Research Article

Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research DOI: 10.22092/IJRFPBGR.2024.364201.1453

Vol. 31, No. 2, Page 275-289 (2024)

Effect of Explant Size on Callus Biomass Production and Characteristics of European Yew (*Taxus baccata* L.) and Pacific Yew (*T. brevifolia* Nutt.) under *in vitro* Culture

S. S. Emadi-Elyerdi[1] and M. S. Sabet[2*]

1- M.Sc. graduate, Dept. Plant Genetics and Breeding, College of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, I. R. Iran.
2*- Corresponding author, Assoc. Prof., Dept. Plant Genetics and Breeding, College of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R. Iran. Email: ms.sabet@modares.ac.ir

Abstract

Background and purpose:

Paclitaxel is one of the most widely used drugs in cancer treatment, and it is found in tiny amounts (0.01-0.03% DW) in the bark of rare *Taxus* trees. Nowadays, success in the culture and production of optimal callus with high quality and quantity under *in vitro* conditions is critical to produce maximum secondary medicinal metabolites and prevent the extinction of valuable plant species. In this regard, the tissue culture's size significantly affects callus biomass and quality due to determining the reproductive ability. Therefore, the present research was conducted to introduce the optimal size of the stem explants for two European and Pacific yew species to produce more quantity and quality callus.

Methodology:

In the present study, the stem tissue of two species of yew, *Taxus baccata* and *T. brevifolia*, were used as explants for tissue culture and callus production. The stem explants of both species of yew were prepared after removing the end part of the leaves, separately in five groups with lengths of 1.5-2, 2-2.5, 2.5-3, 3-3.5, and 3.5-4 cm. All explants were sterilized using ethanol (70%), sodium hypochlorite (1.5%), and cefotaxime antibiotic (200 mg l-1), cultured on solid B5 culture medium and kept in the growth room at 25°C and dark. The studied traits, including the production of callus biomass by species and explant size, were evaluated 28 days after explant culture. Also, the morphological characteristics of calli obtained from each species, including the type of callus tissue in three categories: cottony, soft, and mixed (combination of cottony and soft), the callus color, white, brown, and mixed (combination of white and brown) were investigated. The secretion intensity of phenolic compounds was scored based on the color intensity in the culture medium from zero to five (none, deficient, low, medium, high and very high).

The experiment was carried out as a factorial study with two species factors at two levels and an explant size at five levels in the form of an unbalanced, completely randomized basic design. Statistical analysis was performed using analysis of variance and mean comparison with Duncan's test for callus biomass data and Chi-score test for phenolic compounds data. Pearson's correlation was also used to evaluate the relationship between explant size and biomass and phenolic compounds.

Results:

Based on the results, the callus obtained from explants with a length of less than 2.5 cm in *T. brevifolia* showed 33% higher fresh weight compared to *T. baccata*. Increasing the length of the explants from 1.5-2 to 2.5-3 cm caused a 2.6-fold increase in the callus biomass of *T. baccata* and a 1.5-fold increase in *T. brevifolia*. The secretion of phenolic compounds in explants with a length of

Copyright: © 2024 by the authors. Published by Research Institute of Forests and Rangelands (http://ijrfpbgr.areeo.ac.ir//) .This article is an open-access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution 4.0 International (CC BY 4.0),(http://creativecommons.org/licenses/by/4.0)

less than 2.5 cm was observed in *T. brevifolia*, 14% less than in *T. baccata*. By increasing the length of explants to 2-5.3, 3-3.5, and 3.5-4 cm, the secretion of phenolic compounds increased by 4%, 6%, and 15%, respectively, in *T. brevifolia* compared to *T. baccata*. According to the results, Calli obtained from *T. baccata* and *T. brevifolia* explants had 82 and 27% cotton texture, 2 and 52% soft texture and 16 and 21% mixed texture, respectively. The highest percentage of white calli, with 63% of calli, belonged to *T. baccata*, 30% and 7% with mixed and brown tissues, respectively. Only 37% of *T. brevifolia* calli showed white, 33% and 30% mixed and brown, respectively. The results also indicated a moderate correlation of 0.57 and 0.40 between the explant size and the production biomass in *T. baccata* and *T. brevifolia* species, respectively. Also, a weak correlation of 0.23 and 0.25 was detected between the explant size and the intensity of the secretion of phenolic compounds in the two studied species.

Conclusion:

The results showed that it is possible to significantly increase the callus biomass with the lowest amount of phenolic compounds from the stem explants of two yew species with a specific length increase in the explant size. Also, regarding the productive biomass and callus characteristics, it was found that the length of 2.5-2.5 cm is suggested as the optimal size of the stem explant in the tissue culture of the two studied species due to the production of more callus biomass and less secretion of phenolic compounds.

Keywords: B5 culture medium, paclitaxel, phenolic secretions, tissue culture.

تأثیر اندازه ریزنمونه بر تولید زیست‌توده و ویژگی‌های کالوس در کشت درون‌شیشه‌ای سرخدار اروپایی (*Taxus baccata* L.) و اقیانوس آرام (*T. brevifolia* Nutt.)

سیده سمانه عمادی الیردی[1] و محمدصادق ثابت[2*]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه ژنتیک و به‌نژادی گیاهی، پردیس کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲*- نویسنده مسئول، دانشیار، گروه ژنتیک و به‌نژادی گیاهی، پردیس کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

پست‌الکترونیک: ms.sabet@modares.ac.ir

چکیده

سابقه و هدف:

پاکلی‌تاکسل یکی از پرمصرف‌ترین داروها در درمان سرطان است که در مقادیر بسیار کم (۰/۰۱ – ۰/۰۳ درصد وزن خشک) در پوست درختان نادر گونه‌های *Taxus* وجود دارد. امروزه موفقیت در کشت و تولید کالوس‌های با کمیت و کیفیت در شرایط درون‌شیشه‌ای به منظور تولید حداکثری متابولیت‌های ثانویه دارویی و جلوگیری از انقراض گونه‌های گیاهی ارزشمند از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. در این راستا، اندازه ریزنمونه کشت بافتی به دلیل تعیین توانایی بازتولیدی، تأثیر قابل ملاحظه‌ای بر میزان زیست‌توده کالوس و کیفیت آن دارد. از این‌رو، این پژوهش با هدف معرفی اندازه بهینه ریزنمونه‌های ساقه دو گونه سرخدار اروپایی و اقیانوس آرام در تولید کالوس با کمیت و کیفیت بیشتر انجام شد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق، از بافت ساقه دو گونه سرخدار *Taxus baccata* و *T. brevifolia* به عنوان ریزنمونه برای کشت بافت و تولید کالوس استفاده شد. ریزنمونه‌های ساقه هر دو گونه سرخدار پس از حذف قسمت انتهایی برگ‌ها، به صورت مجزا در پنج گروه با اندازه‌های ۲–۱/۵، ۲/۵–۲، ۳–۲/۵، ۳/۵–۳ و ۴–۳/۵ سانتی‌متر تهیه شدند. کلیه ریزنمونه‌ها پس از ضدعفونی با اتانول (۷۰ درصد)، هیپوکلریت سدیم (۱/۵ درصد) و آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم (۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر)، روی محیط کشت B5 جامد کشت و در اتاق رشد در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و تاریکی نگهداری شدند. صفات مورد مطالعه شامل میزان زیست‌توده کالوس تولیدی به تفکیک گونه و اندازه ریزنمونه، ۲۸ روز پس از کشت ریزنمونه‌ها ارزیابی شد. همچنین ویژگی‌های مورفولوژیک کالوس‌های حاصل از هر گونه شامل نوع بافت کالوس با سه ساختار پنبه‌ای، نرم و مخلوط (ترکیبی از پنبه‌ای و نرم)، رنگ کالوس شامل سفید، قهوه‌ای و مخلوط (ترکیبی از سفید و قهوه‌ای) بررسی گردید. شدت ترشح ترکیبات فنولی براساس شدت رنگ در محیط کشت از صفر تا پنج (فاقد، خیلی‌کم، کم، متوسط، زیاد و خیلی‌زیاد) امتیازدهی شد. آزمایش به صورت فاکتوریل با دو عامل گونه در دو سطح و اندازه ریزنمونه در پنج سطح در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی اجرا شد. تجزیه آماری با استفاده از روش‌های تجزیه واریانس و مقایسه میانگین با آزمون دانکن برای داده‌های کالوس‌زایی و آزمون کای‌اسکور برای داده‌های ترکیبات فنولی انجام شد. همچنین از همبستگی پیرسون به منظور ارزیابی ارتباط بین اندازه ریزنمونه و زیست‌توده و ترکیبات فنولی استفاده شد.

یافته‌ها

براساس نتایج، کالوس‌های حاصل از ریزنمونه‌های با طول کمتر از ۲/۵ سانتی‌متر در گونه *T. brevifolia* دارای ۳۳٪ وزن تر بیشتری در مقایسه با *T. baccata* بود. افزایش طول ریزنمونه از ۲–۱/۵ به ۳–۲/۵ سانتی‌متر سبب افزایش ۲/۶ برابری زیست‌توده کالوس گونه *T. baccata* و ۱/۵ برابری در *T. brevifolia* شد. ترشح ترکیبات فنولی نیز در ریزنمونه‌های با طول کمتر از ۲/۵ سانتی‌متر در گونه *T. brevifolia* ۱۴ درصد کمتر از *T. baccata* مشاهده شد. با افزایش طول ریزنمونه‌ها به ۳–۲/۵، ۳/۵–۳ و ۴– ۳/۵ سانتی‌متر ترشح ترکیبات فنولی به ترتیب ۴، ۶ و ۱۵٪ در *T. brevifolia* در مقایسه با *T. baccata* بیشتر بود. نتایج نشان داد، کالوس‌های حاصل از ریزنمونه‌های *T. baccata* و *T. brevifolia* به ترتیب دارای ۸۲ و ۲۷٪ بافت پنبه‌ای، ۲ و ۵۲٪ بافت نرم و ۱۶ و ۲۱٪ بافت مخلوط بودند. بیشترین درصد کالوس‌های سفید رنگ با ۶۳٪ کالوس به *T. baccata* تعلق داشت و بافت مخلوط و قهوه‌ای به ترتیب در ۳۰٪ و ۷٪ از کالوس‌ها مشاهده شد. در حالی که تنها ۳۷٪ از کالوس‌های *T. Brevifolia* سفید رنگ بودند و ۳۳٪ و ۳۰٪ به ترتیب مخلوط و قهوه‌ای رنگ بودند. نتایج همچنین حکایت از وجود همبستگی متوسط ۰/۵۷ و ۰/۴۰ به ترتیب بین اندازه ریزنمونه با زیست‌توده

تولیدی در گونه *T. baccata* و *T. brevifolia* از یکسو و همبستگی ضعیف ۰/۲۳ و ۰/۲۵ بین اندازه ریزنمونه با شدت ترشح ترکیبات فنولی در دو گونه مورد مطالعه داشت.

نتیجه‌گیری

نتایج نشان داد امکان افزایش معنی‌دار زیست‌توده کالوس با کمترین میزان ترکیبات فنولی از ریزنمونه‌های ساقه دو گونه سرخدار با افزایش طول معین در اندازه ریزنمونه میسر است. همچنین با در نظر گرفتن زیست‌توده تولیدی و ویژگی‌های کالوس مشخص شد که طول ۲/۵–۲ سانتی‌متر به دلیل تولید زیست‌توده کالوس بیشتر از یکسو و ترشح ترکیبات فنولی کمتر از سوی دیگر به عنوان بهینه اندازه ریزنمونه ساقه در کشت بافت دو گونه مورد مطالعه پیشنهاد شد.

واژه‌های کلیدی: پاکلی‌تاکسل، ترشحات فنولی، کشت بافت، محیط کشت B5

مقدمه

امروزه داروهای با منشأ گیاهی به دلیل سمیت کمتر و اثربخشی بهتر در کنترل و درمان سرطان‌ها در بیشتر کشورهای جهان مورد توجه ویژه قرار گرفته است (Aldbass, 2022). گیاهان دارویی سرشار از متابولیت‌های ثانویه هستند که فعالیت‌های دارویی مختلفی ازجمله ضدسرطانی از خود نشان می‌دهند. در این بین، پاکلی‌تاکسل (Taxol®) مهمترین دارو با خاصیت ضدسرطانی به‌شمار می‌رود. سرخداریان (*Taxus sp.*) از باارزش‌ترین منابع متابولیت ثانویه پاکلی‌تاکسل است (Zhang *et al.*, 2020; Mohammadi *et al.*, 2022). مهمترین گونه‌های *Taxus*، سرخدار اروپایی (*T. baccata*) در استان‌های ساحلی دریای خزر ازجمله گیلان، مازندران و گلستان به صورت طبیعی می‌روید و سرخدار اقیانوس آرام (*T. brevifolia*) به صورت پایه‌های دست کاشت در ایران وجود دارد (Rahmati *et al.*, 2017).

میزان پاکلی‌تاکسل در انواع گونه‌های سرخداریان بسیار ناچیز (۰/۰۱ تا ۰/۰۳ درصد وزن پوست خشک) است. از این‌رو، تأمین نیاز یک دوره درمانی یک بیمار مبتلا به سرطان (حدود دو گرم پاکلی‌تاکسل) از پوست ۱۰–۳ درخت صدساله استخراج می‌شود که علاوه بر افزایش خطر انقراض گونه‌های سرخداریان، تخریب زیست‌بوم جانداران را به همراه دارد (Lin *et al.*, 2018). استفاده موفق کلینیکی از پاکلی‌تاکسل موجب افزایش تقاضا و کمبود عرضه شده است. تنها راه ممکن برای تولید تجاری پاکلی‌تاکسل، تولید در محیط‌های کشت بافت و سلول گیاهی بدون بهره‌برداری از گیاه در زیستگاه طبیعی آن است (Gauchan *et al.*, 2021). امروزه کشت کالوس به منظور تولید حداکثری ترکیب‌های مفید توسط سلول‌های گیاهی کاربرد دارد. انتخاب روش کشت بافت با رشد بهینه کالوس و تولید کارآمد پاکلی‌تاکسل فرایندی طولانی مدت است. در شرایط درون‌شیشه‌ای (*in vitro*) عوامل مؤثر بر رشد سلولی مانند نوع و ترکیب محیط کشت و نوع ریزنمونه ازجمله منبع، ژنوتیپ و اندازه آن اهمیت دارد (Benjamin *et al.*, 2019). بررسی‌ها نشان می‌دهد که اندازه ریزنمونه در شرایط درون‌شیشه‌ای به علت تعیین توانایی بازتولیدی بر زیست‌توده، بافت و رنگ کالوس مؤثر است (Behjat *et al.*, 2014; Karjadi & Waluyo, 2021; Karjadi & Gunaeni, 2022).

کشت بافت بسیاری از گیاهان ازجمله گونه‌های جنس *Taxus* به دلیل ترشح ترکیبات فنولی بالا با مشکل جدی قهوه‌ای شدن کالوس‌ها مواجه است. قهوه‌ای شدن سلول‌ها نتیجه اکسیداسیون ترکیبات فنولی و تجمع بیش از حد آنها در سلول است (Esmaeili *et al.*, 2023). پدیده قهوه‌ای شدن کالوس در محیط کشت از تولید انبوه کالوس و تولید تجاری متابولیت‌های دارویی ممانعت می‌کند. تلاش‌های زیادی به منظور کنترل و کاهش فنول‌ها و بهبود رشد کالوس‌های گیاهی در کشت بافت انجام شده است

(Toulabi *et al.*, 2015). ترکیبات فنولی در نتیجه فرایندهای پیام‌رسانی سریع سلول‌ها پس از آسیب و زخم، اشعه ماوراءبنفش، حمله پاتوژن‌ها و حشرات تولید می‌شوند. اکسیداسیون ترکیبات فنولی موجب نکروز شدن و عدم جذب مواد غذایی توسط سلول‌ها از محیط کشت شده و منجر به کاهش رشد کالوس‌ها و مرگ آنها می‌شود (Albuquerque *et al.*, 2021).

این تحقیق با هدف مقایسه ویژگی‌های کالوس و میزان زیست‌توده دو گونه سرخدار *T. baccata* و *T. brevifolia* در شرایط درون‌شیشه‌ای و معرفی بهینه اندازه ریزنمونه‌های ساقه با بیشترین زیست‌توده کالوس و کمترین میزان ترشح ترکیبات فنولی به عنوان اولین گام در کشت سوسپانسیون سلولی و تولید تجاری پاکلی‌تاکسل انجام شد.

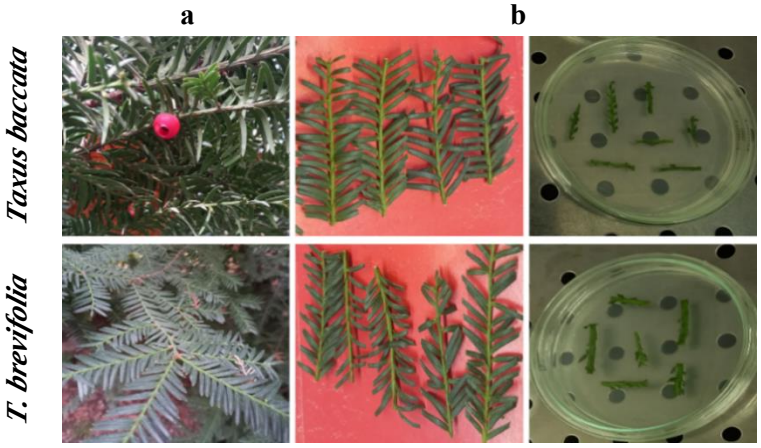
مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و تهیه ریزنمونه

نمونه‌های ساقه از درختان واقع در پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران (۳۵ درجه و ۴۸ دقیقه شمالی و ۵۰ درجه و ۵۹ دقیقه شرقی با ۱۲۳۸ متر ارتفاع از سطح دریا) جمع‌آوری شد (شکل ۱a). به منظور تهیه ریزنمونه برای کشت بافت و القای کالوس، قسمت انتهایی برگ‌ها حذف و سرشاخه‌ها به قطعات ۷–۵ سانتی‌متر به منظور ضدعفونی بریده شد (شکل ۱b). به منظور حذف آلودگی سطحی نمونه‌ها، از مایع ظرف‌شویی و بعد آب‌شویی به مدت ۳۰ دقیقه استفاده شد. ادامه مراحل ضدعفونی در هود لامینار و روی شیکر با ۷۰ دور در دقیقه انجام شد. نمونه‌ها در اتانول ۷۰٪ به مدت پنج دقیقه غوطه‌ور شدند. پس از آب‌شویی با آب مقطر استریل، نمونه‌ها با هیپوکلریت سدیم ۱٪/۵ به مدت ۳۰ دقیقه ضدعفونی شدند. سپس نمونه‌ها با آب مقطر استریل آب‌شویی و دوباره در اتانول ۷۰٪ به مدت دو دقیقه قرار گرفتند. در نهایت کلیه نمونه‌ها با آب مقطر استریل آب‌شویی شدند. به منظور حذف آلودگی باکتریایی، از آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم با غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر به مدت ۳۰ دقیقه استفاده شد. سپس سه بار آب‌شویی با آب مقطر استریل هر بار به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. به منظور تحریک کالوس‌زایی ریزنمونه‌ها، کلیه نمونه‌ها به مدت یک شبانه‌روز قبل از کشت در دمای چهار درجه سانتی‌گراد در آب مقطر استریل نگهداری شدند.

کشت بافت ریزنمونه و کالوس‌زایی

به منظور کشت ریزنمونه‌های دو گونه *T. baccata* و *T. brevifolia* از محیط کشت B5 به همراه ۱ گرم در لیتر کازئین هیدرولیزات، ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسید آسکوربیک، ۲ میلی‌گرم در لیتر هورمون نفتالین استیک اسید، ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون کینتین، ۲۰ گرم در لیتر فروکتوز، ۵ گرم در لیتر ساکارز، ۵ گرم در لیتر گلوکز و ۶/۵ گرم در لیتر آگار استفاده شده و محلول حاصل در pH = ۵/۷ تنظیم گردید. به منظور بررسی اثر طول ریزنمونه‌های ساقه کشت شده بر زیست‌توده و ویژگی‌های کالوس هریک از گونه‌های *T. baccata* و *T. brevifolia* به‌طور مجزا در پنج گروه با طول ۲ – ۱/۵، ۲/۵–۲، ۳–۲/۵، ۳/۵–۳ و ۴–۳/۵ سانتی‌متر به صورت افقی در پتری‌دیش‌هایی با اندازه قطر ۸ سانتی‌متر حاوی ۲۵ میلی‌لیتر محیط کشت B5 قرار گرفتند (شکل ۱c). به ازای هر گروه ریزنمونه، تعداد ۳۰–۱۰ تکرار و در هر پتری‌دیش ۶–۳ ریزنمونه کشت شد. ریزنمونه‌های کشت شده به مدت ۲۸ روز در اتاق رشد با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در شرایط تاریکی نگهداری شدند.



شکل ۱- دو گونه سرخدار ***Taxus baccata*** و ***T. brevifolia***: **a)** سرشاخه‌های درخت، **b)** سرشاخه‌های برش‌خورده برای تهیه ریزنمونه و ضدعفونی، **c)** کشت درون‌شیشه‌ای ریزنمونه‌های ساقه روی محیط کشت **B5**

Figure 1. Two species of yew, *Taxus baccata* and *T. brevifolia*, a) tree branches, b) cut branches for explant preparation and disinfection, c) *in vitro* culture of stem explants grown on B5 culture medium.

صفات مورد مطالعه

در این پژوهش، به منظور ارزیابی تأثیر طول ریزنمونه‌های ساقه کشت شده و ژنوتیپ گیاه بر میزان تولید زیست‌توده کالوس، وزن تر کالوس در هر گروه در دو گونه *T. baccata* و *T. brevifolia* در روز ۲۸ کشت اندازه‌گیری شد. همچنین ویژگی‌های مورفولوژیکی کالوس‌های حاصل از دو گونه مورد مطالعه ازجمله نوع بافت کالوس در سه گروه: پنبه‌ای، نرم و مخلوط (ترکیبی از پنبه‌ای و نرم)، رنگ کالوس‌ها در سه گروه: سفید، قهوه‌ای و مخلوط (ترکیبی از سفید و قهوه‌ای) بررسی گردید. ترشح ترکیبات فنولی براساس شدت تغییر رنگ محیط کشت پس از حذف ریزنمونه‌ها در روز ۲۸ در شش گروه: فاقد ترشحات فنولی (صفر)، کمترین ترشحات فنولی (یک) و بیشترین ترشحات فنولی (دو تا پنج) ارزیابی شد (Khosroushahi *et al.*, 2011; Hosseini *et al.*, 2020; Sarmadi *et al.*, 2020).

تجزیه‌وتحلیل آماری داده‌ها

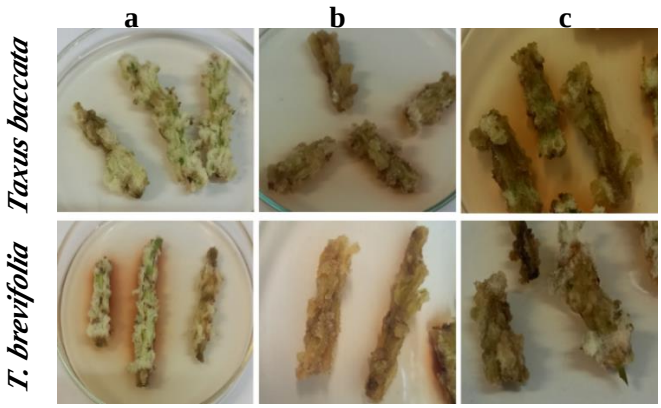
این پژوهش به صورت آزمایش فاکتوریل با دو عامل شامل گونه در دو سطح (*T. baccata* و *T. brevifolia*) و اندازه ریزنمونه در پنج سطح (۲–۱/۵، ۲/۵–۲، ۳–۲/۵، ۳/۵–۳ و ۴–۳/۵ سانتی‌متر) در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی نامتعادل با ۱۰ تکرار زیستی انجام شد. فرضیات تجزیه واریانس شامل نرمال بودن باقیمانده داده‌ها توسط آزمون کولموگروف اسمیرنوف آزمون شد. تجزیه واریانس (ANOVA) داده‌های حاصل از کالوس‌زایی و ترشح ترکیبات فنولی به روش GLM و همبستگی به روش پیرسون با استفاده از نرم‌افزار SPSS 16 انجام گردید. مقایسه میانگین داده‌های حاصل از کالوس‌زایی به روش دانکن و مقایسه میانگین داده‌های غیرنرمال ترشح ترکیبات فنولی با آزمون کای‌اسکور در سطح احتمال معنی‌داری ۵٪ انجام شد. رسم نمودار همبستگی و مقایسات میانگین به ترتیب در نرم‌افزار Excel و GraphPad Prism انجام گردید.

نتایج

ویژگی‌های مورفولوژیکی کالوس‌های دو گونه سرخدار

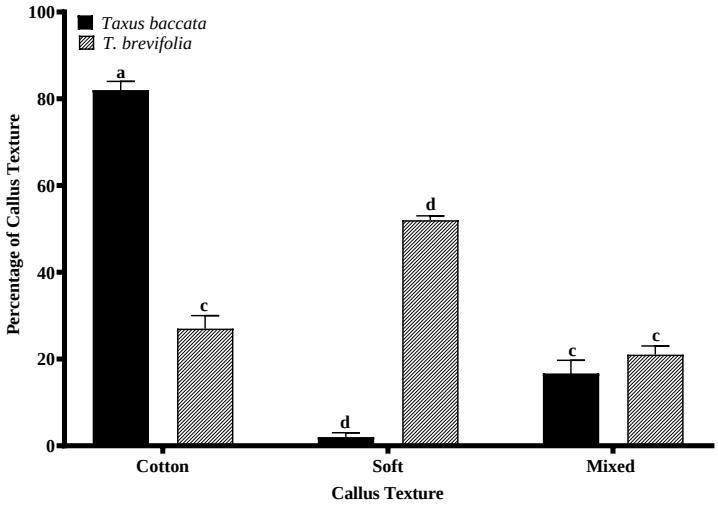
نتایج حاصل از کشت ریزنمونه‌های ساقه دو گونه *T. baccata* و *T. brevifolia* روی محیط کشت B5 حکایت از ظهور کالوس از محل برش و فرو نرفته در محیط کشت داشت. در هر دو گونه مورد مطالعه کالوس‌زایی بعد از

روز دهم تا دوازدهم کشت مشاهده شد. ۲۸ روز پس از کشت ریزنمونه‌ها، عملکرد زیست‌توده کالوس، نوع بافت و رنگ کالوس و میزان ترشح ترکیبات فنولی دو گونه *T. baccata* و *T. brevifolia* در ریزنمونه‌های با طول‌های مختلف بررسی شد. نتایج تجزیه واریانس داده‌های حاصل از نوع بافت کالوس حکایت از وجود تفاوت معنی‌دار بین دو گونه مورد مطالعه در سطح احتمال ۵٪ داشت. براساس نتایج در گونه *T. baccata* درصد بافت کالوس پنبه‌ای، مخلوط و نرم به ترتیب ۸۲، ۱۶ و ۲٪ بود. در حالی که در گونه *T. brevifolia* درصد بافت کالوس نرم، پنبه‌ای و مخلوط به ترتیب ۵۲، ۲۷ و ۲۱٪ بود (شکل ۲ و ۳).



شکل ۲- کالوس‌های حاصل از کشت ریزنمونه‌های ساقه دو گونه سرخدار *Taxus baccata* و *T. brevifolia* روی محیط کشت B5: a) بافت پنبه‌ای، b) بافت نرم، c) بافت مخلوط (ترکیبی از پنبه‌ای و نرم)

Figure 2. Calli obtained from stem explants of *Taxus baccata* and *T. brevifolia* in B5 culture medium a) Cottony tissue b) Soft tissue c) Mixed tissue (combination cottony and soft).



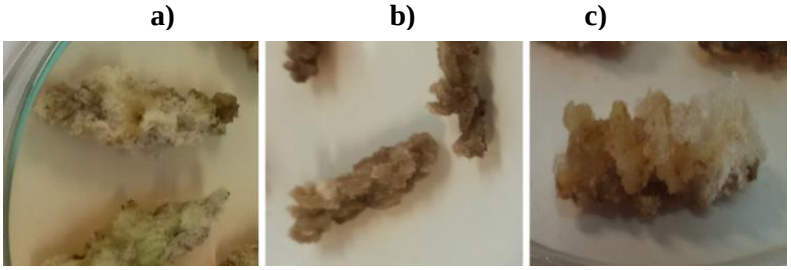
شکل ۳- درصد بافت کالوس‌های حاصل از کشت ریزنمونه‌های ساقه دو گونه سرخدار *Taxus baccata* و *T. brevifolia*

حروف مختلف تفاوت آماری معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ با آزمون دانکن را نشان می‌دهند.

Figure 3. The percentage of calli texture obtained from stem explants of *Taxus baccata* and *T. brevifolia* in B5 culture medium,

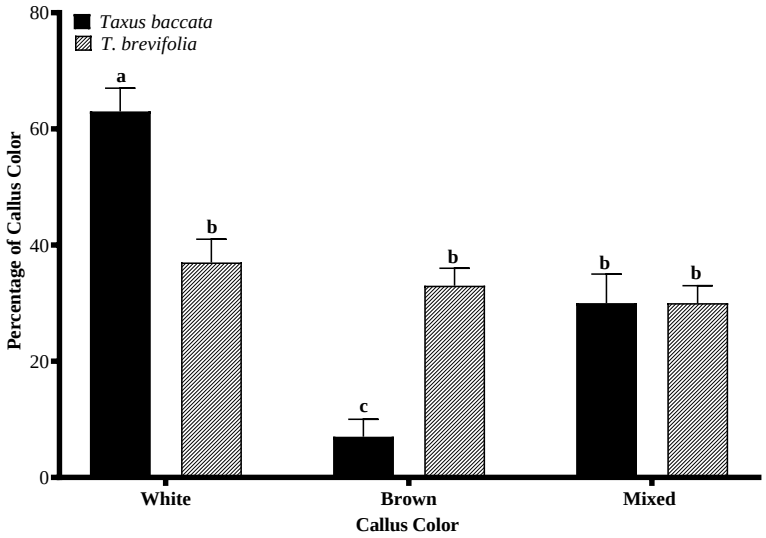
The means of the column followed by different letters show significant differences at the 5% level with Duncan's test.

نتایج تجزیه واریانس داده‌های حاصل از رنگ کالوس حکایت از وجود تفاوت معنی‌دار بین دو گونه مورد مطالعه در سطح احتمال ۵٪ داشت. مقایسه رنگ کالوس‌های حاصل از کشت بافت دو گونه مورد مطالعه در محیط کشت B5 نشان داد که ۶۳، ۳۰ و ۷٪ از کالوس‌های *T. baccata* به ترتیب سفید رنگ، مخلوط و قهوه‌ای بودند، در حالی که این نسبت در کالوس‌های *T. brevifolia* به ترتیب ۳۷، ۳۳ و ۳۰٪ بود (شکل‌های ۴ و ۵).



شکل ۴- کالوس‌های حاصل از کشت ریزنمونه‌های ساقه سرخدار در محیط کشت B5 با رنگ‌های مختلف: a) سفید، b) قهوه‌ای، c) مخلوط (ترکیبی از سفید و قهوه‌ای)

Figure 4. Calli obtained from stem explants of *Taxus* in B5 culture medium with different colors a) White b) Brown c) Mixed (combination white and brown).



شکل ۵- درصد رنگ کالوس‌های حاصل از کشت ریزنمونه‌های ساقه دو گونه سرخدار *Taxus baccata* و *T. brevifolia*

حروف مختلف تفاوت آماری معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ با آزمون دانکن را نشان می‌دهند.

Figure 5. The percentage of calli color obtained from stem explants of *Taxus baccata* and *T. brevifolia* in B5 culture medium,

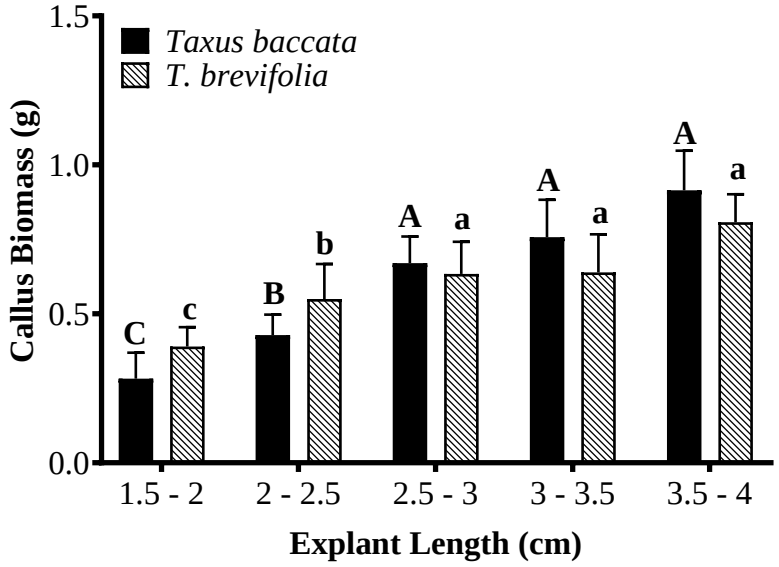
The means of the column followed by different letters show significant differences at 5% level with Duncan's test.

تأثیر اندازه ریزنمونه بر زیست‌توده کالوس‌های *دو گونه سرخدار*

براساس نتایج تجزیه واریانس داده‌ها، اندازه ریزنمونه‌های کشت شده به‌طور معنی‌داری بر میزان زیست‌توده کالوس تولیدی در هر دو گونه مورد مطالعه تأثیر داشت. با افزایش طول ریزنمونه از ۲–۱/۵ به ۳–۲/۵ سانتی‌متر وزن تر کالوس در گونه *T. baccata* و *T. brevifolia* به ترتیب ۲/۶ و ۱/۵ برابر افزایش یافت. باوجوداین، با افزایش طول ریزنمونه تا ۴ سانتی‌متر افزایش معنی‌داری در وزن تر کالوس‌ها در هر دو گونه ملاحظه نشد. نتایج همچنین نشان داد ریزنمونه‌های با طول کمتر از ۲/۵ سانتی‌متر در گونه *T. brevifolia*، ۳۳٪ زیست‌توده بیشتری در مقایسه با *T. baccata* تولید کردند. در گونه *T. brevifolia*، ریزنمونه‌های با طول ۲–۱/۵ و ۲/۵–۲ سانتی‌متر به ترتیب ۶۱ و ۱۶٪ زیست‌توده کالوس بیشتری نسبت به *T. baccata* تولید نمودند. با افزایش طول ریزنمونه بیشتر از ۲/۵ سانتی‌متر، این روند به نفع گونه *T. baccata* تغییر کرد و وزن تر کالوس‌های *T. baccata* ، ۱۱٪ بیشتر از گونه *T. brevifolia* بود. ریزنمونه‌های با طول ۴–۳/۵، ۳/۵–۳ و ۳–۲/۵ سانتی‌متر در گونه *T. baccata* نسبت به *T. brevifolia* به ترتیب ۱۴، ۱۳ و ۳٪ زیست‌توده کالوس بیشتری تولید کردند (شکل ۶).

ترشحات فنولی کالوس‌های حاصل از کشت بافت دو گونه سرخدار

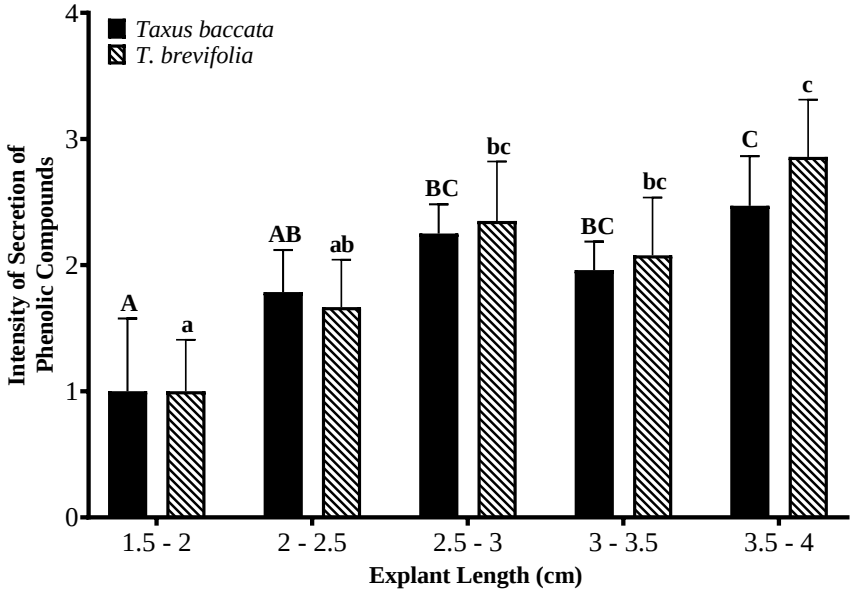
نتایج نشان داد در هر دو گونه مورد مطالعه با افزایش طول ریزنمونه تا ۳ سانتی‌متر ترشح ترکیبات فنولی به‌طور معنی‌داری افزایش یافت، در حالی که با افزایش طول ریزنمونه به ۳/۵ و ۴ سانتی‌متر افزایش معنی‌داری در میزان ترشح ترکیبات فنولی ملاحظه نشد. علاوه بر این، در ریزنمونه‌های با طول کمتر از ۲/۵ سانتی‌متر شدت ترشح ترکیبات فنولی در گونه *T. baccata* ۱۴٪ بیشتر از گونه *T. brevifolia* بود. ریزنمونه‌های با طول ۲–۱/۵ و ۲/۵–۲ سانتی‌متر در گونه *T. baccata* نسبت به *T. brevifolia* به ترتیب ۲۵ و ۷٪ ترشح ترکیبات فنولی بیشتری نشان داد. با افزایش طول ریزنمونه بیشتر از ۲/۵ سانتی‌متر روند معکوس در شدت ترشحات فنولی مشاهده شد، به‌طوری‌که در گونه *T. brevifolia* به میزان ۹٪ بیشتر از گونه *T. baccata* بود. میزان ترشح ترکیبات فنولی در ریزنمونه‌های با طول ۳– ۲/۵، ۳/۵–۳ و ۴–۳/۵ سانتی‌متر به ترتیب ۴، ۶ و ۱۵٪ در گونه *T. brevifolia* نسبت به *T. baccata* بیشتر بود (شکل ۷).



شکل ۶- اثر طول ریزنمونه بر زیست‌توده کالوس در ***Taxus baccata*** و ***T. brevifolia***

حروف مختلف تفاوت آماری معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ با آزمون دانکن را نشان می‌دهند.

Figure 6. The effect of explant length on callus biomass in *Taxus baccata* and *T. brevifolia*,
The means of the column followed by different letters show significant differences at 5% level with Duncan's test.



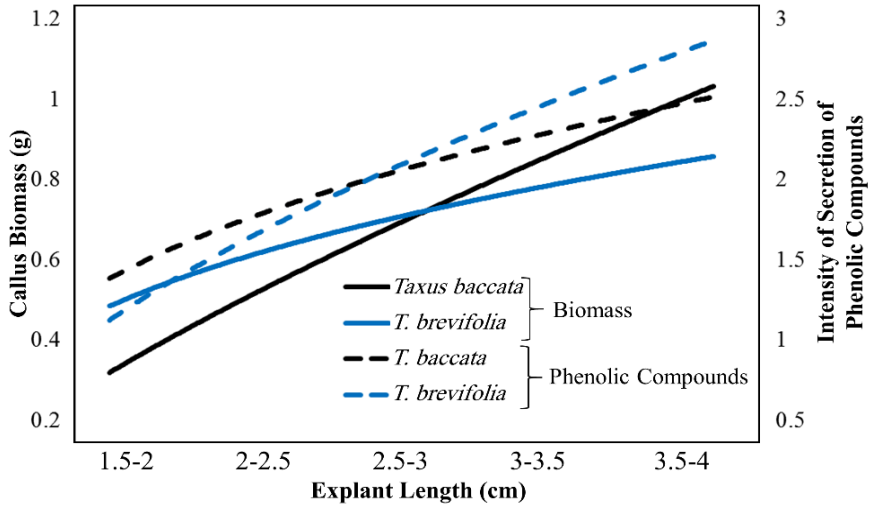
شکل ۷- شدت ترشح ترکیبات فنولی در کشت ریزنمونه دو گونه ***Taxus baccata*** و ***T. brevifolia*** در محیط کشت **B5**

حروف متفاوت در شکل تفاوت آماری معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ با آزمون کای‌اسکور (χ^2) را نشان می‌دهند.

Figure 7. The intensity of the secretion of phenolic compounds in the explant culture of *Taxus baccata* and *T. brevifolia* in B5 culture medium,
The means of the column followed different letters show significant difference at the 5% level with Chi-square (χ^2) test.

همبستگی اندازه ریزنمونه با زیست‌توده و ترشحات فنولی کالوس‌های *T. baccata* و *T. brevifolia*

مقایسه ضریب همبستگی پیرسون بین اندازه ریزنمونه کشت شده و زیست‌توده حاصل از کالوس‌های دو گونه مورد مطالعه حکایت از وجود همبستگی متوسط ۰/۵۷ در گونه *T. baccata* در مقایسه با ۰/۴۰ در گونه *T. brevifolia* داشت. همچنین بین اندازه ریزنمونه کشت شده و ترشح ترکیبات فنولی به محیط کشت همبستگی ضعیف ۰/۲۳ در گونه *T. baccata* و ۰/۲۵ در گونه *T. brevifolia* ملاحظه شد (شکل ۸).



شکل ۸- همبستگی پیرسون بین اندازه ریزنمونه با زیست‌توده و ترشحات فنولی کالوس‌های ***Taxus baccata*** و ***T. brevifolia*** روی محیط **B5**

Figure 8. Pearson correlation between explant size vs biomass and phenolic secretions of *Taxus baccata* and *T. brevifolia* calli in B5 culture medium.

بحث

امروزه کشت بافت سیستمی کارآمد، امیدوار کننده، دوستدار طبیعت و جایگزین عملی برای تولید متابولیت‌های دارویی ارزشمند گیاهی محسوب می‌شود. در حال حاضر، مؤثرترین راه برای تولید انبوه پاکلی‌تاکسل بدون تخریب گیاهان در زیستگاه طبیعی آنها، استفاده از کشت‌های درون‌شیشه‌ای است (Gauchan *et al.*, 2021). در کشت درون‌شیشه‌ای، ترکیب محیط کشت، نوع ریزنمونه، تنظیم‌کننده‌های رشدی گیاه و ترشح ترکیبات فنولی از عوامل مؤثر بر زیست‌توده کالوس هستند (Ashrafi *et al.*, 2010; Irshad *et al.*, 2017). در این پژوهش از محیط کشت B5 به منظور دستیابی به کالوس‌های با بیشترین میزان زیست‌توده و کمترین میزان ترشح ترکیبات فنولی استفاده شد. برای کشت بافت ریزنمونه‌های سرخدار از بین محیط‌های کشت مورد استفاده شامل Gamborg (B5)، Murashige and Skoog (MS) و Woody Plant Medium (WPM) در تحقیقات قبلی، محیط کشت B5 به عنوان بهترین محیط کشت برای تولید و رشد کالوس گزارش شده است (Nasiri *et al.*, 2015; Toulabi *et al.*, 2015; Mirjalili, 2022). وجود ویتامین‌های ضروری ازجمله پیریدوکسین، تیامین و اسید نیکوتینیک برای رشد مناسب، تقسیم و متابولیسم سلولی گیاهی در محیط کشت B5 سبب پاسخ مناسب ریزنمونه‌های این گیاه به کشت درون‌شیشه‌ای شده است (Hrubša *et al.*, 2022). تیامین در مسیرهای متابولیتی ازجمله گلیکولیز، پنتوز فسفات و چرخه اسید کربوکسیلیک نقش دارد (Kashani *et al.*, 2018). در این تحقیق، عدم مشاهده اختلاف معنی‌دار در زیست‌توده کالوس‌های دو گونه سرخدار *T. baccata* و *T. brevifolia*،

نشان‌دهنده پاسخ مناسب دو گونه مورد مطالعه به محیط کشت B5 به منظور کشت درون‌شیشه‌ای می‌باشد.

از سوی دیگر، به دلیل حضور مهارکننده‌های رشد، کالوس‌های حاصل از ریزنمونه‌های ساقه و برگ *T. baccata* رشد آهسته‌ای دارند؛ باوجوداین کشت ساقه برای تولید کالوس، رشد سریع‌تر و با کیفیت‌تری نسبت به کشت برگ دارد. معمولاً قطعات جوان ساقه درختان بالغ به عنوان منابع ریزنمونه اولیه برای القای کالوس در گونه *T. baccata* استفاده می‌شود. همچنین کالوس‌های حاصل از ساقه بیشتر از کالوس‌های حاصل از برگ‌ها تحت تأثیر تیمارها قرار می‌گیرند و محتوای پاکلی‌تاکسل بالاتری نسبت به کالوس‌های به‌دست آمده از ریزنمونه‌های برگی دارند (Ashrafi *et al.*, 2010; Ghafoori *et al.*, 2012; Behjat *et al.*, 2014). کالوس‌زایی سرخداریان در محیط کشت B5 همراه با فیتوهورمون‌های اکسین (۴،۲- دی کلرو فنوکسی استیک اسید، نفتالین استیک اسید و ایندول بوتیریک اسید در غلظت‌های مختلف) در ترکیب با ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر کینتین گزارش شده است (Nasiri *et al.*, 2015; Irshad *et al.*, 2017; Bhuju & Gauchan, 2018; Mirjalili, 2022). در این پژوهش از هورمون‌های اکسین نفتالین استیک اسید با غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر و کینتین با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر برای کالوس‌زایی دو گونه *T. baccata* و *T. brevifolia* استفاده شد.

با توجه به نوع گیاه و اندام گیاهی مورد استفاده برای کشت بافت گیاهی، اندازه ریزنمونه عامل تعیین‌کننده‌ای در تولید کالوس‌های مناسب محسوب می‌شود (Karjadi & Gunaeni, 2022). تاکنون در تحقیقات قبلی از ریزنمونه‌های ساقه با طول‌های ۱ سانتی‌متر (Abbasin *et al.*, 2010)، ۱/۵–۱ سانتی‌متر (Behjat *et al.*, 2014)، ۱/۲–۱/۵ سانتی‌متر (Nasiri *et al.*, 2015) و ۲ –۱ سانتی‌متر (Toulabi *et al.*, 2015) برای کشت بافت *T. baccata* استفاده شده است. مطالعه اندازه ریزنمونه در ارقام مختلف سیب‌زمینی (گرانولا، مدین و اقیانوس اطلس) در کشت ریزنمونه مریستم و نوک ساقه روی محیط کشت MS حکایت از تأثیر معنی‌دار اندازه ریزنمونه بر رشد کالوس‌ها داشت. براساس نتایج، ریزنمونه‌های با اندازه کمتر از ۰/۵ میلی‌متر در مقایسه با ریزنمونه‌های با اندازه بیشتر از ۰/۵ میلی‌متر کاهش دوام کشت را نشان دادند (Karjadi & Waluyo, 2021). همچنین بررسی تأثیر اندازه ریزنمونه (۰/۵ و ۱ سانتی‌متر) بر ایجاد کالوس در گیاه کاکتوس زینتی (*Cereus peruvianum*) نشان می‌دهد، ریزنمونه‌های با طول ۰/۵ سانتی‌متر در مقایسه با ریزنمونه‌های با اندازه ۱ سانتی‌متر کالوس بیشتری تولید می‌کنند (Karimi *et al.*, 2010). بنابراین در این تحقیق، ریزنمونه‌های با اندازه‌های ۲–۱/۵، ۲/۵–۲، ۳–۲/۵، ۳/۵–۳ و ۴–۳/۵ سانتی‌متر به منظور مطالعه زیست‌توده و ویژگی‌های کالوس در گونه‌های *T. baccata* و *T. brevifolia* بررسی شد. نتایج نشان داد بین اندازه ریزنمونه و زیست‌توده کالوس‌های دو گونه *T. baccata* و *T. brevifolia* به ترتیب همبستگی متوسط و ضعیف وجود داشت که نشان می‌دهد در گونه *T. baccata* اندازه ریزنمونه عامل مؤثرتری در افزایش تولید کالوس در مقایسه با *T. brevifolia* است و افزایش طول ریزنمونه افزایش بیشتر کالوس را در پی خواهد داشت. به‌عبارتی امکان افزایش تولید کالوس فقط با افزایش اندازه مشخص ریزنمونه میسر بوده و این روند قابل بسط نیست. کالوس‌های حاصل از کشت بافت گیاهان با توجه به منبع ریزنمونه، محیط کشت، هورمون‌ها و شرایط کشت می‌توانند دارای انواع مختلفی باشند. در این پژوهش، کالوس‌های حاصل از کشت ریزنمونه ساقه گونه *T. brevifolia* دارای ۵۰٪ بافت نرم بیشتری در مقایسه با گونه *T. baccata* بودند. کالوس‌های دارای بافت نرم با رنگ سفید منابع ارزشمندی برای ایجاد کشت‌های سوسپانسیون سلولی به‌شمار می‌روند. این کالوس‌ها کاربرد و اهمیت فراوانی در باززایی، اندام‌زایی و جنین‌زایی سوماتیک دارند. همچنین زیرکشت کالوس‌های دارای بافت نرم در مقایسه با دیگر انواع کالوس‌های حاصل از کشت بافت با افزایش زیست‌توده تولیدی کالوس همراه است (Setamam, 2019; Jogi *et al.*, 2020).

یکی از موانع اصلی در کشت بافت و نگهداری کالوس سرخداریان، ترشح ترکیبات فنولی به محیط کشت است که با جلوگیری از رشد کالوس‌ها، منجر به قهوه‌ای شدن و در نهایت مرگ سلول‌ها و از بین رفتن کالوس‌ها می‌شود. چنین کالوس‌هایی هرچند پرآوری و زیست‌توده مناسبی نیز برای کشت سلول داشته باشند، به دلیل ترشحات فنولی زیاد موجب از دست رفتن کشت‌های حاصل طی زیرکشت‌های متوالی خواهند شد. گونه‌های جنس *Taxus* به دلیل بالا بودن سطح ترکیبات فنولی در سلول‌ها به تجمع ترکیبات فنولی به محیط کشت بسیار حساس هستند. از این‌رو، پژوهشگران از روش‌های مختلفی با هدف کاهش ترکیبات فنولی و بهبود رشد کالوس‌های سرخداریان در کشت آزمایشگاهی ازجمله استفاده از ترکیبات جذب‌کننده مانند پلی‌وینیل پیرولیدون و زغال فعال، استفاده از آنتی‌اکسیدان‌هایی مانند سیتریک اسید، آسکوربیک اسید و پلی‌اتیلن گلایکول استفاده می‌کنند (Khosroushahi *et al.*, 2011; Toulabi *et al.*, 2015). دستیابی به کشت بهینه برای تولید کالوس‌های حاوی کمترین میزان ترشح ترکیبات فنولی با بیشترین پرآوری کالوس در کشت سلول و تولید تجاری پاکلی‌تاکسل با انتخاب ریزنمونه‌های مناسب محقق می‌گردد. وجود همبستگی ضعیف بین ترشحات فنولی و اندازه ریزنمونه در هر دو گونه سرخدار *T.baccata* و *T. brevifolia* در این تحقیق نشان داد با افزایش اندازه ریزنمونه، مقادیر ترشح ترکیبات فنولی همواره روند افزایشی نداشته و با افزایش طول ریزنمونه به بیش از ۳ سانتی‌متر تغییر قابل توجهی در میزان ترشحات ترکیبات فنولی در هر دو گونه ایجاد نشد، ازاین‌رو امکان استفاده از ریزنمونه‌های با طول بیشتر و در نتیجه میزان کالوس تولیدی بیشتر وجود دارد. نتایج تحقیقات قبلی نشان می‌دهد ترشح ترکیبات فنولی بیشتر متأثر از عواملی ازجمله آسیب غشای زیستی و تنش‌های زیستی و غیرزیستی است (Sarmadi *et al.*, 2019).

نتیجه‌گیری

در این پژوهش برای اولین بار اثر طول ریزنمونه ساقه دو گونه *T. baccata* و *T. brevifolia* از نظر میزان کالوس‌زایی و تولید زیست‌توده، ویژگی‌های کالوس و میزان ترشح ترکیبات فنولی به محیط کشت B5 بررسی شد. نتایج نشان داد با افزایش طول ریزنمونه تا ۳ سانتی‌متر، سبب افزایش زیست‌توده کالوس و ترشح ترکیبات فنولی گردید. وزن تر کالوس‌های حاصل از ریزنمونه‌های با طول کمتر از ۲/۵ سانتی‌متر در گونه *T. brevifolia* از گونه *T. baccata* بیشتر بود، در حالی که در ریزنمونه‌های با طول کمتر از ۲/۵ سانتی‌متر شدت ترشح ترکیبات فنولی در گونه *T. baccata* از گونه *T. brevifolia* بیشتر بود. البته بین اندازه ریزنمونه کشت شده با زیست‌توده و ترشح ترکیبات فنولی کالوس‌های دو گونه مورد مطالعه به ترتیب همبستگی متوسط و ضعیف وجود داشت. با توجه به تولید زیست‌توده کالوس مطلوب و ترشح ترکیبات فنولی پایین، ریزنمونه ساقه با طول ۲/۵ – ۲ سانتی‌متر به عنوان بهینه اندازه ریزنمونه ساقه در کشت بافت دو گونه *T. baccata* و *T. brevifolia* پیشنهاد می‌شود.

References

– Abbasin, Z., Zamani, S., Movahedi, S., Khaksar, G., and Tabatabaei, B. S., 2010. *In vitro* micropropagation of Yew (*Taxus baccata*) and production of plantlets. Biotechnology, 9(1): 48-54.

– Albuquerque, B. R., Heleno, S. A., Oliveira, M. B. P., Barros, L., and Ferreira, I. C. 2021. Phenolic compounds: Current industrial applications, limitations and future challenges. Food & function, 12(1): 14-29.

– Aldbass, A. M., 2022. Use of Natural Products and Their Derivative in Cancer Research for the Discovery of Safer Treatments. Journal of Pharmaceutical Research International, 10: 39-46.

– Ashrafi, S., Mofid, M. R., Otroshi, M., Ebrahimi, M., and Khosroshahli, M., 2010. Effects of plant growth regulators on the callogenesis and taxol production in cell suspension of *Taxus baccata* L. Trakia Journal of Science, 8(2): 36-43.

Cv. Wufu: Influence of anti-browning additives on phenolic secretion and callus formation frequency in explants. Horticulture, Environment, and Biotechnology, 58: 503-513.
– Jogi, Q., Chen, A., Sun, M., Wang, S., Kandhro, M. N., Soomro, A. H., and Babar, N., 2020. Impact of phyto-hormone concentrations in optimizing cell suspension culture of flue-cured tobacco (*Nicotiana tabaccum* L.) cultivars. Pure and Applied Biology, 9(4): 2589-2598.
– Karimi, N., Mofid, M. R., Ebrahimi, M., and Khayyam Nekouei, S. M., 2010. Effect of genotype, explant size and position on callus induction in *Cereus peruvianum* Mill. (Cactaceae). Trakia Journal of Sciences, 8(1): 33-37.
– Karjadi, A. K., and Gunaeni, N., 2022. The Effect of Antiviral Ribavirin, Explant Size, Varieties on Growth and Development in Potato Meristematic. In IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 985(1): 12-22.
– Karjadi, A. K., and Waluyo, N., 2021. The effect of explant size and addition of antiviral ribavirin on proliferation of meristematic potatoes (*Solanum tuberosum* L.). In IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 807(3): 17-32.
– Kashani, K., Jalali Javaran, M., Sabet, M. S., and Moieni, A., 2018. Identification of rate-limiting enzymes involved in paclitaxel biosynthesis pathway affected by coronatine and methyl-β-cyclodextrin in *Taxus baccata* L. cell suspension cultures. DARU Journal of Pharmaceutical Sciences, 26: 129-142.
– 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: 1(1): 37-42.
– Lin, S. L., Wei, *T.*, Lin, J. F., Guo, L. Q., Wu, G. P., Wei, J. B., Huang, J. J., and Ouyang, P. L., 2018. Bio-production of baccatin III, an important precursor of paclitaxel by a cost effective approach. Molecular Biotechnology, 60: 492–505.
– Mirjalili, M. H., 2022. Influence of Titania–graphene nanocomposite and coronatine on taxanes production and expression patterns of
– Behjat, B. S., Omidi, M., Naghavi, M. R., Hariri, F. A., Kalateh, S. J., Shafiee, M., and Shafiee, M., 2014. Effect of explants, salts concentration medium and hormone treatments on *Taxus baccata in vitro* culture. International Journal of Bioscience, 5: 1-9.
– Benjamin, E. D., Ishaku, G. A., Peingurta, F. A., and Afolabi, A. S., 2019. Callus culture for the production of therapeutic compounds. American Journal of Plant Biology, 4(4): 76-84.
– Bhuju, S. and Gauchan, D. P., 2018. *Taxus wallichiana* (Zucc.), an endangered anti-cancerous plant: a review. International Journal of Research and Review, 5(21): 10-21.
– Esmaeili, S., Sharifi, M., Ghanati, F., Soltani, B. M., Samari, E., and Sagharyan, M., 2023. Exogenous melatonin induces phenolic compounds production in *Linum album* cells by altering nitric oxide and salicylic acid. Scientific Reports, 13(1): 4158.
– Gauchan, D. P., Bhuju, S., Lamichhane, J., Shakya, R., and García-Gil, M. R., 2021. Establishment of regenerative callus, cell suspension system, and molecular characterization of *Taxus wallichiana* Zucc. for the *in vitro* production of Taxol. Journal of Applied Pharmaceutical Science, 11(6): 022-034.
– Ghafoori, R., Bernard, F., Abolmaali, S., and Mousavi, A., 2012. Improved effect of glutathione on the induction and growth of *Taxus baccata* L. callus. Annals of Biological Research, 3(4): 1726-1730.
– Hosseini, N. S., Ghasimi Hagh, Z., and Khoshghalb, H., 2020. Morphological, antioxidant enzyme activity and secondary metabolites accumulation in response of polyethylene glycol-induced osmotic stress in embryo-derived plantlets and callus cultures of *Salvia leriifolia*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 140: 143-155.
– Hrubša, M., Siatka, T., Nejmanová, I., Vopršalová, M., Kujovská Krčmová, L., Matoušová, K., and Oemonom, M., 2022. Biological properties of vitamins of the B-complex, part 1: Vitamins B1, B2, B3, and B5. Nutrients, 14(3): 484.
– Irshad, M., He, B., Liu, S., Mitra, S., Debnath, B., Li, M., Hafiz, M., and Qiu, D., 2017. *In vitro* regeneration of *Abelmoschus esculentus* L.

under drought stress. *In Vitro* Cellular & Developmental Biology-Plant, 56: 703-717.
– Sarmadi, M., Karimi, N., Palazón, J., Ghassempour, A., and Mirjalili, M. H., 2019. Improved effects of polyethylene glycol on the growth, antioxidative enzymes activity and taxanes production in a *Taxus baccata* L. callus culture. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 137: 319-328.
– Setamam, N., 2019. Effects of different concentration of both naphthaleneacetic acid and 6-benzylaminopurine in callus induction of *capsicum frutescens*. Gading Journal for Science and Technology, 2(1): 23-30.
– 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 and Biotechnology, 3(2): 58-67.
– Zhang, B., Tian, L., Xie, J., Chen, G., and Wang, F., 2020. Targeting miRNAs by natural products: a new way for cancer therapy. Biomedicine and Pharmacotherapy, 130: 11-17.

the key genes involved in taxol biosynthetic pathway in cell suspension culture of *Taxus baccata*. 3: 1-13.
– Mohammadi, Y., Mashayekhi, M. R., Zhoulideh, Y., and Gheytaranpour-Sehrigh, Sh., 2022. Study of *dbat* gene expression pattern and Taxol production in Yew (*Taxus baccata*) leaves under the influence of Methyl Jasmonate. Journal of Forest Research and Development, 8(4): 403-414 (In Persian).
– Nasiri, J., Naghavi, M. R., Alizadeh, H., Fattahi Moghadam, M. R., Mashouf, A., and Nabizadeh, M., 2015. Modified AHP-based decision-making model toward accurate selection of eligible maintenance media for production of taxanes in *Taxus baccata* callus culture. Acta Physiologiae Plantarum, 37: 1-15.
– Rahmati, Z., Payam Nour, V., Ghasemi Bezdi, K., and Ebrahimi, P., 2017. Optimization of culture medium for *in vitro* callogensis in *Taxus baccata* L. and *T. brevifolia* Nut. Forest and Wood Products, 70(3): 381-391 (In Persian).
– Sarmadi, M., Karimi, N., Palazón, J., Ghassempour, A., and Mirjalili, M. H., 2020. Physiological, biochemical, and metabolic responses of a *Taxus baccata* L. callus culture