زیست‌شناسی گیاهی ایران، سال هفتم، شماره بیست و سوم، بهار ۱۳۹۴، صفحه ۴۱-۵۰
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۳/۰۲/۰۳
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۹۳/۰۴/۱۶
تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۳/۱۰/۲۲

بررسی اثر غلظت‌های مختلف کینتین و 2,4-D بر ایجاد و رشد کالوس در کشت رویان گیاه سرخدار (*Taxus baccata* L.)

سید جواد داورپناه [۱] *، مهرداد لاهوتی [۲] و رامین کریمیان [۱]
[۱] مرکز تحقیقات زیست فناوری کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران
[۲] گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

چکیده

گیاه سرخدار (*Taxus baccata* L.) منبع اصلی پاکلی تاکسول است که در درمان سرطان زهدان و پستان به کار می‌رود. با توجه به این که تولید این دارو نیازمند قطع درختان سرخدار است و این گونه در خطر انقراض است ضروری است سیستم کشت بافت و ریزازدیادی آن بهینه‌سازی شود. در این راستا، برای تولید کالوس تأثیر ۱۶ ترکیب مختلف از دو تنظیم‌کننده رشد 2,4-D (۰، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر) و کینتین (۰، ۰/۱، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر) بر کال‌زایی و معیارهای رشد کالوس درکشت رویان سرخدار ایرانی بررسی شد. مشخص شد بهترین ترکیب مؤثر بر رشد ترکیب ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر کینتین است و القای کالوس با افزایش غلظت 2,4-D به طور صعودی افزایش می‌یابد. با این حال، افزایش غلظت کینتین در محدوده غلظت ۰/۵ تا ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر موجب افزایش نرخ کال‌زایی می‌شود. با این حال، کینتین اثر مثبت چندانی در رشد کالوس نشان نمی‌دهد و به نظر می‌رسد نیازی به حضور آن جهت رشد کالوس نباشد.

واژه‌های کلیدی: سرخدار، رویان، کالوس، ۲ و ۴- دی کلروفنوکسی استیک اسید (2,4-D)، کینتین

مقدمه

گیاه سرخدار با نام علمی *Taxus baccata* L. تنها جنس از تیره Taxaceae و دارای کاربرد اقتصادی است (Datta and Jha, 2001). پس از کشف پاکلی تاکسول در سرخدار در سال ۱۹۷۱ میلادی (Dewick, 2009) و افزایش ناگهانی تقاضا و فروش آن در اواخر دهه ۹۰ میلادی برای درمان سرطان‌های رحم و پستان (Mastropaolo *et al*., 1995؛ Phisalaphong and Linden, 1999؛ Jennewein and Croteau, 2001) به علت برداشت زیاد از ذخایر آن، این گیاه در معرض انقراض قرار گرفته است (Stierle *et al*., 1995). با توجه به محدودیت منابع و حفاظت شده بودن این گیاه در ایران باید به دنبال راهکارهای زیست فناورانه جهت تولید پاکلی تاکسول بود به ویژه آن که تولید آن با روش شیمیایی از

*نویسنده مسؤول: نشانی پست الکترونیک: davarpanah@bmsu.ac.ir، شماره تماس: ۰۲۱۸۲۴۸۲۵۷۳

نظر اقتصادی عملا امکان‌پذیر نیست (Hezari and Croteau, 1997؛ Hezari *et al*., 1997؛ Walker *et al*., 2002). کشت بافت گیاهی یکی ازمنابع پایدار برای تولید ترکیبات ضد سرطان است و تولید ترکیبات ضد سرطان توسط کشت کالوس شماری از گیاهان به اثبات رسیده است (Wickremesinhe and Arteca, 1993). بنابراین نخستین گام برای تولید پاکلی تاکسول می‌تواند کشت بافت سرخدار باشد. کالوس های سرده سرخدار با استفاده از جدا کشت‌هایی از بافت‌های مختلف از جمله: پوست، شاخه، اجزای دانه، ساقه‌های جوان و برگ‌ها القا شده است (Wickremesinhe and Arteca, 1993؛ Son *et al*., 1999؛ Agrawal *et al*., 2003). از این میان ساقه‌ها، بهترین منبع جداکشت‌ها بوده‌اند و کالوس‌های حاصل از آن رشد سریعی داشته‌اند. ترکیب محیط مهم ترین بخش در القای کالوس، رشد یاخته و همچنین تشکیل متابولیت در کشت بافت و یاخته گیاهی است (Mihaljevic *et al*., 2002؛ Bruňáková *et al*., 2004؛ Hussain *et al*., 2013). اجزا، غلظت و ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی نقش مهمی در القا کالوس دارد و عموماً محیط دارای ۱ تا ۲ میلی‌گرم بر لیتر ۲ و ۴- دی کلروفنوکسی استیک اسید (2,4-D) یا ترکیب آن با سایر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی دارای این ویژگی بوده است. تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی نظیر کینتین و نفتالن استیک اسید (NAA) نیز استفاده می‌شوند (Furmanowa *et al*., 1997؛ Ashrafi *et al*., 2010). در بررسی تأثیر نوع و غلظت قندها و ترکیب هورمونی بر کال‌زایی در سرخدار معمولی مشخص شده است که در محیط B5 گامبورگ از بین ترکیب‌های مختلف (۰، ۰/۵، ۱، ۲ و ۴ میلی‌گرم بر لیتر) 2,4-D و NAA (۰، ۰/۵، ۱، ۲ و ۴ میلی‌گرم بر لیتر) و (۰، ۰/۱، ۰/۲، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر) کینتین، ترکیب ۱ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر کینتین بهترین ترکیب هورمونی برای کال‌زایی بوده است (Wickremesinhe and Arteca, 1993). در مقایسه 2,4-D و NAA مشخص شد که در برگ‌ها 2,4-D بهتر از NAA عمل می‌کند اما در ساقه‌ها بین این دو تفاوت چندانی مشاهده نشده است (Qorbanli and Delavar, 2001). غلظت‌های اندک کینتین (۰/۱ و ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر) بهتر از غلظت‌های بالای کینتین (۰/۵ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر) عمل می‌کند (Qorbanli and Delavar, 2001). پیشتر نشان داده شده است که در محیط دارای ۲ میلی‌گرم بر لیتر کینتین و غلظت‌های مختلف اکسین یا هیچ گونه کال‌زایی در جداکشت سرخدار صورت نمی‌گیرد یا میزان کالوس تولید شده بسیار اندک است اما در محیط‌های حاوی ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر کینتین درصد کال‌زایی بسیار بالا است (Wickremesinhe and Arteca, 1993). در این کشت‌ها هیچ گونه اندام‌زایی مشاهده نشده است که علت آن ممکن است در ارتباط با استفاده از 2,4-D یا NAA باشد زیرا گزارش شده است که این هورمون‌ها موجب توقف اندام‌زایی و تمایزیابی بافت‌ها شده، کال‌زایی را تسریع می‌کند (Qorbanli and Delavar, 2001). در سرخدار هیمالیایی گزارش شده است محیط MS پایه حاوی ۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر کینتین بهترین ترکیب هورمونی برای رشد کالوس ساقه بوده است و برای کالوس برگ ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر کینتین و ۳ میلی‌گرم در لیتر NAA ترکیب هورمونی بهینه بوده

است (Datta and Jha, 2001). در *Taxus × media* Var. Hatfieldii مشخص شد پیکلورام در محیط White-Rangaswamy (WR) با غلظت ۱۰ میکرومولار رشد کالوس را تا ۵/۸ برابر افزایش داده است ضمن آن که بر تولید تاکسان‌ها تأثیری نداشته است (Furmanowa *et al.*, 1977).

در بررسی اثر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی و غلظت آهن روی جداکشت‌های سرشاخه و رویان *Taxus baccata* در محیط MS حاوی ۳ میلی‌گرم بر لیتر NAA و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر کینتین به همراه ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آرژنین و ۲/۵ درصد سوکروز، در ۸۶/۴ درصد جدا کشت‌های رویان و ۱۰۰ درصد جداکشت‌های شاخه جوان کالوس القا شد که توان رشد این کالوس های القا شده در پاسخ به توان ژنتیکی و ترکیب محیط کشت تغییر می‌کند. در رویان های بالغ ۱۰۰ درصد القا کالوس در محیط MS حاوی ۳ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D، ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر کینتین و ۲ درصد سوکروز به دست آمده است. بهترین القای کالوس های به دست آمده از ساقه به میزان ۱۰۰ درصد در محیط MS حاوی ۳ میلی‌گرم بر لیتر NAA و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر کینتین و ۲/۵ درصد سوکروز رخ داد. رویان‌های حاصل از تخم بازدهی بالایی برای القای کالوس دارند و دودمان‌های کالوس حاصل از رویان رشد سریعی دارند. همچنین، رویان های حاصل از تخم به دلیل ناهمسان بودن شمار کافی از دودمان‌های متفاوت یاخته‌ای حتی در یک درخت فراهم می‌کنند که به دلیل توان رشد و میزان پاکلی تاکسول متنوع می‌توانند منبعی برای کال‌زایی و کشت یاخته‌ای فراهم کنند (Mihaljevic *et al.*, 2002).

با توجه به این موارد، ترکیبات هورمونی متفاوت، محیط‌های گوناگون و قندهای متفاوت برای القا و رشد کالوس برای گونه‌های متفاوت سرخدار استفاده شده است. علاوه بر تفاوت بین گونه‌ها درون هر گونه نیز واریته‌های گوناگون نیز متفاوتند و پاسخ هر ژنوتیپ به ترکیبات گوناگون محیط رشد می‌تواند متفاوت باشد (Bruňáková *et al.*, 2004). بنابراین، در پژوهش حاضر، تأثیر غلظت های مختلف 2,4-D و کینتین بر کال زایی و رشد کالوس به دست آمده از کشت رویان سرخدار ایرانی مطالعه شد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری از جنگل دول آرام، شهرستان علی‌آباد کتول در دو نقطه سنگ سوراخ با ارتفاع ۱۲۵۰ متر و جنی دره در محدوده ارتفاعی ۱۴۸۰ تا ۱۵۰۰ متر از سطح دریا انجام گرفت.بذرهای جمع‌آوری شده متعلق به درختانی با طول عمر حدودا ۱۰۰ سال بودند. برای تهیه محیط کشت، نمک‌های ماکرو، میکرو و آهن بر اساس ترکیب MS تهیه شد (Murashige and Skoog, 1962)، سپس ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر آسکوربیک اسید، ۲ میلی‌گرم بر لیتر گلیسین و ۳۰ گرم بر لیتر سوکروز افزوده شد. 2,4-D در چهار سطح (۰، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر) و کینتین در چهار سطح (۰، ۰/۱، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر) به محیط کشت اضافه شد. بدین ترتیب بر اساس جدول مربع لاتین ۱۶ تیمار از ترکیب این دو تنظیم کننده رشد گیاهی جهت بررسی اثر آنها بر کال زایی در کشت رویان سرخدار استفاده شد. اسیدیته محیط با NaOH ۰/۱ نرمال در حدود ۰/۰۵ ± ۵/۸ تنظیم شد. مقدار فیتوآگار ۷ گرم بر لیتر بود.

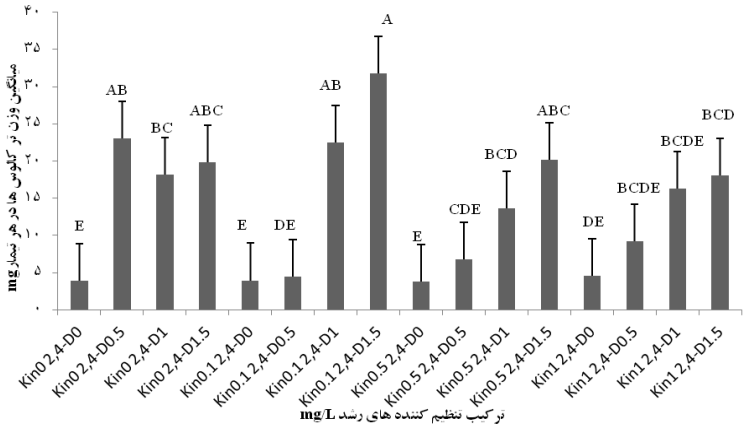
بذرهای سرخدار پس از جداکردن آریل، با آب لوله‌کشی شستشو شد، خشک شد و برای کشت ۱ تا ۲ دقیقه در اتانول ۷۰ درصد همزده شد، سپس از اتانول جدا شدند. پس از تبخیر اتانول پوست بذر شکسته و از اندوسپرم جدا گردید. رویان از اندوسپرم جدا شد و در هر ظرف ویال حاوی ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت، ۳ رویان و در مجموع ۱۵ رویان در ۵ تکرار در هر تیمار کشت شد. درب کلیه ظروف با ورقه آلومینیوم بسته شد، سپس در تاریکی و دمای ۲۴ درجه سانتیگراد به مدت ۴۵ روز نگهداری شدند. پس از این مدت برداشت کالوس‌ها جهت سنجش وزن تر و خشک انجام شد.

نرخ کال‌زایی با توجه به نسبت جداکشت‌های کال‌زا به تعداد کل جدا کشت‌ها در هر تیمار محاسبه شد و در نرم‌افزار Excel به آرک سینوس تبدیل شد. آنالیز واریانس در نرم‌افزار JMP® و آزمون دانکن در نرم‌افزار MSTAT-C با دقت ۹۵ درصد انجام گرفت. نتایج هر سه در نرم‌افزار JMP® بر اساس آزمون فاکتوریل با دقت ۹۵ درصد تحلیل آماری شد. اختلاف میانگین‌ها با آزمون دانکن با دقت ۹۵ درصد در MSTAT-C تحت DOS تحلیل و گراف‌ها در Excel رسم شد. گراف اثر عوامل تیمار روی شاخص‌ها توسط MSTAT-C تحت ویندوز و / یا JMP® رسم شد.

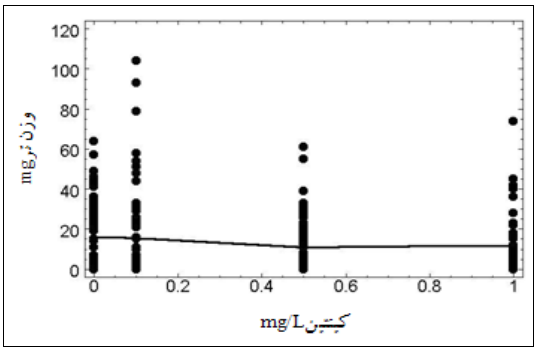
نتایج

در بررسی نتایج حاصل از وزن تر کالوس‌ها مشخص شد که وزن تر تنها تحت تأثیر 2,4-D قرار گرفته است و کینتین و ترکیب 2,4-D و کینتین اثر معنی‌داری نداشته است (شکل ۱).

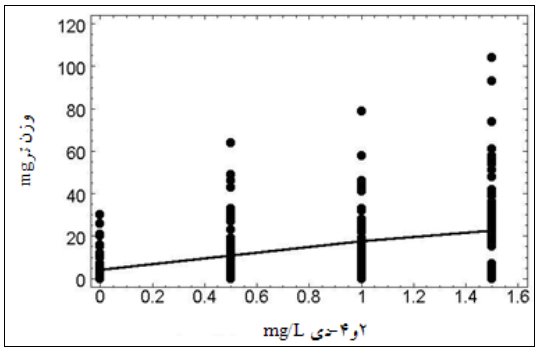
در بررسی نمودار اثر غلظت‌های مختلف 2,4-D و کینتین بر وزن تر کالوس‌ها در پاسخ به کینتین در محدوده ۰ تا ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر هیچ تغییری نشان نداد وپس از آن با افزایش غلظت تا ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر وزن تر کاهش نشان داد وپس از این غلظت تا ۱ میلی‌گرم بر لیتر ثابت ماند (شکل ۲)، اما 2,4-D رشدی خطی نشان داد و بالاترین وزن تر در محیط حاوی ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D حاصل شد (شکل ۳).



شکل ۱- رابطه وزن تر کالوس حاصل از رویان *T. baccata* و ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشد 2,4-D و کینتین. مقادیر میانگین ۵ تکرار ±SE است. در هر یک از مجموعه تیمارهای 2,4-D و کینتین حروف مشترک بیانگر نبود اختلاف معنی‌دار در سطح P<0.05 است.



شکل ۲- اثر کینتین بر وزن تر کالوس حاصل از کشت رویان *T. baccata*



شکل ۳- اثر 2,4-D بر وزن تر کالوس حاصل از کشت رویان *T. baccata*

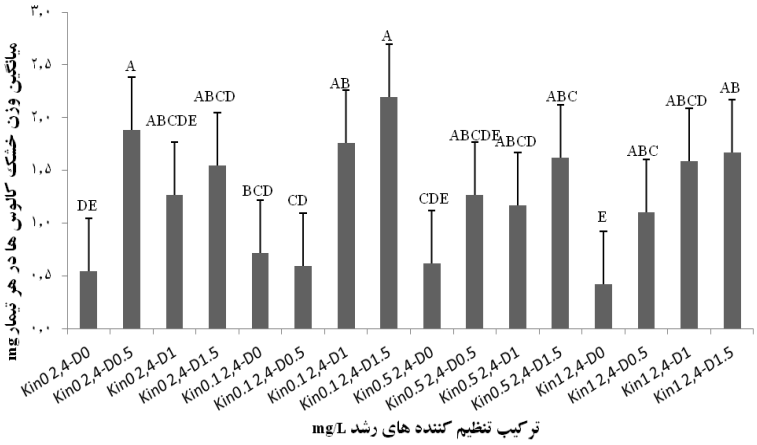
همچنین مشخص شد محیط دارای ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D+ ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر کینتین بهترین ترکیب هورمونی را از نظر افزایش وزن تر کالوس‌های ایجاد شده داشته است اما تفاوتی معنی‌دار بین این ترکیب و ترکیب‌های: ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D+ ۰ میلی‌گرم بر لیتر کینتین، ۱ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D+ ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر کینتین، ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D+ ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر کینتین، ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D+ ۰ میلی‌گرم بر لیتر کینتین مشاهده نشد. ضعیف‌ترین نتایج متعلق به نسبت بالای کینتین به 2,4-D بود. مشخص شد که در محیط‌های حاوی غلظت اندک کینتین و بالای 2,4-D کالوس‌ها رشدی سریعی دارند و ساختار کالوس نرم و سست است اما در محیط دارای غلظت کینتین بالا کالوس سفت است. در مواردی که کالوس ایجاد نشد رویان‌ها سفید باقی ماندند و در غلظت کم کینتین به نظر می‌رسید که رویان‌ها اندکی رشد یافته و حجیم شده‌اند.

در غلظت صفر تنظیم‌کننده‌های رشد انتظار ایجاد کالوس نمی‌رفت اما با طولانی شدن زمان تاریکی پس از رشد پیش‌رسی که رویان‌ها در محیط بدون هورمون نشان دادند کال‌زایی در آنها القا شد. در بررسی اثر تنظیم‌کننده‌ها و ترکیب آنها بر وزن خشک کالوس بر اساس آزمون فاکتوریل نتایج اثر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی 2,4-D و کینتین بر وزن تر تأیید شد و 2,4-D تنها عامل مؤثر بر وزن خشک کالوس‌ها شناخته شد (شکل‌های ۴ و ۵).

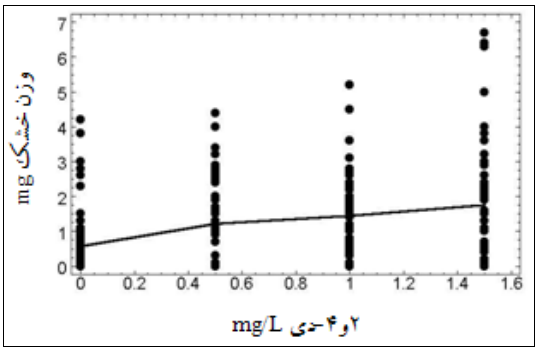
همراه با افزایش غلظت کینتین، تغییرات وزن خشک کالوس روندی کاهشی و بسیار آهسته نشان داد (شکل ۶).

روند اثر 2,4-D بر وزن خشک کالوس تا غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر افزایش سریع نشان داد و در غلظت‌های بالاتر، اندکی از سرعت آن کاسته شد اما روند افزایش خود را به خوبی حفظ کرد.

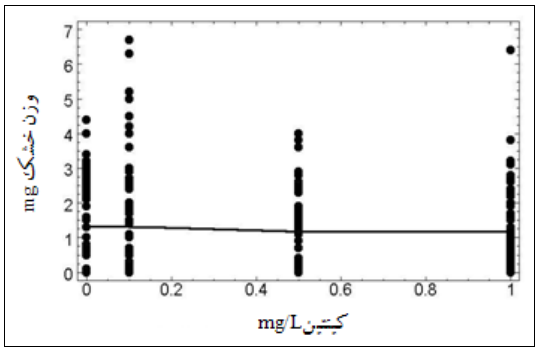
در ترکیب دو تنظیم‌کننده 2,4-D و کینتین، بر اساس آزمون دانکن ترکیب ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D+ ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر کینتین و ترکیب ۲ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D + ۰ میلی‌گرم بر لیتر کینتین بهترین نتایج به دست آمد، هر چند اختلاف معنی‌داری بین آنها و ۹ ترکیب محیط دیگر مشاهده نشد. ضعیف‌ترین نتیجه در ترکیب ۰ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D+ ۱ میلی‌گرم بر لیتر کینتین به دست آمد وتفاوت معنی‌دار بین آن و ۸ ترکیب دیگر مشاهده نشد. در بررسی اثر عوامل هورمونی بر نرخ کال‌زایی رویان سرخدار مشخص شد که 2,4-D و کینتین هر دو مؤثر بوده‌اند اما ترکیب این دو تأثیر معنی‌داری بر کال‌زایی نداشته است (شکل ۷).



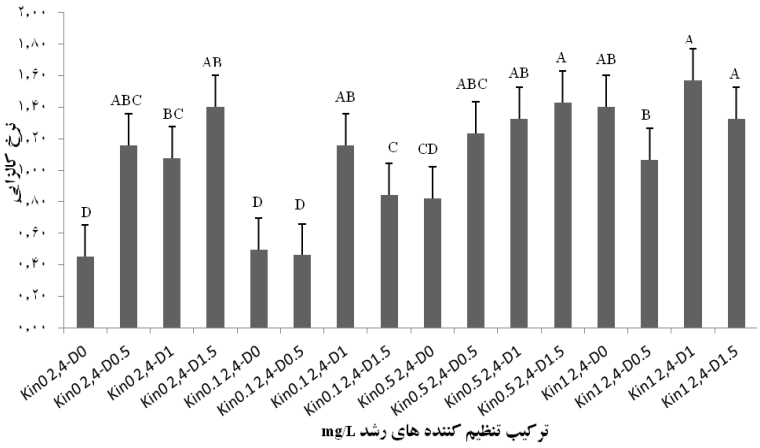
شکل ۴- رابطه وزن خشک کالوس حاصل از رویان *T. baccata* و ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشد 2,4-D و کینتین. مقادیر میانگین ۵ تکرار ± SE است. در هر یک از مجموعه تیمارهای 2,4-D و کینتین حروف مشترک بیانگر نبود اختلاف معنی‌دار در سطح P<0.05 است.



شکل ۵- اثر 2,4-D بر وزن خشک کالوس حاصل از کشت رویان *T. baccata*



شکل ۶- اثر کینتین بر وزن خشک کالوس حاصل از کشت رویان *T. baccata*

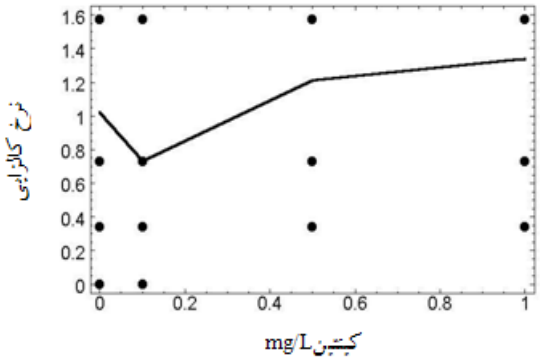


شکل ۷- نرخ کال‌زایی رویان *T. baccata* و ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشد 2,4-D و کینتین. مقادیر میانگین ۵ تکرار ±SE است. در هر یک از مجموعه تیمارهای 2,4-D و کینتین حروف مشترک بیانگر نبود اختلاف معنی‌دار در سطح P<0.05 است.

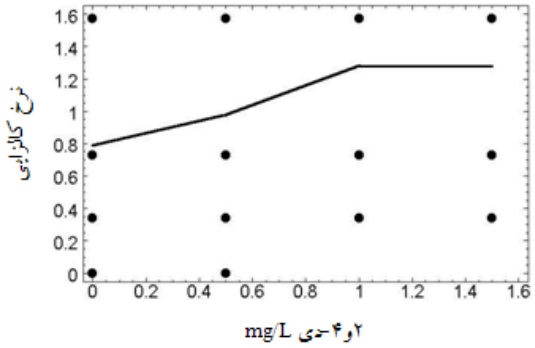
در بررسی اثر کینتین مشخص شد که این تنظیم‌کننده در محدوده غلظت ۰ تا ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر تأثیر معنی‌داری بر نرخ کال‌زایی ندارد اما پس از آن روندی افزایشی را در پیش می‌گیرد به طوری که در غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر بالاترین نرخ کال‌زایی مشاهده می‌شود (شکل ۸).

در بررسی اثر 2,4-D مشخص شد که این تنظیم‌کننده رشد تا غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر اثر افزایشی بر نرخ کال‌زایی دارد و پس از آن تا غلظت ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر نرخ کال‌زایی تقریباً ثابت می‌شود (شکل ۹).

همچنین مشخص شد بیشترین نرخ کال‌زایی در ترکیب ۱ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D + ۱ میلی‌گرم بر لیتر کینتین رخ داده است که با نتایج این دو تنظیم‌کننده رشد گیاهی به تنهایی انطباق دارد. اما از نظر آماری بین این ترکیب و ۸ ترکیب دیگر تفاوت قابل توجهی مشاهده نشد. ضعیف‌ترین نتایج به ترتیب در ترکیب‌های: ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D + ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر کینتین و ۰ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D + ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر کینتین مشاهده شد اما در نرخ کال‌زایی بین آنها تفاوت معنی‌داری وجود نداشت.



شکل ۸- اثر کینتین بر نرخ کال‌زایی در کشت رویان *T. baccata*



شکل ۹- اثر 2,4-D بر نرخ کال‌زایی در کشت رویان *T. baccata*

بحث

در بررسی اثر ۱۶ تیمار ترکیب 2,4-D و کینتین بر وزن تر، خشک و نرخ کال‌زایی در کالوس‌های حاصل از کشت رویان *Taxus baccata* مشخص شد که 2,4-D بر هر سه عامل اثر مثبت داشته است و بهترین نتایج در بیشترین غلظت آن ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر به دست آمد. گزارش شده است که در *T. baccata* غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D بهترین غلظت برای تحریک کال‌زایی در محیط B5 بوده است (Qorbanli and Delavar, 2001). البته در محیط‌های مختلف نتایج گوناگونی به دست آمده است و بهترین غلظت ۱ تا ۲ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D به تنهایی یا ترکیب آن با سایر تنظیم‌کننده‌های رشد برای کال‌زایی و رشد کالوس گزارش شده است (Malik *et al.*, 2011). همچنین در محیط MS، بهترین کال‌زایی در جداکشت‌های سر شاخه *T. baccata* در غلظت‌های ۲ و ۳ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D گزارش شده است (Mihaljevic *et al.*, 2002) در حالی که در غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D در *T. baccata* بیش از ۷۰ درصد جداکشت‌ها تولید کالوس نموده‌اند و با افزایش

آن به ۲ میلی‌گرم بر لیتر نرخ کال‌زایی به کمتر از ۷۵ درصد کاهش یافته است. با وجود این، در سرخدار اقیانوس آرام نرخ کال زایی در محدوده بالاتر از ۷۵ درصد در هر دو غلظت ثابت مانده است (Wickremesinhe and Arteca, 1993). با توجه به نمودار اثر اکسین می‌توان انتظار داشت که غلظت‌های بالاتر 2,4-D تا ۲ میلی گرم بر لیتر و بیشتر باعث افزایش قابل توجهی در نرخ کال‌زایی و وزن تر و خشک کالوس‌ها بشود. با این حال گزارش شده است که غلظت‌های ۱ میلی گرم بر لیتر 2,4-D و ۰/۱ میلی گرم بر لیتر کینتین بهترین ترکیب برای رشد کالوس سرخدار است (Monacelli *et al*., 1994).

کینتین هیچ تأثیر معنی داری بر وزن تر و خشک نداشته است و حتی افزایش غلظت آن به ۰/۵ میلی گرم بر لیتر باعث کاهش وزن تر شده است، اما موجب افزایش نرخ کال زایی شد. در رویان گندم یک پروتئین خاص رویان با تمایل اتصال به سیتوکینین گزارش شده است (Moore, 1989) شاید وجود گیرنده احتمالی سیتوکینین در سطح رویان سرخدار و اتصال به کینتین باعث تحریک موقتی سیتوکنیز به ویژه در غلظت بالای کینتین شده است که پس از اشباع گیرنده‌ها این تحریک قطع شده و غلظت بالای کینتین در ادامه رشد کالوس بی‌تأثیر بوده است؛ بنابراین افزایش وزن تر و خشک مشاهده نشده است. مشخص شد که ترکیب 2,4-D و کینتین بر وزن تر، خشک و نرخ کال زایی بی‌تأثیر بوده است. بهترین ترکیب مؤثر بر وزن تر و خشک ۱/۵ میلی گرم بر لیتر 2,4-D و ۰/۱ میلی گرم بر لیتر کینتین است. شاید اختلاف در نتایج مربوط به اثر کینتین به علت ناهمسان بودن بافت‌های رویان و وجود مراکز مریستمی متفاوت در دو انتهای رویان با پاسخ‌های متفاوت به غلظت‌های متغیر کینتین باشد.

در آزمون فاکتوریل با دقت ۹۵ درصد مشخص شد که وزن تر تحت تأثیر تنها 2,4-D قرار گرفته است وکینتین اثری معنی دار نداشته است. در بررسی نمودار اثر این عوامل کینتین در محدوده ۰ تا ۰/۱ میلی گرم بر لیتر هیچ تغییری نشان نداد وپس از آن با افزایش غلظت تا ۰/۵ میلی گرم بر لیتر وزن تر کاهش نشان داد و پس از این غلظت تا ۱ میلی گرم بر لیتر ثابت ماند، اما در مورد 2,4-D رشد خطی نشان داد و بالاترین وزن تر حاصل در غلظت ۱/۵ میلی گرم بر لیتر بود. ترکیب 2,4-D و کینتین در این آزمایش مشخص می کند اثر بازدارنده کینتین بر اثر تحریک کننده 2,4-D چیره شده است.

در آزمون دانکن با رتبه‌بندی میانگین تیمارها مشخص شد که محیط دارای ۱/۵ میلی گرم بر لیتر 2,4-D و ۰/۱ میلی گرم بر لیتر کینتین بهترین ترکیب هورمونی را داشته است. ضعیف ترین نتایج متعلق به غلظت های صفر دو تنظیم کننده رشد یا نسبت بالای کینتین به 2,4-D به ویژه غلظت صفر 2,4-D بود.

در بررسی اثر تنظیم‌کننده‌ها و ترکیب آنها بر وزن خشک کالوس طبق آزمون فاکتوریل نتایج وزن تر تأیید شد و 2,4-D تنها عامل مؤثر بر وزن خشک کالوس‌ها شناخته شد. در بررسی اثر این عوامل، کینتین روندی کاهشی و بسیار آهسته در تغییرات وزن خشک کالوس همراه با افزایش غلظت نشان داد. روند اثر 2,4-D تا غلظت ۰/۵ میلی گرم بر لیتر افزایشی سریع نشان داد و پس از آن اندکی از سرعت آن کاسته شد اما روند افزایش خود را به خوبی حفظ کرد.

2,4-D و کینتین هر دو بر تغییرات نرخ کال‌زایی رویان سرخدار مؤثر بودند. در 2,4-D این عامل تا غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر اثر افزایشی نشان می‌دهد و پس از آن تا غلظت ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر تقریباً ثابت می‌شود.

بیشترین نرخ کال‌زایی در ترکیب ۱ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D + ۱ میلی‌گرم بر لیتر کینتین رخ داده است که با نتایج دو عامل به تنهایی انطباق دارد. با توجه به نتایج دیگران به نظر می‌رسد با افزایش غلظت کینتین لازم است که میزان 2,4-D نیز برای افزایش نرخ کال‌زایی افزایش یابد برای مثال، نرخ کال‌زایی در کشت رویان *T. baccata* در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر کینتین در حالی به ۱۰۰ درصد می‌رسد که غلظت 2,4-D به ۳ میلی‌گرم بر لیتر افزایش یابد (Mihaljevic *et al*., 2002). این در حالی است که جهت رشد بهتر کالوس غلظت کمتر کینتین (۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر) مورد نیاز است (Monacelli *et al*., 1994؛ Datta and Jha, 2001). به بیان دیگر، نسبت بهینه از این دو تنظیم کننده رشد برای تشکیل کالوس مورد نیاز است. در بررسی اثر ۱۶ تیمار ترکیب 2,4-D و کینتین بر وزن تر، خشک و نرخ کال‌زایی در کالوس‌های حاصل از کشت رویان سرخدار معمولی مشخص شد که 2,4-D بر هر سه عامل اثر مثبت داشته است و بهترین نتایج در بیشترین غلظت آن ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر به دست آمده است.

سپاسگزاری

نگارندگان از همکاری صمیمانه اداره کل محیط زیست استان گلستان و اداره محیط زیست شهرستان علی‌آباد کتول به ویژه محیط‌بانان پاسگاه محیط‌بانی سیاه رودبار تشکر و قدردانی می‌نمایند.

منابع

Agrawal, S. Banerjee, S. Chattopadhyay, S. Shashidhar, K. V. Gupta, S. K. and Kumar, S. (2003) Synthesis of (+) catechin penta-acetate by callus culture of Himalayan yew, *Taxus wallichiana* Zucc. Indian Journal of Biotechnology 2(2): 264-267.

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

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.

Datta, M. M. and Jha, S. (2001) Some observation on Himalayan yew: *Taxus wallichiana*. Journal of Tropical Medicinal Plants 2(2): 245-251.

Dewick, P. M. (2009) Medicinal natural products: a biosynthetic approach. 3rd edition, John Wiley & Sons, Inc., Chichester.

Furmanowa, M., Glowniak, K., Syklowska-Baraneck, K., Zgorka, G. and Jozefczyk, A. (1997) Effect of picloram and methyl jasmonate on growth and taxane accumulation in callus cultures of *Taxus* × *media* var. *Hatfieldii*. Plant, Cell, Tissue and Organ Culture 49(1): 75-79.

Hezari, M. and Croteau, R. (1997) Taxol biosynthesis: an update. Planta Medica 63(4): 291-295.

Hezari, M., Ketchum, R. E. B., Gibson, D. M. and Croteau, R. (1997) Taxol production and taxadiene

synthase activity in *Taxus canadensis* cell suspension cultures. Archives of Biochemistry and Biophysics 337(2): 185-190.

Hussain, A., Qarshi, I. A., Nazir, H., Ullah, I., Rashid, M. and Shinwari, Z. K. (2013) *In vitro* callogenesis and organogenesis in *Taxus wallichiana* zucc. the Himalayan yew. Pakistan Journal of Botany 45(5): 1755-1759.

Jennewein, S. and Croteau, R. (2001) Taxol: biosynthesis, molecular genetics and biotechnological applications. Applied Microbiology and Biotechnology 57(1-2): 13-19.

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.

Mastropaolo, D., Camerman, A., Lou, Y., Breyer, G. D. and Camerman, N. (1995) Crystal and molecular structure of paclitaxel (taxol). Proceeding of Natural Academy of Science USA 92(15): 6920-6924.

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

Monacelli, B., Pasqua, G., Cuteri, A. ,Varusio, A., Botta, B., Delle Monache, G. and Scurria, R. (1994) Factors affecting growth in callus cultures of *Taxus baccata* L. (Taxaceae). Giornale Botanico Italiano 128(1): 331.

Moore, T. C. (1989) Biochemistry and physiology of plant hormones. Springer-Verlag, New York.

Murashige, T. and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bio-assays with Tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15(3): 473-497.

Phisalaphong, M. A. and Linden, J. C. (1999) Kinetic studies of paclitaxel production by *Taxus canadensis* cultures in batch and semicontinuous with total cell recycle. Biotechnology Progress 15(6): 1072-1077.

Qorbanli, M. and Delavar, K. (2001) Study of effects of sugar type and concentration on taxol production in tissue culture if the yew *Taxus baccata* L. Journal of Agricultural Science of Iran 32: 575-583 (in Persian).

Son, S. H., Choi, S. M., Choi, K. B., Lee, Y. H., Lee, D. S., Choi, M. S. and Park, Y. G. (1999) Selection and proliferation of rapid growing cell lines from embryo derived cell cultures of yew tree (*Taxus cuspidata* Sieb. et Zucc). Biotechnology and Bioprocess Engineering 4(2): 112-118.

Stierle, A., Strobel, G., Stierle, D., Grothaus, P. and Bignami, G.(1995) The search for a taxol-producing microorganism among the endophytic fungi of the pacific yew, *Taxus brevifolia*. Journal of Natural Products 58(9): 1315-1324.

Walker, K., Long, R. and Croteau, R. (2002) The final acylation step in taxol biosynthesis: cloning of taxol C-13 side-chain N-benzoyltransfrases. Proceeding of Natural Academy of Science, USA 99(14): 9166-9171.

Wickremesinhe, E. R. M. and Arteca, R. N. (1993) Taxus callus cultures: initiation, growth optimization, characterization and taxol production. Plant, Cell, Tissue and Organ Culture 35(2): 181-193.

Study of callus initiation and growth criteria at different concentrations of 2,4-D and kinetin in *Taxus baccata* L. embryo culture

Seyed Javad Davarpanah [1]*, Mehrdad Lahouti [2] and Ramin Karimian [1]

[1] Applied Biotechnology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[2] Department of Biology, Faculty of Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

Abstract
Taxus baccata L. is the main and almost the sole source of paclitaxel, which is an anti neoplastic agent and is used as a cure for treatment of breast and ovary cancer. Since production of this drug is almost a destructive process and yew is an endangered plant, it is required to optimize its tissue culture and micropropagation system. In order to produce embryo derived callus 16 combinations of two plant growth regulators; 2,4-D (0, 0.5, 1 and 1.5 mg/L) and Kinetin (0, 0.1, 0.5 and 1 mg/L) were used to study its effects on callus formation and growth in Taxus baccata. It was determined that 1.5 mg/L 2,4-D + 0.1 mg/L kinetin was the best combination for callus growth. Increasing 2,4-D concentration, however, promoted callogenesis while kinetin only in a narrow range had positive effect on callus initiation.
Key words: *Taxus baccata* L., Embryo, Callus, 2,4-D, Kinetin

* Corresponding Author: davarpanah@bmsu.ac.ir