Archive of SID

نشریه پژوهش‌های علوم و فناوری چوب و جنگل
جلد بیست و چهارم، شماره اول، ۱۳۹٦
http://jwfst.gau.ac.ir

تأثیر اکسین‌های IBA، NAA و 2, 4- D بر تولید و رشد کالوس در گونه سرخدار (*Taxus baccata* L.) در شرایط درون شیشه‌ای

*سیدعلی رضوی[۱]، سیدمحمد حسینی نصر[۲]، حسن رضادوست[۳] و فرامرز رستمی چراتی[۴]

[۱]دانشجوی دکتری، گروه جنگلداری، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، مربی گروه منابع طبیعی، دانشگاه گنبد کاووس، گنبد، ایران، [۲]دانشیار، گروه جنگلداری، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران، [۳]استادیار، پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی، دانشگاه شهید بهشتی تهران، تهران، ایران، [٤]دانشیار، گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گنبد کاووس، گنبد، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹٤/۱۲/۲۳؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰٤/۱۵

چکیده

سابقه و هدف: سرخدار یکی از با ارزش‌ترین گونه‌های سوزنی‌برگ جنگل‌های شمال ایران است که گونه‌ای سایه‌پسند بوده و از آستارا تا علی‌آباد کتول استان گلستان پراکنش دارد. این‌گونه ضمن داشتن ارزش فراوان از نظر ذخایر ژنتیکی، جنگلشناسی و اکولوژیکی، در صنعت دارویی نیز جایگاه ویژه‌ای دارد. از آنجایی که کالوس به‌عنوان ماده اولیه برای کشت‌های سلولی و تولید متابولیت‌های ثانویه و نیز تولید گیاهچه به روش غیرمستقیم ضروری می‌باشد، لذا به‌منظور پیشنهاد ریزنمونه مناسب و غلظت معینی از تنظیم‌کننده‌های رشد جهت تولید کالوس، تأثیر اکسین‌های ایندول بوتریک اسید (IBA)، نفالین استیک اسید (NAA) و ۲ و ٤ دی‌کلروفنوکسی استیک اسید (2, 4- D) بر میزان تولید و رشد کالوس سرخدار در شرایط درون شیشه‌ای مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش از قسمت‌های مختلف درخت نظیر برگ، ساقه‌های جوان و جوانه‌های رویشی ریز نمونه‌هایی به طول ۱/۵ سانتی‌متر تهیه شد. برای سترون‌سازی ریزنمونه‌ها از روش‌های مختلفی استفاده شد. ریزنمونه‌ها پس از سترون‌سازی در محیط کشت موراشیگ و اسکوگ (MS) کشت شدند. جهت القاء کالوس از هورمون‌های IBA، NAA و 2,4- D در چهار سطوح ۰، ۰/۳، ۳ و ٦ میلی‌گرم در لیتر استفاده شد. به منظور جلوگیری از تجزیه اکسین‌ها و جذب بهتر آن‌ها توسط بافت ریزنمونه، کلیه ریزنمونه‌ها به‌مدت یک هفته در شرایط تاریکی نگه داشته شدند. برای هر یک از ریزنمونه‌های ساقه، برگ و جوانه منحنی رشد کالوس ترسیم گردید. تجزیه و تحلیل داده‌ها توسط آزمون تجزیه واریانس و آزمون دانکن انجام شد.

یافته‌ها: نتایج پژوهش نشان داد که بهترین روش برای سترون‌سازی ریزنمونه‌ها استفاده از اتانول ۷۰ درصد (۱ دقیقه) و کلرید جیوه ۰/۲ درصد و کلرور کلسیم ۰/۲ درصد (۱ دقیقه) می‌باشد. بیشترین درصد قهوه‌ای شدن به ریزنمونه‌های جوانه در غلظت ٦ میلی‌گرم در لیتر NAA تعلق داشت. ریزنمونه‌های برگ از نظر پدیده قهوه‌ای شدن از وضعیت بهتری برخوردار بودند، به‌طوری که در غلظت‌های مختلف IBA و 2, 4- D هیچگونه آثار قهوه‌ای شدن مشاهده نشد.

*مسئول مکاتبه: razaviseyedali@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

بیشترین وزن تر و خشک کالوس به ریزنمونه‌های ساقه و جوانه تعلق داشت که به‌ترتیب تحت تیمار هورمون‌های 2, 4- D و NAA با غلظت ۳ میلی‌گرم در لیتر بودند. ضمن این‌که کالوس‌های تولید شده دارای بافت و رنگ متفاوتی بودند. بیشتر ریزنمونه‌های جوانه در غلظت ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر NAA وضعیت طبیعی خود را حفظ کرده ولی عمده جوانه‌ها در غلظت ٦ میلی‌گرم در لیتر IBA و 2, 4- D به کالوس تبدیل شدند. منحنی‌های رشد کالوس در ریزنمونه‌های مختلف نشان دادند که شروع کالوس‌دهی و رشد آن دارای سرعت نسبتاً پائینی است.

نتیجه‌گیری: در صورتی‌که هدف، تولید کالوس از ریزنمونه‌های ساقه و برگ سرخدار باشد، 2, 4- D با غلظت ۳ میلی‌گرم در لیتر و برای تولید کالوس از جوانه انتهایی غلظت ۳ میلی‌گرم در لیتر NAA و چنانچه تولید گیاهچه از جوانه‌های سرخدار مدنظر باشد غلظت ۰/۳ میلی‌گرم NAA به‌عنوان پروتکل‌هایی مناسب، پیشنهاد می‌گردند.

واژه‌های کلیدی: سرخدار- کالوس- تنظیم‌کننده‌های رشد- کشت درون شیشه‌ای- منحنی رشد کالوس

مقدمه

سرخدار[1] یکی از گونه‌های سوزنی‌برگ نادر و ارزشمند جنگل‌های شمال ایران می‌باشد که از آستارا تا علی‌آباد کتول استان گلستان دیده می‌شود (۱۷ و ۲۲). این گونه سایه‌پسند بوده و در ارتفاع ۹۰۰ تا ۱۸۰۰ متر دامنه‌های پرشیب و سنگلاخی و نیز در دره‌های عمیق و کم نور مستقر می‌گردد (۸). تمامی اندام‌های این درخت به جز قسمت گوشتی میوه[2]، حاوی ترکیبی از آلکالوئیدها، دی‌ترپنوئیدها، لیگان‌ها، تانن‌ها و رزین‌ها می‌باشند که باعث سمیت بسیار شدید آن‌ها می‌شوند (۲٤). اندام‌های مختلف سرخدار بخصوص پوست آن منبع مناسبی برای ماده ضد سرطان تاکسول می‌باشد (۲۷). تأثیرات ضدسرطانی تاکسول در درمان سرطان‌های ریه، مثانه، سینه، رحم و نیز بیماری ایدز بسیار مورد توجه می‌باشد که برای اولین بار در سال ۱۹۷۷ مورد استفاده قرار گرفت (۱٤ و ۱۱). برای تولید یک کیلوگرم تاکسول، به ۱۰۰۰۰ کیلوگرم پوست درخت سرخدار و یا ۳۰۰۰ اصله سرخدار نیاز می‌باشد و یک بیمار سرطانی به ۲/۵ تا ۳ گرم پاکلی‌تاکسول[3] و یا به ۸ درخت ٦۰ ساله نیاز دارد (۲۷). بنابراین در صورت تهیه این ماده دارویی بسیار باارزش از درختان سرخدار مستقر در رویشگاه‌های طبیعی آن که جزء درختان ممنوع‌القطع و در حال انقراض می‌باشند، مقدمات نابودی کامل این‌گونه فراهم می‌گردد (۱۷). به همین دلیل استفاده از کشت سلول و بافت از اندام‌های مختلف سرخدار در شرایط آزمایشگاهی یکی از روش‌های جایگزین، برای تولید این ماده دارویی می‌باشد. تشکیل کالوس از اندام‌های گیاهی مانند برگ، ساقه و ریشه مرحله اساسی در کشت درون شیشه‌ای است (٤). کالوس توده‌ای از سلول‌های پارانشیمی بی‌شکل با دیواره سلولی نازک است که هم در شرایط طبیعی و یا در محیط درون شیشه‌ای به صورت سازمان نیافته رشد می‌کند (۱۰). کالوس‌های تولید شده، در شرایط درون شیشه‌ای تکثیر شده و از طریق اندام‌زایی و یا جنین‌زایی رویشی قابلیت باززایی و تبدیل شدن به گیاه کامل را دارند (۲ و ۳). ضمن اینکه بافت کالوس عمدتاً به عنوان بافت هدف برای دستکاری ژنتیکی استفاده می‌شود. قابل ذکر است از کالوس‌های سست و نرم

1- *Taxus baccata* L.
2- Arill
3- Paclitaxel

www.SID.ir

Archive of SID

معمولاً برای ایجاد کشت سوسپانسیون سلولی استفاده می‌شود (۱۰). رشد بافت کالوس همانند رشد موجودات تک سلولی به شکل منحنی سیگموئیدی (S مانند) می‌باشد که دارای مراحل مختلفی است و رفتار سلول‌های کالوس در طول هر یک از مراحل رشدی متفاوت است (۲۵). اولین گزارش درباره تولید کالوس از گامتوفیت سرخدار توسط روهر در سال ۱۹۷۳ منتشر شد (۲۷). بعدها محققین دیگر از قسمت‌های مختلف سرخدار نظیر لپه‌ها، ساقه‌های جوان و مسن، ریشه نهال‌های جوان و برگ‌ها برای تولید کالوس استفاده کردند (۲۷). گیبسون و همکاران (۱۹۹۳) در بررسی میزان رشد کالوس روی *Taxus brevifolia* Nutt.، با استفاده از ریزنمونه‌های پوست، ساقه و برگ در محیط کشت‌های مختلف نظیر B5[1]، MS[2]، White[3] و DKW[4] به همراه غلظت‌های مختلفی از تنظیم کننده‌های رشد نظیر NAA[5]، BA[6]، 2, 4- D[7] و Picloram به‌این نتیجه رسیدند که ریزنمونه‌ها بعد از ۲ هفته شروع به تولید کالوس کرده و محیط کشت‌های WPM[8] با ۲ میلی‌گرم در لیتر 2, 4- D و B5 با ۱ تا ۲ میلی‌گرم در لیتر 2, 4- D دارای نتایج بهتری بودند (۱۳). اسجزانا و همکاران (۲۰۰۲) با بررسی تأثیر محل اخذ ریزنمونه و تنظیم کننده‌های رشد روی میزان رشد کالوس *Taxus baccata* L. در شرایط درون شیشه‌ای با استفاده از ریزنمونه‌های جنین‌های جنسی و سرشاخه‌های جوان در غلظت‌های مختلفی از تنظیم‌کننده‌های رشد در محیط کشت MS نشان دادند که بهترین کالوس از جنین‌های جنسی، در محیط کشت MS به همراه ۳ میلی‌گرم در لیتر 2, 4- D، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin[9] و ۲ درصد ساکارز حاصل شد که دارای رنگ زرد تیره بودند همچنین ریزنمونه‌های تهیه شده از سرشاخه‌های نازک، در محیط کشت مذکور به همراه ۳ میلی‌گرم در لیتر NAA، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin و ۲/۵ درصد ساکارز واجد کالوسی به رنگ زرد کمرنگ تا سفید شدند (۲۶). عباسیان و همکاران (۲۰۱۰) جهت تولید گیاهچه‌های سرخدار با استفاده از جوانه انتهایی، در محیط کشت‌های MS، B5 و WPM و غلظت‌های مختلفی از BAP، Zeatin، Kin، IBA[10] و NAA به این نتیجه رسیدند که محیط کشت MS به‌همراه ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP بیشترین تولید جوانه‌ها و رشد آنها را به همراه داشته است و اضافه کردن ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر NAA به محیط کشت مذکور باعث افزایش کالوس شد (۱). غفوری و همکاران (۲۰۱۲) برای سترون‌سازی ریزنمونه‌های ساقه و برگ *T. baccata* از هیپوکلریت سدیم[11] ۳ درصد به مدت ۱۵ دقیقه و اتانول ۷۰ درصد به مدت ۱ دقیقه و برای کاهش قهوه‌ای شدن آنها از گلوتامین در غلظت‌های مختلف استفاده نمودند. در این بررسی غلظت ۰/۱ میلی‌مول گلوتامین ضمن کاهش پدیده قهوه‌ای شدن باعث افزایش تولید کالوس گردید (۱۲). کریمیان و همکاران (۲۰۱٤) با بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف 2, 4- D (۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) و Kin (۰/۱، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) بر کالوس‌زایی ریزنمونه‌های ساقه *T. brevifolia* در محیط کشت MS، بهترین میزان تولید کالوس را غلظت ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر 2, 4- D و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر Kin معرفی کردند (۱۹). مهدی‌نژاد و همکاران (۲۰۱۵) برای سترون‌سازی

1- Gamborg
2- Murashige and Skoog
3- White's medium
4- Driver Kuniyuki Walnut
5- α-Naphtaleneacetic acid
6- 6- Benzyladenine
7- 2, 4- Dichlorophenoxyacetic acid
8- Woody plant medium
9- Kinetin
10- Indole-3- butyric acid
11- NaClO

www.SID.ir

Archive of SID

ریزنمونه‌های برگ *T. baccata* پس از شستشوی آن در آب روان[1] از کلرید جیوه ۰/۱ درصد به‌مدت ۱۵ دقیقه استفاده نمودند و برای کاهش اثرات سوء کلرید جیوه و کاهش قهوه‌ای شدن، ریزنمونه‌ها را توسط آب مقطر استریل شده شستشو دادند. در نتایج آنها بیشترین وزن کالوس در محیط کشت MS در غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA به همراه ۰/۲۵ میلی‌گرم Kin حاصل شد (۲۳).

هدف از پژوهش حاضر تعیین ریزنمونه مناسب و غلظت معینی از تنظیم کننده‌های رشد جهت تولید کالوس در کشت بافت گیاهی اعم از تولید گیاهچه به روش غیرمستقیم[2] و یا تهیه ریزنمونه برای کشت‌های کالوس و سلول جهت تولید داروی ضد سرطان تاکسول می‌باشد.

مواد و روش‌ها

منطقه مورد مطالعه: در پژوهش حاضر ریزنمونه‌های موردنیاز از توده‌های طبیعی سرخدار در منطقه افراتخته تهیه شد. رویشگاه سرخدار افراتخته به وسعت ۳۵۲ هکتار در ۳۰ کیلومتری جنوب شرقی شهرستان علی‌آباد کتول استان گلستان در مجاورت روستای ییلاقی افراتخته قرار دارد. مختصات جغرافیایی آن ٥٤ درجه ٥٥ دقیقه ٤٨ ثانیه تا ٥٤ درجه ٥٧ دقیقه ۱۲ ثانیه طول شرقی و ۳٦ درجه ٤٥ دقیقه ۲٤ ثانیه تا ۳٦ درجه ٤۷ دقیقه ۳ ثانیه عرض شمالی بوده و در محدوده ارتفاعی ۱۳۵۰ تا ۲۰۰۰ متر از سطح دریا قرار دارد. متوسط بارندگی در منطقه مورد مطالعه ۹۵۰ میلی‌متر و متوسط دمای سالیانه منطقه ۱۰/۳ درجه سانتی‌گراد می‌باشد. بر اساس طبقه‌بندی اقلیمی به روش دومارتن منطقه دارای اقلیم خیلی مرطوب نوع الف می‌باشد (۹).

روش تهیه ریزنمونه‌ها: در این پژوهش از قسمت‌های مختلف درخت نظیر برگ، ساقه‌های جوان سبز رنگ (یک تا دوساله) و نیز جوانه‌های رویشی[3] ریز نمونه‌هایی به طول ۱/۵ سانتی‌متر تهیه شد. ریزنمونه‌ها کمی بزرگتر از حد معمول تهیه شده و در هنگام کاشت دو انتهای ریزنمونه‌ها به علت نفوذ مواد سترون‌سازی برش داده شد و در لوله‌های آزمایش محتوی ۵ میلی‌لیتر محیط کشت، قرار داده شدند.

سترون‌سازی ریزنمونه‌ها: ابتدا جهت سترون‌سازی ریزنمونه‌ها توسط چند قطره مایع ظرفشویی و توئین ۲۰[4] شستشو و با استفاده از آب مقطر ضدعفونی سطحی شدند. سپس ۱۲ تیمار سترون‌سازی در نظر گرفته شد (جدول ۱)

1- Running water
2- Indirect organogenesis
3- Shoot buds
4- Tween 20

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱- تیمارهای سترون‌سازی کشت ریزنمونه‌های ساقه، برگ و جوانه *Taxus baccata*.

Table 1. Sterilization treatments for stem, leaf and bud explants of *Taxus baccata*.

شماره تیمار Treatment No.	تیمارهای سترون‌سازی Sterilization treatments
1	اتانول ۷۰ درصد، ۲ دقیقه، هیپو کلریت سدیم ۱ درصد ۱۰ دقیقه Ethanol 70% (2 min), NaClO 1% (10 min)
2	اتانول ۷۰ درصد ۲ دقیقه، آب کلر اشباع شده ۲۰ دقیقه Ethanol 70% (2 min), Chlorine water (20 min)
3	اتانول ۷۰ درصد ۲ دقیقه، کلرید جیوه ۰/۵ درصد ۱۵ دقیقه Ethanol 70% (2 min), $HgCl_2$ 0.5% (15 min)
4	اتانول ۷۰ درصد ۲ دقیقه، هیپو کلریت سدیم ۳ درصد ۱۵ دقیقه Ethanol 70% (2 min), NaClO 3% (15 min)
5	اتانول ۷۰ درصد ۲ دقیقه، هیپو کلریت سدیم ۵ درصد۱۵ دقیقه Ethanol 70% (2 min), NaClO 5% (15 min)
6	اتانول ۷۰ درصد ۱ دقیقه، کلرید جیوه ۰/۵ درصد و کلرور کلسیم ۰/۵ درصد ۱۰ دقیقه Ethanol 70% (1 min), $HgCl_2$ 0.5% and $CaCl_2$ 0.5% (10 min)
7	اتانول ۷۰ درصد ۱ دقیقه، کلرید جیوه ۰/۵ درصد و کلرور کلسیم ۰/۵ درصد ۵ دقیقه، Ethanol 70% (1 min), $HgCl_2$ 0.5% and $CaCl_2$ 0.5% (5 min)
8	اتانول ۷۰ درصد ۱ دقیقه، کلرید جیوه ۰/۵ درصد و کلرور کلسیم ۰/۵ درصد ۳ دقیقه Ethanol 70% (1 min), $HgCl_2$ 0.5% and $CaCl_2$ 0.5% (3 min)
9	اتانول ۷۰ درصد ۱ دقیقه، کلرید جیوه ۰/۵ درصد و کلرور کلسیم ۰/۵ درصد ۱ دقیقه Ethanol 70% (1 min), $HgCl_2$ 0.5% and $CaCl_2$ 0.5% (1 min)
10	اتانول ۷۰ درصد ۱ دقیقه، کلرید جیوه ۰/۱ درصد و کلرور کلسیم ۰/۱ درصد ۱ دقیقه Ethanol 70% (1 min), $HgCl_2$ 0.1% and $CaCl_2$ 0.1% (1 min)
11	اتانول ۷۰ درصد ۱ دقیقه کلرید جیوه ۰/۲ درصد و کلرور کلسیم ۰/۲ درصد ۱ دقیقه Ethanol 70% (1 min), $HgCl_2$ 0.2% and $CaCl_2$ 0.2% (1 min)
12	اتانول ۷۰ درصد ۱ دقیقه، کلرید جیوه ۰/۳ درصد و کلرور کلسیم ۰/۳ درصد ۱ دقیقه Ethanol 70% (1 min), $HgCl_2$ 0.3% and $CaCl_2$ 0.3% (1 min)

کلیه ریزنمونه‌ها بعد از هر مرحله از سترون‌سازی، سه مرتبه توسط آب مقطر استریل شستشو شده و **محیط کشت و هورمون‌های مورد استفاده:** در این پژوهش برای کشت تمامی ریزنمونه‌ها از محیط کشت MS استفاده شد (۱۵). جهت مطالعه تأثیرهای تنظیم کننده‌های رشد روی ریزنمونه‌های برگ، ساقه و جوانه‌های رویشی سرخدار یک تیمار شاهد (بدون هورمون) و سه نوع اکسین (IBA، NAA و 2,4- D) در نظر گرفته شد. جهت امکان مقایسه نتایج هورمون-های مذکور، غلظت برای کلیه اکسین‌ها در ٤ سطوح ۰، ۰/۳، ۳ و ٦ میلی‌گرم در لیتر در نظر گرفته شد. به طور معمول اکسین‌ها در برابر نور تجزیه می‌شوند. بنابراین برای جلوگیری از تجزیه و جذب آنها توسط نهایتاً ریزنمونه‌های استریل شده به‌مدت ۱/۵ تا ۲ ساعت در آب مقطر استریل خیسانده شدند.

بافت ریزنمونه، کلیه تیمارها به‌مدت ۱ هفته در تاریکی نگه‌داری شدند (۲۱).

منحنی رشد کالوس: برای رسم منحنی رشد کالوس[1] به ٢٤ قطعه تقریبا مساوی و مشابه کالوس نیاز می‌باشد (۱۵). برای این منظور از کالوس‌های تولید شده در هر یک از ریزنمونه‌های مورد بررسی ٢٤ قطعه تقریباً هم‌اندازه و هم‌شکل جدا شده و در ارلن کشت گردید. سپس در روزهای ۱، ٤، ۹، ١٤، ٢١، ٢٨، ٣٥ و ٤٣ به‌طور تصادفی ۳ قطعه از کالوس‌های مذکور انتخاب و وزن تر و خشک (٢٤ ساعت در

1- Callus growth curve

www.SID.ir

Archive of SID

دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد) آنها تعیین گردید. نهایتاً با توجه به اطلاعات حاصل منحنی رشد کالوس ترسیم شد (۱۵ و ۱۰).

تجزیه و تحلیل آماری: این پژوهش به‌صورت آزمایش فاکتوریل سه عامله در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی انجام شد. عامل‌های مورد بررسی نوع ریزنمونه (ساقه، برگ و جوانه)، نوع هورمون (IBA، NAA و 2,4- D) و غلظت هورمون (۰، ۰/۳، ۳ و ۶ میلی‌گرم در لیتر) بودند. داده‌ها پس از جمع‌آوری در نرم‌افزار Excel سازماندهی شده و برای آنالیز آن‌ها از نرم‌افزار SPSS استفاده شد. همگنی واریانس‌ها با استفاده از آزمون لون و نرمال بودن داده‌ها توسط آزمون کولوموگراف مورد بررسی قرار گرفت. جهت بررسی وجود اختلاف بین میانگین‌ها از آزمون تجزیه واریانس دو طرفه و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون دانکن استفاده شد.

نتایج و بحث

کنترل آلودگی ریزنمونه‌های *Taxus baccata*: کنترل آلودگی ریزنمونه‌ها و مهار قهوه‌ای شدن آن‌ها، یکی از مهمترین اقدامات در پژوهش‌های مربوط به کشت بافت‌های گیاهی در شرایط درون شیشه‌ای است (۱۸). در این پژوهش جهت سترون‌سازی ریزنمونه‌ها با توجه به منابع، پروتکل‌هایی مورد استفاده قرار گرفت ولی روش‌های مذکور برای ضدعفونی ریزنمونه‌ها مؤثر واقع نشد (۱۲، ۱۶ و ۲۳). از جمله کلرید جیوه ۰/۵ درصد به‌مدت ۱۵ دقیقه به همراه اتانول ۷۰ درصد به‌مدت ۲ دقیقه استفاده شد. ولی با وجود اینکه غلظت مذکور ۵ برابر غلظت مورد استفاده مهدی‌نژاد و همکاران (۲۰۱۵) بوده است، کارایی لازم را نداشته و کلیه نمونه‌ها دچار آلودگی شدند (۲۳). شاید یکی از دلایل این امر تفاوت عوامل ایجاد کننده آلودگی در ریزنمونه‌های مورد بررسی باشد که در رویشگاه‌های مختلف متفاوت است.

در این پژوهش ۸۵ تا ۱۰۰ درصد ریزنمونه‌های ضدعفونی شده توسط تیمارهای ۱ تا ٤، دچار آلودگی شدند. لذا در مرحله بعد، تیمارهای ۵ و ۶ طراحی شدند. در تیمار ۵ بیش از ۹۰ درصد ریزنمونه‌ها آلوده شدند و آلودگی در تیمار ۶ تا ۹۰ درصد کنترل شد ولی ۱۰۰ درصد آنها قهوه‌ای[1] شدند. با توجه به نتیجه تیمار ۶ تیمارهای ۷، ۸ و ۹ طراحی و مورد بررسی قرار گرفت که نتیجه آنها کنترل آلودگی بیش از ۹۰ درصد بوده ولی مجدداً همه ریزنمونه‌ها قهوه‌ای شدند. در آخرین مرحله با توجه به نتایج تیمار ۹، پروتکل تیمارهای ۱۰، ۱۱ و ۱۲ طراحی و ریزنمونه‌ها توسط آنها سترون شدند. با توجه به اینکه در تیمار ۱۱ (اتانول ۷۰ درصد ۱ دقیقه، کلرید جیوه ۰/۲ درصد و کلرور کلسیم ۰/۲ درصد ۱ دقیقه)، آلودگی به طور کامل (۱۰۰ درصد) و پدیده قهوه‌ای شدن تا ۹۰ درصد کنترل شد، بنابراین از تیمار مذکور برای سترون‌سازی کلیه ریزنمونه‌ها استفاده شد.

مقایسه میانگین درصد قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها و وزن تر و خشک کالوس در ریزنمونه‌های *Taxus baccata*: نتایج تجزیه واریانس نشان می‌دهد که اختلاف معنی‌داری بین اثر متقابل نوع ریزنمونه، نوع هورمون و غلظت‌های مختلف هورمون در تمامی مشخصه‌های مورد بررسی وجود دارد (جدول ۲).

1- Browning

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس درصد قهوه‌ای شدن و وزن تر و خشک کالوس در ریزنمونه‌های ساقه، برگ و جوانه *Taxus baccata* با استفاده از آزمون F.

Table 2. ANOVA analysis browning percentage and callus wet and dry weight of stem, leaf and bud explants of *Taxus baccata* by F test.

F			میانگین مربعات MS			درجه آزادی Df	منابع تغیرات S. O.V
وزن خشک کالوس (گرم) Callus dry weight (g)	وزن تر کالوس (گرم) Callus wet weight (g)	قهوه ای شدن (درصد) Browning (%)	وزن خشک کالوس (گرم) Callus dry weight (g)	وزن تر کالوس (گرم) Callus wet weight (g)	قهوه‌ای شدن (درصد) Browning (%)		
686.07**	340.87**	117.59**	0.00455	0.02889	5798.44	2	A
116.02**	58.3**	7.26**	0.00077	0.00494	357.81	2	B
1839.61**	896.26**	14.4**	0.01221	0.07596	710.24	3	C
15.31**	8.05**	13.05**	0.0001	0.00068	643.75	4	A*B
169.95**	83.04**	7.85**	0.00113	0.00704	387.33	6	A*C
23.52**	10.69**	12.01**	0.00016	0.00091	592.53	6	B*C
24.45**	11.73**	9.49**	0.00016	0.00099	468.06	12	A*B*C
			6.64E-06	8.47E-05	49.31	72	خطا Error
			0.00054	0.0034	299.67	107	کل Total

** وجود اختلاف معنی‌دار در سطح یک درصد.

A= Explant (ریز نمونه), B= Hormone (هورمون), C= Concentration (غلظت).

جدول ۳- نتایج مقایسه میانگین درصد قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌های مختلف *Taxus baccata* با استفاده از آزمون دانکن.

Table 3. The results mean comparison browning percentage in different explants of *Taxus baccata* using Duncan test.

اثر متقابل Interaction effect	A	B	C			
			0 mg L^{-1}	0.3 mg L^{-1}	3 mg L^{-1}	6 mg L^{-1}
A*B*C	Stem	IBA	30 cd	40 bc	30 cd	40 bc
		NAA	30 cd	20 de	30 cd	10 ef
		2, 4- D	30 cd	20 de	40 bc	20 de
	Leaf	IBA	0 f	0 f	0 f	0 f
		NAA	0 f	0 f	12.5 def	50 ab
		2, 4- D	0 f	0 f	0 f	0 f
	Bud	IBA	20 de	30 cd	40 bc	20 de
		NAA	25 cde	0 f	30 cd	60 a
		2, 4- D	15 def	20 de	20 de	30 cd

وجود حداقل یک حرف مشترک بین میانگین‌ها نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار می‌باشد.

A= Explant (ریز نمونه), B= Hormone (هورمون), C= Concentration (غلظت)

به‌طور معمول بافت‌های کشت شده در شرایط درون شیشه‌ای، به دلایل مختلف از جمله زخم‌های ناشی از بریدن ریزنمونه‌ها، آلودگی به پاتوژن‌ها، اکسیداسیون ترکیبات فنلی و تانن‌ها، غلظت بالای مواد سترون‌کننده، عدم تنظیم pH، حرارت محیط و غیره قهوه‌ای می‌شوند (۷). در این پژوهش با وجود این‌که در کشت‌های پیش سترون‌سازی تا ۹۰ درصد از قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها جلوگیری شد ولی در تیمارهای اصلی که هورمون‌های رشد نیز به محیط کشت اضافه شد درصد قهوه‌ای شدن افزایش یافت. قابل ذکر است که در این پژوهش با طراحی پروتکل‌های مختلف غلظت دقیق مواد سترون کننده و مدت زمان خیساندن ریزنمونه‌ها در آنها تعیین شد. ضمن‌اینکه برای کاهش پدیده مذکور ضمن تنظیم دقیق pH و حرارت محیط، ریزنمونه‌ها پس از سترون‌سازی، به‌مدت ۱/۵ تا ۲ ساعت در آب مقطر

www.SID.ir

Archive of SID

استریل خیسانده شدند که به‌نظر می‌رسد در کنترل قهوه‌ای شدن ریز نمونه‌ها مؤثر بوده است.

ریزنمونه‌های جوانه در غلظت ٦ میلی‌گرم در لیتر NAA بیشترین درصد قهوه‌ای شدن را به خود اختصاص دادند (جدول ۳). ضمن‌اینکه میزان قهوه‌ای شدن در ریز نمونه‌های برگ و جوانه با افزایش غلظت هورمون NAA افزایش می‌یابد. از آنجایی‌که افزایش غلظت NAA باعث کاهش فتوسنتز برگ‌ها می‌شود (۵) بنابراین افزایش غلظت هورمون مذکور با کاهش فعالیت فتوسنتزی برگ باعث قهوه‌ای شدن آنها شده است. از آنجائیکه کلیه ریزنمونه‌ها در فصل بهار جمع‌آوری شدند و جوانه‌ها در فصل رویش فاقد فلس‌های محافظ می‌باشند آسیب بیشتری دیده‌اند. به‌طور کلی ریزنمونه‌های برگ از نظر پدیده قهوه‌ای شدن نسبت به سایر ریزنمونه‌ها از وضعیت بهتری برخوردار بوده‌اند به‌طوری‌که در غلظت‌های مختلف IBA و 2, 4- D هیچگونه آثار قهوه‌ای شدن مشاهده نشد.

مقایسه میانگین وزن تر و خشک کالوس توسط آزمون دانکن در ریزنمونه‌های *Taxus baccata*:

مقایسه میانگین وزن تر و خشک کالوس در ریزنمونه‌های ساقه، برگ و جوانه سرخدار در غلظت‌های مختلف هر یک از هورمون‌های مورد بررسی توسط آزمون تجزیه واریانس نشان می‌دهد که بین میانگین‌های مذکور اختلاف معنی‌داری وجود دارد (جدول ٤). بیشترین وزن تر و خشک کالوس تولید شده در ریزنمونه‌های ساقه، برگ و جوانه سرخدار متعلق به تیمار هورمون‌های 2, 4- D و NAA با غلظت ۳ میلی‌گرم در لیتر بودند و در ریزنمونه‌های ساقه بیشترین وزن تر و خشک به تیمار ۳ میلی‌گرم در لیتر 2, 4- D تعلق دارد (جداول ٤ و ۵).

جدول ٤- مقایسه میانگین وزن تر کالوس حاصل از ریزنمونه‌های مختلف *Taxus baccata* با استفاده از آزمون دانکن.

Table 4. Mean comparison callus wet weight in different explants of *Taxus baccata* using Duncan test.

اثر متقابل Interaction effect	A	B	C			
			0 mg L^{-1}	0.3 mg L^{-1}	3 mg L^{-1}	6 mg L^{-1}
A*B*C	Stem	IBA	0.115 g	0.135 defg	0.155 cd	0.129 efg
		NAA	0.116 g	0.167 bc	0.157 bcd	0.156 cd
		2, 4- D	0.114 g	0.179 ab	0.19 a	0.161 bc
	Leaf	IBA	0 h	0.113 g	0.117 g	0.129 efg
		NAA	0 h	0.112 g	0.113 g	0.113 g
		2, 4- D	0 h	0.13 efg	0.148 cdef	0.126 fg
	Bud	IBA	0 h	0.127 fg	0.124 g	0.128 fg
		NAA	0 h	0.157 bcd	0.197 a	0.116 g
		2, 4- D	0 h	0.151 cde	0.162 bc	0.192 a

وجود حداقل یک حرف مشترک بین میانگین‌ها نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار می‌باشد.

A= Explant (ریز نمونه), B= Hormone (هورمون), C= Concentration (غلظت)

جدول ۵- مقایسه میانگین وزن خشک کالوس‌های حاصل از ریزنمونه‌های مختلف *Taxus baccata* با استفاده از آزمون دانکن.

Table 5. Mean comparison callus dry weight in different explants of *Taxus baccata* using Duncan test.

اثر متقابل Interaction effect	A	B	C			
			۰ میلی‌گرم در لیتر 0 mg L^{-1}	۰/۳ میلی‌گرم در لیتر 0.3 mg L^{-1}	۳ میلی‌گرم در لیتر 3 mg L^{-1}	٦ میلی‌گرم در لیتر 6 mg L^{-1}
A*B*C	Stem	IBA	0.046 hi	0.054 fg	0.052 de	0.062 gh
		NAA	0.047 hi	0.067 cd	0.062 de	0.063 de
		2, 4- D	0.045 i	0.071 bc	0.076 a	0.065 de
	Leaf	IBA	0 j	0.045 i	0.052 gh	0.047 hi
		NAA	0 j	0.047 hi	0.045 i	0.045 i
		2, 4- D	0 j	0.052 gh	0.051 ghi	0.059 ef
	Bud	IBA	0 j	0.051 ghi	0.051 ghi	0.05 ghi
		NAA	0 j	0.063 de	0.079 a	0.046 hi
		2, 4- D	0 j	0.06 e	0.065 de	0.077 a

وجود حداقل یک حرف مشترک بین میانگین‌ها نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار می‌باشد.

A= Explant (ریز نمونه), B= Hormone (هورمون), C= Concentration (غلظت)

www.SID.ir

Archive of SID

از آنجایی‌که وجود هورمون‌های تحریک کننده رشد برای تولید کالوس و یا اندام در ریزنمونه‌های مورد بررسی ضروری می‌باشد (٤، ١٠ و ٦) بنابراین عدم واکنش ریزنمونه‌ها در شاهد (غلظت صفر) امری طبیعی است. نتیجه این پژوهش با نتایج تحقیق غفوری و همکاران (٢٠١٢) مبنی بر تولید بیشتر کالوس توسط ریزنمونه‌های ساقه نسبت به ریزنمونه‌های برگ و نیز تأثیر بیشتر 2, 4- D در تولید کالوس نسبت به سایر اکسین‌ها (١٢) و نیز نتایج کریمیان و همکاران (٢٠١٤) مبنی بر تأثیر بیشتر 2, 4- D در کالوس‌زایی ریزنمونه‌های ساقه *T. brevifolia* نسبت به Kin همسو است (١٩). قابل ذکر است که در بررسی اسجزانا و همکاران (٢٠٠٢) بیشترین کالوس در غلظت ٣ میلی‌گرم در لیتر NAA به همراه ٠/٥ میلی‌گرم در لیتر Kin تولید شده است (٢٦).

اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها در غلظت‌های مختلف انواع متفاوتی از کالوس را تولید می‌کنند (٢٣). یکی از نکات قابل توجه در این پژوهش رنگ و نوع کالوس‌های تولید شده در ریزنمونه‌های مختلف می‌باشد (جدول ٦). به طوری که در ریزنمونه‌های ساقه، کالوس تولید شده در غلظت‌های مختلف 2, 4- D سبز کم‌رنگ مایل به قهوه‌ای می‌باشند و در غلظت‌های مختلف NAA به رنگ قهوه‌ای بوده که دارای اشکال ویژه ایست که نشان از تمایز دارند. هورمون IBA در غلظت ٣ میلی‌گرم در لیتر تولید کالوسی متراکم و به رنگ سبز مایل به زرد نموده ولی در تیمارهای ٠/٣ و ٦ میلی‌گرم در لیتر تولید کالوسی شفاف و سفید رنگ نموده است که نشان‌دهنده شیشه‌ای شدن[1] کالوس دارد. پدیده شیشه‌ای شدن یک مشکل عمومی در ریزازدیادی است، که معمولاً کالوس در این شرایط آبکی و نیمه‌شفاف بوده و فاقد بافت طبیعی می‌باشد، که انتقال گیاهچه‌های شیشه‌ای شده از محیط کشت به خاک نیز اغلب مشکل است (١٠).

کالوس‌های تولید شده در تیمارهای مربوط به IBA سبز کم‌رنگ، در NAA سبز تیره و در 2, 4- D دارای دو بخش جداگانه به رنگ‌های سبز پسته‌ای و زرد می‌باشد که از نشانه‌های تمایز کالوس تولید شده می‌باشد. مهدی‌نژاد و همکاران (٢٠١٥) بیشترین مقدار کالوس را از ریزنمونه‌های برگ سرخدار در محیط کشت MS به همراه ٠/٢٥ میلی‌گرم درلیتر Kin و ٢ میلی‌گرم در لیتر NAA به‌دست آورند که کالوس‌های حاصل دارای رنگ قهوه‌ای تیره بودند (٢٣).

میزان رویش طبیعی ریزنمونه‌های جوانه در غلظت‌های مختلف هورمونی: مقایسه میانگین درصد ریزنمونه‌های جوانه سرخدار، که تحت تأثیر هورمون‌های IBA، NAA و 2, 4- D در غلظت‌های مختلف قرار گرفتند و شکل طبیعی خود را حفظ کردند توسط آزمون تجزیه واریانس نشان می‌دهد که اختلاف آماری معنی‌داری بین تیمارها وجود دارد (جدول ٧).

1- Vitrification

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ٦- نوع و رنگ کالوس در تیمارهای مختلف ریزنمونه‌های *Taxus baccata*

Table6. Type and color of callus in different treatments of *Taxus baccata* explants

هورمون Hormone	غلظت (میلی‌گرم در لیتر) Concentration ($mg\ L^{-1}$)	ساقه Stem		برگ Leaf		جوانه Bud	
		نوع کالوس Callus type	رنگ کالوس Callus color	نوع کالوس Callus type	رنگ کالوس Callus color	نوع کالوس Callus type	رنگ کالوس Callus color
IBA	0	نرم- همگن Soft- Homogeneous	زرد Yellow	---	---	---	---
	0.3	نرم- ناهمگن Soft- Heterogeneous	سفید- شفاف White- Transparent	نرم- همگن Soft- Homogeneous	سبز کم‌رنگ Light green	سخت- همگن Hard- Homogeneous-	سبز مایل به زرد Green yellowish
	3	سخت- همگن Hard- Homogeneous-	سبز مایل به زرد Green yellowish	نسبتاً نرم- همگن Fairly soft- Homogeneous	سبز مایل به زرد Green yellowish	نسبتاً سخت- همگن Fairly hard- Homogeneous	سبز کم‌رنگ Light green
	6	نرم- ناهمگن Soft- Heterogeneous	سفید- شفاف White- Transparent	نسبتاً سخت- همگن Fairly hard- Homogeneous	سبز تیره Dark green	نسبتاً سخت- همگن Fairly hard- Homogeneous	سبز کم‌رنگ Light green
NAA	0	نسبتاً نرم- همگن Fairly soft- Homogeneous	زرد Yellow	---	---	---	---
	0.3	سخت - ناهمگن Hard - Heterogeneous-	سبز کم‌رنگ مایل به قهوه‌ای Light green brownish	سخت- همگن Hard - Homogeneous	سبز تیره Dark green	سخت- ناهمگن Hard - Heterogeneous-	زرد- سبز Yellow- Green
	3	سخت- ناهمگن Hard- Heterogeneous	قهوه‌ای Brown	نسبتاً سخت- همگن Fairly hard Homogeneous	تقریباً قهوه‌ای brownish	سخت- ناهمگن Hard - Heterogeneous-	سبز- قهوه‌ای Green- Brown
	6	سخت- ناهمگن Hard- Heterogeneous	قهوه‌ای Brown	نسبتاً سخت- همگن Fairly hard Homogeneous	سبز تیره مایل به قهوه‌ای Dark green brownish	سخت- همگن hard- Homogeneous	قهوه‌ای Brown
2, 4- D	0	نرم- همگن Soft- Homogeneous	سبز کم‌رنگ Light green	---	---	---	---
	0.3	نسبتاً سخت - ناهمگن Fairly hard - Heterogeneous-	تقریباً قهوه‌ای Brownish	سخت- ناهمگن Hard - Heterogeneous-	سبز مایل به زرد Green yellowish	نسبتاً سخت- ناهمگن Fairly hard - Heterogeneous	سبز کم‌رنگ مایل به زرد Light green yellowish
	3	سخت- ناهمگن Hard - Heterogeneous-	سبز کم‌رنگ مایل قهوه‌ای Light green brownish	سخت- ناهمگن Hard - Heterogeneous-	سبز پسته‌ای- زرد Green- Yellow Yellow	سخت- ناهمگن Hard - Heterogeneous-	زرد مایل به قهوه‌ای Yellow brownish
	6	سخت - ناهمگن Hard - Heterogeneous-	سبز کم‌رنگ مایل قهوه‌ای Light green brownish	نسبتاً سخت سخت- ناهمگن Fairly hard - Heterogeneous-	سبز کم‌رنگ Light green	نسبتاً سخت- همگن Fairly hard- Homogeneous	سبز پسته‌ای Green- Yellow

www.SID.ir

Archive of SID

شکل ۱- تولید کالوس متفاوت در ریزنمونه‌های برگ *Taxus baccata* در غلظت ۳ میلی‌گرم در لیتر 2, 4- D.

Figure 1. Different callus production in leaf explants of *Taxus baccata* at concentration of 3 mg L^{-1} 2,-4- D.

جدول ۷- تجزیه واریانس تأثیر نوع و غلظت‌های مختلف هورمونی روی شکل ریزنمونه‌های جوانه بر اساس آزمون F

Table 7. ANOVA analysis the effect of different type and concentrations of hormonal on shape of bud explants by F test.

Sig.	F	میانگین مربعات MS	درجه آزادی Df	مجموع مربعات SS	منبع تغییرات S. O.V
0.000**	226.609	1996	8	15968.03	تیمارهای هورمونی Hormone treatments
		8.81	18	158.55	خطای آزمایش Test error
			26	16126.56	کل Total

: اختلاف آماری در سطح یک درصد معنی‌دار است.

جدول ۸- مقایسه میانگین درصد ریزنمونه‌های جوانه *Taxus baccata* با رویش نرمال تحت تأثیر نوع و غلظت‌های مختلف هورمونی توسط آزمون دانکن.

Table 8. Mean comparison of normal growth of *Taxus baccata* bud explants in response to different type and concentrations of hormonal using Duncan test.

میانگین جوانه‌های نرمال (درصد) Mean of normal buds (%)	غلظت (میلی‌گرم در لیتر) Concentration (mg L^{-1})	هورمون Hormone
14.3 g	0.3	IBA
20 ef	3	
10 g	6	
87.5 a	0.3	NAA
57.5 b	3	
25 e	6	
50 c	0.3	2, 4- D
42.8 d	3	
15 fg	6	

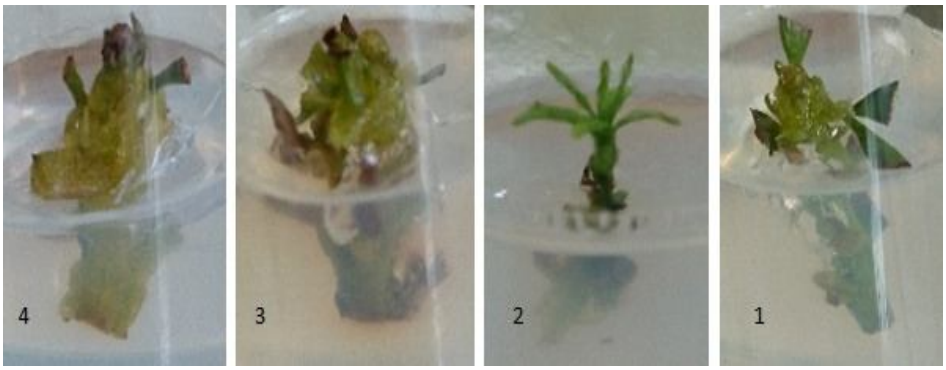
وجود حداقل یک حرف مشترک بین میانگین‌ها نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار بین آن‌ها می‌باشد.

در بعضی از تیمارها جوانه‌ها وضعیت طبیعی خود را حفظ کرده و در بعضی دیگر شکل طبیعی خود را از دست داده و کاملاً به کالوس تبدیل شدند، یکی از نکات قابل ملاحظه در واکنش ریزنمونه‌های جوانه نسبت به نوع و غلظت هورمونی می‌باشد. به طوری که در غلظت ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر NAA بیشتر

www.SID.ir

Archive of SID

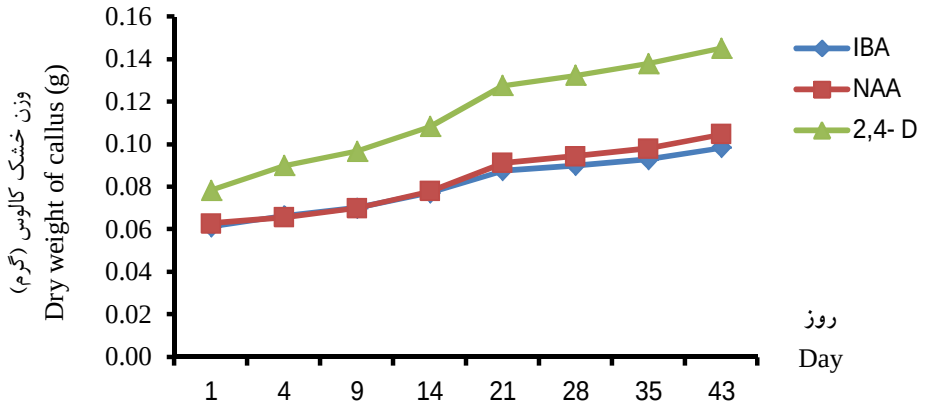
ریزنمونه‌ها وضعیت طبیعی خود را حفظ کرده و کالوس قابل ملاحظه‌ای در قاعده جوانه‌ها تولید شده است، بنابراین در صورتیکه هدف تولید گیاهچه از جوانه انتهایی در شرایط درون شیشه‌ای باشد تیمار مذکور پروتکل مناسبی خواهد بود، ضمن این‌که کالوس تولید شده در قاعده فیزیولوژیک ریزنمونه‌ها در حال تمایز می‌باشند (شکل ۲). بنابراین در صورتی‌که هدف تولید گیاهچه از جوانه‌های سرخدار در شرایط درون شیشه‌ای باشد تیمار مذکور بسیار مناسب خواهد بود. در مقابل عمده جوانه‌ها در غلظت ٦ میلی‌گرم در لیتر IBA و 2, 4- D به کالوس تبدیل شدند. هرچند در هر دو تیمار مذکور جوانه‌ها به کالوس تبدیل شدند ولی میزان تولید کالوس در غلظت ٦ میلی‌گرم در لیتر 2, 4- D به طور قابل ملاحظه‌ای بیشتر است، بنابراین برای تولید کالوس از جوانه انتهایی برای اهدافی نظیر کشت سلول و تولید متابولیت‌های ثانویه سرخدار پروتکلی مناسب می‌باشد (شکل ۲).



شکل ۲- رشد غیرطبیعی جوانه در غلظت ٦ میلی‌گرم در لیتر IBA (۱)، رشد طبیعی جوانه در غلظت ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر NAA (۲)، تبدیل جوانه به کالوس در غلظت ۳ میلی‌گرم در لیتر NAA (۳) و تبدیل جوانه به کالوس در غلظت ٦ میلی‌گرم در لیتر 2, 4- D (٤).

Figure 2. Abnormal growth of bud at concentration of 6 mg L^{-1} IBA (1), normal growth of bud at concentration of 0.3 mg L^{-1} NAA (2), converting bud to callus at concentration of 3 mg L^{-1} NAA (3) and converting bud to callus at concentration of 6 mg L^{-1} 2, 4- D (4).

بررسی منحنی‌های رشد کالوس: جهت بررسی میزان و نحوه رشد کالوس در ریزنمونه‌های مورد بررسی، غلظت ۳ میلی‌گرم در لیتر در نظر گرفته شد و منحنی رشد کالوس هر یک از ریزنمونه‌ها در غلظت مذکور با توجه به وزن خشک کالوس، برای هورمون‌های مختلف ترسیم شد (شکل‌های ۳ – ۵).

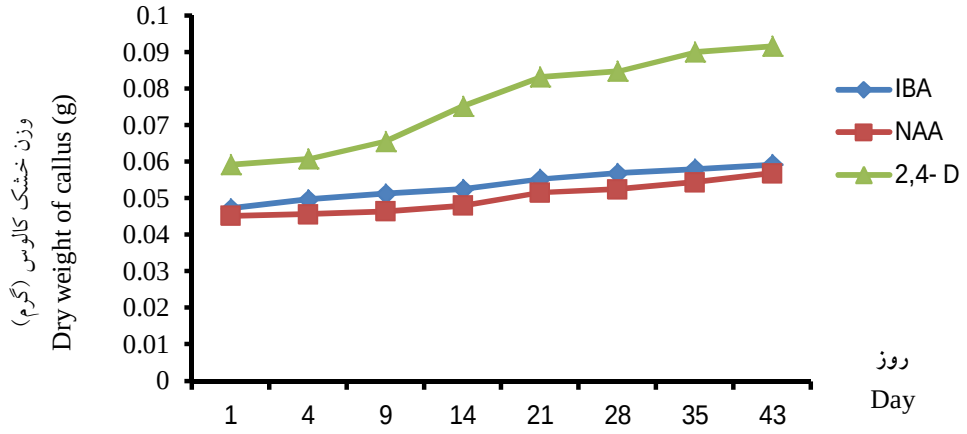


شکل ۳- مقایسه منحنی‌های رشد کالوس (وزن خشک) بر حسب روز در ریزنمونه‌های ساقه *Taxus baccata*.

www.SID.ir

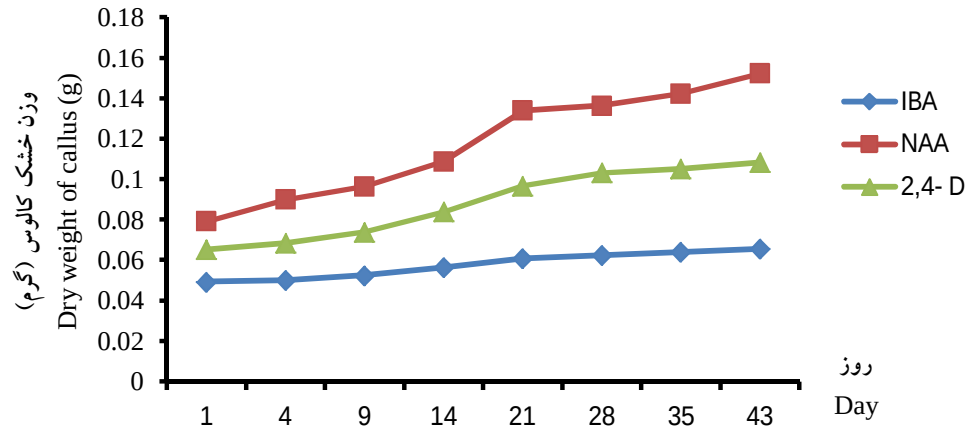
Archive of SID

Figure 3. Comparison of growth curves of callus (dry weight) in day in stem explants of *Taxus baccata*.



شکل ٤- مقایسه منحنی‌های رشد کالوس (وزن خشک) بر حسب روز در ریزنمونه‌های برگ *Taxus baccata*.

Figure 4. Comparison of growth curves of callus (dry weight) in day in leaf explants of *Taxus baccata*.



شکل ٥- مقایسه منحنی‌های رشد کالوس (وزن خشک) بر حسب روز در ریزنمونه‌های جوانه *Taxus baccata*.

Figure 5. Comparison of growth curves of callus (dry weight) in day in bud explants of *Taxus baccata*.

در طی آغازش درون شیشه‌ای کالوس، تمایز و تخصص یافتگی سلول‌ها در گیاه والد، برگشت یافته و یاخته‌های ریزنمونه به حالت تمایز نیافته در می‌آیند (۲۰). فرایند برگشت از تمایز[1] در نتیجه تغییر در فعالیت متابولیکی، ناپدید شدن مواد ذخیره‌ای و افزایش سرعت تقسیم سلولی مشخص شده که منجر به تولید سلول‌های پارانشیمی تمایز نیافته می‌شود. قابل ذکر است که کالوس تولید شده دارای خصوصیات ظاهری و فیزیکی متفاوتی بوده و قابلیت تمایز به ریشه، اندام‌های هوایی و یا جنین‌های سوماتیکی[2] را دارا می‌باشد. در این پژوهش ضمن تشکیل کالوس‌هایی با رنگ‌ها و شکل‌های مختلف، در کلیه ریزنمونه‌های مورد بررسی، شروع کالوس‌دهی و رشد آنها دارای سرعت نسبتاً پائینی بود (شکل‌های ۳- ۵) که این امر به کند رشد بودن سرخدار و نیز حضور بازدارنده‌های رشد بستگی دارد. بنابراین بررسی منحنی‌های رویش نیز نتایج قبلی این پژوهش را تأئید می‌کند به طوری که منحنی‌های مذکور نشان

www.SID.ir

Archive of SID

می‌دهند بیشترین وزن خشک تولید شده به ریزنمونه-های ساقه و جوانه تعلق دارد. ضمن اینکه در ریزنمونه‌های ساقه و برگ تأثیر هورمون 2, 4- D و در ریزنمونه‌های جوانه نقش هورمون NAA بیش از سایر اکسین‌ها می‌باشد.

به‌طور کلی اگر هدف تولید کالوس از جوانه‌های رویشی سرخدار باشد، NAA با غلظت ۳ میلی‌گرم در لیتر، و برای تولید کالوس از ریزنمونه‌های ساقه و برگ 2, 4- D با غلظت ۳ میلی‌گرم در لیتر و چنانچه تولید گیاهچه از جوانه‌های رویشی سرخدار مورد توجه باشد، غلظت ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر NAA به‌عنوان پروتکل‌هایی مناسب، پیشنهاد می‌گردد.

سپاسگزاری

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

منابع

1.Abbasian, Z., Zamani, S., Movahedi, S., Khaksare, G., and Sayed Tabatabaie, B.E. 2010. In vitro micropropagation of yew (*Taxus baccata* L.) and production of plantlets. Biotechnology. 9(1): 48- 54. (In Persian)

2.Arvin, M.J. 2002. In vitro culture of trees. Shahid Bahonar University of Kerman Publication. 279p. (In Persian)

3.Bagheri, A., Ziaratnia, M., and Hosseini, M., 2004. In vitro culture of trees. Ferdowsi University of Mashhad press. 245p. (In Persian)

4.Bagheri, A., and Saffari, M. 2011. In vitro culture of higher plants. Ferdowsi University of Mashhad press. 406p. (In Persian)

5.Berry, J.B. 1984. Rooting hormone formulations. A chance for advancement, Plant Propagator Society. 34: 486-491.

6.Burkhin, V.B., Moleva, I.R., Filonova, L.H., Grakhov, V.P., Blume, Y.B., and Bozhkov, P.V. 1996. Proliferative activity of callus cultures of *Taxus baccata* L. in relation to anticancer diterpenoid taxol biosynthesis. Biotechnology Letters. 18: 1309-1314.

7.Chee, P.P. 1995. Organogenesis in *Taxus brevifolia* Nutt. tissue cultures. Plant Cell Reports. 14: 560-565.

8.Ebady, A., and Omidvar, A. 2011. Relationship between some ecological factors and distribution of yew tree (*Taxus baccata* L.) in Arasbaran forests (Case study: Ilganechay and Horand regions). Iranian Journal of Forest and Poplar Research. 19(3): 327- 339. (In Persian)

9.Esmailzadeh, O., Hosseini, M., and Oladi, J. 2005. A phytosociological study of English yew (*Taxus baccata* L.) in Afratakhteh reserve. Journal of Pajouhesh and Sazandegi. 68: 66-76. (In Persian)

10.Esna Ashari, M., and Zokaee khosroshahi, M.R. 2013. Plant tissue culture a comprehensive guide. Bu-Ali Sina University press. 475p. (In Persian)

11.Etokawa, H., and Lee, K.H. 2002. The genus *Taxus*. Taylor and Francis. London, New York. 386p.

12.Ghafoori, R., Bernard, F., Abolmaali, Sh., and Mousavi, A. 2012. Improve effect of gluthanine on the induction and growth of *Taxus baccata* L. callus. Annals of Biological Research. 3(4): 1726- 1730.

13.Gibson, D.M., Ketcham, R.E.B., Vance, N.C., and Christen, A.A. 1993. Initiation and growth of cell lines of *Taxus brevifolia* Nutt. (Pacific yew). Pant Cell Reports. 12: 479- 482.

1- Somatic embryos
2- Dedifferentiation

www.SID.ir

Archive of SID

14.Hirasuna, T.J., Pestchaner, L.J., Srinivasan, V., and Shuler, M.L. 1996. Taxol production in suspension culture of *Taxus baccata* L. Plant cell, Tissue and Organ Culture. 44: 95- 102.
15.Hosseini Nasr, S.M. 2015. Plant cell tissue and organ culture. Aeeizh press. 378p. (In Persian)
16.Hussain, A., Qarshi, I.A., Nazir, H., Ullah, I., Rashid, M., and Shinwari, Z. 2013. In vitro callogenesis in *Taxus wallichiana* Zucc. The Himalayan yew. Pakistan Journal of Botany. 45(5): 1755- 1759. (In Persian)
17.Jalili, A., and Jamzad, Z. 1999. Red data book of Iran. Research Institute of Forests and Rangelands. 748p.
18.Jaziri, M., Zhiri, A., Guo, Y., and Dupont, J. 1996. *Taxus sp*. Cell, tissue and organ culture as alternative sources for taxoids production: a literature survey. Plant cell, Tissue and Organ Culture. 46: 59-75.
19.Karimian, R., Lahouti, M., and Davarpanah, S.J. 2014. Effect of different concentration of 2, 4- D and Kinetin on callogenesis of *Taxus brevifolia* Nutt. Journal of Applied Biotechnology Reports. 1(4): 167- 170.
20.Khosrowshahli, M., and Behnamian, M. 2008. Plant cell culture. Tabriz University press. 277p.
21.Lahouti, M., Zare Hasan Abadi, M., and Ahmadian, R. 2011. Biochemistry and physiology of plant hormones. Ferdowsi University of Mashhad press. 359p. (In Persian)
22.Lesani, M.R. 1999. Yew (*Taxus baccata* L.). Forests and Rangelands Research Institute, 219p. (In Persian)
23.Mahdinejad, N., Fakhari, B.A., and Ghanbari, S. 2015. Effects of growth regulators on in vitro callogenesis of *Taxus baccata* L. Biological Forum- An International Journal. 7(1): 142-145.
24.Nasiri Madiseh, Z., Mofid, M.R., Ebrahimi, M., Khayyam Nekoei, S.M., and Khosro Shahi, M. 2009. Isolation of taxol producing endophytes fungi from Iranian yew (*Taxus baccata* L.). Journal of Shahrekord University of Medical Sciences. 11(4): 101-107. (In Persian)
25.Sharifi, A., Moshtaghi, N., and Bagheri, A. 2010. Practical plant tissue culture. Jahad Daneshghahi Mashhad press. 479p. (In Persian)
26.Snjezana, M., Bjedov, I., Kovac, M., Levanic, D.L., and Jejaska, S. 2002. Effect of explant source and growth regulators on in vitro callus growth of *Taxus baccata* L. Food Technology and Biotechnology. 40(4): 299-303.
27.Sonia, M., Rosa, M., Mirjalili, M.H., Moyano, E., Javier, P., and Bonfill, M. 2011. Production of the anticancer drug taxol in *Taxus baccata* L. suspension culture: A review. Process Biochemistry. 46: 23-34.

www.SID.ir

Archive of SID

Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources
J. of Wood & Forest Science and Technology, Vol. 24 (1), 2017
http://jwfst.gau.ac.ir

Effects of IBA, NAA and 2, 4- D on callus production and growth in common yew (*Taxus baccata* L.) under *in vitro* conditions

***S.A. Razavi[1], S.M. Hosseini Nasr[2], H. Reza Doost[3] and F. Rostami Charati[4]**
[1]Ph.D. Student, Dept., of Forestry, Sari University of Agricultural Science and Natural Resources and Lecturer, Dept., Natural Resource, Gonbad Kavous University, Gonbad, Iran, [2]Associate Prof., Dept., of Forestry, Sari University of Agricultural Science and Natural Resources, Sari, Iran, [3]Assistant Prof., Medicinal Plant and Drugs Research Institute, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran, [4]Associate Prof., Dept., of Chemistry, Faculty of Science, Gonbad Kavous University, Gonbad, Iran
Received: 03/13/2016 ; Accepted: 07/05/2016

Abstract

Background and objectives: Common yew (Taxus baccata L.) is one of the most valuable coniferous species in the northern forests of Iran which is shade tolerant and its distribution is from Astara to Ali Abad Katoul (Golestan province). This species additional to having genetic reservation, silvicultural and ecological values, has the special advantage in drug industry. As callus is a primary substance for cell cultures and secondary metabolite's production and indirect organogenesis, therefore, in order to suggest a suitable explant and definite concentration of growth regulators for callus production, the effect of Indole-3- butyric acid (IBA), α-Naphtaleneacetic acid (NAA) and 2, 4- Dichlorophenoxyacetic acid (2, 4- D) on callus production and growth in common yew under in vitro conditions were considered.

Materials and methods: In this research, the explants were provided from different parts of the tree such as leaf, young stems and apical buds with 1.5 cm lengths. For sterilization of explants different methods were used. The explants were cultured in Murashige and Skoog medium after sterilization. For callus induction from IBA, NAA and 2, 4- D in 4 levels (0, 0.3, 3 and 6 mg L^{-1}) were used. In order to prevention of auxins decomposition and their better absorption by explants texture, all of the explants were maintained in dark conditions for a week. For each explants of stem, leaf and bud callus growth curve were drawn. Data were analyzed with ANOVA and Duncan tests.

Results: The results were shown that the best method for explants sterilization was ethanol 70% (for 1 min), HgCl2 0.2 % and CaCl2 0.2% (for 1 min). The maximum percentage of browning was observed in bud explants at concentration of 6 mg L-1 NAA. The leaf explants were better than other explants in the browning phenomenon, so that there was no evidence of browning in different concentration of IBA and 2, 4- D. The maximum wet and dry weight of callus was belonging to stem and bud explants under treatments of 2, 4- D and NAA at concentration of 3 mg L-1, respectively. In addition, the produced calluses had different texture and color. Most of bud explants at concentration of 0.3 mg L-1 NAA were normal conditions but at concentration of 6 mg L-1 IBA and 2, 4- D, they were converted to callus. The callus growth curves in different explants showed that initiation and callus production and its growth is having a relatively low rate.

Conclusion: 2, 4- D at concentration of 3 mg L^{-1} for callus production from yew stem and leaf explants, NAA at concentration of 3 mg L^{-1} for callus production from apical bud and NAA at concentration of 0.3 mg L^{-1} for plantlet production from yew bud are suggested as suitable protocols.

Keywords: *Taxus baccata* L., Callus, Growth regulators, In vitro culture, Callus growth curve

*Corresponding author: razaviseyedali@yahoo.com

www.SID.ir