسیار طولانی تا حدود یک سال دارد (Delevoy *et al.*, 1967) در نتیجه توانایی تولید کالوس و بهینه‌سازی تولید آن از جداکشت‌های سُرخدار می‌تواند، گامی موثر در پژوهش‌های باززایی و تکثیر این گیاه ارزشمند و مهمترین اصل در استقرار کشت‌های سوسپانسون سلولی و تولید تجاری تاکسول در بیوراکتورهای تجاری باشد.

یکی از مهمترین مشکل‌های کال‌زایی بویژه در گیاهان دارویی، قهوه‌ای‌شدن اکسایشی کالوس‌ها (oxidative browning) به‌دلیل تولید اکسیداسیون ترکیب‌های فنلی می‌باشد که سبب کاهش و یا توقف رشد سلول‌ها، کاهش قدرت باززایی و در نهایت مرگ سلول‌ها می‌شود (Jones and Saxena, 2013). در بسیاری از روش‌های کشت بافت گیاهی، ریزنمونه‌ها، بریده شده و سپس در محیط‌هایی که بطور نهفته دارای شرایط تنش هستند کشت می‌شوند. این امر سبب تولید و رهایش ترکیب‌های فنلی در ریزنمونه‌ها و یا محیط کشت می‌شود (Titov *et al.*, 2006). قهوه‌ای‌شدن بافت کالوس و رشد کند کالوس‌های سُرخدار به‌خاطر داشتن ترکیب‌های فنولی، شایعترین مشکل در تحقیق‌های کشت بافت سُرخدار می‌باشد (Abdelwahd *et al.*, 2008; Toulabi *et al.*, 2015). خنثی‌سازی یا حذف فنل‌ها در محیط کشت عاملی ضروری در تحقیق‌های کشت بافت گیاهی محسوب می‌شود که موفقیت پروژه‌های تحقیقاتی و صنعتی را تحت تاثیر قرار می‌دهد. برای حذف مواد تراوش‌شده و جلوگیری از تشکیل آن‌ها، روش‌های مختلفی پیشنهاد شده است، از جمله نگهداری کالوس‌ها در تاریکی و استفاده از آنتی‌اکسیدان هایی چون آسکوربیک اسید، ملاتونین و اسید سیتریک که تنش اکسایشی را کاهش داده و از اکسایش ترکیب‌های فنلی جلوگیری می‌کند (Gill and Gill, 1994; Khosroushahi *et al.*, 2011). همچنین به استفاده از مواد جاذبی مانند زغال فعال و پلی‌وینیل پیرولیدون (PVP) که با ترکیب‌های فنولی پیوند ایجاد کرده و سبب کاهش سمیت این ترکیب‌ها می‌شوند می‌توان اشاره کرد (Jones and Saxena, 2013).

نظر به ضرورت حفظ، احیاء و گسترش محدود توده‌های باقی‌مانده سُرخدار در شمال کشور، بهینه‌سازی کشت بافت این گیاه و کاهش مشکل قهوه‌ای‌شدن کالوس آن بسیار دارای اهمیت است. در این راستا بررسی‌های زیادی صورت گرفته است که بیشتر با تمرکز بر تاثیرهای عنصرهای غذایی، نوع محیط کشت و هورمون‌ها بوده است (Fett-Neto *et al.*, 1993; Jaziri *et al.*, 1996). بنابراین در تحقیق بالا سعی شد، استفاده مقایسه‌ای از مواد جاذب و ترکیبی از آنتی‌اکسیدان‌ها در بهبود رشد کالوس سُرخدار مورد مطالعه قرار گیرد. بدین منظور از پلی‌وینیل پیرولیدون، زغال فعال و ترکیبی از چند آنتی‌اکسیدان شامل (اسید آسکوربیک ، اسید سیتریک و اسید آمینه گلوتامین) بعنوان تیمار در کشت کالوس‌های این گیاه استفاده شد و بعد از گذشت ۲۱ روز برخی تغییرپذیری‌های مورفولوژیکی و بیوشیمیایی کالوس‌ها مطالعه و بهترین تیمار برای بهینه‌سازی کالوس و تولید تاکسول انتخاب و نشان داده شد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و القای کالوس

از سرشاخه‌های جوان سُرخدار بومی ایران واقع در دانشگاه شهید بهشتی تهران (ارتفاع از سطح دریا ۱۷۸۵ متر، ´۳۵°۴۸ عرض جغرافیایی شمالی و ´۵۱ °۲۳ طول جغرافیایی غربی) بعنوان ریزنمونه استفاده شد. ریزنمونه‌ها به‌مدت یک ساعت زیر آب جاری قرار داده شدند و بعد از حذف برگ‌ها، یک دقیقه در الکل ۷۰ درصد (V/V) و سپس در هیپوکلریت سدیم ۲ درصد به‌مدت ۲۰ دقیقه ضدعفونی شدند و در پایان در سه زمان با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. برای القای کالوس از محیط کشت گمبورگ (B5) حاوی ۶ میلی‌گرم در لیتر دو و چهار-دی‌کلرو فنوکسی استیک اسید (2,4-D) و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر کینتین (KIN) همراه با ۳۰ گرم در لیتر ساکارز با pH= ۵/۸ استفاده شد (Bruňáková *et al.*, 2004). ریزنمونه‌ها به قطعه‌های ۱ سانتی‌متری برش داده و بصورت افقی بر روی محیط کشت قرار داده شدند و در اتاق کشت با دمای ۲۵ درجه و در تاریکی تا زمان کالوس‌دهی نگهداری شدند. بعد از القای کالوس، کالوس‌ها از ریزنمونه‌ها جدا و به محیط رشد کالوس شامل ۰/۵ میلی‌گرم کینتین (KIN)، سه میلی‌گرم دو و چهار-دی‌کلرو فنوکسی استیک اسید (2,4-D) و ۰/۵ میلی‌گرم جیبرلین (GA3) منتقل شدند و در اتاق کشت با دمای ۲۵ و در تاریکی درجه نگهداری شدند و هر ۲۱ روز واکشت شدند (Bruňáková *et al.*, 2004).

طراحی آزمایش و بررسی تیمارهای مختلف

از سه تیمار زغال فعال (یک گرم در لیتر)، پلی‌وینیل پریلیدون (۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر) و یک ترکیب آنتی‌اکسیدانی شامل (۰/۲ گرم بر لیتر گلوتامین، ۰/۰۵ گرم بر لیتر اسید آسکوربیک و ۰/۰۵ گرم بر لیتر اسید سیتریک) در محیط رشد کالوس‌ها بمنظور تیماردهی استفاده شد. برای انجام تیمار ۴ گرم از کالوس‌های ۶۰ روزه به محیط کشت رشد کالوس حاوی هرکدام از تیمارها منتقل شدند. از آن‌جا که آنتی‌اکسیدان‌ها از جمله اسید آسکوربیک در برابر افزایش دما ناپایدار هستند، ترکیب آنتی‌اکسیدانی بعد از تهیه توسط فیلتر سرنگی ۰/۲۲ میکرومتر فیلتر شد و سپس به محیط کشت اتوکلاو شده برای تیماردهی اضافه شد. محیط کشت پایه رشد کالوس بدون هیچ‌گونه تیمار بعنوان گروه شاهد در نظر گرفته شد. همه نمونه‌های شاهد و تیمار به‌مدت ۲۱ روز در اتاق کشت و در تاریکی با دمای ۲۵ درجه نگهداری شدند.

اندازه‌گیری میزان وزن تر و خشک کالوس‌ها

بعد از گذشت ۲۱ روز از زمان تیماردهی، کالوس‌ها از محیط کشت جدا شده و بلافاصله وزن تر آن‌ها با ترازو مشخص گردید. سپس کالوس‌ها به‌مدت ۴۸ ساعت در دستگاه خشک‌کن انجمادی (Freez dryer) خشک شده و وزن خشک آن‌ها ثبت گردید.

تخمین میزان قهوه‌ای‌شدن بافت‌ها

بمنظور تعیین میزان قهوه‌ای‌شدن کالوس‌ها بعد از ۲۱ روز از زمان تیماردهی، بر اساس میزان قهوه‌ای‌شدن و تیره‌شدن کالوس‌ها در ۵ رتبه قرار داده شدند. کمترین میزان قهوه‌ای‌شدن با یک و بیشترین میزان آن با ۵ رتبه‌بندی شد.

بررسی زنده‌مانی سلول‌ها

کالوس‌ها با محلول رنگ‌آمیزی ۴٪وزنی-حجمی تریپان بلو (Trypan blue) رنگ‌آمیزی شدند و بعد از گذشت ۵ دقیقه سلول‌ها با لام شمارش‌کننده سلول (Haemocytometer) زیر میکروسکوپ نوری مشاهده شدند. آسیب‌دیدن دیوارهٔ سلولی و غشاء سلول‌های مرده، سبب نفوذ رنگ آبی به داخل آن‌ها می‌شود.

اندازه‌گیری میزان پراکسید هیدروژن (H_2O_2)

۰/۰۵ گرم از بافت تازه کالوس در ۱۵۰۰ ماکرولیتر TCA ۰/۱٪ ساییده شد و عصاره به‌دست آمده به مدت ۱۵ دقیقه در g ۱۵۰۰۰ سانتریفیوژ شد. سپس به ۵۰۰ ماکرولیتر از سوپرناتانت، ۵۰۰ ماکرولیتر بافر فسفات

پتاسیم ۱۰۰ میلی‌مولار (pH=۷) و ۱ میلی‌لیتر یدور پتاسیم ۱ مولار اضافه شد. مخلوط واکنش به‌مدت ۱ ساعت در تاریکی و در دمای اتاق نگهداری شد و سپس جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۳۹۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد (Alexieva *et al.*, 2001).

اندازه‌گیری محتوای مالون دی‌آلدئید (MDA)

۰/۱گرم بافت با ۲ میلی‌لیتر محلول تری‌کلرو استیک اسید ۱۰٪ دارای تیوباربیتوریک اسید ۰/۵٪ هموژن گردید. مخلوط در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه گرم شده و سپس به سرعت در حمام یخ سرد شد و ۳۰ دقیقه در ۱۰۰۰rpm سانتریفیوژگردید، جذب محلول رویی بالا توسط اسپکتروفوتومتر در ۵۳۲ nm خوانده شد. بمنظور تصحیح اثر عامل‌های مزاحم، جذب محلول در ۶۰۰nm نیز خوانده و از جذب ۵۳۲ nm کم شد. غلظت کمپلکس مالون دآلدئید- تیو بار بیتوریک اسید با استفاده از ضریب خاموشی ۱۵۵ محاسبه شد (Heath and Packer, 1968).

اندازه‌گیری فنول کل

برای اندازه‌گیری میزان فنول کل از روش فولین سیوکالتیو (Folin- Ciocalteu) استفاده شد (Ainsworth and Gillespie, 2007). برای این منظور یک گرم کالوس تر در متانول ۸۰٪ هموژن و به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سونیک شد. سپس در g ۱۵۰۰۰ برای ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید و سوپرناتانت بعد از خشک شدن تحت خلاء در یک میلی‌لیتر متانول حل و بعنوان عصاره برای اندازه‌گیری میزان فنول نگهداری شد. بمنظور اندازه‌گیری میزان فنول کل ۱۰۰ ماکرولیتر از عصاره تهیه شده با ۲۰۰ ماکرولیتر محلول فولین سیلکاتیو و ۷۰۰ ماکرولیتر کربنات سدیم ۷۰۰ میلی‌مولار مخلوط و برای دو ساعت در دمای ۲۵ درجه نگهداری شد. سپس جذب آن در طول موج ۷۶۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. از محلول اسید گالیک در غلظت‌های مختلف بعنوان استاندارد استفاده شد و نتایج به‌صورت میلی‌گرم اسید گالیک بر گرم وزن تر گزارش شد.

اندازه‌گیری آنزیم پلی‌فنول اکسیداز (PPO)

۰/۵ گرم از بافت تازه کالوس در بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار با pH هفت حاوی یک میلی‌مولار EDTA یک مولار و PVP یک درصد هموژن شد و سپس برای ۱۵ دقیقه در ۴ درجه سانتریفیوژ گردید و سوپرناتانت بعنوان عصاره برای سنجش فعالیت آنزیم استفاده شد (Gapińska *et al.*, 2008). برای سنجش فعالیت آنزیم پلی‌فنول اکسیداز ۵۰ ماکرولیتر عصاره آنزیمی با ۱/۹۵ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۰/۱ مولار با pH هفت حاوی ۰/۱ مولار کاتکول (catechol) بعنوان سوبسترا مخلوط شد. سپس افزایش جذب در طول موج ۴۱۰ نانومتر برای ۱ دقیقه اندازه‌گیری شد (Soliva *et al.*, 2000).

استخراج تاکسان‌ها از کشت سوسپانسیون سلولی سُرخدار

به یک گرم از سلول‌های خشک‌شده ۱۰۰ میلی‌لیتر متانول اضافه گردید. نمونه‌ها بعد از ۱۶ ساعت تکان داده شدن به‌مدت ۱۰ دقیقه در دستگاه اولتراسونیک قرار گرفتند تا دیواره سلولی کاملا هضم شود. بعد از صاف‌کردن سلول‌ها با استفاده از قیف جداکننده و حلال دی‌کلرو متان در سه مرتبه استخراج صورت گرفت تا تاکسان‌ها درون دی‌کلرو متان حل شود. سپس با استفاده از روتاری حلال جدا شده و عصاره به‌دست آمده در یک میلی‌لیتر استو نیتریل حل شد.

روش اندازه‌گیری تاکسول

برای اندازه‌گیری میزاندتاکسول از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) همراه با ستون دارای پرفکتسیل ۴/۶×۲۵ میلی‌متر C18 استفاده گردید. از حلال‌های استونیتریل/ آب HPLC بعنوان فاز متحرک (محلول B) استفاده شد و سرعت جریان حلال در ستون یک میلی‌لیتر بر دقیقه، دما ۲۵ درجه سانتی‌گراد، طول موج UV ۲۷۰ نانومتر و میزان نمونه تزریق شده ۲۰

میکرولیتر در نظر گرفته شد. از استاندارد تاکسول (سیگما) برای تعیین منحنی کالیبراسیون و محاسبه میزان تاکسول استفاده شد.

محاسبه‌های آماری

این آزمایش در قالب طرح فاکتوریل کاملاً تصادفی اجرا شد. نتایج با استفاده از نرم افزار SPSS و تجزیه واریانس یک‌طرفه ANOVA در سطح پنج درصد بررسی شد برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون دانکن و برای بررسی همبستگی بین متغیرها از ضریب پیرسون استفاده شد. نمودارها نیز توسط نرم‌افزار Microsoft Office Excel 2010 رسم شد.

نتایج و بحث

بررسی تاثیرهای تیمارهای بکاربرده شده بر رشد و مورفولوژی کالوس‌ها

نتایج حاصل از بررسی رشد و تغییرپذیری‌های مورفولوژیکی کالوس‌ها تحت تاثیر تیمارهای مختلف نشان داد که در همه تیمارها شدت قهوه‌ای‌شدن کالوس‌ها نسبت به نمونه شاهد کاهش و میزان زنده‌مانی، وزن‌تر و خشک افزایش می‌یابد. کاهش قهوه‌ای‌شدن در نمونه‌های تیمار شده با زغال فعال نسبت به نمونه شاهد معنی‌دار نبود و بیشترین کاهش قهوه‌ای‌شدن و افزایش زنده‌مانی مربوط به نمونه‌های تیمارشده با ترکیب آنتی‌اکسیدانی با ۹۱٪/۴۳ بود. همچنین بین نمونه‌های تیمارشده با زغال فعال و PVP از نظر زنده‌مانی و میزان قهوه‌ای‌شدن اختلاف معنی‌داری دیده نشد. بررسی نتایج وزن‌تر و خشک نیز نشان داد که تنها تیمار ترکیب آنتی‌اکسیدانی سبب افزایش معنی‌دار وزن تر و خشک کالوس‌ها نسبت به نمونه شاهد می‌شود و بین تیمارهای زغال فعال و PVP با یکدیگر و نسبت به نمونه شاهد در فاکتورهای رشدی (وزن تر و خشک) اختلاف معنی‌داری وجود ندارد (جدول ۱).

یکی از عامل‌های اصلی در قهوه‌ای‌شدن و مرگ سلولی در کشت بافت گیاهی، اکسایش ترکیب‌های فنولی و سمیت ناشی از اکسیده‌شدن آن‌ها است (Jones and Saxena, 2013; Titov *et al.*, 2006). ترکیب‌های آنتی‌اکسیدانی با کاهش رادیکال‌های آزاد و جلوگیری از اکسایش ترکیب‌های فنولی و جاذب‌های شیمیایی از طریق پیوند با ترکیب‌های فنولی در محیط کشت و کاهش اکسایش و سمیت آن‌ها سبب کاهش مرگ سلولی و جلوگیری از قهوه‌ای‌شدن بافت می‌شوند (Krishna *et al.*, 2008). تأثیر مثبت آنتی‌اکسیدان‌ها مانند اسید آسکوربیک، اسید سیتریک و استفاده از PVP در کاهش ترکیب‌های فنلی و بهبود رشد کالوس‌های (*Abies balsamea*)، (*Arctium lappa*)، (*Lichi chinensis*)، (*Pinus sylvesteris*) و (*Picea gluca*) نیز مشاهده شده است (Jones and Saxena, 2013; Palma *et al.*, 2001). مشخص شده است که جاذب‌های شیمیایی ازجمله زغال فعال افزون بر جذب ترکیب‌های سمی و ترکیب‌های فنولی از محیط کشت، هورمون‌ها و ترکیب‌های محرک رشد از قبیل ویتامین‌های تیامین و اسید نیکوتینیک را نیز از محیط کشت جذب می‌کنند و دسترسی سلول‌ها را به آن‌ها کاهش می‌دهند (Madhusudhanan and Rahiman, 2000) به این ترتیب نبود افزایش رشد و گاهی کاهش رشد در نمونه‌های تیمارشده با زغال فعال در تحقیق‌های قبلی و تحقیق حاضر می‌تواند توجیه‌پذیر باشد.

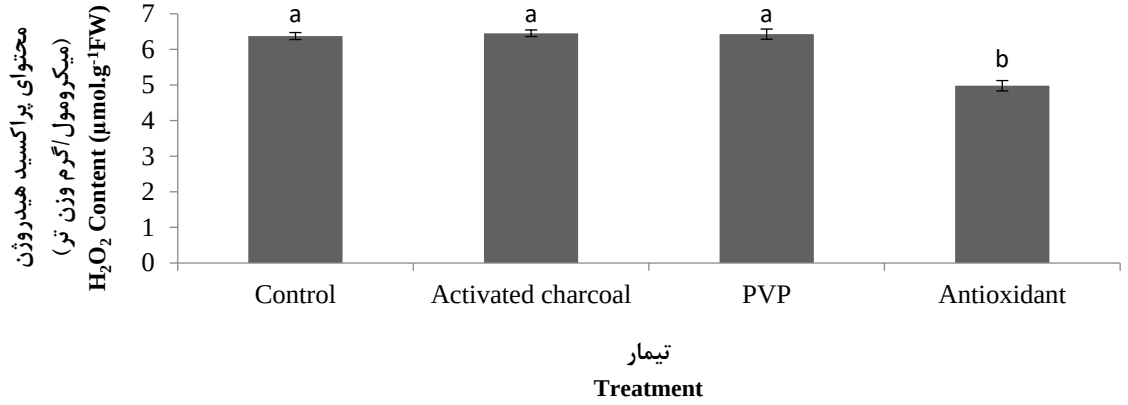
بررسی تاثیرهای تیمارهای بکاربرده شده بر پراکسید هیدروژن و پراکسیداسیون لیپید غشائی

بررسی تغییرپذیری‌های میزان پراکسید هیدروژن تحت تیمارهای مختلف نشان داد که تیمار ترکیب آنتی‌اکسیدانی سبب کاهش معنی‌دار محتوای پراکسید هیدروژن نسبت به نمونه کنترل و دیگر تیمارها می‌شود و بین تیمارهای PVP و زغال فعال با یکدیگر و با نمونه شاهد، اختلاف معنی‌داری در محتوای پراکسید هیدروژن وجود ندارد (شکل ۱).

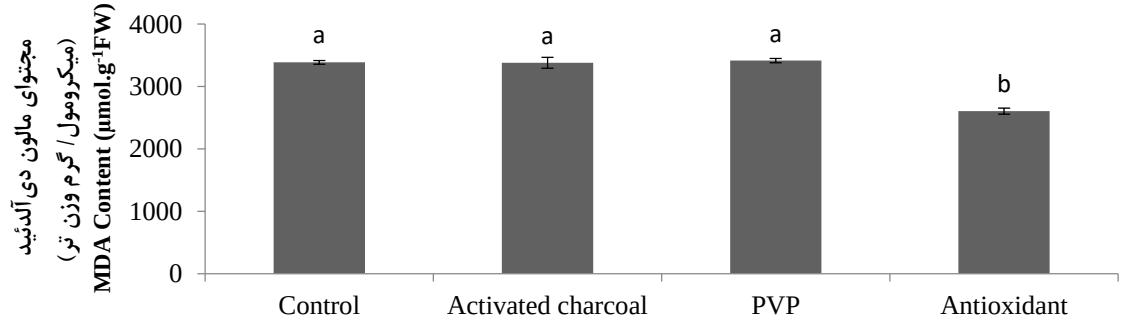
جدول ۱- بررسی تغییرپذیری‌های میانگین صفات رشدی و مورفولوژیک کالوس‌ها تحت تاثیر تیمارهای مختلف بعد از ۲۱ روز
Table 1. Comparison of mean growth and morphological characteristics under different treatments after 21 days

میزان قهوه‌ای‌شدن Browning rate	زنده مانی سلول (٪) Cell viability (%)	وزن خشک (گرم) Dry weight (g)	وزن تر (گرم) Fresh weight (g)	تیمار Treatment
3.50 ± 0.28a	66.66 ± 1.45a	0.37 ± 0.01a	5.88 ± 0.13a	شاهد Control
2.83 ± 0.16ab	86.33 ± 1.33b	0.36 ± 0.01a	5.99 ± 0.14a	زغال فعال Activated charcoal
1.85 ± 0.76bc	87.33 ± 1.45b	0.38 ± 0.02a	6.12 ± 0.21a	پلی وینیل پیرولیدون PVP
1.50 ± 0.26c	91.43 ± 1.85c	0.41 ± 0.01b	6.87 ± 0.14b	ترکیب آنتی‌اکسیدان Antioxidant compound

*مقادیر دارای حروف مشترک در هر ستون فاقد تفاوت معنی‌دار آماری در سطح احتمال 5 درصد بر اساس آزمون آماری دانکن میباشند.
*Values in each column followed by similar letters are not significantly different at 5% probability level, using Duncan's Multiple Range Test.



شکل ۱- مقایسه میانگین محتوای پراکسید هیدروژن تحت تیمارهای مختلف بعد از ۲۱ روز
Fig. 1- Comparison of mean H2O2 content under different treatments after 21 days



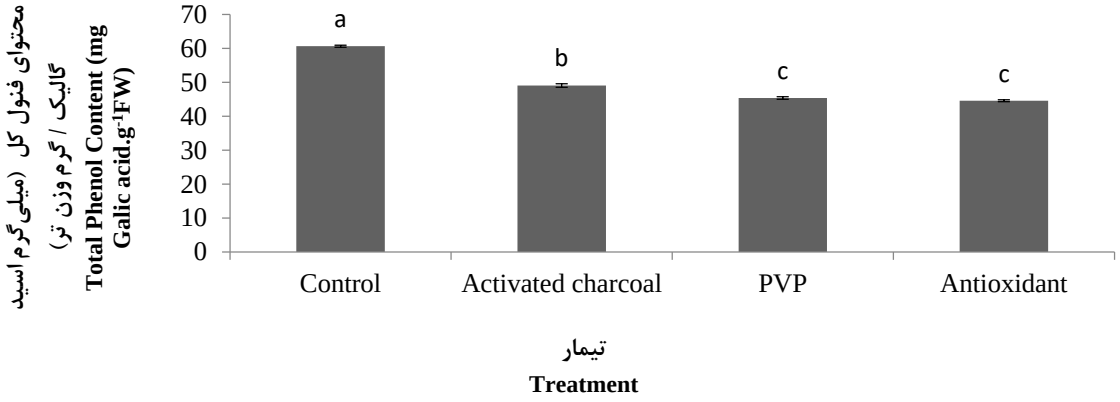
شکل ۲- مقایسه میانگین محتوای مالون دی‌آلدئید تحت تیمارهای مختلف بعد از ۲۱ روز
Fig. 2- Comparison of mean MDA content under different treatments after 21 days

بررسی تغییرپذیری‌های محتوای مالون دی‌آلدئید بعنوان نشان‌گر پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی نیز نشان داد که با تیمار ترکیب آنتی‌اکسیدانی میزان پراکسیداسیون لپید با کاهش محتوای مالون دی‌آلدئید بطور معنی‌داری نسبت به نمونه شاهد کاهش می‌یابد (کاهش ۲۳ درصدی نسبت به شاهد). همچنین بین تیمارهای PVP و زغال فعال از نظر تغییرپذیری‌های محتوای مالون دی‌آلدئید نسبت به یکدیگر و نمونه شاهد اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (شکل۲).

افزایش پراکسید هیدروژن و پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی نشان‌گر استرس اکسیداتیو در سلول‌ها و بافت‌ها می‌باشد (Neill *et al.*, 2002). استرس اکسیداتیو بطور معمول در اثر عامل‌های تنش‌زا از جمله زخمی‌شدن بافت‌ها و تغییرپذیری‌های محیطی اتفاق می‌افتند که در اثر آن مجموعه پیچیده‌ای از تغییرپذیری‌های شیمیایی و پاسخ‌های آنتی‌اکسیدانی دربافت‌های گیاهی روی می‌دهد (Mittler, 2002; Sairam and Saxena, 2000). ترکیب‌های آنتی‌اکسیدانی با کاهش رادیکال‌های آزاد از جمله پراکسید هیدروژن سبب کاهش استرس اکسیداتیو و آسیب‌های ناشی از آن‌ها می‌شوند. پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی یکی از اثرهای ناشی از استرس اکسیداتیو است که در صورت کنترل نکردن استرس اکسیداتیو سبب مرگ‌سلولی و تخریب بافتی گسترده می‌شود (Liu and Huang, 2000). کاهش پراکسیداسیون لیپید تحت تاثیر ترکیب‌های آنتی‌اکسیدانی می‌تواند نتیجه کاهش استرس اکسیداتیو و خنثی‌شدن رادیکال‌های آزاد ازجمله پراکسیدهیدروژن در بافت‌های تیماردیده باشد.

بررسی تاثیرهای تیمارهای بکاربرده شده بر میزان فنول کل و فعالیت آنزیم پلی‌فنول اکسیداز

ترشح ترکیب‌های فنولی از جداکشت‌ها و کالوس‌های سُرخدار و قهوه‌ای شدن کالوس ها یکی از مشکل‌های متداول در همه تحقیق‌های کشت بافت سُرخدار محسوب می‌شود (Toulabi *et al.*, 2015). نتایج حاصل از اندازه‌گیری میزان فنول‌کل در کالوس‌ها تحت تیمارهای مختلف در مقایسه با نمونه شاهد در (شکل ۳) نشان داده‌شده است. در حضور زغال فعال، PVP و ترکیب‌های آنتی‌اکسیدانی میزان ترکیب‌های فنولی بطور معنی‌داری تغییر کرد. این تغییر در تیمار ترکیب آنتی‌اکسیدانی با کاهش ۲۶/۴۹ درصدی نسبت به نمونه شاهد همراه بود و بعد از آن به‌ترتیب تیمارهای PVP زغال فعال، کمترین میزان فنول کل را نشان دادند، ولی بین میزان فنول نمونه‌های تیمار شده با PVP و ترکیب‌های آنتی‌اکسیدانی اختلاف معنی‌دار نبود.

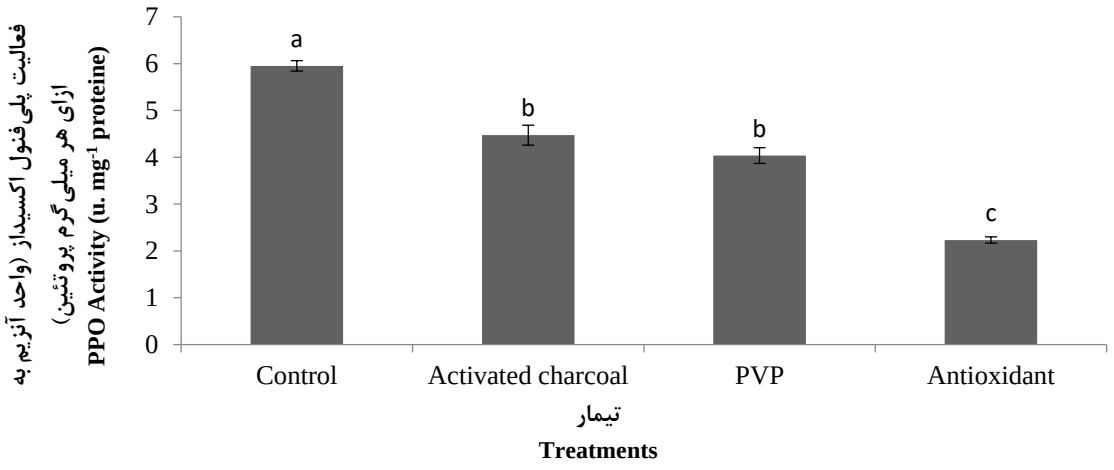


شکل ۳- مقایسه میانگین محتوای فنول کل تحت تیمارهای مختلف بعد از ۲۱ روز

Fig. 3- Comparison of mean total phenol content under different treatments after 21 days

بررسی تغییرپذیری‌های فعالیت آنزیم پلی‌فنول اکسیداز نیز نشان داد که تحت تاثیر همه تیمارهای بکاربرده شده، بطور معنی‌داری از فعالیت این آنزیم کاسته شد و تیمار ترکیب آنتی‌اکسیدانی کمترین میزان فعالیت آنزیمی را در مقایسه با نمونه شاهد و دیگر تیمارها نشان داد. همچنین بین فعالیت آنزیم در نمونه‌های تیمارشده با زغال فعال و PVP اختلاف، معنی‌دار نبود (شکل ۴). دلیل اصلی قهوه‌ای‌شدن بافت‌های گیاهی تجمع و اکسایش ترکیب‌های فنلی در بافت‌ها می‌باشد که بیشتر بعنوان پاسخ دفاعی گیاه به استرس‌های زنده و غیرزنده رخ

می‌دهد (Titov *et al.*, 2006). آنزیم پلی‌فنل اکسیداز که در پلاست‌های سلول‌های گیاهی قرار دارد در اکسایش ترکیب‌های فنولی و قهوه‌ای شدن بافت‌ها نقش بسزایی دارد. در شرایط عادی، این آنزیم در پلاست‌های سلول‌های گیاهی قرار دارد و پیش‌ماده فنولی آن در واکوئل سلول‌های گیاهی ذخیره شده‌است و به دلیل این جدایی مکانی از واکنش قهوه‌ای‌شدن در بافت‌ها ممانعت می‌گردد. در صورت آسیب به سلول‌های گیاهی و بویژه در زمان کشت با زخمی‌شدن ریزنمونه‌ها و کالوس‌ها این آنزیم و پیش‌ماده آن با هم مخلوط شده و پدیده قهوه‌ای‌شدن در بافت‌ها رخ می‌دهد (Vahdatpour *et al.*, 2009). یکی از روش‌های بهبود رشد کالوس‌ها حذف و کاهش این ترکیب‌های سمی با استفاده از ترکیب‌هایی همچون جاذب‌های شیمیایی زغال فعال و PVP و یا استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها بمنظور کاهش تولید و ترشح ترکیب‌های فنولی است (Palma *et al.*, 2001). در تحقیق حاضر استفاده از زغال فعال و PVP با اتصال به ترکیب-های فنولی، کاهش حضور آن‌ها در سلول‌های تیمار شده را سبب شدند. همچنین با کاهش دسترسی آنزیم پلی‌فنول اکسیداز به سوبسترای فنولی در حضور جاذب‌های نام برده فعالیت این آنزیم نیز کاهش یافت که می‌تواند با کاهش اکسایش ترکیب‌های فنولی و کاهش تاثیرهای سمی آن‌ها افزایش زنده‌مانی و کاهش میزان قهوه‌ای‌شدن کالوس‌ها را سبب شود (جدول ۱). استفاده از ترکیب‌های آنتی‌اکسیدان از جمله اسید آسکوربیک و اسید سیتریک در کنار اسید آمینه‌هایی که نقش آنتی‌اکسیدانی دارند از جمله گلوتامین با حذف رادیکال‌های آزاد از جمله پراکسید هیدروژن و کاهش استرس اکسیداتیو می‌تواند راهی موثر برای کاهش اکسایش ترکیب‌های فنولی توسط رادیکال‌های آزاد و کاهش فعالیت آنزیم پلی‌فنول اکسیداز باشد. همچنین با کاهش استرس اکسیداتیو، ترشح ترکیب‌های فنولی بعنوان نوعی پاسخ دفاعی متداول در استرس‌های اکسیداتیو کاهش می‌یابد و به این ترتیب اثرهای سمی ناشی از تمرکز و تجمع ترکیب‌های فنولی در سلول‌ها کاهش یافته و افزایش زنده‌مانی و رشد بهتر کالوس‌ها و تولید کالوس‌های سالمتر با رنگ روشن را سبب می‌شود (جدول۱). در راستای تحقیق بالا، کاهش فعالیت آنزیم پلی‌فنول اکسیداز در حضور اسید سیتریک در کالوس‌های (*Taxus baccata*) در حضور تیمارهای جداگانه اسید آسکوربیک و اسید سیتریک نیز گزارش شده است (Khosroushahi *et al.*, 2011).

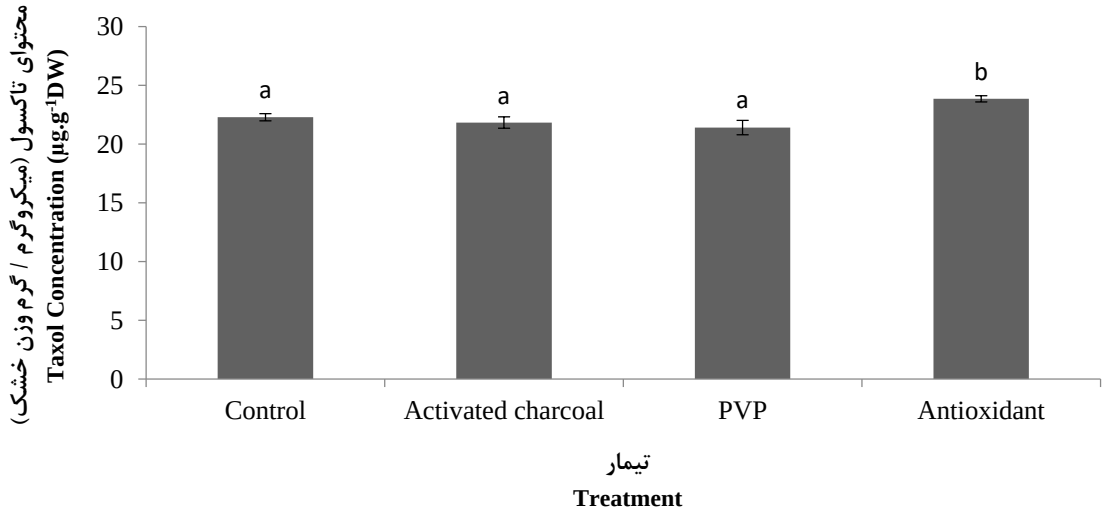


شکل ۴- مقایسه میانگین فعالیت آنزیم پلی‌فنول اکسیداز تحت تیمارهای مختلف بعد از ۲۱ روز

Fig. 4- Comparison of mean polyphenol oxidase activity under different treatments after 21 days

بررسی تاثیرهای تیمارهای بکاربرده شده بر میزان تاکسول

تیمارهای PVP و زغال فعال تغییر معنی‌داری در میزان تاکسول ایجاد نکردند اما ترکیب آنتی‌اکسیدانی سبب افزایش معنی‌دار میزان تاکسول نسبت به نمونه شاهد گردید (شکل ۵). افزایش تاکسول تحت تیمار آنتی‌اکسیدانی می‌تواند به دلیل بهبود رشد و افزایش زنده‌مانی سلول‌ها نسبت به نمونه شاهد باشد. افزایش تولید تاکسول تحت تیمار اسید آسکوربیک در کالوس‌های این گیاه پیشتر گزارش شده است (Khosroushahi *et al.*, 2011) که هماهنگ با نتایج حاصل از تحقیق بالا تحت تاثیر آنتی‌اکسیدان‌های اسید آسکوربیک، اسید سیتریک و گلوتامین می‌باشد.



شکل ۵- مقایسه میانگین میزان تاکسول تحت تاثیر تیمارهای مختلف بعد از ۲۱ روز
Fig. 5- Comparison of mean taxol concentration under different treatments after 21 days

بررسی ضریب همبستگی بین صفات بیوشیمیای و مورفولوژیکی مطالعه‌شده تحت تیمارهای بکاربرده شده

نتایج حاصل از بررسی ضریب همبستگی بین صفات مورفولوژیکی و تغییرپذیری‌های بیوشیمیایی موید این مطلب بود که بین میزان ترکیب‌های فنولی، میزان زنده‌مانی و قهوه‌ای‌شدن کالوس‌ها ارتباط مثبت و معنی‌دار وجود دارد (جدول۲). بطوری‌که تحت تیمار PVP و زغال فعال، میزان تولید ترکیب‌های فنولی و فعالیت آنزیم پلی‌فنول اکسیداز کاهش و در راستای آن میزان زنده‌مانی کالوس‌ها افزایش و از شدت قهوه‌ای‌شدن آن‌ها کاسته شد. همچنین مشخص شد بین صفت محتوای پراکسید هیدروژن با میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی، فعالیت آنزیم پلی‌فنول اکسیداز، میزان قهوه‌ای‌شدن ارتباط مثبت و معنی‌دار و با صفات وزن تر، خشک و تولید تاکسول ارتباط منفی و معنی‌داری وجود دارد (جدول۲) بطوری‌که تحت تیمار آنتی‌اکسیدانی با کاهش میزان پراکسید هیدروژن از میزان پراکسیداسیون لیپدهای غشایی و همچنین فعالیت آنزیم پلی‌فنول اکسیداز کاسته شد و با کاهش فعالیت آنزیم پلی‌فنول اکسیداز و کاهش میزان فنول کل، کاهش قهوه‌ای‌شدن و افزایش زنده‌مانی، میزان وزن تر، ورن خشک و تولید تاکسول اتفاق افتاد.

جدول ۲- همبستگی بین صفات

Table 2- Correlation between treatments

صفت Treat	پراکسید هیدروژن H_2O_2	قهوه‌ای شدن Browning	مالون‌دی آلدئید MDA	فنول Phenol	وزن‌خشک Dry Weight	وزن‌تر Fresh weight	زنده‌مانی Viability	پلی‌فنول اکسیداز PPO	تاکسول Taxol
پراکسید هیدروژن H_2O_2	1								
قهوه‌ای شدن Browning	.671*	1							
مالون‌دی‌آلدئید MDA	.945**	.588*	1						
فنول Phenol	.415	.781**	.449	1					
وزن‌خشک Dry Weight	-.735**	-.574	-.794**	-.454	1				
وزن‌تر Fresh weight	-.810**	-.420	-.799**	-.541	.813**	1			
زنده مانی Viability	-.388	-.709**	-.485	-.968**	.461	.529	1		
پلی‌فنول‌اکسیداز PPO	.770**	.777**	.814**	.868**	-.710**	-.767**	-.869**	1	
تاکسول Taxol	-.790**	-.189	-.797**	-.152	.743**	.738**	.199	-.580*	1

**همبستگی معنی‌دار در سطح ۰/۰۱ (دو دنباله).

* همبستگی معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ (دو دنباله).

**Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed)

*Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed)

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از بررسی و مقایسه تیمارهای مختلف در بهبود رشد و نمو کالوس سُرخدار نشان داد که تحت تاثیر تیمارهای مطالعه شده، کالوس‌های بهتر و سالمتری نسبت به نمونه شاهد تولید می‌شود، ولی کالوس‌های تولیدشده تحت تیمار ترکیب آنتی‌اکسیدانی به‌دلیل داشتن بالاترین میزان وزن تر و خشک و بیشترین درصد زنده‌مانی در کنار بیشینه تولید تاکسول تیمار موفق‌تری نسبت به دیگر تیمارها محسوب می‌شود و می‌تواند بعنوان یک ترکیب موثر در بهبود رشد کالوس بمنظور پیشبرد بهتر تحقیق‌های بسیار در کشت بافت سُرخدار و کاهش ریسک انقراض این گونه‌ی باارزش پیشنهاد گردد.

سپاسگزاری

از معاونت‌های پژوهشی دانشگاه رازی کرمانشاه و دانشگاه شهید بهشتی تهران برای حمایت مالی از این تحقیق و همچنین از جناب آقای مهندس حمید احدی کارشناس گروه کشاورزی و دیگر همکاران محترم پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی دانشگاه شهید بهشتی که ما را در اجرای این تحقیق یاری کردند، تشکر و قدردانی می‌نماییم.

پی‌نوشت‌ها

1 English yew (Taxus baccata L.)
2 Taxaceae

منابع

Abdelwahd, R., Hakam, N., Labhilili, M. and Udupa, S.M., 2008. Use of an adsorbent and antioxidants to reduce the effects of leached phenolics in in vitro plantlet regeneration of faba bean. African Journal of Biotechnology. 7, 997-1002.

Ainsworth, E.A. and Gillespie, K.M., 2007. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. Nature Protocols. 2, 875-877.

Alemi, A., Eslami, A. and Shataee joibari, S., 2013. Investigation on development potential of endangered species of *Taxus baccata* at Golestan Province, based on GIS technology (Case study: Pooneh Aram reserve). Iranian journal of Forests and Poplar Research. 21, 678- 689 (In Persian with English abstract).

Alexieva, V., Sergiev, I., Mapelli, S. and Karanov, E., 2001. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. Plant, Cell & Environment. 24, 1337-1344.

Behera, M.D., Srivastava, S., Kushwaha, S. and Roy, P., 2000. Stratification and mapping of *Taxus baccata* L. bearing forests in Talle Valley using remote sensing and GIS. Current Science. 1008-1013.

Bruňáková, K., Babincova, Z. and Čellárová, E., 2004. Selection of callus cultures of *Taxus baccata* L. as a potential source of paclitaxel production. Engineering in Life Sciences. 4, 465-469.

Delevoy, D., Jackson, W. and Harrison, S., 1967. A handbook of Coniferae and Ginkgoaceae, New York: St. Martin's Press.

Expósito, O., Bonfill, M., Onrubia, M., Jané, A., Moyano, E., Cusidó, R.M., Palazón ,J. and Piñol, M.T., 2009. Effect of taxol feeding on taxol and related taxane production in *Taxus baccata* suspension cultures. New biotechnology. 25, 252-259.

Fett-Neto, A.G., Melanson, S.J., Sakata, K. and DiCosmo, F., 1993. Improved growth and taxol yield in developing calli of *Taxus cuspidata* by medium composition modification. Nature Biotechnology. 11, 731.

FILOVÁ, A., 2014. Production of secondary metabolities in plant tissue cultures. Research Journal of Agricultural Science. 46, 236- 245.

Gapińska, M., Skłodowska, M. and Gabara, B., 2008. Effect of short-and long-term salinity on the activities of antioxidative enzymes and lipid peroxidation in tomato roots. Acta Physiologiae Plantarum. 30, 11- 18.

Gill, R. and Gill, S., 1994. In-vitro Exudation of Phenols in Eucalyptus. Indian Forester. 120, 504-509.

Golalizadeh, D., 2010. Phytosociological study on natural *T. baccata* in forests of Gorgan, Qaemshahr and Noor. MSc thesis, Department of Forestry, Faculty of Natural Resources, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran.

Heath, R.L. and Packer, L., 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Archives of Biochemistry and Biophysics. 125, 189-198.

Hoffman, A. and Shahidi, F., 2009. Paclitaxel and other taxanes in hazelnut. Journal of Functional Foods. 1, 33-37.

Jaziri, M., Zhiri, A., Guo, Y.-W., Dupont, J.-P., Shimomura, K., Hamada, H., Vanhaelen, M. and Homès, J., 1996. Taxus sp. cell, tissue and organ cultures as alternative sources for taxoids production: a literature survey. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 46, 59-75.

Jones, A.M.P. and Saxena, P.K., 2013. Inhibition of phenylpropanoid biosynthesis in Artemisia annua L.: a novel approach to reduce oxidative browning in plant tissue culture. PloS One. 8, 1- 13.

Khosroushahi, A.Y., Naderi-Manesh, H. and Simonsen, H.T., 2011. Effect of antioxidants and carbohydrates in callus cultures of Taxus brevifolia: evaluation of browning, callus growth, total phenolics and paclitaxel production. BioImpacts: BI. 1, 37.

Krishna, H., Sairam, R., Singh, S., Patel, V., Sharma, R., Grover, M., Nain, L. and Sachdev, A., 2008. Mango explant browning: Effect of ontogenic age, mycorrhization and pre-treatments. Scientia Horticulturae. 118, 132-138.

Lan, W., Yu, L., Li, M. and Qin, W., 2003. Cell death unlikely contributes to taxol production in fungal elicitor-induced cell suspension cultures of Taxus chinensis. Biotechnology Letters. 25, 47-49.

Liu, X. and Huang, B., 2000. Heat stress injury in relation to membrane lipid peroxidation in creeping bentgrass. Crop Science. 40, 503-510.

Madhusudhanan, K. and Rahiman, B., 2000. The effect of activated charcoal supplemented media to browning of in vitro cultures of Piper species . Biologia Plantarum. 43, 297-299.

Mittler, R., 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends in Plant Science. 7, 405-410.

Mousavi, B., Parsaeimehr, A. and Irvani, N., 2011. Influences of growth regulators on callus induction, ephedrine and pseudoephedrine contents and chemical analysis of mature embryo of Ephedra strobilacea Bunge.

Neill, S.J., Desikan, R., Clarke, A., Hurst, R.D. and Hancock, J.T., 2002. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. Journal of Experimental Botany. 53, 1237-1247.

Palma, M., Piñeiro, Z. and Barroso, C.G., 2001. Stability of phenolic compounds during extraction with superheated solvents. Journal of Chromatography A. 921, 169-174.

Price, R.A., 1990. The genera of Taxaceae in the southeastern United States. Journal of the Arnold Arboretum. 71, 69-91.

Rajewski, M., Lange, S. and Hattemer, H., 2000. Problems of reproduction in the genetic conservation of rare tree species: the example of common yew (*Taxus baccata* L.). Forest Snow and Landscape Research. 75, 251-266.

Sairam, R. and Saxena, D., 2000. Oxidative stress and antioxidants in wheat genotypes: possible mechanism of water stress tolerance. Journal of Agronomy and Crop Science. 184, 55- 61.

Soliva, R.C., Elez, P., Sebastián, M .and Martín, O., 2000. Evaluation of browning effect on avocado purée preserved by combined methods. Innovative Food Science and Emerging Technologies. 1, 261-268.

Svenning, J.-C. and Magård, E., 1999. Population ecology and conservation status of the last natural population of English yew *Taxus baccata* in Denmark. Biological Conservation. 88, 173-182.

Titov, S., Bhowmik, S.K., Mandal, A., Alam, M.S. and Uddin, S.N., 2006. Control of phenolic compound secretion and effect of growth regulators for organ formation from Musa spp. cv. Kanthali floral bud explants. Am. J. Biochem. Biotechnol. 2, 97-104.

Toulabi, S.B., Moieni, A., Ghanati, F. and Emami, F., 2015. Investigation of the Effects of the Basal Medium, Auxin and Antioxidants on the Induction and Maintenance of Callus and Taxol Production in Yew (*Taxus baccata*). Journal of Advances in Biology & Biotechnology. 3, 2394- 1081.

Vahdatpour, F., Mashayekhi, K. and Piri Zirkouhi,

M., 2009. Investigation of ontioxidant effect turmeric in comparing with active coal and ascorbic acid in cultural medium of Ulmas pavrifolia Jasq. Callus. plant production researches. 16, 1- 14 (In Persian with English abstract).

Witherup, K.M., Look, S.A., Stasko, M.W., Ghiorzi, T.J., Muschik, G.M. and Cragg, G.M., 1990. Taxus spp. needles contain amounts of taxol comparable to the bark of *Taxus brevifolia*: analysis and isolation. Journal of Natural Products. 53, 1249-1255.

Woo, D.D., Miao, S.Y., Pelayo, J.C. and Woolf, A.S., 1994. Taxol inhibits progression of congenital polycystic kidney disease. Nature. 368, 750- 753.

Zare, H., 2001. Introduced and Native Conifers in Iran. Agricultural Research, Educational and Extention Organization.

Zhang, C.-H. and Wu, J.-Y., 2003. Ethylene inhibitors enhance elicitor-induced paclitaxel production in suspension cultures of Taxus spp. cells. Enzyme and Microbial Technology. 32, 71-77.

Zhang, C.H., Fevereiro, P.S., He, G. and Chen, Z., 2007. Enhanced paclitaxel productivity and release capacity of Taxus chinensis cell suspension cultures adapted to chitosan. Plant Science. 172, 158-163.

Zhao, J., Davis, L.C. and Verpoorte, R., 2005. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. Biotechnology Advances. 23, 283-333.

Environmental Sciences Vol.16 / No.4 / Winter 2019

213-228

An approach to the conservation of the endangered yew (*Taxus baccata L.*) by optimizing callus culture for taxol production

Marziyeh Sarmadi[1], Naser Karimi[1] and Mohammad Hossein Mirjalili[2*]

[1] Department of Biology, Faculty of Sciences, Razi University, Kermanshah, Iran

[2] Department of Agriculture, Medicinal Plants and Drugs Research Institute, Shahid Beheshti University, G.C., Tehran, Iran

Received: 2018.04.23 Accepted: 2018.12.26

Sarmadi, M., Karimi, N. and Mirjalili, M.H., 2019. An approach to the conservation of the endangered yew (*Taxus baccata* L.) by optimizing callus culture for taxol production. Environmental Sciences. 16(4): 213-228.

Introduction: *Taxus baccata* is one of the native forest species in Iran. It is one of the most important sources of taxol, an anti-cancer compound. This plant is an endangered species due to its low growth and regeneration and also over-harvesting. Taxol production by tissue culture technique can protect this plant from the danger of extinction. In this study, the improvement of the growth of callus and taxol production in *Taxus baccata* were assessed using chemical absorbents and antioxidant compounds.

Material and methods: Activated charcoal (1 g/l), Polyvinylpyrrolidone (PVP; 250 mg/l) and an antioxidant compound (0.2 g/l glutamine, 0.05 g/l ascorbic acid and 0.05 g/l citric acid) were used for treating in a callus growth medium. Four grams of 60 day-old calli were transferred to a callus growth medium containing each of the treatments, where the untreated culture medium was considered as the control group. After 21 days, the amount of callus browning, wet weight, dry weight and viability as growth and morphological factors and also hydrogen peroxide (H_2O_2), malondialdehyde, total phenol, polyphenol oxidase activity and taxol amount as phytochemical factors were studied and evaluated.

Results and discussion: The results of morphological and phytochemical changes of calli under treatments showed that the antioxidant compound reduced the H_2O_2 and lipid peroxidation amount and with the reduction of oxidative stress, browning of tissues decreased. Also, under this treatment, with decreasing total phenol and activity of phenoloxidase, the amount of phenol oxidation decreased significantly. So, cell viability and wet and dry weight were increased and the amount of tissue browning was decreased. By absorbing the phenolic compound, activated charcoal and PVP decreased the polyphenol oxidase activity. The decrease in the polyphenol oxidase activity increased cell viability and prevented tissue browning. Under these treatments, no significant changes in H_2O_2 and MDA content, and wet and dry weight was observed. No changes were

* Corresponding Author. *E-mail Address*: m-mirjalili@sbu.ac.ir

observed in the callus growth, which may be due to the absorption of hormones and vitamins along with the absorption of toxic compounds from the medium.

Conclusion: All treatments were effective in decreasing the amount of tissue browning and increasing the viability of calli, but antioxidant compound treatment was the most effective in improving growth and increasing wet and dry weight with increasing taxol. Therefore, it is suggested as the best treatment for optimizing the callus culture of yew.

Keywords: Antioxidan, Browning, Callus, Extinction, Taxol, Yew.