Archive of SID

پژوهش و سازندگی

شماره ۷۱، تابستان ۱۳۸۵

در منابع طبیعی

تولید گیاهک‌های سرخدار(*Taxus baccata*) با استفاده از کشت درون شیشه‌ای و نجات رویان

• **ندا نیک‌وش**، دانشجوی کارشناس ارشد دانشگاه پیام نور دانشکده علوم واحد تهران
• **محمدحسن عصاره**، موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور
• **مه لقا قربانلی**، دانشگاه آزاد اسلامی‌واحد گرگان
• **عباس قمری زارع**، موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور

تاریخ دریافت: اسفند ماه ۱۳۸۳ تاریخ پذیرش: اسفند ماه ۱۳۸۳

Email: asareh@rifr-ac.ir

چکیده

سرخدار یک گیاه رو به انقراض بوده و زادآوری طبیعی آن بسیار اندک می‌باشد. آزمایش‌هائی به منظور یافتن راهکارهای عملی جهت ازدیاد این گیاه صورت پذیرفته است. بذرهای این گیاه از توده سرخدارهای طبیعی دره زرین گل واقع در منطقه علی‌آباد کتول گرگان واقع در استان گلستان در آذرماه سال ۸۲ جمع‌آوری گردید. بذرها ابتدا در آب جاری خیسانده و ضدعفونی گردیدند. چهار تیمار مختلف ضدعفونی بذوراعمال گردیدکه این تیمارها از نظر آماری در سطح ۱٪ یا ۵ ٪ تفاوت معنی‌داری را نشان دادند. بهترین نتیجه از بکارگیری تیمار بنومیل ۱٪ والکل ۷۰٪ و هیپوکلریت سدیم ۳٪ و کلرید مرکوریت ۰/۱٪ گرفته شد که با استفاده از این تیمار، ۶۷٪ از بذور عاری از هر گونه آلودگی باکتریایی و قارچی بودند. رویان‌های بذور استریل شده با روش تجربه شده در این تحقیق از دیواره‌های داخلی بذور و آندوسپرم جدا شدند و بدین صورت تعداد بی‌شماری رویان در مدت کوتاهی تحت آزمایش کشت درون شیشه‌ای قرار گرفت. رویان‌ها در محیط MS غنی شده با کازئین gl^{-1} ۰/۱ ، مخمر gl^{-1} ۰/۱ ، اسید اسکوربیک gl^{-1} ۰/۱و ذغال فعال gl^{-1} ۵ کشت داده شدند.عمل واکشت نمودن آنها هر دو هفته یک‌بار انجام شد تا قسمت هوائی گیاهک‌ها به حدود ۵ سانتی متر برسد. با اندازه‌گیری مستمر گیاهک‌ها رشد ماهانه درحدود ۰/۷ سانتی‌متر محاسبه گردید. گیاهچه‌ها پس از چندین واکشت به گلدان‌های کوچک(جیفی پات) منتقل شدند و در دو هفته اول با محلول غذایی MS بدون آگار به‌علاوه آنتی بیوتیک کربنی سیلین آبیاری گردیدند. به منظور تقویت و توسعه ریشه ها، به گیاهک‌های جوان بعد از دو هفته از رشد و نمو در گلدان‌های جیفی پات، IBA به میزان ۱ یک میلی گرم / لیتر NA a به مقدار ۰/۵ میلی‌گرم / لیتر افزوده شد.گیاهک‌های بدست آمده از این تحقیق پس از رشد کافی ریشه و قسمت هوائی به خاک منتقل شده و برای سه ماه در اتاقک رشد در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد درحضور نور به مدت ۱۴ ساعت و دمای ۱۷ درجه سانتیگراد درغیاب نور به مدت ۸ ساعت، نگهداری شدند .در این مدت گیاهان ازنظر مورفولوژیکی و رشد و نمو کاملاً طبیعی مشاهده گردیدند.

کلمات کلیدی: سرخدار ،رویان ، کشت بافت

www.SID.ir

Archive of SID

Pajouhesh & Sazandegi No:71 pp: 26-32

Mass production of common yew (*Taxus baccata*) plantlets by *invitro* embryo culture

By: N. Nikvash; MSc. Student, Payame. Nour University, Tehran, Iran. M.H. Asareh; Research Institute of Forests and Rangelands, M.Ghorbanli; Scientific Board Member of Gorgan Azad University Gorgan, Iran. A.Ghamari Zare, Research Institute of Forests and Rangelands.

Taxus baccata is an endangered forest tree species which its regeneration is very low. Embryo culture carried out to find a practical method for seedling mass propagation. Seeds collected in December 2004 from its natural stand at Zarrin gol valley of Ali Abad Katol in Golestan province, Iran. The seeds were immersed under running water four treatment used to sterilize the seeds. The best treatment (a=%1) was Benomyl 1%.ethanol alcahol 70%, Sedium hypochlorite 3% and mercuric chloride 1%. Sixty seven percent of the treated seeds were uncontaminated from bacteria and fungi. Bassd on the method experienced in this research embryos separated from the seeds walls and endosperm. As a result many embryos were tested under *inviro* method at short period. The embryos were cultured on Ms Containing casein, yeast, ascorbic acid and activated charcoal (0.1, 1.0, 0.1 and 5.0 gr^{-1} respeectively). Plantlets were recultured every two weeks in order to increase the shoot height to 5cm. Monthly growth rate of plantlets was 0.7cm. The plantlets were transplanted to jiffy plate after few reculturing then watered at two first weeks with liquid Ms nutrition solution containing antibiotic (Carbonicilin). In order to increase root development, the young plantlets growing in jiffy Plate wer treated with IBN and NAA (1.0 and 0.5mg^{-1} respectively) after two weeks and enough growth (shoot and root) plantlets wer translanted in to soil and kept in a growth room for three months at 25°c for 14 hours in light and 17°c for 8 hours in dark. All seedling had normal growth.

Keywords: Taxus, Embryo, Tissue culture.

مقدمه

سرخدار معمولی (Common yew)با نام علمی *Taxus baccata* از سوزنی برگان بومی‌ایران بوده (۱۳) و درسال‌های اخیر از دو جنبه مورد توجه قرار گرفته است.۱- حفاظت ویژه با توجه به روند رو به انقراض و۲- اندام‌های این گیاه حاوی ماده شیمیایی فوق‌العاده ارزشمند به‌نام تاکسول است که کاربرد وسیع آن در پزشکی و معالجه سرطان اثبات شده است. در ضمن لسانی(۱) در سال‌های اخیر پژوهشی در مورد وضعیت کمی و کیفی توده در طبیعی سرخدار در استان گلستان انجام داده است. ریز ازدیادی سوزنی برگان برای اولین بار توسط Sommer و همکاران در سال ۱۹۷۵با کشت جنین‌های کاج(*Pinus palustris*) انجام شد(۱۱، ۱۸). آنها ساقه‌های نابجایی بدست آوردند که آنها را برش داده و متعاقباً ریشه‌دارکردند . از آن پس بسیاری از گونه‌های سوزنی برگ از رویان و یا قطعاتی از آن، به ویژه از لپه‌ها در تکنیک ریز ازدیادی مورد استفاده قرار گرفتند (۱۸). برای برخی از گونه‌ها به ویژه (*Pinus radiatris*) این روش موثر بود، اما برای سایر گونه‌ها استفاده از کشت رویان چندان موفق‌تر از تحریک ریشه‌زائی قلمه‌ها نبوده است. این موضوع به خصوص درجنس Abies با مشکل همراه بوده است (۹).

مطالعات انجام شده نشان می‌دهد که معمولاً رویان‌های جدا شده از بذور خیس خورده ضد عفونی یا استراتفیکاسیون شده بر بذرهای خشک ارجحیت دارند و این خرد اندامگان از بذور خیس خورده به راحتی جدا شده و واکنش بهتری به کشت *In vitro* نشان می‌دهند(۱۲).

جوانه‌زنی رویان‌ها *Pinus canuriensis* که حاصل از بذور خیس شده در تماس با آب جاری که به‌طور مستمر از محلی وارد و از نقطه دیگر مداوم خارج می‌شوند بدست می‌آیند، نسبت به بذرهای خیس خورده دریک نقطه ثابت دارای رویش معنی‌داری بودند (۱۶).

در کشت بافت سرخدار، از قسمت‌های جوان مانند گامتو فیت ماده، رویان،جنین اولیه و قسمت‌های بالغ گیاه مثل برگ‌ها ، ساقه جوان و ریشه استفاده شده است(۴). محیط‌های کشت درون شیشه‌ای پیشنهاد شده شامل MS , B_5 و WPM بوده است (۴). محیط کشت TM_5 جهت کشت بافت گیاه سرخدار بسیار مناسب تشخیص داده شد(۱۵). تیمارهای مختلف مثل کازئین ، اسید اسکوروبیک و پلی ونیل پیرولیدون نیز در افزایش رشد و نمو آن مؤثر بوده است (۱۴). تاکنون برای ازدیاد گونه‌های سرخدار روشی روشن و مشخص برای تولید انبوه از طریق تکنیک‌های کشت بافت گزارش نشده است (۸) .ولی برای سایر گونه‌های موجود در تیرهٔ Taxodiaceae گزارش‌هایی موجود است (۵). تحقیق حاضر به‌دنبال دستیابی به روشی ساده و قابل اجرا در سطح وسیع و تولید انبوه گیاهک و سپس نهال برای اهداف دارویی و درمانی بوده بدون اینکه نیازی به برداشت از عرصه‌های حفاظت شده طبیعی باشد.

www.SID.ir

Archive of SID

مواد و روش‌ها

بذور مورد نیاز برای این تحقیق از توده سرخدارهای طبیعی دره زرین گل واقع در منطقه علی آباد کتول گرگان واقع در استان گلستان در آذرماه سال ۸۲ جمع‌آوری گردید. این بذور به مدت سه هفته در آب جاری قرار گرفته و خیسانده شدند. بذور بالغ و رسیده سرخدار قهوه‌ای رنگ وتخم مرغی شکل بوده و اندازه آن بین ۰/۷ - ۰/۶ سانتی متر در طول و ۰/۵- ۰/۴ سانتی متر در عرض متغیر است. سترون سازی بذور در چهار تیمار مختلف انجام گردید و مبادرت به جداسازی رویان از آنها شده و سپس در محیط کشت MS غنی شده کشت گردید(۱۷). چهار تیمار جهت بدست آوردن بهترین روش ضد عفونی کردن بذرها طراحی و به‌کار گرفته شد. تیمار اول شامل هیپو کلرید سدیم ۳٪ (ده دقیقه) و الکل اتیلیک ۷۰٪ (ده دقیقه) ، تیمار دوم: بنو میل ۱٪ (یک ساعت) ، هیپو کلرید سدیم ۳٪ (ده دقیقه)، الکل اتیلیک ۷۰٪(ده دقیقه) ،کلرید مرکوریک (یک دقیقه)، تیمار سوم: بنومیل ۱٪(یک ساعت)، هیپو کلرید سدیم ۳٪ (ده دقیقه)، الکل اتیلیک ۷۰٪(ده دقیقه)، کلرید مرکوریک (دو دقیقه)، تیمارچهارم: بنومیل ۱٪ (یک ساعت)، هیپو کلرید سدیم ۳٪ (ده دقیقه)، الکل ۷۰٪ (ده دقیقه)، کلرید مرکوریک(سه دقیقه). در تمامی‌این تیمارها بذور از پیش با مایع ظرفشویی شتستشو گردیده و آخرین مرحله شستشو استفاده از کلرید مرکوریک بوده که در زیر هود و تحت شرایط استریل انجام شد. محیط کشت مورد استفاده MS می‌باشد که با اضافه نمودن کازئین و مخمر وذغال فعال و اسید اسکوربیک به ترتیب به مقادیر ۰/۱، ۱، ۵ و۰/۱ گرم غنی گردید. روش تجزیه واریانس در قالب طرح کاملاً تصادفی و مقایسه میانگین‌ها با روش دانکن صورت پذیرفت. داده‌های مربوط به درصد آلودگی باکتریایی و قارچی، درصد نمونه‌های جوانه زده، درصد آلودگی در نمونه‌های جوانه نزده، تجزیه واریانس گردید. از آنجایی که داده‌ها به صورت درصد بوده و در بین داده‌ها عدد صفر نیز وجود داشت، جهت نرمال کردن داده‌ها از تبدیل جذری استفاده شد و سپس تجزیه آماری روی آنها صورت گرفت بعد از سترون سازی بذور مبادرت به جداسازی رویان در شرایط استریل نموده و با دقت و بدون آسیب رساندن به جنین با کمی فشار ملایم در داخل محیط کشت قرار داده شد. نحوه برش و منطقه برش بذر، جهت جدا نمودن رویان بسیار حائز اهمیت می‌باشد. بذرهای تخم مرغی شکل را از طول به سه قسمت مساوی به طور فرضی تقسیم شد. برش از یک سوم طول بذر انجام گردید. دو سوم باقی مانده حاوی رویان بوده که در مواد اندوخته‌ای به طرز خاصی ممزوج شده است. هنگامی که این امتزاج با همرنگی رویان و مواد اندوخته‌ای که سفید رنگ هستند همراه می‌شود، اغلب تشخیص رویان را بسیار مشکل می‌کند. به‌هرحال رویان درخت سرخدار به شکل دانه برنج و کمی‌سفید تر از مواد اندوخته‌ای خود بوده و اندازه آن یک میلیمتر می‌باشد(تصویر شماره ۱). برای خارج سازی رویان ابتدا بانوک اسکالپل از دو سوم برش یافته بذر،کل مواد اندوخته‌ای را خارج نموده و مواد مذکور را با احتیاط ازدو طرف رویان کنار زده و با فشار مختصری جنین را خود از مواد اندوخته‌ای جدا که در این صورت برداشتن آن با یک پنس ظریف عملی شده و بلافاصله اقدام به کشت آن می‌شد به‌دلیل اینکه سرخدار بسیار کند رشداست،گیاهک‌ها جندین بار متوالی جهت تامین مواد غذایی و محیط و بستر مناسب رشد، واکشت گردیدند. تقریباً هر سه هفته یک‌بار عمل باز گشت صورت می‌پذیرد. و به طور مرتب هر ماه رشد گیاهچه‌ها اندازه‌گیری شد. به منظور وادار کردن گیاه به تولید شاخه های بیشتر، ریشه‌های گیاهک‌های به دست آمده قطع گردید و برای افزایش شاخه زایی دو تیمار هورمونی مختلف استفاده شد. در این تیمارها، از هورمون‌های BA، IBA و TDZ استفاده شد. تیمار اول شامل: محیط کشت MS محتوی تنظیم کننده‌های رشد گیاهی BA، IBA با مقادیر به ترتیب ۰/۵ و ۰/۱ میلی گرم در لیتر به همراه TDZ با غلظت۰/۰۵گرم در لیتر. تیمار دوم شامل: محیط MS به همراه BA و IBA هر کدام با غلظت ۰/۱ میلی گرم در لیتر.

تطبیق تدریجی گیاهچه‌های حدود۵ سانتی متر از شرایط *In vitro* (درون شیشه‌ای) به شرایط *In vivo* (کشت در گلخانه) برای سازگار نمودن گیاه انجام شد. گیاهچه‌ها به گلدان‌های کوچک جیفی‌پات منتقل شده و جهت جلوگیری از تنش به گیاه و نیز تقویت ریشه‌دهی، از محلول غذایی MS بدون اگار در دو هفته اول انتقال به گلدان، استفاده شد.

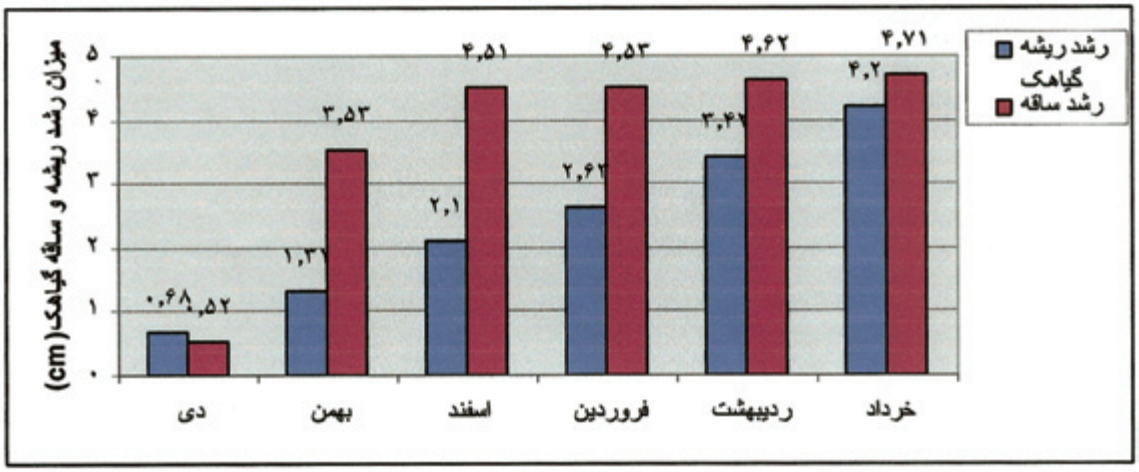
لازم به توضیح است که گلدان‌های جیفی پات ابتدا می‌بایست در آب قرارداده می‌شدند تا به نه برابر حجم ابتدایی خود یعنی به طول در حدود ۵ سانتی متر برسدند. سپس این گلدان‌ها در آون باحرارت ۱۰۰درجه سانتی گراد به‌مدت یک ساعت قرار داده شدند. بعد از خارج کردن وسرد شدن خاک جیفی پات، گیاهک‌ها بایک پنس ظریف خارج نموده و بعدکشت گردیدند. بر روی گلدان‌ها پلاستیک کشیده شد تا تنش رطوبتی به حداقل کاهش یابد. ماده غذایی MS همراه با آنتی بیوتیک که تحت شرائط کاملاً استریل تهیه شده بود، بایک پیپت ظریف هر دو روز یکبار به مدت دو هفته در پای هر گیاهک به مقدار ۱۰قطره ریخته شد (تصویر شماره ۲). گیاهان بدست آمده پس از طی مراحل فوق به‌طور مداوم آبیاری شده و برای مدتها نگهداری شدند.

نتایج و بحث

بذرهای خیسانده شده و ضد عفونی شده طبق جدول شماره ۱ با روش تیمار نوع سوم حدود ۶۷٪ جوانه‌زنی داشت گیاهک‌ها در طی ۵ الی ۶ ماه در حدود ۵ سانتی متر رشدکرده‌اند (تصویر شماره ۳). رویان‌ها اغلب بعد از سپری شدن سه تا چهار هفته سبز می‌شدند، ولی گاهی این زمان تا یک ماه هم طول می‌کشید . تمایز به دو قسمت ریشه چه و ساقه چه اغلب با هم صورت گرفت. در ابتدا دو برگ کوچک ظاهر می‌شد و بتدریج بر تعداد آن افزوده می‌گردید (تصویر شماره۴). با هر بار بازکشت گیاه، به رشد قطری ساقه افزوده می‌شد، هر چند که ممکن بود به تعداد برگ‌ها اضافه نگردد. به طور میانگین هر ماه هفت میلیمتر رشد داشت (نمودار شماره ۱). Zhiri برای از بین بردن نهفتگی نهال‌های سرخدار روی دانه‌های رقم Stricta آزمایشی انجام داده که نتیجه آن میزان بسیار بالای رشد رویان‌های جدا شده از بذر سرخدار بودکه تقریباً با نتیجه بدست آمده در این تحقیق (حدود ۶۷٪) نزدیک است(۱۸).گزارشی دیگر بر روی رویان‌های زیگوتیک بریده شده از بذور سرخدار برگ کوچک (*T.brevifolia*) توسط Chee (۸)، موجود می‌باشند که آزمایشی مشابه به روش کشت رویان در این تحقیق، انجام شده که بذور بالغ به مدت ۴ هفته در تاریکی روی محیط کشت نمکی پایه (B و MS) کشت داده شد و ظهور ریشه‌چه و جوانه اولیه در محیط در بالاترین میزان بود. رشد جوانه سرخدار برگ کوچک، سرخ دار ژاپنی، معمولی و رقم Stricta در این محیط از ۲ تا ۳۶ ٪ در نوسان بود(۷).

www.SID.ir

Archive of SID



نمودار شماره ۱: میانگین رشد طولی ماهیانه ریشه و ساقه گیاهک سرخدار پس از شروع آزمایش

در بین دو تیمار شاخه زائی ، تیمار اول شامل هورمون‌های IBAو TDZ,BA بیشترین درصد شاخه‌زائی مشاهده گردید (تصویر شماره۵). Bonga اظهار داشته تشکیل ساقه نابجا نیاز به تیمار اکسین و سیتوکنین داردکه البته تاکید بر این است که اکسین با غلظت پایین استتفاده گردد. زیرا کاربرد وسیع آن سبب رشد کالوس و غیر نورمال شدن ساقه می‌گردد(۳، ۵).

در مرحله تطبیق تدریجی گیاهک‌ها با محیط خارج از شیشه، کاهش تنش‌های رطوبتی و غذایی تأثیر واضحی در تحمل شرائط خارج از شیشه‌ای گیاه سرخدار داشت و طی دو هفته اول که گیاه با محلول غذایی و آنتی‌بیوتیک آبیاری می‌شد ، گیاهان دارای سرسبزی و شادابی مطلوب بودند. و هورمون‌های ریشه‌زایی نیز در افزایش ریشه‌دهی کاملاً مؤثر بودند(۶). (تصویر شماره۶). استفاده از آنتی بیوتیک‌ها برای کاهش رشد میکروبی ، در مرحله تطبیق گیاه با محیط خاک توسط Ihuja و Muhs مورد استفاده قرار گرفته است(۲). Derive و Suttle اثر هورمون‌های ریشه‌زایی به منظور افزایش ریشه‌دهی را، بر روی تعدادی از سوزنی برگان مورد آزمایش قرار داده و نتایج مطلوبی بدست آوردند(۱۰). آنها گیاهک‌های بدست آمده را تحت رطوبت بالا به مدت ۱ تا ۲ هفته با مواد ریشه زایی تیمار دادند که نتایج بدست آمده در این تحقیق با نتایج آنان مطابقت دارد .

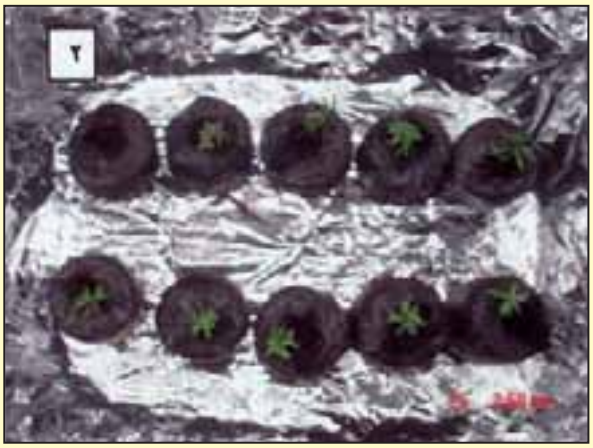
یکی از موانع تکثیر درون شیشه‌ای سرخدار حضور باکتری‌های سیستمیک و غیر سیستمیک در محیط است که در این تحقیق اقداماتی برای کنترل آنها صورت گرفت. همه ویژگی‌ها از نظر نوع تیمار تفاوت معنی‌داری نشان دادند. در مورد ویژگی آلودگی باکتریایی تفاوت تیمارها در سطح ۱ ٪ معنی‌دار بود. بیشترین آلودگی مربوط به تیمار و کمترین آلودگی مربوط به تیمار ۳بود (نمودار شماره۲). در مورد ویژگی آلودگی قارچی تفاوت معنی‌داری بین تیمار ۳ با تیمارهای ۱ و ۲ مشاهده نگردید. تیمار ۳ کمترین میزان آلودگی قارچی را به خود اختصاص داده است (نمودار شمارهٔ ۲). در مورد ویژگی درصد جوانه‌زنی نمونه‌ها، تیمار ۳ با تیمارهای ۱ و ۲ در سطح ۱ درصد تفاوت معنی‌داری نشان داد، ولی تیمارهای ۱ و ۲ تفاوت معنی‌داری با هم نداشتند. بیشترین درصد جوانه‌زنی مربوط به تیمار ۳ بود (نمودار شماره ۳). در مورد ویژگی درصد آلودگی در بین نمونه‌های جوانه‌زده، تیمار ۳ کمترین میزان آلودگی را داشت و با تیمارهای ۱ و ۲ در سطح ۱ درصد تفاوت معنی‌داری مشاهده گردید (نمودار شماره۲). در مورد

جدول شمارهٔ ۱ مقایسه میانگین تیمارهای اعمال شده سترون نمودن بذور و رویان‌های تولید شده (حروف مشابه بیانگر عدم معنی‌دار بودن تیمارها بر اساس روش دانکن است.)

تیمارهای آزمایش شده	٪ آلودگی باکتریایی	٪آلودگی قارچی	٪ جوانه زنی رویانها	٪ آلودگی در بذور جوانه نزده	٪ آلودگی در بذور جوانه نزده
۱	۷/۲۳c	۱۰/۱a	۳۹/۸۵b	۲۸/۲۵a	۱۹/۳۳b
۲	۱۳/۰۰b	۹/۰۰a	۴۱/۴۴b	۱۹/۷۲a	۵۲/۶۰a
۳	۳۰/۶a	۱/۰۰b	۶۷/۷۱a	۰/۰۰b	۲۶/۶۷b

www.SID.ir

Archive of SID



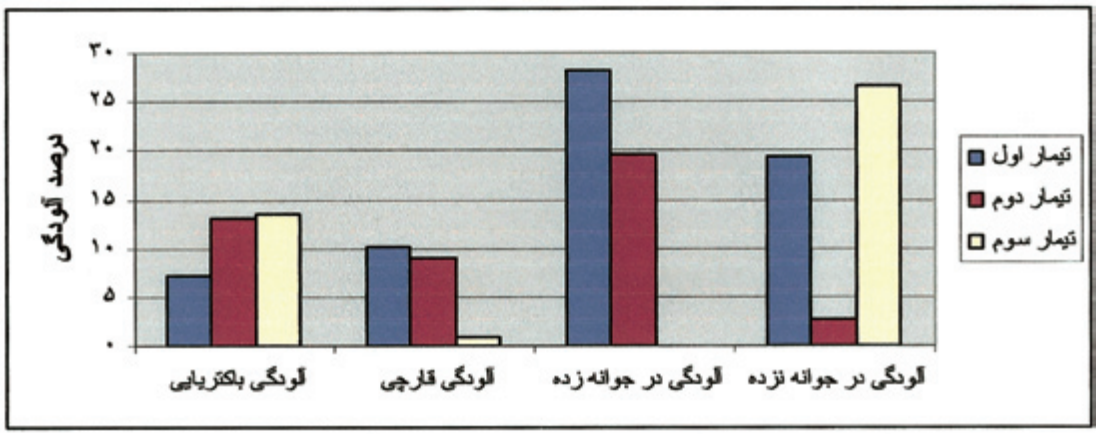
نجات رویان تصویر شماره ۱ جنین سرخدار تصویر شماره ۲ گیاهک‌های ۵ و ۶ ماهه منتقل شده به خاک تصویرشماره۳ گیاهک‌های ۵ سانتی متری سرخدار

تصویر شماره ۴ مرحله۳ برگی شدن گیاهک تصویر شماره ۵ وادار کردن گیاهک به تولید شاخه (بعد از قطع ریشه آن)درتیمار هورمونی تصویر شماره ۶

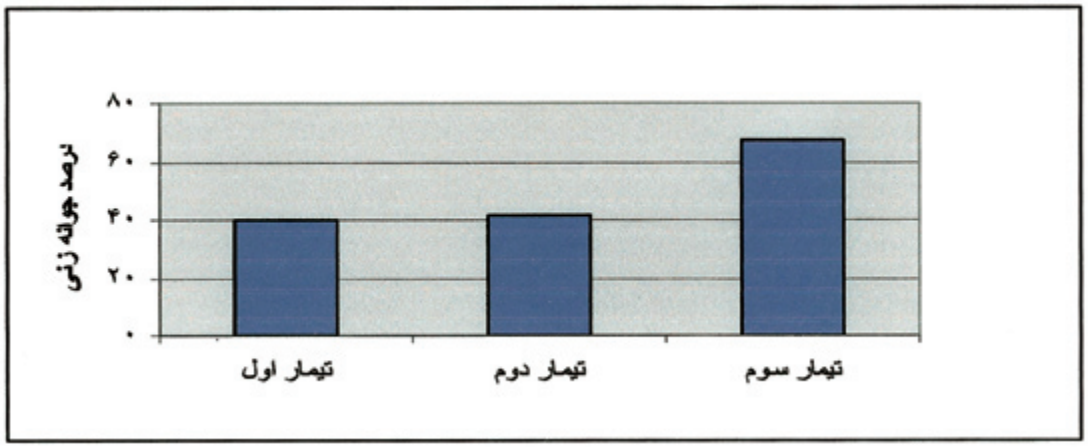
آبیاری گیاه با هورمون ریشه‌زایی سبب افزایش ریشه‌زایی در خاک گردید.BA, IBAوTDZ

www.SID.ir

Archive of SID



نمودار شماره ۲: میانگین درصد آلودگی در تیمارهای مختلف ضد عفونی بذر



نمودار شماره ۳: مقایسه میانگین در صد جوانه‌زنی در تیمارهای مختلف بذر

درصد آلودگی در نمونه‌های جوانه نزده، تیمار ۲ با سـایر تیمارها در سطح ۵ درصد تفاوت معنی‌داری نشان داد (نمودار شمارهٔ ۲)، ولی تیمارهای ۱ و ۳ تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نشان ندادند. خلاصهٔ نتایج در جدول شمارهٔ ۱ آمده است. نتایج نشان داد که تیمار ۱ بیشترین تأثیر را در کاهش آلودگی باکتریایی دارد. تیمار ۳ بیشـترین تأثیـر را درکاهش آلودگی قارچی دارد. همچنین تحت تیمار ۳ کمترین کاهش جوانه‌زنی مشاهده گردید.

منابع مورد استفاده

۱ - لسانی م. ، ۱۳۷۸؛ سرخدار . موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع،شماره انتشار: ۱۵، ۲۱ صفحه

2- Ahuja M.R.H.J.muhs.1982; Control of growth and and differentiation in tissues and protoplast drived callus in different genotgpes of aspen. proceeding of 5th international congress of Plant Tissue and Callus Culture, pp171-178.

3- Bong , J.Mamd P.Van aderkas 1988; *Invitro* culure of tree m.nighoff publisher , Dordrecht, 190-191.

4- Bonga J.M and P.Von aderkas.1988; *Invitro* culure of tree m.nighoff publishrs , Dordercht , 23-45.

5- Bonga , J.M .1987; Cell and tissue culture in foresty ,m .nighoff publishers , Dordrecht , pp 50-52.

6.Borgkard,F.and J.M Favre .1988; Plant Cell report 7:445-448.

7- Chee . P. P .1994; *invitro* culture of zygotic embryo of taxus species heo.tscience , 29 : 6, 695-6997; 6 pl;12 ref.

8-Chee,P. P. 1995; Organogenesis in *Taxus brevifolia*. Plant Cell Report.14:560-565.

9-David, A. 1987; Conifer protoplasm. In: J. M. Bonga and

www.SID.ir

Archive of SID

D.G.Darzan (eds) Cell and Tissue Culture in Foresty,vol.2, Specific principles and methods :Growth and developments.Martinus Nijhoff publishers,Dordercht,pp 2-15.

10- Driver J.A,G.R.L.Sultle.1987; Narserrg hending of propaqules .in:J.M .Bonga and D.J.Durzan (cls) Cell and Tissue Culture in Forestry , vol 2, Specific Principles and Methods , Martinus Nijhoff Publishrs , Dordrecht , pp 171-176.

11-Flim B.S , D.T.Webb, W.Georgis .1986; *Invitro* control of caulogmesis by growth regulators and media conponets in embryonic explants of castern white pine(*Pinus strobus*).

12- Gajdosova,A. and B.Vookova .1990; The selection of Abies species suitable for micropropagation .Biologia 45:673-684.

13- Jalili,A. and Z. Jamzad .1999; Red Data Book of Iran .16.

14- Jaziri,M, A . Zhiri ,YW.Guo , J.P.Upont, K. Shimomura, H.Hamada, M.Vanhaelen and J.Homes .1996; taxus sp.cell,tissue and organ culture as an alternative sources for taxoids production:a literature survey.Plant cell , Tissue and Organ Culture.46:59-75.

15- Ketchum REB , D.M.Gibson and L.G.Gallo. 1995; Media optimization for aximum biomass production in cell culture of pacific yew.plant cell tiss. Org.cult.42:185-193.

16- Martinez Pulido C,IS.Harry and T.Thorpe. 1990; *Invitro* regeneration of plantlets of canary Island pine(*Pinus cararіensis*).20 :1200-1211.

17- Murashinge , T.and F.Skoog .1962; A revised medium for rapid growth and big – assage with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum 15:473-597.

18- Sommer H.E., C.L.Brown and P.P.Kormanik .1975; Differentiation of plantlets in longleaf pine(*Pinus palustris* Mill.) tissue cultured *in vitro*.botanicGaz 136:169-200.

19-Zhiri A , M.Jaziri , J . Homes , M.Vanbaelcn and K. Shimonura.1994; Factors affecting the *in vitro* rapid germination of taxus embryos and the evaluation of taxol content in the plantlets. Plant, Cell, Tissue and Organ Culture .39:3,261-263,14 ref.

www.SID.ir