جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۲۷، شمارهٔ ۲، صفحهٔ ۳۲۵-۳۱٦ (۱۳۹۰)

تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد، محیط کشت و ریزنمونه بر تولید کالوس در گیاه سرخدار (*Taxus baccata* L.)

منصور امیدی[۱]، بهارک بهجت ساسان[۲*]، محمدرضا نقوی[۱]، سپیده کلاته جاری[۳] و علیرضا اطمینان[٤]

۱- استاد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده علوم زراعی و دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران

۲*- نویسنده مسئول، دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات تهران

پست الکترونیک: bahar_sasan60@Yahoo.com

۳- مربی، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات تهران

٤- مربی، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمانشاه

تاریخ دریافت: فروردین ۱۳۸۹ تاریخ اصلاح نهایی: خرداد ۱۳۸۹ تاریخ پذیرش: مرداد ۱۳۸۹

چکیده

سرخدار (*Taxus baccata* L.) گیاهی رو به انقراض و دارای زادآوری طبیعی بسیار اندک است. اهمیت مضاعف سرخدار به‌واسطه تولید تاکسول می‌باشد که مؤثرترین دارو برای درمان انواع سرطان‌ها شناخته شده است. هدف از این آزمایش بررسی محیط‌های کشت، غلظت‌های مختلف هورمون‌ها و ریزنمونه‌های مختلف سرخدار جهت تولید کالوس به‌عنوان یکی از منابع مهم تولید تاکسول می‌باشد. آزمایش به روش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. سه فاکتور شامل ریزنمونه (ساقه و برگ)، محیط کشت MS پایه و ٤ محیط MS تغییریافته در میزان نمک‌ها، میزان نیتروژن (KNO_3 و NH_4NO_3) و گلوتامین و فاکتور سوم ترکیب‌های هورمونی اکسین NAA و 2,4-D در ٤ سطح و سیتوکینین Kin در ۳ سطح در ترکیب با هم استفاده شد. در مرحله دوم آزمایش از محیط کشت MS ½ با ۳ میلی‌گرم در لیتر Kin + ۰/٤ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D استفاده گردید. بیشترین درصد تشکیل کالوس (۹٦/٦۷٪) در تیمار هورمونی 2,4-D در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر و Kin در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر در محیط کشت H با استفاده از جداکشت ساقه بدست آمد. بیشترین اندازه کالوس (۸۰/٦۷mm^2) در تیمار هورمونی ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA به همراه ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر Kin در محیط کشت F در قطعه جداکشت برگ از بین تیمارهای بکار برده شده، مشاهده شد. همچنین، کالوس‌های حاصل از ساقه فقط دارای سلول‌های مریستمی بودند. براساس نتایج بدست آمده گلوتامین تأثیر بسزایی در القای کالوس و همچنین در تحریک رشد کالوس داشت. همچنین غلظت‌های کم تنظیم‌کننده‌های رشد نسبت به غلظت‌های بالای تنظیم‌کننده‌های رشد بر دو صفت کالزایی و اندازه کالوس تأثیر بیشتری داشتند.

واژه‌های کلیدی: سرخدار (*Taxus baccata* L.)، تنظیم‌کننده‌های رشد، کالوس، محیط MS.

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقدمه

سرخدار (*Taxus baccata*) متعلق به جنس Taxus از درختان سوزنی‌برگ با رشد کُند در مناطق مرطوب و نیمه‌مرطوب است که اهمیت صنعتی و دارویی قابل توجهی در ایران دارد. تکثیر رویشی این گونه همانند سایر بازدانگان به دشواری صورت می‌گیرد. سرخدار به دلیل وجود ماده پاکلی‌تاکسل (Pacli taxol) در پوست و شاخه‌های درخت که جزو مؤثرترین داروهای ضدسرطان می‌باشد به‌عنوان یک گیاه دارویی بسیار مهم و پراهمیت شناخته شده است (لسانی، ۱۳۷۸). متأسفانه تخریب جنگل‌ها و بهره‌برداری نامناسب از این درخت سبب شده تراکم و فراوانی آن بسیار پایین بیاید و حتی خطر انقراض آن وجود دارد (نیک‌وش و همکاران، ۱۳۸۵). در توده‌های سرخدار زادآوری طبیعی ضعیف بوده و بندرت دیده می‌شود، همچنین کشت مجدد آن وقت و هزینه بسیار زیادی را می‌طلبد. بنابراین توصیه بر این است که تکثیر و تولید متابولیت‌های ثانویه به دلیل سادگی و سرعت عمل از طریق کشت بافت انجام شود (Rajewski *et al*., 2000؛ Zhang *et al*., 2002). تاکنون محیط‌های کشت و تنظیم‌کننده‌های رشد گوناگون در القای کالوس گونه‌های سرخدار مورد پژوهش و مطالعه قرار گرفته است.

اولین پژوهش در زمینه کشت بافت سرخدار در سال‌های ۱۹۹۶ تا ۱۹۹۹ با استفاده از محیط کشت B_5 در *T. cuspidate* و سایر گونه‌های Taxus انجام شده است (Parc *et al*., 2002). محیط کشت MCM در *T. brevifolia* (Parc *et al*., 2002) و محیط کشت WPM در *T. media* (Chee, 1996) انجام گردید. در بیشتر محیط‌های کشت در گونه‌های Taxus به‌منظور القای کالوس از ترکیب اکسین و سایتوکینین و همچنین از ریزنمونه بذر و ساقه استفاده شده بود (Fett-Neto *et al*., 1992؛ Zhong, 1995). محیط کشت MS جهت تولید کالوس تقریباً محیط مؤثری نیست (Zhir *et al*., 1995)، گرچه این محیط به‌طور مکرر در کالزایی و رشد کالوس‌ها استفاده می‌شود (طباطبایی و همکاران، ۱۳۸۸). ولی در *T. cuspidate* برای رشد کالوس از محیط کشت MS استفاده شد و نتایج کالزایی بسیار بالایی را نسبت به دیگر محیط‌های کشت مورد استفاده نشان داده‌است (Fetto-Neto *et al*., 1993). برای اندام‌زایی از کالوس، از جنین بالغ *T. Wallichiana* و محیط کشت ½WPMSH و تنظیم‌کننده‌های رشد 2,4-D و BAP استفاده شده است (Datta *et al*., 2006). طبق بررسی که بر روی کشت بافت و تولید تاکسول گیاه سرخدار انجام شده، Kin و 2,4-D و NAA و محیط کشت MS قابل توصیه است (Mihaljevic *et al*., 2002). روشهایی جهت کالزایی و کشت سوسپانسیون سلولی در گونه‌های مختلف Taxus (Wickremesinhe & Arteea, 1993) و همچنین اخیراً روشی برای ازدیاد گیاه *Himalaya yew* گزارش شده است (Datta & Jha, 2004). استفاده از محیط کشت MS و ترکیب‌های هورمونی NAA، Kin و BAP و ریزنمونه جنین جهت تولید سلول‌های مریستمی گزارش شده است (Akaneme & Eneobong, 2008). هدف از این پژوهش بررسی اثر محیط کشت MS تغییریافته و نسبت‌های متفاوت تنظیم‌کننده‌های رشد مختلف روی ساقه و برگ سرخدار *T. baccata* و به منظور تولید کالوس همچنین بررسی تولید سلول‌های مریستمی در سلول‌های کالوس تولیدی بوده است.

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مواد و روشها

تهیه ماده گیاهی و ریزنمونه‌های کشت

ریزنمونه مورد نیاز (ساقه و برگ) برای این تحقیق از گیاه سرخدار واقع در پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران تهیه گردید. ریزنمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در زیر آب جاری قرار گرفت. پس از آن ۷ دقیقه با قارچ‌کش بنومیل ۱٪ ضدعفونی و به‌منظور شستشوی مجدد، ۳۰ دقیقه زیر آب جاری قرار داده شدند. ضدعفونی نهایی در زیر هود لامینار توسط اتانول ۷۰٪ به مدت ۳۰ ثانیه و کلرید جیوه ۰/۱٪ به مدت ۷ دقیقه انجام شد. سپس ۳ بار شستشو با آب مقطر دو بار استریل انجام گردید. قطعات جداکشت در تیمارهای مختلف محیط کشت، بکار برده شد. به این صورت که بر روی سطوح فوقانی برگها ۳ خراش عمود بر رگبرگها ایجاد شد و به تعداد ۱۰ عدد، بر روی محیط‌های مختلف قرار داده شد. ساقه‌ها نیز به قطعات ۳ تا ۵ میلی‌متر جدا و بر روی محیط‌های مختلف قرار داده شد.

القای کالوس

محیط کشت MS پایه و چهار محیط MS تغییریافته در ترکیب با گلوتامین یا فاقد گلوتامین به نام‌های E، F، G و H طبق جدول ۱ مورد استفاده قرار گرفتند. به محیط‌های کشت ۲۵ گرم در لیتر ساکارز و ۷ گرم در لیتر آگار اضافه گردید و به‌منظور جلوگیری از قهوه‌ای شدن کالوس‌ها ۱۰۰ گرم در لیتر پلی‌وینیل پیرولیدون (PVP) استفاده شد. قطعات جداکشت ساقه و برگ، تحت تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد NAA و 2,4-D در غلظت‌های ۰، ۰/۵، ۱، ۲ و ٤ میلی‌گرم در لیتر در ترکیب با Kin در غلظت ۰، ۰/۲، ۰/٤ و ۱ میلی‌گرم در لیتر قرار داده شدند. این آزمایش در ۳ تکرار و در هر تکرار ۱۰ قطعه جداکشت بکار برده شد. نمونه‌های کشت شده در انکوباتور با شرایط دمایی ۲ ± ۲۳ درجه سانتی‌گراد و در تاریکی نگهداری شدند و عمل واکشت، هر ١٦ روز یک بار انجام شد. کالوس‌ها پس از دو ماه به محیط دوم که شامل محیط کشت MS ½ با ترکیب هورمونی ۳ میلی‌گرم در لیتر Kin + ۰/٤ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D انتقال داده شدند و به مدت دو ماه در اتاق رشد تحت شرایط دمایی ۲ ± ۲۳ درجه سانتی‌گراد و شرایط نوری ١٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. ارزیابی روی تولید کالوس و سطح کالوس صورت گرفته است.

جدول ۱- ترکیب محیط کشت MS پایه و ٤ محیط کشت تغییریافته (بر حسب میلی‌گرم در لیتر)

N- منبع	محیط کشت				
	MS	E	F	G	H
عناصر ماکرو	کامل	۱/۲	۱/۲	۱/۲	۱/۲
عناصر میکرو	کامل	۱/۲	۱/۲	۱/۲	۱/۲
KNO_3	۱۹۰۰	۹۵۰	۹۵۰	٤۷۵	٤۷۵
NH_4NO_3	١٦٥٠	۸۲۵	۸۲۵	٤۱۲/۵	٤۱۲/۵
گلوتامین	۰	۰	۱۰۰	۰	۱۰۰

بررسی بافت‌شناسی

بافت‌ها در ۵ میلی‌لیتر فرمالین ۱۰٪ به همراه ۵ میلی‌لیتر اسیداستی به مدت ۳۰ دقیقه جهت تثبیت قرار داده شدند، سپس برای آبگیری بافت‌ها از الکل با درجات مختلف (۷۰٪- ۸۰٪- ۹۵٪- ۹۵٪- ۱۰۰٪- ۱۰۰٪) هر کدام به مدت یک ساعت استفاده شد. بعد از این مرحله کالوس‌ها با استفاده از پارافین قالب‌گیری و بعد برش زده شدند و به مدت ۲٤ ساعت در سافرانین ۱٪ قرار داده شدند و به‌دنبال آن در الکل ۵۰٪ و در نهایت در الکل ۱۰۰٪ قرار گرفتند و بافت مورد نظر جهت مشاهده در زیر میکروسکوپ آماده شدند.

آنالیز داده‌ها و محاسبات آماری

داده‌های بدست آمده در آزمایش فاکتوریل و با طرح پایه کاملاً تصادفی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. رسم نمودار در Excel، مقایسه میانگین‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن و آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار MSTAT انجام گردید.

نتایج

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های مربوط به درصد تشکیل کالوس و اندازه کالوس بر روی هر قطعه جداکشت (جدول ۲) نشان داد که اثر هر یک از عوامل ترکیب‌های تنظیم‌کننده رشد، محیط کشت و نوع قطعه جداکشت هر یک به تنهایی و همچنین اثر متقابل دو فاکتور و سه فاکتور در سطح احتمال ۱٪ (P<۰/۰۱) معنی‌دار می‌باشد. این بدان مفهوم است که فاکتورهای مورد مطالعه از نظر تأثیر بر روی صفت مورد مطالعه به‌صورت مستقل از یکدیگر عمل نمی‌کنند و وابسته به یکدیگر می‌باشند.

جدول ۲- تجزیه واریانس اثر عامل‌های ترکیب هورمونی و محیط کشت و نوع قطعه جداکشت بر درصد تشکیل کالوس و اندازه کالوس

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		درصد کالزایی	اندازه کالوس
ترکیب هورمونی	۷	۱۵۸۸/۳۰۲ **	۳۷۲/۸٤۹ **
محیط کشت	٤	۲۱۱۲/۵۱۷ **	٤۸۳/٦۷٤ **
هورمون × محیط کشت	۲۸	۸۷۵/٦۸۳ **	۳۲۸/۱۰۳ **
ریزنمونه	۱	۱۳۳۲۰/٦۰۰ **	٦۷/٤۱٦ n.s
ترکیب هورمونی × ریز نمونه	۷	۱۲۷۵/٦٤۸ **	۲۹۸/۵۵۷ **
محیط کشت × ریز نمونه	٤	۱۵٤۵/٦۰۰ **	۱۵۳/٤۳۸ **
ترکیب هورمونی × محیط کشت × ریزنمونه	۲۸	۹۷۹/۵۷٦ **	۲۳۳/۲۵۹ **
خطای آزمایش	۱٦۰	۱٦۹/۹۵٤	۳۰/۰۱۲
ضریب تغییرات (٪)		۲۱/۸۸	۱۰/۳۵

**: اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح ۱٪

جدول ۳- درصد کالزایی در ساقه و برگ در محیط‌های کشت (MS، E، F، G، H) در ترکیب با اکسین و سیتوکینین

تیمارها	غلظت (mg/l)	درصد کالزایی									
		ساقه					برگ				
		MS	E	F	G	H	MS	E	F	G	H
NAA & Kin	۰/۵ + ۰/٤	۹۰	۳۳/۳۳	۲٦/٦۷	٦۰	۹۰	٤۳/۳۳	٤۰	٦٥	۷۰	٥۰
NAA & Kin	۱ + ۱	٥۰	٦٦	٥۰	٥٥	٦۰	٥٥	۱۳/۳۳	٥۰	٥۳/۳۳	٦۰
NAA & Kin	۲ + ۰/۲	٥۳/۳۳	٥٥	۷۰	۹۳/۳۳	۹۰	۳٦/٦۷	۷۳/۳۳	٤٦/٦۷	۸۳/۳۳	۲۳/۳۳
NAA & Kin	٤ + ۰/٤	٤٥	٥۳/۳۳	۷۰	٤٦/٦۷	۳٦/٦۷	۱۸/۳۳	٦٥	۷۰	۷٦/٦۷	۱۳/۳۳
2,4-D & Kin	۰/۵ + ۰/٤	۹۰	۷٦/٦۷	۸٦/٦۷	۸۰	٥٦/٦۷	٥٦/٦۷	٥٦/٦۷	٤۳/۳۳	۷۱/٦۷	٦۳/۳۳
2,4-D & Kin	۱ + ۱	٦۰	٦٦/٦۷	۸٦/٦۷	۷۰	۹٦/٦۷	۷۰	۸٥	٦٦/٦۷	٥۰	۲٥
2,4-D & Kin	۲ + ۰/۲	٥٦/٦۷	٦۰	۷٦/٦۷	۹۰	٥۰	۷۰	٥۰	۸۰	۷۰	٤٦/٦۷
2,4-D & Kin	٤ + ۰/٤	۸٦/٦۷	٦۳/۳۳	٦٦/٦۷	۸۳/۳۳	٥۳/۳۳	۲٦/٦۷	۲۰	٤۰	٦٦/٦۷	۲۰

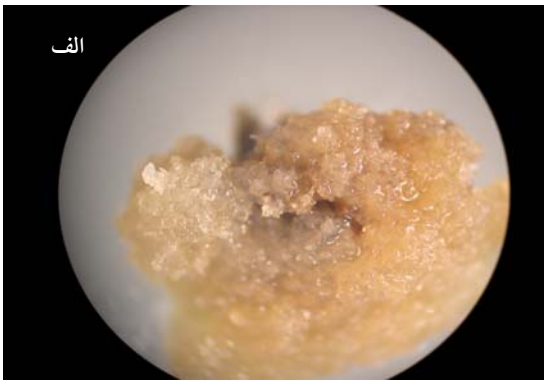
بیشترین درصد تشکیل کالوس (۹٦/٦۷٪) در تیمار هورمونی 2,4-D در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر و Kin در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر در محیط کشت H با قطعه جداکشت ساقه مشاهده شد (جدول ۳). تنظیم‌کننده رشد 2,4-D در مقایسه با NAA تأثیر بیشتری بر درصد تشکیل کالوس بر جای گذاشت. نوع قطعه جداکشت نیز بر درصد کالزایی بسیار مؤثر بود و به‌طور کلی ساقه بیشترین درصد تشکیل کالوس را با توجه به تیمارهای هورمونی و نوع محیط کشت بکار برده شده داشت.

جدول ٤- اندازه کالوس در ساقه و برگ در محیط‌های کشت (MS، E، F، G، H) در ترکیب با اکسین و سیتوکینین

تیمارها	غلظت (mg/l)	اندازه کالوس (mm^2)									
		ساقه					برگ				
		MS	E	F	G	H	MS	E	F	G	H
NAA & Kin	۰/۵ + ۰/٤	۲۰/۱۷	۲٦/۳۷	۷/۹۳	۱۲/٤۳	۲۳/۷۳	۱۳/۹۷	۳۰/۸۷	۱۷/۰۳	۱۱/۰۷	۱۸/۰۷
NAA & Kin	۱ + ۱	۱٤/۹۰	۱۷/٤۷	۱٦/٤۰	۱٤	۱۰/۰۳	۳۸/٦۰	۱۰/۸۳	۲۳/٤۳	۲٦/۲۳	۱۰/۱۷
NAA & Kin	۲ + ۰/۲	۲٦/۸۳	۹/٤	۲۰/۷۷	۲۰/٥۷	۲۰/۲۰	۳۹/٥۰	۱۰/۹۷	۸۰/٦۷	۱۳/۹۷	۲۰/۲۰
NAA & Kin	٤ + ۰/٤	۳۸/۳۷	۲۰/٦۷	۲۹/۹۷	۲۷/٥۷	۸/۱۳	۲۰/۸۷	۱۹	۲۲/۹۷	۱۸/۲۳	۱٤/۱۷
2,4-D & Kin	۰/۵ + ۰/٤	۱۷/۷۳	۱٤/۸۳	۱۹/۳۳	۱۳/۲۷	۱۸/۹۰	۱۷/۷۷	۱۲/۱۳	٦/٤	۱۸/۰۷	۲۲/۳۰
2,4-D & Kin	۱ + ۱	۱۸/۲۰	۱۲/۹۷	۲۱/۳۳	۲۲/۲۳	۱۹/٥۰	۱۲/۹۷	۲٦/۲۳	۱۱/٦۳	۱۸/۸۰	۱٥/٦۰
2,4-D & Kin	۲ + ۰/۲	۲٥/۸۰	۲٥/۲۰	۱۸/۷۳	۱٦/٦۳	۱۸/۳۳	۱۳/۸۰	۱٥/۸۰	۲۱/۸۰	۱٥/۳۷	۱۹/۰۷
2,4-D & Kin	٤ + ۰/٤	۲۱/٤۳	۲۲/٥۳	۱۲/۹۳	۹/٦٦	۱۱/۱۷	۱٦/۷۷	۲٥	۲۲/٦۰	٥/۳۳	۳/۹۳

شکل ۱ کالوس‌های القا شده بعد از ٦ هفته کشت ریزنمونه را نشان می‌دهد. از نظر ظاهر دو فرم کالوس دیده می‌شود: ۱) کالوس‌های نرم و انعطاف‌پذیر و به رنگ کرم که اغلب کالوس‌های حاصل از ساقه بودند و ۲) کالوس‌های فشرده و سفت و قهوه‌ای که این فرم کالوس در ریزنمونه برگ بیشتر دیده شد.

برگ



ساقه

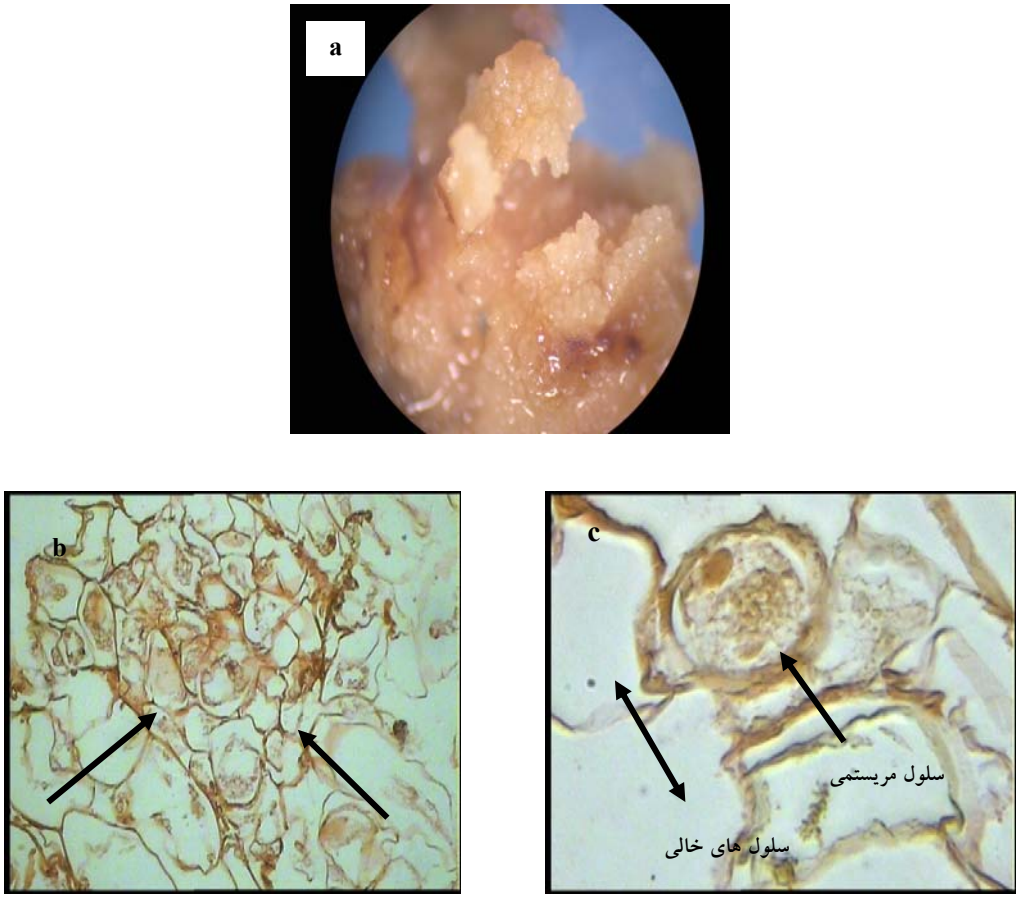
شکل ۱- کالوس‌های حاصل از ساقه و برگ

الف) کالوس ساقه نرم و کرم رنگ، ب) کالوس برگ سخت و سفت و متمایل به قهوه‌ای

نتایج حاصل از بافت‌شناسی نشان داد که کالوس‌های حاصل از ساقه دارای سلول‌های مریستمی بودند. این سلول‌های مریستمی دارای قدرت باززایی می‌باشند. البته سلول‌های مریستمی در کالوس‌هایی که از محیط کشت G با ترکیب هورمونی ٤ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D + ۰/٤ میلی‌گرم در لیتر Kin به محیط دوم انتقال داده شده بودند مشاهده شد و در سرتاسر کالوس پراکنده بودند (شکل b–۲). این سلول‌های مریستمی توسط سیتوپلاسم غلیظ و محتوی نشاسته از سلول‌های اطراف قابل تشخیص بودند. به‌نظر می‌رسد که هر کدام از سلول‌ها دارای سیتوپلاسم غلیظ و هسته بزرگترین نقطه آغازین جنین‌زایی یا ساقه‌دهی باشد (شکل C–۲).

بحث

برای القای کالوس در بیشتر گیاهان، نیاز به استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد از نوع اکسین و سیتوکینین می‌باشد. در منابع مربوط به کشت بافت گیاهان خانواده Taxaceae نیز جهت القای کالوس در قطعات جداکشت از ضرورت وجود یک منبع اکسین مانند NAA یا 2,4-D به تنهایی و یا همراه با یک منبع سیتوکینین مانند BAP، Kin در محیط کشت یاد شده است و بیشتر منابع از محیط کشت پایه MS به همراه تنظیم‌کننده رشد استفاده شده است (Kumria *et al.*, 2003؛ leelavathi *et al.*, 2004؛ Rajasekaran *et al.*, 2000؛ Trolinder & Goodin, 1987). در مطالعه انجام گرفته، جهت القای کالوس وجود اکسین ضروری بود، به‌طوری که پاسخ‌دهی به تولید کالوس در انواع محیط‌های کشت MS که فاقد هر گونه تنظیم‌کننده رشد گیاهی بودند، صفر بود. نیاز به نسبت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد جهت القای کالوس در بسیاری از گیاهان گزارش شده است (Mihaljevic *et al.*, 2002).



شکل ۲- a) سلول حاصل از ساقه، b) بزرگنمایی X ۱۰ (فلش سمت راست: ایجاد نواحی مریستمی، سلول‌هایی با سیتوپلاسم حاوی نشاسته، فلش سمت چپ: سلول‌های فاقد نشاسته در سیتوپلاسم)، c) بزرگنمایی X ٤٠ (سلول تمایز نیافته (فاقد نشاسته) و سلول مریستمی)

بررسی که بر روی القای کالوس جنین‌های بالغ و ساقه‌های جوان *T. baccata* بر روی محیط کشت MS حاوی NAA، 2,4-D و Kin انجام شده است (Mihaljevic *et al*., 2002) از نظر درصد کالزایی با نتایج حاصل از مطالعه حاضر مطابقت داشت. همچنین گزارش شده است که رشد کالوس‌ها در محیط B_5 موفق‌تر از محیط MS است و افزایش فشار اسمزی محیط با غلظت بالای ساکارز و یا غلظت بالای نمک‌های غیرآلی موجب کاهش تقسیمات سلولی می‌شود (Mihaljevic *et al*., 2002). در پژوهشی که از ریزنمونه‌های مختلف گیاه ارس کوهی (*Juniperus excelsa*) برای القای کالوس و تولید شاخساره استفاده کردند نتایج نشان داد که برای تولید شاخساره BAP مؤثرتر از Kin بوده است. القای کالوس در غلظت کم BAP مشاهده شد و با افزایش غلظت سیتوکینین بیشتر از ۱ میلی‌گرم در لیتر اثر منفی بر روی القای کالوس داشت و بین ترکیب‌های تنظیم‌کننده رشد بکار برده شده 2,4-D نسبت به NAA و IBA در محیط MS (½Nitrate) به همراه گلوتامین، بیشترین تأثیر را در

القای کالوس داشت (Salehi Shanjani, 2003) که با مطالعه حاضر همخوانی دارد. در کشت بسیاری از گونه‌های چوبی محیط کشت پایه MS یک عامل بازدارنده رشد است و می‌توان با کاهش غلظت آمونیوم و حذف کامل نیتروژن، این مشکل را حل کرد (Bonga & Aderkas, 1992). از ریزنمونه‌های ریشه، ساقه و برگ گونه‌های مختلف جنس Taxus جهت القای کالوس و تولید تاکسوئیدها استفاده شده است و نتایج نشان داده است که رشد کالوس‌های حاصل از ریشه بیشتر از ساقه و آن هم بیشتر از برگ بوده است (Parc *et al.*, 2002). در نتایج مطالعه حاضر نیز درصد کالزایی در ساقه، البته با توجه به ترکیب تنظیم‌کننده رشد و محیط کشت، بیشتر از برگ بود.

بر طبق گزارشها کاهش نیترات‌ها و کاربرد گلوتامین، درصد کالزایی و رشد کالوس را افزایش می‌دهد (Haq & Zafar, 2004). سوزنی‌برگان و دیگر گونه‌های جنگلی برای رشد خوب کالوس به هر دو نیترات و آمونیم و همچنین به گلوتامین برای تحریک تقسیم سلولی و افزایش کالوس نیاز دارند (Salehi Shanjani, 2003).

با بررسی نتایج بدست آمده گلوتامین تأثیر بسزایی در القای کالوس و اثر در تحریک رشد کالوس داشت و همچنین غلظت‌های کم تنظیم‌کننده‌های رشد روی کالزایی و اندازه کالوس نسبت به غلظت‌های بالا بسیار مؤثرتر می‌باشند و همان‌طورکه در بالا ذکر شد محیط کشت MS با غلظت نصف نمک‌های ماکرو و میکرو و میزان کمتر از حد معمول نیتروژن‌ها (KNO_3، NH_4NO_3) تأثیر قابل‌توجهی نسبت به MS پایه در دو صفت مورد بررسی داشت.

در گیاه *Taxus wallichiana* گزارش شده که بهترین رشد کالوس در محیط کشت ½WPMSH همراه با تنظیم‌کننده رشد 2,4-D توأم با BAP در ریزنمونه رویان بالغ بوده است و همچنین باززایی از کالوس‌ها در همان محیط کشت کالزایی و تیمار هورمونی البته با تغییر جزئی که میزان اکسین را کاهش و سیتوکینین را افزایش داد اتفاق افتاده است (Datta *et al.*, 2006) که با مطالعه حاضر از لحاظ نوع تنظیم‌کننده‌های رشد همخوانی دارد. محققان روی گیاه *Pinus caribaea* اظهار داشتند که تشکیل کالوس در ترکیب هورمونی اکسین و سایتوکینین اتفاق افتاد و منجر به تولید سلول‌های مریستمی شد (Akaneme & Eneobong, 2008).

معمولاً سیتوکینین‌ها به‌خصوص BAP برای باززایی مستقیم و غیرمستقیم در کاج‌ها استفاده می‌شود (Patel & Thorpe, 1984)، که این نظریه با نتیجه آزمایش ما که با افزایش سیتوکینین (Kin) و کاهش غلظت 2,4-D منجر به تولید سلول مریستمی شده که قابلیت باززا شدن خواهند داشت همخوانی دارد. بنابراین با توجه به نتایج دریافتی، می‌توان سرخدار (*T. baccata*) (گیاه چوبی) را به لیست گیاهانی که قابلیت باززایی از کالوس را دارند اضافه کرد.

منابع مورد استفاده

- طباطبایی، ب.ا.، امیدی، م. و ترکان، ش.، ۱۳۸۸. کشت بافت و سلول گیاهی. انتشارات دانشگاه تهران، تهران، ۳۶۸ صفحه.
- لسانی، م.ر.، ۱۳۷۸. سرخدار. انتشارات مؤسسه تحقیقات و جنگل‌ها و مراتع کشور، تهران، ۲۲۰ صفحه.
- نیک‌وش، ن.، عصاره، م.ح.، قربانلی، م.ل. و قمری‌زارع، ع.، ۱۳۸۵. تولید گیاهک سرخدار (*Taxus baccata*) با استفاده از کشت درون شیشه‌ای و نجات رویان. پژوهش و سازندگی، ۱۹(۲): ۳۲-۲۶.

- Akaneme, F.I. and Eneobong, E.E., 2008. Tissue culture in *Pinus caribaea* Mor. Var Hondurensis barr. and golf. II: Effect of two auxins and two cytokinins on callus growth habits and subsequent organogensis. African Journal of Biotecnology, 7(6): 757-765.
- Bonga, J.M. and aderkas, P.V., 1992. *In vitro* culture of tree. Kluwer Academic Publishers, Dordereht, 232p.
- Chee, P.P., 1996. Plant regeneration from somatic embryos of *Taxus brevifolia*. Plant Cell Reports, 16(3-4): 184-187.
- Datta, M.M. and Jha, S., 2004. Embryo culture of *Taxus wallichiana* (Zucc.). Journal of Plant Biotechnology, 6(4): 213-219.
- Datta, M.M., Majumder, A. and Jha, S., 2006. Organogensis and plant regeneration in *Taxus wallichiana* (Zucc.). Plant Cell Reports, 25(1): 11-18.
- Fett-Neto, A.G., DiCosmo, F., Reynolds, W.F. and Sakata, K., 1992. Cell culture of Taxus as a source of Taxus as a source of the neoplastic drug taxol and related taxanes. BioTechnology, 10: 1572-1575.
- Fett-Neto, A.G., Melanson, S.J., Sakata, K. and DiCosmo, F., 1993. Improved growth and taxol yield in developing calli of Taxus cuspidata by medium composition modification. BioTechnology, 11: 731-734.
- Haq, I.U. and Zafar, Y., 2004. Effect of nitrate on embryo induction efficiency in cotton (Gossypium hirsutum L.). African Journal of Biotechnology, 3(6): 319-323.
- Kumria, R., Sunnichan, V.G., Das, D.K., Gupta, S.K., Reddy, V.S., Bhatnagar, R.K. and Leelavathi, S., 2003. High-Frequency somatic embryo production and maturation into normal plants in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) through metabolic stress. Plant Cell Reports, 21(7): 635-639.
- Leelavathi, S., Sunnichan, V.G., Kumria, R., Vijaykanth, G.P., Bhatnagar, R.K. and Reddy, V.S., 2004. A simple and rapid *Agrobacterium* mediated transformation protocol for cotton (*Gossypium hirsutum* L.): Embryogenic calli as a source to generate large numbers of transgenic plants. Plant Cell Reports, 22(7): 465-470.
- Mihaljevic, S., Bjedou, 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.
- Parc, G., Canaguier, A., Lander, P., Hocquemiller, K., Chriqui, D. and Meyer, M., 2002. Production and nutrient use in suspension culture of *Taxus cuspidate* in shake flasky and a Wilson-type bioreactor. Enzyme and Microcial Technology, 19(4): 250-260.
- Patel, K.R. and Thorpe, T.A., 1984. *In vitro* differentiation of plantlets from embryonic explants of lodgepole pine (*Pinus contora Dougl*. Ex loud.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 3: 131-142.
- Rajasekaran, K., Hudspeth, R.L., Cary, J.W., Anderson, D.M. and Cleveland, T.E., 2000. High frequency Stable transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) by particle bombardment of embryogenic Cell Suspension cultures. Plant Cell Reports, 19(6): 539-545.
- Rajewski, M., Lange, S. and Hattemer, H.H., 2000. Problems of reproduction in the genetic conservation of rare tree species: The example of common yew (*T. baccata* L.). Forest snow and Landscape Research, 75: 251-266.
- Salehi Shanjani, P., 2003. Nitrogen effect on callus induction and plant regeneration of *Juniperus excelsa*. International Jornal of Agriculture and Biology, 5(4): 419-422.
- Trolinder, N.L. and Goodin, J.R., 1987. Somatic embryogenesis and plant regeneration in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). Plant Cell Reports, 6(3): 231-234.
- Wickremesinhe, E.R.M. and Arteea, R.N., 1993. Taxus callus cultures: Initiation, growth optimization, characterization and taxol production. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 35(2): 181-193.
- Zhang, C.H., Wu, J.Y. and He, G.Y., 2002. Effect of inoculums size and age on biomass growth and paclitaxel production of elicitor-treated *Taxus yunnanesis* cell cultures. Applied Microbiology and Biotechnology, 60(4): 396-402.
- Zhir, A., Maciejewska, K., Jaziri, M., Homés, J. and Vanhaelen, M., 1995. Establishment of Taxus baccata callus cultures and evaluation of taxoid production. Med Fac Landbouw Univ Ghent, 2111-2214.
- Zhong, J.J., 1995. Phosphate effect on production of ginseng saponin and polysaccharide by cell suspension cultures of Panax ginseng and Panax quinquefolium. Plant Tissue Culture and Biotechnology, 1: 75-80.

Effect of growth regulators, medium and explant on callus induction in *Taxus baccata* L.

M. Omidi[1], B. Behjat Sasan[2*], M.R. Naghavi[1], S. Kalate Jari[3] and A.R. Etminan[4]

1- Department of Agronomy and Plant Breeding, University of Tehran, Tehran, Iran
2*- Corresponding author, Department of Horticultural, Islamic Azad University, Tehran, Iran
E-mail: bahar_sasan60@Yahoo.com
3- Department of Horticultural, Islamic Azad University, Tehran, Iran
4- Department of Agronomy and Plant Breeding,Islamic Azad University, Kermanshah, Iran

Received: April 2010 Revised: June 2010 Accepted: August 2010

Abstract

Taxus baccata L. is an endangered forest tree species. Taxol is recognized as a highly effective anticancer drug. It is mainly extracted from the bark and needles of taxus. A factorial experiment was carried out on the base of completely randomized design to find the best combination of media, explants and plant regulators for callus induction in order to produce biomass taxol. In this research three factors were used as follows: MS medium and 4-modified MS media, which differ in salts and nitrogen construction and glutamine, two plant regulators (NAA, 2, 4-D and Kin), and two explants (stem and leaf). Following two months of callus, the tissue was transferred to ½ MS supplemented with 0.4 mg/l 2, 4-D+ 3mg/l Kin. The maximum percentage of callus induction (96.97%) was obtained from stem segments on ½ MS (475 mg/l KNO_3, 412.5 mg/l NH_4NO_3) medium in combination with glutamine (100 mg/l) and containing 2,4-D (1mg/l) + Kin (1mg/l). The best response (80.67 mm^2) was observed from leaf on ½ MS in combination with glutamine (100 mg/l) and containing NAA (2mg/l)+ Kin (0.2 mg/l) for callus size. Stem callus showed meristematic cells. According to the results, glutamine showed significant effects on callus induction and growth. The effect of low concentrations of growth regulators on callus induction and callus size was also more than that of high concentrations of growth regulators.

Key words: *Taxus baccata* L., growth regulators, callus, MS.