جنگل و فرآورده‌های چوب، مجلهٔ منابع طبیعی ایران
دورهٔ ۷۰، شمارهٔ ۳، پاییز ۱۳۹۶
ص ۳۸۱-۳۹۱

DOI: 10.22059/jfwp.2017.111443.561

بهینه‌سازی محیط کشت به‌منظور کالوس‌زایی *Taxus baccata* L. و *Taxus berevifolia* Nutt. در شرایط درون‌شیشه‌ای

زینب رحمتی[1*]، وحیده پیام نور[2]، کمال قاسمی بزدی[3]، پونه ابراهیمی[4]

۱. کارشناس ارشد گروه جنگل‌شناسی و اکولوژی جنگل، دانشکدهٔ علوم جنگل، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
۲. دانشیار گروه جنگل‌شناسی و اکولوژی جنگل، دانشکدهٔ علوم جنگل، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
۳. دانشیار سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مؤسسهٔ تحقیقات پنبهٔ کشور، گرگان
۴. دانشیار گروه شیمی، دانشکدهٔ علوم پایه، دانشگاه گلستان، گرگان

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۲/۰۵، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۱/۱۳

چکیده

تاکسول یکی از مؤثرترین داروهای ضد سرطان است که در درمان طیف گسترده‌ای از سرطان‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. کشت بافت سرخدار منبع جایگزین مناسبی برای تهیه تاکسول و سایر تاگزان‌های وابسته به آن است. یکی از روش‌های تولید متابولیت‌های ثانویه در شرایط درون شیشه‌ای در گیاهان کالوس‌زایی است. تحقیق حاضر با هدف بررسی محیط کشت پایه و غلظت‌های هورمونی به‌منظور کالوس‌زایی دو گونهٔ سرخدار (*Taxus baccata* و *Taxus berevifolia*) به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام گرفت. به‌منظور بهینه‌سازی شرایط رشد کالوس، قطعات جداکشت ساقه در سه نوع محیط کشت پایهٔ WPM، MS، B5 و تحت تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد 2,4-D با غلظت‌های ۱، ۲ و ٤ میلی‌گرم در لیتر در ترکیب با کینتین با غلظت ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر بررسی شد. نتایج نشان داد که بیشترین درصد کالوس‌زایی (۵۷/۳ درصد) ریزنمونه‌های ساقه در محیط WPM و غلظت هورمونی ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر کینتین صورت گرفت. کمترین درصد کالوس‌زایی (۲۲/۳ درصد) در محیط کشت MS انجام گرفت و محیط کشت B5 در وضعیتی بین این دو قرار داشت. همچنین استفاده از غلظت‌های کم تنظیم‌کننده‌های رشد نسبت به غلظت‌های بیشتر، تأثیر بیشتری بر متغیر کالوس‌زایی در ریزنمونه‌های ساقهٔ دو گونهٔ سرخدار داشت.

واژه‌های کلیدی: تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، سرخدار، کالوس‌زایی، محیط کشت.

مقدمه

سرخدار متعلق به جنس *Taxus* از درختان سوزنی‌برگ کندرشد و سایه‌پسند است که در مناطق مرطوب و نیمه‌مرطوب پراکنده است و زادآوری طبیعی اندک و اهمیت صنعتی و دارویی زیادی دارد [۱، ۲]. سرخدار از معدود سوزنی‌برگان بومی ایران است که در دوران سوم زمین‌شناسی در بعضی از نقاط دنیا انتشار یافت و به‌تدریج در نتیجهٔ عوامل مختلف اکولوژیک از جمله گرم شدن اقلیم و تخریب توسط عوامل انسانی، رویشگاه‌های طبیعی خود را از دست داده است و سیر قهقرایی را طی می‌کند. این شرایط سبب شده که گونهٔ سرخدار در معرض تهدید قرار گیرد [۳]. تکثیر این گیاه از طریق کشت بافت ممکن است در احیای این گونه و تولید انبوه نهال آن در آینده مؤثر باشد. از طرفی این درخت منبع اولیهٔ تولید داروی

* نویسندهٔ مسئول، تلفن: ۰۸۴۳۳۶۲۶۱۹۱
Email: z.rahmati65@yahoo.com

Archive of SID
www.SID.ir

ضدسرطان تاکسول با اثر ویژه در درمان سرطان‌های سینه، رحم، ریه، مثانه و غیره است [٤] که در تمامی بخش‌های درخت سرخدار به‌جز میوهٔ تازهٔ آن به مقدار کم وجود داشته و مقادیر آن در اندام‌های مختلف و گونه‌های متفاوت (۰/۰۱ تا ۰/۰۳ میلی‌گرم در یک گرم بافت خشک) نوسان دارد [۵]. با توجه به غلظت کم تاکسول موجود در پوست درخت سرخدار، کندرشد بودن گیاه و پراکنش کم آن در عرصه‌های طبیعی، منبع تولید مادهٔ تاکسول بسیار محدود است [۲]. ازاین‌رو در دهه‌های اخیر محققان کشورهای مختلف در پی روش‌های جدید بهبود شرایط تولید و کاهش قیمت این داروی باارزش به‌منظور پاسخگویی به نیاز بیماران سرطانی و کلینیک‌های تخصصی بوده‌اند [٦]. یکی از روش‌های تولید تاکسول، استفاده از کشت بافت و تولید کالوس‌های حاصل از شرایط درون‌شیشه‌ای یا سوسپانسیون سلولی است [۷]. در این خصوص تعیین روش سترون‌سازی مناسب ریزنمونه‌ها، محیط کشت بهینه و تیمارهای هورمونی مناسب برای دستیابی به درصد کالوس‌زایی زیاد اهمیت ویژه‌ای دارد [۸]. یکی از عوامل اصلی و محدودکنندهٔ استفاده از روش‌های کشت بافت، وجود آلودگی‌های قارچی و باکتریایی ریز نمونه‌هاست.

برای سترون‌سازی ریزنمونه‌های گونه‌های مختلف سرخدار به‌منظور کالوس‌زایی در شرایط درون‌شیشه‌ای، پیشتر از تیمارهای مختلفی استفاده شده است که می‌توان به شست‌وشوی نمونه‌ها با آب به‌مدت ۳۰ دقیقه و سپس ۷ دقیقه شست‌وشو با محلول قارچ‌کش بنومیل ۱ درصد به‌عنوان پیش‌تیمار و ضدعفونی نهایی با استفاده از تیمار الکل ۷۰ درصد به‌مدت ۳۰ ثانیه و سپس کلرید جیوهٔ ۰/۱ درصد به‌مدت ۷ دقیقه روی ریزنمونهٔ سرشاخهٔ گونهٔ *T. baacata* در محیط کشت MS [۹]، تیمار الکل ۷۰ درصد به‌مدت ۳۰ ثانیه و سپس محلول کلرید جیوهٔ ۰/۱ درصد به‌مدت ۷ دقیقه روی ریزنمونه‌های برگ و ساقهٔ گونهٔ *T. baccata* در محیط کشت MS اشاره کرد [۱].

تحقیقات به‌نسبت زیادی در زمینهٔ کشت‌های درون‌شیشه‌ای این گونه و بهینه‌سازی محیط کشت و تنظیم‌کننده‌های رشد گوناگون در القای کالوس گونه‌های مختلف سرخدار انجام گرفته است. تحقیقات مقدماتی در خصوص کشت کالوس سرخدار از سال ۱۹۷٤ آغاز شد [۱۰]. بعدها کالوس‌هایی با استفاده از جداکشت‌هایی از بافت‌های مختلف از جمله پوست، شاخه، اجزای دانه، ساقه‌های جوان و برگ‌ها تولید شد که از این میان، ساقه‌ها بهترین ریزنمونه بودند و کالوس‌های حاصل رشد سریع‌تری داشتند [۱۱]. ترکیب محیط مهم‌ترین بخش در القای کالوس، رشد سلول و همچنین تشکیل متابولیت در کشت بافت و سلول گیاهی است. غلظت و ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی تأثیر مهمی در القای کالوس دارد و محیط دارای ۱ تا ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D[1] یا ترکیب آن با سایر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، تأثیر مهمی در کال‌زایی داشته است [۱۲]. وجود یک منبع اکسین به‌تنهایی یا همراه با یک سیتوکینین برای القای کالوس گونه‌های مختلف سرخدار ضروری است [۱]. در بیشتر گزارش‌ها محیط‌های کشت درون‌شیشه‌ای MS[2]، B5[3] و WPM[4] آزمون شده است [۹]، برای نمونه اثر غلظت‌های مختلف 2,4-D و کینتین[5] بر کالوس‌زایی ریزنمونهٔ برگ *T. berevifolia* در شرایط درون‌شیشه‌ای بررسی و از محیط کشت MS به‌عنوان محیط پایه استفاده شده و غلظت‌های ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D در ترکیب با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر کینتین، بهترین ترکیب برای کالوس‌زایی این گونه معرفی شده است [۱۳]. اشرفی و همکاران (۲۰۱۰) طی پژوهشی اثر تنظیم‌کننده‌های رشد بر کالوس‌زایی ریز نمونه های مختلف *T. baccata* را بررسی و محیط کشت B5 به‌همراه 2,4-D با غلظت ٤ میلی‌گرم در لیتر در ترکیب با

1. 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid
2. Murashige & Skoog, 1962
3. Gamborg et al, 1968
4. Woody Plant Medium
5. kinetin

Archive of SID

www.SID.ir

۰/۵ میلی‌گرم در لیتر کینتین را مناسب‌ترین تیمار برای کالوس‌زایی گزارش کردند [۱٤]. باقری طولابی و همکاران (۲۰۱۵) کالوس‌زایی ریزنمونه‌های برگ و ساقهٔ *T. baccata* را در دو محیط کشت پایهٔ MS و B5 بررسی کردند و محیط کشت B5 را برای کالوس‌زایی در این گونه، مناسب‌تر دانستند [۱۵]. مهدی‌نژاد و همکاران (۲۰۱۵) با کشت ریزنمونهٔ برگ *T. baccata* در محیط کشت پایهٔ WPM به‌همراه هورمون‌های 2,4-D و NAA موفق به کالوس‌دهی زیاد (۷۸ درصد) شدند [۱٦]. برخی محققان اظهار داشته‌اند که محیط کشت MS برای تولید کالوس مناسب نیست [۱۵، ۱۷]، درحالی‌که برخی دیگر گزارش کرده‌اند که بهترین محیط برای کال‌زایی ریزنمونه‌های سرشاخهٔ گونهٔ *T. baccata* محیط کشت MS است [۱، ۱۱]. محقق دیگری نیز استفاده از محیط B_5 به‌همراه هورمون‌های 2,4-D و به‌صورت ترکیب با سایر تنظیم‌کننده‌های رشد را بهترین محیط برای تکثیر سلول‌های کالوس اعلام کرده است [۷]. استروبل و همکاران (۱۹۹٦) نیز استفاده از محیط کشت B5 را برای رشد کالوس نسبت به استفاده از محیط کشت MS توصیه کرده‌اند [۱۰]. با بررسی تأثیر نوع و غلظت قندها و ترکیب هورمونی بر کال‌زایی در *T. baccata* مشخص شده است که در محیط کشت B5 از بین ترکیبات مختلف (۰، ۰/۵، ۱، ۲ و ٤ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰، ۰/۱، ۰/۲، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر کینتین)، ترکیب ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر کینتین بهترین ترکیب برای کال‌زایی با بیش از ۵۰ درصد کالوس‌زایی بوده است [۱۷]. البته در محیط‌های پایهٔ مختلف نتایج گوناگونی به‌دست آمده و بهترین غلظت ۱ تا ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D به‌تنهایی یا ترکیب آن با سایر تنظیم‌کننده‌های رشد برای کال‌زایی و رشد کالوس *T. baccata* گزارش شده است [۱۸]. ازآنجا که پاسخ هر یک از گونه‌ها، زیرگونه‌ها و حتی واریته‌های مختلف سرخدار در محیط‌های پایه و ترکیبات هورمونی بهینه برای القا و رشد کالوس متفاوت است [۱۹] و با توجه به اهمیت موضوع، انتخاب روش مناسب سترون‌سازی نمونه‌ها، اثر محیط کشت‌های پایهٔ WPM، MS، B5 و نسبت‌های متفاوت تنظیم‌کننده‌های رشد مختلف روی ریزنمونهٔ ساقهٔ سرخدار *T. baccata* (سرخدار ایرانی) و *T. berevifolia* (سرخدار برگ‌ریز) به‌منظور بررسی تولید کالوس در شرایط درون‌شیشه‌ای بررسی شد.

مواد و روش‌ها

تحقیق حاضر در آزمایشگاه کشت بافت دانشکدهٔ علوم جنگل دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان در سال ۱۳۹۱ انجام گرفت. نمونه‌های مورد نظر از ساقه‌های جوان گونهٔ *Taxus baccata* واقع در درهٔ زیارت گرگان با مختصات طول جغرافیایی ″۳۵ ′۲۷ °٥٤ و عرض جغرافیایی ″۱۲ ′٤۰ °۳٦ و گونهٔ *T. berevifolia* واقع در باغ گیاه‌شناسی جنگل آموزشی-پژوهشی شصت‌کلاتهٔ گرگان با مختصات طول جغرافیایی ″۳۰ ′۲۲ °٥٤ و عرض جغرافیایی ″۱۲ ′٤٦ °۳٦ در اواسط آبان طی یک مرحله از درختان بالغ ۳۵ ساله به‌صورت تصادفی برداشت و در پارچهٔ نخی مرطوب پیچیده شد و سپس به آزمایشگاه انتقال یافت و تا زمان کشت در یخچال نگهداری شد (شایان ذکر است که نمونه‌ها حداکثر یک روز پس از برداشت در محیط‌های مورد نظر کشت داده شدند). پیش‌سترون‌سازی نمونه‌ها با قرار دادن ریزنمونه‌ها در محلول قارچ‌کش بنومیل ۰/٤ درصد به‌مدت ۲ ساعت و شست‌وشوی سطحی با آب شهری صورت گرفت. ۹ تیمار سترون‌سازی از طریق کشت ریزنمونه‌ها در محیط کشت PDA[1] اعمال و ارزیابی شد و مناسب‌ترین تیمار سترون‌سازی مشخص شد و در نهایت نمونه‌ها سه مرتبه با آب مقطر استریل شست‌وشو شد. برای القای کالوس، تیمارهای هورمونی از غلظت‌های ۱، ۲ و ٤ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D در ترکیب با غلظت ۰/۱، ۰/۲ و

1. Potato Dextrose Agar

Archive of SID

www.SID.ir

۰/۳ میلی‌گرم در لیتر کینتین در محیط‌های کشت WPM، MS و B5 (جدول ۱) شامل ۲۵ گرم در لیتر ساکارز و ۸ گرم در لیتر آگار و تنظیم pH در محدودهٔ ۵/۸–۵/۷ اعمال شد. سترون‌سازی محیط کشت به‌مدت ۲۰ دقیقه در ۱۲۱ درجه و فشار ۱/۵ اتمسفر در اتوکلاو انجام گرفت و پس از کشت ریزنمونه‌های ساقه، در انکوباتور با دمای ۲±۲٤ در شرایط تاریکی به‌مدت دو ماه نگهداری شد. کشت‌ها در ۵ تکرار و ۱۰ ریزنمونه در هر تکرار انجام گرفت. عمل واکشت نمونه‌ها هر دو هفته یک‌بار به‌دلیل ترشح زیاد فنول صورت گرفت. نمونه‌های کشت‌شده برای مشاهدهٔ کالوس‌زایی، اندام‌زایی، رنگ و کیفیت کالوس به‌صورت هفتگی بررسی شد؛ پس از گذشت دو ماه، درصد کالوس‌دهی در تیمارهای هورمونی و محیط کشت‌های مختلف تعیین و تجزیه‌وتحلیل شد.

جدول ۱. ترکیبات مختلف محیط کشت به‌منظور کالوس‌زایی ریزنمونهٔ ساقهٔ *T. baccata* و *T. berevifolia*

ترکیب هورمونی (میلی‌گرم در لیتر)	محیط کشت پایه
2,4-D (۱) +Kin (۰/۱)	B5/WPM/MS
2,4-D (۲) +Kin (۰/۲)	B5/WPM/MS
2,4-D (۴) +Kin (۰/۳)	B5/WPM/MS

داده‌های به‌دست‌آمده براساس آزمایش فاکتوریل با طرح پایهٔ کاملاً تصادفی (۵ تکرار و ۱۰ ریزنمونه در هر تکرار) تجزیه‌وتحلیل شد. رسم نمودارها در Excel، مقایسهٔ میانگین‌ها داده‌ها با استفاده از آزمون دانکن و آنالیز داده‌ها نیز با استفاده از نرم‌افزار MSTATC انجام گرفت.

نتایج و بحث

در جدول ۲ نتایج مقایسهٔ میانگین تیمارهای سترون‌سازی اعمال‌شده آمده است. مشاهده می‌شود که براساس آن تیمار ٦ (کلرید جیوهٔ ۰/۱ درصد به‌مدت ۵ دقیقه) بهترین تیمار شناخته شده و در مراحل بعدی کار استفاده شد. افزایش زمان استفاده از این مادهٔ شیمیایی تا ۱۰ دقیقه (تیمار ۷) با وجود کاهش موقت درصد آلودگی‌ها، به‌دلیل سمیت ایجادشده، سبب آسیب‌دیدگی ریزنمونه‌ها و کاهش زنده‌مانی آنها می‌شود. یکی از موانع تکثیر و کالوس‌دهی در شرایط درون‌شیشه‌ای سرخدار یا هر گیاه دیگری که ریزنمونه‌های آن از محیط خارج، به‌ویژه عرصه‌های جنگلی که آلودگی‌هایی زیادی دارند، حضور باکتری‌های سیستمیک و غیرسیستمیک و همچنین وجود قارچ‌هاست و مهم‌ترین مسئله در شرایط کشت بافت، کنترل این آلودگی‌هاست. ریزنمونه‌ای که کشت می‌شود اغلب حاوی منبع مهمی از آلودگی‌هاست. میکروارگانیسم‌ها روی سطح، در شکاف‌های کوچک، برگ‌های در حال نمو، جوانه‌ها و غیره وجود دارند و به همین دلیل، سترون‌سازی مرحله‌ای مهم و الزامی برای کاهش آلودگی ریزنمونه‌های به‌کاررفته در کشت بافت است [۲۰]. محلول هیپوکلریت سدیم به‌عنوان نوعی ضدعفونی‌کنندهٔ عمومی، توانایی محدودی در کنترل آلودگی‌ها دارد و به‌صورت معمول به‌همراه ترکیبات دیگر استفاده می‌شود. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده (جدول ۲)، درصد آلودگی نمونه‌ها در تیمارهایی که از هیپوکلریت سدیم استفاده شده، بیش از ۵۰ درصد بوده است و این محلول قابلیت مناسبی برای سترون‌سازی نمونه‌ها ندارد. استفاده از محلول الکل ۷۰ درصد موجب حذف لایهٔ سطح کوتیکول شده و در نتیجه سبب می‌شود محلول ضدعفونی‌کنندهٔ اصلی نفوذ و تأثیر بهتری بر بافت‌ها بگذارد و آلودگی‌ها را تا حدودی کاهش دهد. در ضمن اتانول به‌دلیل خاصیت میکروب‌کشی و مسموم‌کنندگی گیاهان باید در مدت زمان کوتاهی استفاده شود [۲۱]؛ اگرچه با توجه به نتایج، اتانول ۷۰ درصد نیز قادر به کنترل آلودگی‌ها تا حد مطلوب نیست. محلول کلرید جیوهٔ ۰/۱ درصد از سمی‌ترین محلول‌های سترون‌سازی است که باید در زمان کوتاه با غلظت کم استفاده شود تا از انهدام بافت‌ها جلوگیری شود. مدت زمان مناسب استفاده از این محلول با توجه به نوع گونه و فصل برداشت آن متفاوت است. کاربرد محلول کلرید جیوه به‌عنوان سترون‌ساز اصلی به این دلیل است که

Archive of SID

www.SID.ir

مقادیر ضعیف آن در تیمارهای کوتاه‌مدت، تأثیر قوی و ماندگار بر حذف آلودگی‌های میکروبی دارد و کارایی ضدعفونی را افزایش می‌دهد و سبب قهوه‌ای شدن نمونه‌ها نمی‌شود [۲۲]. محققانی همچون دادور و همکاران (۲۰۱۳) استفاده از محلول کلرید جیوهٔ ۰/۱ درصد به‌مدت ۵ دقیقه را به‌دلیل مشاهده نشدن هر نوع آلودگی، مناسب‌ترین تیمار برای ضدعفونی نمونه‌های گونهٔ .*Celtis caucasica* Willd در فصل پاییز عنوان کرده‌اند که با نتایج یادشده همسوست [۲۲]. در ضمن یادآوری می‌شود که پسماندهای کلرید جیوه با مشکلات زیست‌محیطی همراه است و از بین بردن این پسماندها مشکل است؛ ازاین‌رو استفاده از آن در غلظت‌های کمتر، مناسب‌تر است. شرایط نگهداری گیاه مادری که نمونه از آن تهیه می‌شود، بر شدت آلودگی در شرایط درون‌شیشه‌ای تأثیرگذار است. نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که نمونه‌های جمع‌آوری‌شدهٔ دو گونهٔ سرخدار از رویشگاه‌های مختلف آلوده‌اند و به‌راحتی قادر به کالوس‌دهی حتی در شرایط کنترل‌شدهٔ درون‌شیشه‌ای نیستند.

نتایج تجزیهٔ واریانس داده‌های درصد تشکیل کالوس بر روی هر قطعهٔ جداکشت ساقه (جدول ۳) نشان داد که اثر هر کدام از عوامل گونهٔ *Taxus*، محیط کشت پایه و همچنین اثر متقابل دو فاکتور گونهٔ *Taxus* × محیط کشت و محیط کشت × تیمارهای هورمونی در سطح احتمال ۱ درصد ($P < ۰/۰۱$) و همچنین اثر تیمارهای هورمونی در سطح احتمال ۵ درصد ($P < ۰/۰۵$) معنی‌دار است.

جدول ۲. مقایسهٔ میانگین اثر تیمارهای سترون‌سازی بر درصد آلودگی نمونه‌های کشت‌شده در شرایط درون‌شیشه‌ای به روش دانکن در سطح احتمال ۱ درصد

کد تیمار	شرح تیمار	درصد آلودگی
۱	قارچ‌کش بنومیل ۰/۴ درصد به‌مدت ۲ ساعت	۸۸/۳۳^{a}
۲	هیپوکلریت سدیم ۳ درصد به‌مدت ۱۰ دقیقه + الکل ۷۰ درصد به‌مدت ۱ دقیقه	۷۴/۱۴^{b}
۳	هیپوکلریت سدیم ۳ درصد به‌مدت ۲۰ دقیقه + الکل ۷۰ درصد به‌مدت ۳۰ ثانیه	۹۶/۶۷^{a}
۴	هیپوکلریت سدیم ۳ درصد به‌مدت ۱۵ دقیقه + الکل ۷۰ درصد به‌مدت ۱ دقیقه	۷۲/۵۰^{bc}
۵	هیپوکلریت سدیم ۲ درصد به‌مدت ۲۰ دقیقه+ الکل ۷۰ درصد به‌مدت ۱/۳۰ دقیقه	۶۵/۸۳^{bc}
۶	کلرید جیوهٔ ۰/۱ درصد به‌مدت ۵ دقیقه	۴/۱۶^{d}
۷	کلرید جیوهٔ ۰/۱ درصد به‌مدت ۱۰ دقیقه	۴/۱۶^{d}
۸	کلرید جیوهٔ ۰/۱ درصد به‌مدت ۵ دقیقه + الکل ۷۰ درصد به‌مدت ۱ دقیقه	۶/۶۶^{d}
۹	هیپوکلریت سدیم ۲ درصد به‌همراه چند قطره مایع ظرفشویی به‌مدت ۵ دقیقه	۶۰/۸۳^{c}

حرف‌هایی که یکسان نیستند، تفاوت معنی‌داری را در سطح احتمال ۱ درصد با آزمون دانکن نشان می‌دهند.

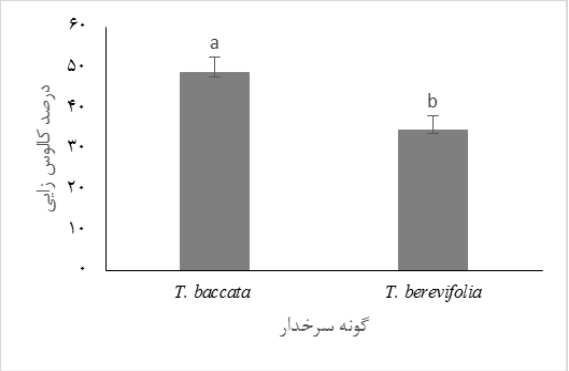
جدول ۳. تجزیهٔ واریانس اثر عامل‌های گونهٔ *Taxus*، ترکیب هورمونی و محیط کشت بر درصد کالوس‌زایی

منبع تغییرات (SOV)	درجهٔ آزادی (df)	میانگین مربعات (MS)	مقدار F	سطح معنی‌داری
گونهٔ *Taxus*	۱	۴۲۷۱/۱۱**	۳۸/۰۵	۰/۰۰
محیط کشت پایه	۲	۹۲۸۷/۷۸**	۸۲/۷۶	۰/۰۰
تیمارهای هورمونی	۲	۶۲۱/۱۱*	۴/۱۶	۰/۰۱
گونهٔ *Taxus* × محیط کشت	۲	۴۶۷/۷۸**	۵/۵۳	۰/۰۰
گونهٔ *Taxus* × تیمارهای هورمونی	۲	۴۷/۷۸$^{n.s}$	۰/۴۲	۰/۸۱۶
محیط کشت × تیمارهای هورمونی	۴	۲۹۳۲/۷۸**	۲۶/۱۳	۰/۰۰
گونهٔ *Taxus* × محیط کشت × تیمار هورمونی	۴	۱۴۹/۴۴$^{n.s}$	۱/۳۳	۰/۲۶
اشتباه	۷۲	۱۱۲/۲۲		
کل	۸۹			
ضریب تغییرات (c.v) درصد	۲۵/۹			

n.s: نبود اختلاف معنی‌دار؛ * و **: به‌ترتیب اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱. نتایج مقایسهٔ میانگین کالوس‌زایی ریزنمونهٔ ساقهٔ گونهٔ *Taxus* تحت تأثیر فاکتور نوع گونه

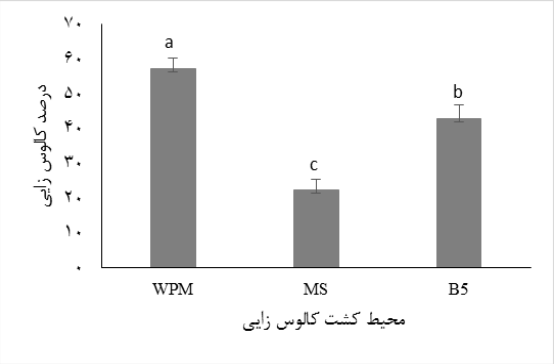
نتایج مقایسهٔ میانگین کالوس‌زایی ریزنمونهٔ ساقهٔ حاصل از گونه‌های *Taxus* در شکل ۱ آورده شده است. در تحقیق حاضر، کال‌زایی از سطوح برش‌یافته که در داخل محیط کشت فرو نرفته بودند، آغاز شد و جداکشت‌های ساقه از هفتهٔ دوم شروع به کال‌زایی کردند. بر این اساس، بیشترین درصد تشکیل کالوس (۴۷/۸ درصد) در گونهٔ *T. baccata* مشاهده شد، اما درصد کال‌زایی در گونهٔ *T. berevifolia* کمتر بود. به‌صورت کلی ریزنمونهٔ ساقهٔ *T. baccata* قابلیت بیشتر و بهتری برای تشکیل کالوس داشت. از دلایل وجود این اختلاف می‌توان به متفاوت بودن رویشگاه و شرایط جغرافیایی و محیطی مختلف رویشگاه گونه‌های *Taxus* اشاره کرد. گونهٔ *T. baccata* در درهٔ زیارت گرگان که رویشگاه طبیعی خود بود، رشد یافته و با شرایط محیطی حاکم بر این منطقه سازش و تطابق یافته است. ازاین‌رو به‌نظر می‌رسد نمونه‌های ساقه که از درختان واقع در رویشگاه طبیعی خود انتخاب شوند، در شرایط آزمایشگاهی کالوس‌دهی موفق‌تری نیز خواهند داشت؛ اما با توجه به اینکه گونهٔ *T. berevifolia* بومی ایران نیست و به‌صورت پایه‌های دست‌کاشت در کشور ما یافت می‌شود، با محیط تطابق کمتری یافته است و در شرایط آزمایشگاهی نیز کالوس‌دهی کمتری از خود نشان می‌دهد. از طرف دیگر با توجه به اینکه گونه‌ها و حتی واریته‌های مختلف یک گونه ممکن است پاسخ‌های متفاوتی بسته به محیط کشت و ترکیبات هورمونی مختلف داشته باشند [۱۹]، تفاوت در میزان کال‌زایی گونه‌های مورد تحقیق مورد پذیرش است.

نتایج مقایسهٔ میانگین حاصل از محیط کشت پایه بر درصد کالوس‌زایی ریزنمونهٔ ساقه در شکل ۲ آورده شده است. براساس نتایج، بین محیط کشت‌ها اختلاف معنی‌داری در میزان کالوس‌زایی وجود داشت. بیشترین درصد کالوس‌زایی (۵۷/۳ درصد) در محیط کشت WPM که مختص درختان چوبی است، مشاهده شد. محیط کشت B5 با ۴۳ درصد کالوس‌زایی بعد از محیط کشت WPM بوده و کالوس‌زایی در محیط کشت MS (۲۲/۳ درصد) دارای کمترین مقدار بود. علت موفقیت در محیط WPM ممکن است تناسب مواد و عناصر موجود در این محیط کشت با گیاه باشد. محیط کشت WPM فاقد نیترات پتاسیم بوده و مقدار آمونیوم آن کمتر از محیط کشت MS است و در کل نمک‌های پرمصرف کمتری دارد، به همین دلیل بیشتر در کشت بافت درختان چوبی استفاده می‌شود و ممکن است بر رشد کالوس و حتی ریشه‌زایی نیز تأثیر چشمگیری داشته باشد. ترکیبات محیط کشت‌های B5 و MS تا حدودی با هم متفاوت است. علاوه‌بر وجود تفاوت در عناصر پرمصرف، محیط کشت B5 برخلاف محیط کشت MS فاقد گلایسین است، اما تیامین بیشتری دارد. گونه‌ها و حتی ارقام مختلف یک گونه ممکن است به عناصر غذایی متفاوتی نیاز داشته باشند و همین موضوع ممکن است بر کال‌زایی آنها اثرگذار باشد [۲۳]. ممکن است کال‌زایی بیشتر در محیط کشت B5 نسبت به محیط MS، به‌دلیل نبود گلایسین و افزایش تیامین باشد، زیرا در گیاهی مانند صبر زرد نشان داده شده است که افزایش تیامین در افزایش کال‌زایی و باززایی مؤثر است [۲۴]. ازاین‌رو ممکن است بیشتر بودن تیامین در محیط کشت B5 نسبت به محیط MS، سبب افزایش کالوس‌زایی در گونه‌های سرخدار شده باشد. از طرف دیگر محیط کشت B5 دارای کینتین و 2,4-D است که ممکن است بر کال‌زایی ریزنمونه‌های ساقه اثرگذار بوده باشند. نتایج تحقیقات نان و همکاران

Archive of SID

www.SID.ir

(۲۰۱۵) دربارهٔ کالوس‌زایی ریزنمونهٔ ساقهٔ گونهٔ *T. chinesis* نشان می‌دهد که محیط کشت B5 نسبت به MS، برای تشکیل کالوس در شرایط درون‌شیشه‌ای مناسب‌تر است که با نتایج تحقیق حاضر همسویی دارد [۲۵].



شکل ۲. نتایج مقایسهٔ میانگین کالوس‌زایی گونه‌های *Taxus* تحت تأثیر فاکتور محیط کشت پایه

در این پژوهش با وجود استفاده از نسبت‌های هورمونی متنوع برای کشت بافت، با مشاهده و بررسی نمونه‌های کشت‌شده هیچ‌گونه اندام‌زایی در بافت مشاهده نشد (جدول ٤) که علت آن ممکن است استفاده از2,4-D باشد، زیرا گزارش‌هایی وجود دارد مبنی بر اینکه استفاده از این هورمون سبب توقف اندام‌زایی و تمایزیابی بافت‌ها می‌شود و کال‌زایی را تسریع می‌کند [۲٦]. با اینکه کشت ریزنمونه‌های اولیهٔ به‌کاررفته در تحقیق، همزمان انجام گرفت، ویژگی‌های کیفی از جمله بافت و رنگ کالوس‌های ایجادشده در محیط کشت‌ها متفاوت بود (جدول ٤). کالوس‌ها در محیط کشت WPM بافت ترد و زردی داشتند، درصورتی که کالوس‌های حاصل از محیط کشت B5 بافت نرم و قهوه‌ای روشن داشتند. کالوس‌های محیط کشت MS بافتی شل داشتند و رنگشان قهوه‌ای تیره مایل به سیاه بود (شکل ۳). ازآنجا که کیفیت کالوس به نوع و مقدار عناصر موجود در محیط کشت (ماکرو، میکرو، ویتامین‌ها و غیره) وابسته است، محیط کشت و تنظیم‌کننده‌های مختلف رشد می‌توانند بر این متغیر اثرگذار باشند. گزارش شده است که در محیط کشت‌های حاوی غلظت اندک کینتین و غلظت زیاد 2,4-D کالوس‌ها رشد سریعی خواهند داشت و ساختار کالوس نرم و سست خواهد بود؛ اما با افزایش مقدار کینتین بافت کالوس نیز سفت‌تر خواهد شد [۱۲]. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که نوع محیط کشت پایه یا به‌عبارت دیگر نوع و غلظت عناصر غذایی ممکن است بر میزان کالوس‌زایی اثر درخور توجهی داشته باشد. کال‌زایی در محیط کشت WPM از ابتدای هفتهٔ دوم کشت و زودتر از دو محیط دیگر آغاز شد (جدول ٤) و در عین حال در طول مدت یکسان آزمایش، حجم بیشتری نسبت به دو محیط دیگر داشت. با توجه به اینکه سرخدار درختی چوبی است، به‌نظر می‌رسد محیط کشت‌های پایه‌ای مانند WPM که بیشتر مختص درختان چوبی‌اند، شرایط مناسب‌تری را برای رشد کالوس و سلول‌های این گیاه فراهم می‌کنند. نتایج تحقیق میهالِیویچ و همکاران [۱۱] بیانگر این است که رشد کالوس سرخدار در محیط کشت B5 به‌دلیل افزایش فشار اسمزی محیط با غلظت زیاد ساکارز یا غلظت زیاد نمک‌های غیرآلی، موفق‌تر از محیط MS است که موجب کاهش تقسیمات سلولی می‌شود. در کشت بسیاری از گونه‌های چوبی محیط کشت پایهٔ MS یک عامل بازدارندهٔ رشد است و می‌توان با کاهش غلظت آمونیوم و حذف کامل نیتروژن این مشکل را حل کرد. محیط کشت MS با اینکه به‌طور مکرر در کال‌زایی و رشد کالوس‌های گونه‌های زیادی استفاده می‌شود، در گونهٔ سرخدار چندان مؤثر نبوده است؛ این موضوع را امیدی و همکاران [۱] نیز بیان کرده‌اند و با نتایج تحقیق حاضر همخوانی دارد.

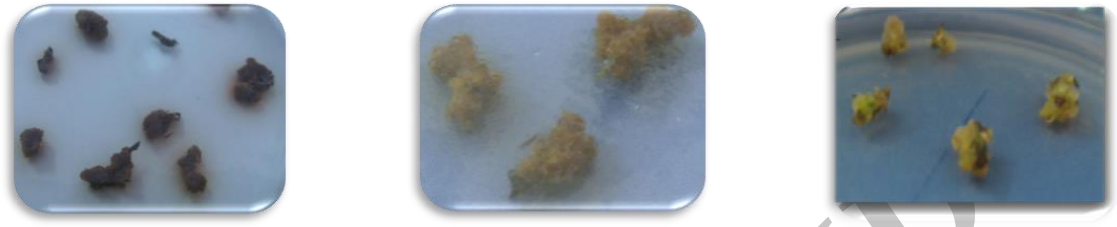
تجزیه‌وتحلیل داده‌های مربوط به مقایسهٔ میانگین اثر تنظیم‌کننده‌های رشد در شکل ٤ آورده شده است. نتایج نشان داد که بیشترین درصد تشکیل کالوس (٤٤ درصد) در تیمار هورمونی 2,4-D در غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر و در ترکیب با غلظت ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر کینتین در محیط کشت WPM مشاهده شد، اگرچه اختلاف معناداری با ترکیب ۰/۱ و ۱

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۴. اثر محیط کشت بر زمان آغاز کالوس‌دهی، رنگ، کیفیت، وزن تر و خشک کالوس و اندام‌زایی در ریزنمونهٔ ساقهٔ سرخدار

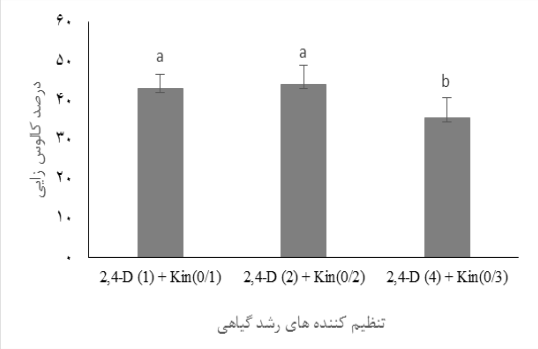
محیط کشت	زمان آغاز کالوس‌دهی	رنگ کالوس	کیفیت کالوس	وزن تر کالوس	وزن خشک کالوس	اندام‌زایی
WPM	ابتدای هفتهٔ دوم پس از کشت	زرد	ترد	۵/۵	۰/۵	-
B5	هفتهٔ سوم پس از کشت	قهوه‌ای روشن	نرم	۳/۸	۰/۳	-
MS	هفتهٔ سوم پس از کشت	قهوه‌ای تیره مایل به سیاه	شل	۲/۲	۰/۲	-



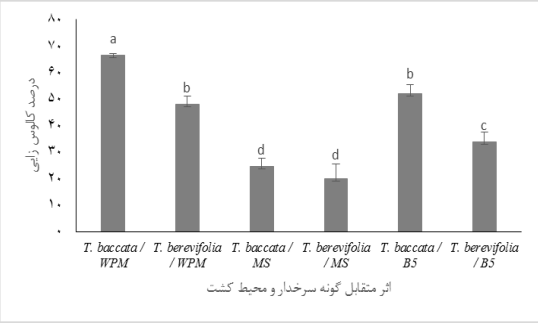
الف ب ج

شکل ۳. رنگ و کیفیت کالوس‌های تشکیل‌شده در تیمار هورمونی برتر (۰/۲) Kin+(۲) 2,4-D بر روی محیط کشت‌های الف) WPM، ب) B5 و ج) MS

میلی‌گرم بر لیتر هورمون‌های مذکور نداشت. با توجه به نتایج، به‌صورت کلی استفاده از غلظت‌های کم تنظیم‌کننده‌های رشد تأثیر بیشتری بر درصد کالوس‌زایی دارد که با نتایج تحقیق امیدی و همکاران همسوست [۱]. هم غلظت هورمون 2,4-D و هم غلظت کینتین بر تغییرات نرخ کال‌زایی ساقهٔ سرخدار مؤثر بودند. با افزایش غلظت این دو هورمون تا مقدار ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر کینتین درصد کال‌زایی به‌طور جزئی افزایش داشت و پس از آن با افزایش این دو هورمون، کال‌زایی دچار سیر نزولی شد. به بیان دیگر، نسبت بهینه از این دو تنظیم‌کنندهٔ رشد برای تشکیل کالوس لازم است. به‌طور کلی کالوس‌های سرخدار در مقایسه با سایر مخروطیان رشد کندتری دارند که دلایل احتمالی آن، عوامل وراثتی و ژنتیکی، وجود بازدارنده‌های رشد یا نبود ترکیبات لازم برای رشد است [۲۶]. داورپناه و همکاران [۱۲] در بررسی اثر این دو هورمون بر نرخ کال‌زایی کشت رویان *T. baccata*، نتیجه گرفتند که بهترین ترکیب مؤثر غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D به‌همراه ۱ میلی‌گرم در لیتر کینتین است. احتمالاً اختلاف نتایج به‌دلیل تفاوت نوع ریزنمونهٔ مورد استفاده است؛ ضمن اینکه محیط مورد استفادهٔ این محققان MS بوده است. در محیط کشت‌های مختلف نتایج گوناگونی به‌دست آمده و بهترین غلظت ۱ تا ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D یا ترکیب آن با سایر تنظیم‌کننده‌های رشد برای کال‌زایی و رشد کالوس گزارش شده است [۱۸].



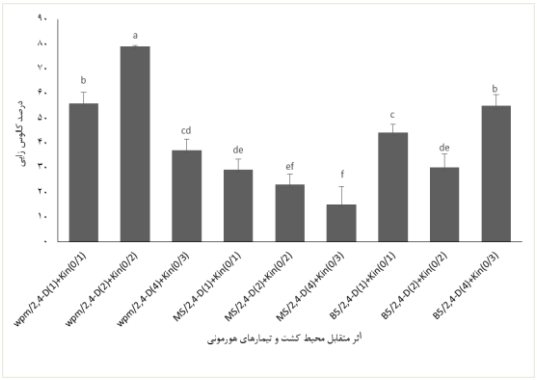
شکل ۴. نتایج مقایسهٔ میانگین کالوس‌زایی گونه‌های *Taxus* تحت تأثیر فاکتور تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی



شکل ۵. نتایج مقایسهٔ میانگین اثر متقابل گونهٔ *Taxus* و محیط کشت بر درصد کالوس‌زایی ریزنمونهٔ ساقه

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۶. نتایج مقایسهٔ میانگین اثر متقابل محیط کشت و تیمارهای هورمونی بر درصد کالوس‌زایی ریزنمونهٔ ساقه

با توجه به نتایج مقایسهٔ میانگین اثر متقابل گونهٔ *Taxus* و محیط کشت در هر دو گونهٔ *T. baccata* و *T.berevifolia* بیشترین درصد کالوس‌زایی در محیط کشت WPM و کمترین درصد در محیط کشت MS مشاهده شد. در بررسی اثر متقابل محیط کشت و تیمارهای هورمونی (شکل ٦) نیز مشخص شد که محیط WPM و ترکیب هورمونی ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D به‌همراه ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر کینتین با ۷۹ درصد بیشترین نرخ کال‌زایی را داشته است. با توجه به نتایج، محیط‌های کشت WPM و B5 در مقایسه با محیط کشت MS تأثیر بیشتری بر درصد کال‌زایی ریزنمونه‌های ساقه داشتند (شکل‌های ۵ و ٦). همچنین در محیط کشت MS، بهترین کال‌زایی در جداکشت‌های سرشاخهٔ *T. baccata* در غلظت‌های ۲ و ۳ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D گزارش شده است [٦]. بیشترین درصد کال‌زایی در محیط کشت MS در غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D مشاهده شد که با نتایج یادشده همخوانی دارد. کمترین درصد کالوس‌زایی (۱۵ درصد) در محیط MS و تیمار هورمونی ٤ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D به‌همراه ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر کینتین حاصل شده است. براساس نتایج، غلظت تیمارهای هورمونی در محیط‌های کشت مختلف نتایج متفاوتی خواهد داشت.

نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که از بین دو گونهٔ سرخدار بررسی‌شده، درصد کالوس‌زایی در گونهٔ *T. baccata* بیشتر است. با وجود این، ریزنمونه‌های ساقهٔ هر دو گونه در محیط کشت پایهٔ WPM به‌همراه ترکیب هورمونی 2,4-D (۲)+Kin (۰/۲) دارای بیشترین درصد کالوس‌زایی هستند. همچنین روش کار بهینه‌شده در این پژوهش، برای پیشبرد مراحل اندام‌زایی و استفاده از آنها در مطالعات زیست‌فناوری می‌تواند کاربرد داشته باشد.

References

[1]. Omidi, M., Behjat Sasan, B., Naghavi, M.R., Kalate Jari, S., and Etminan, A.R. (2011). Effect of growth regulators, medium and explant on callus induction in *Taxus baccata* L.Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 27 (2): 316-325.

[2]. Yazdani, D., Shahnazi, S., Reza Zade, S., and Pir Ali Hamedani, M. (2005). Review on Yew tree (*Taxus baccata* L*).* Journal of Medicinal Plants, 3(15): 1-8.

[3]. Lesani, M.R. (1999). Yew. Tehran: Mministry of Jahade Sazandegi Publication: 8-17.

[4]. Caruso, M., Colombo, A.L., Fedeli, L., Pavesi, A., Quaroni, S., Saracchi, M., and Ventrella, G. (2000). Isolation of endophytic fungi and actinomycetes taxane producers. Ann Microbiol, 50(1): 3-13.

[5]. Alizade, N., Farci, M., Majidi, M., and Rasoli Akordi, E. (2012). Optimization of culture medium compositions for increasing the production callus of yew (*Taxus baccata*) .Iranian Journal of Crops Research, 9(4): 573-583.

[6]. Nasiri Madiseh, Z., Mofid, M.R., Ebrahimi, M., Khayyam.Nekoei, S.M., and Khosro-shahli, M. (2010). Isolation of Taxol producing endophytes fungi from Iranian Yew (*Taxus baccata* L). Journal of Shahrekord University of Medical Sciences, 11(4): 101-107.

[7]. Denis, J.N., Greene, A.E., Guenard, D., Gueritt-Voegelein, F., Managatal, L., and Poiter, P. (1988). highly efficient approach to natural taxol. Journal of the American Chemical Society, 110(17): 5917-5919.

Archive of SID

www.SID.ir

[8]. Abbasi Kajani, A., Mofid, M.R., and Otroshy, M. (2012). Investigation of the effects of basal medium type on the production of anti-cancer drug Taxol from cell culture of *Taxus baccata* L. Journal of Plant Biology, 4(12): 83-88.

[9]. Behjat Sasan, B., Omidi, M., Naghavi, M.R., Kalate Jari, S., and Etminan, A.R. (2012). The effect of growth regulators, medium and activated charcoal on micropropagation of Taxus baccata L.. Iranian Journal of plant and ecosystem, 7(29-2): 77-86.

[10]. Strobel, G., Yang, X., Sears, J., Kramer, R., Sidhu, R.S., and Hess, W.M. (1996*). Taxol* from Pestalotiopsis microspopra, an endophytic fungus of *Taxus willichiana*. Micribiology, 142: 435-440.

[11]. Mihaljevic, S., Bjedov, I., Kovac, M., Levanic, D.L., and Jelaska, S. (2002). Effect of explants source and growth regulators on *in vitro* callus growth of *Taxus baccata* L. Washingtonii. Food Technology and Biotechnology, 40(4): 299-303.

[12]. Davarpanah, S.J., Lahouti, M., and Karimian, R. (2015). Study of callus initiation and growth criteria at different concentrations of 2,4-D and kinetin in *Taxus baccata* L. embryo culture. Iranian Journal of Plant Biology, 7(23): 41-50.

[13]. Karimian, R., Lahouti, M., and Davarpanah, S.J. (2014). Effects of different concentrations of 2,4-D and Kinetin on callogenesis of *Taxus Brevifolia* Nutt. Journal of Applied Biotechnology Reports, 4: 167-170.

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

[15]. Bagheri Toulabi, S., 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(2): 58-67.

[16]. Mahdinejad., N., Fakheri, B.A., and Ghanbari, S. (2015). Effect of growth regulators on in vitro callogensis *Taxus baccata* L.. Biological Forum–An International Journal, 7(1): 142-145.

[17]. Zhiri, A., Maciejewska, K., Jazari, M., Homés, J., and Vanhaelen, M. (1995). Establishment of *Taxus baccat*a callus cultures and evaluation of taxoid production. Med Fac Landbouw Univ Ghent, 60: 2111-2214.

[18]. Malik, S., Cusidó, R.M., Mirjalili, M.H., Moyano, E., Palazón, J., and Bonfill, M. (2011). Production of the anticancer drug taxol in *Taxus baccata* suspension cultures: a review. Process Biochemistry, 46(1): 23-34.

[19]. Bruňáková, K., Babincová, 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(5): 465-469.

[20]. Nikvash, N., Assareh, M.H., Ghorbanli, M., and Ghamari Zare, A. (2006). Mass production of common Yew (*Taxus baccata*) plantlets by in vitro embryo culture. Pajouhesh and Sazandegi, 71: 26-32.

[21]. Assareh, M.H., Ghorbanli, M., Akbari, M., Ghamari Zare, A., and Emam, M. (2006). Micropropagation, organogenesis and using new method of semi photoautotrophic in *Eucalyptus gongylocarpa*. Pajouhesh & Sazandegi, 75: 134-145.

[22]. Dadvar, F., Rostami Shahraji, T.M., Assare, M.H., Emam, M., and Shirvany, A. (2013). Effects of different concentrations of plant regulators on in vitro micropropagation of *Celtis caucasica* Willd. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 21(1): 13-23.

[23]. Alizade, M. (2011). A user manual plant tissue culture and micropropagation, Noroozi Publication, Gorgan.

[24]. Zarinpanjeh, N., Oladzad Abbasabadi, A., and Omidi, M. (2012). Effects of plant growth regulators and vitamin combinations on callus induction, somatic embryogenesis and plantlet production of *Aloe vera* L.. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 20(2): 181-191.

[25]. Nan, D., Zhe, X., Bing, H., Lijuan, H., Shaomei, L., and Chunyan, Y. (2015). Optimization of callus induction and subculture conditions of *Taxus chinensis*. Journal of Pharmaceutical and Scientific Innovation, 4(1): 33-35.

[26]. Ghorbanly, M., and Delavar, K. (2001). Effect of the type and concentration of sugars on taxol content in callus culture of *Taxus baccata* L.. Iranian Journal of Agricultural Sciences, 32 (3): 575-583.

Archive of SID

www.SID.ir

Optimization of culture medium for in vitro callogenesis in *Taxus baccata* L. and *T. berevifolia* Nut

Z. Rahmati*; M.Sc. Graduate, Department of Forest Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, I.R.Iran

V. Payam Nour; Assoc. Prof., Faculty of Forest Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, I.R.Iran

K. Ghasemi Bezdi; Assoc. Prof., Cotton Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Gorgan, I.R.Iran

P. Ebrahimi; Assoc. Prof., Faculty of Sciences, Department of Chemistry, University of Golestan, Gorgan, I.R.Iran

(Received: 25 April 2015, Accepted: 02 February 2016)

ABSTRACT

Taxol is an effective anticancer drug which is used widely for the treatment of a variety of cancers. Tissue culture of taxol represents a potential altrnative source of taxol and related taxane. Callogensis in plant regeneration, one method of producing metabolites a secondary in vitro. This study was performed to investigate the basic culture medium and hormonal concentrations for callogenesis of two yew species (*Taxus baccata* and *Taxus berevifolia*). The research was conducted as factorial experiment in a completely randomized design. For callus optimization, growth conditions and stem explants were studied in three medium types (WPM, MS and B5) and under the effect of 2,4-D growth regulator at concentrations of 1, 2 and 4 mg l^{-1} in combination with kinetin at concentrations of 0.1, 0.2 and 0.3 mg l^{-1}. The results showed that the highest percentage of stem callogenesis (57.3%) was observed in WPM medium enriched with 2 mg l^{-1} 2,4-D and 2.0 mg l^{-1} kinetin. The lowest percentage of callogenesis (22.3%) occurred on MS medium and B5 medium had average callogenesis. Application of lower concentrations of growth regulators than higher concentrations had also more effect on callogenesis variable in stem explants in two studied *Taxus* species.

Keywords: Callogenesis, Culture medium, Plant growth regulators, Yew species.

Archive of SID

* Corresponding Author, Email: z.rahmati65@yahoo.com, Tel: +988433626191

www.SID.ir