اثر ریزنمونه و محیط کشت بر تولید گیاه زینتی – دارویی سرخدار و تولید بذر مصنوعی *Taxus bacat* L

شایان منتظری[1*]، فردوس رحیمی [2] و رضا یعقوبی ساردو[3]

*نویسنده مسئول: shayanmontazery@yahoo.com

چکیده

گیاه زینتی دارویی سرخدار *Taxus bacat* L از گیاهان رو به انقراض و دارای زادآوری بسیار طبیعی اندک می باشد. اهمیت گونه های متعلق به این جنس *taxus* در تولید ترپنوئید موسوم به تاکسول که موثرترین دارو برای درمان انواع سرطان ها شناخته شده است. آزمایش هایی به منظور یافتن راهکارهای عملی جهت حفظ و نگهداری این گیاه صورت پذیرفته شده است.نمونه گیاهی سرخدار از جنگلهای واقع در منطقه ی لفور سوادکوه استان مازندران جمع آوری گردیده و پس از طی مراحل ضدعفونی جهت تولید کالوس مورد بررسی قرار گرفت. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی شامل ریز نمونه (ساقه و برگ و محیط B5,1/2MS,MS) بررسی گردید. بیشترین درصد تولید کالوس (۹۶,۴) درصد در محیط B5 با ریز نمونه ساقه بیشترین اندازه ی کالوس ۸۳,۴۵ در تیمار محیط MS بوده است.

کلمات کلیدی: سرخدار ،زینتی دارویی،کالوس، بذر مصنوعی ،محیط کشت

مقدمه

سرخدار معمولی (Common yew) با نام علمی از درختان سوزنی *Taxus bacat* L برگ با رشد کم در مناطق مرطوب و نیمه مرطوب است که در کشور ما در مناطق شمالی و جنگل های ارسباران یافت می شود و متاسفانه به دلیل بهره برداری نامناسب از جنگل ها از تراکم این گیاه کاسته شده است.این گیاه در سال های اخیر به دو دلیل مورد توجه قرار گرفته است؛حفاظت ویژه با توجه به روند رو به انقراض اندام های این گیاه حاوی ماده ی شیمیایی فوق العاده ارزشمند به نام تاکسول است که کاربرد وسیعی در پزشکی و معالجه ی سرطان دارد.در کشت بافت سرخدار از قسمتهای جوان گیاه مانند گامتومنیت ماده, رویان,جنین اولیه و قسمت های بالغ گیاه مثل برگها , ساقه ها جوان در ریشه استفاده شده است.محیط کشت درون شیشه ای پیشنهاد شده شامل B5,MSو wpm میباشد.(نیک وش و همکاران ۱۳۸۳).اولین پژوهش در زمینه ی کشت بافت سرخدار در سال های ۱۹۹۹-۱۹۹۶با استفاده از محیط کشت B5 در *T.cuspidate* و سایر گونه های Taxus انجام شده است.(parcct al,2002) و محیط کشت MCMدر *T.brevifolia*(parcct al,2002) و محیط کشت WMP در *T.media* (chee,1966) از ترکیب اکسین و ساتیوکینین و همچنین از ریز نمونه بذر و ساقه استفاده شده بود(zhong,1995-1992) .محیط کشت MS به طور مکرر در کالزایی و رشد کالوس ها استفاده می شود.(طباطبایی و همکاران,۱۳۸۸)روشهایی جهت کالزیی و کشت سوسپانسیون سلولی در گونه های مختلف Taxusگزارش شده است و استفاده از محیط هایی Ms و ترکیب هورمونی NAA و KIN و BAP و ریز نمونه جهت تولید سلولهای هر سیستمی گزارش شده است (امیدی و همکاران, ۱۳۹۰)هدف از این پژوهش بررسی اثر محیط های کشت MS,1/2MSو B5 بر روی ریز نمونه های برگ و ساقه به منظور تولید کالوس می باشد.

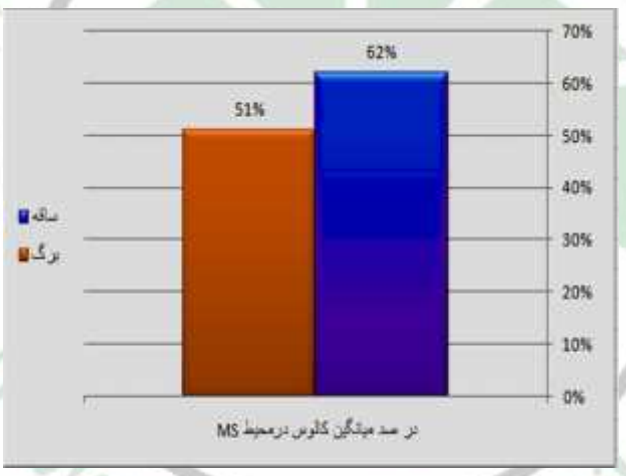
مواد و روش ها

ریز نمونه ها در این پژوهش از جنگل های لفور واقع درسوادکوه استان مازندران از برگ ها و شاخه های جوان *T.bacata* جمع آوری گردید. ریز نمونه های با تیمارهایی شامل هیپوکلرید سدیم ۳٪ (ده دقیقه) , الکل اتیلیک ۷۰٪ (ده دقیقه) ,الکل استیک ۷۰٪(ده دقیقه) شستشو و ضد عفونی گردیدند. قبل از هر تیمار ریزنمونه ها با مایع ظرف شویی و آب جاری شتستشو شده و بعد

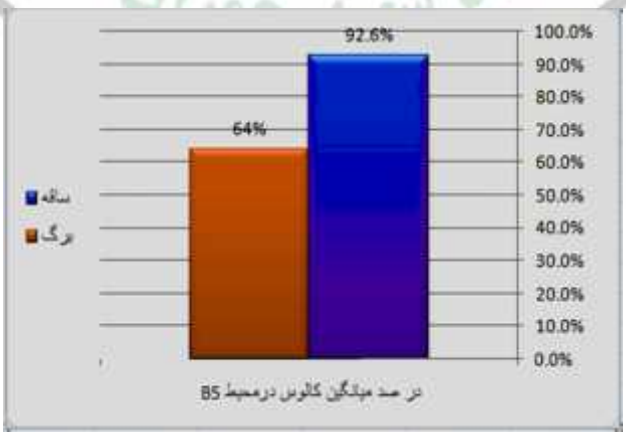
آن نیز با آب مقطر ۲بار تقطیر و استریل می شوند. در هر ظرف کشت ۱۰ عدد ریزنمونه قرارگرفته و آزمایش در ۳ تکرار انجام شد.محیط های مورد بررسی شامل MS,1/2MS و B5 بودند و دمای انکوباتور ۲±21درجه ی سانتی گراد و در تاریکی انجام شد و بازکشت به مدت ۱۴ وز یک بار انجام گرفت. به منظور جلوگیری از قهوه ای شدن کالوس ها از ۱۰۰گرم در لیتر پلی وینیل پیرولیدون(PVP) استفاده شد.

نتایج و بحث

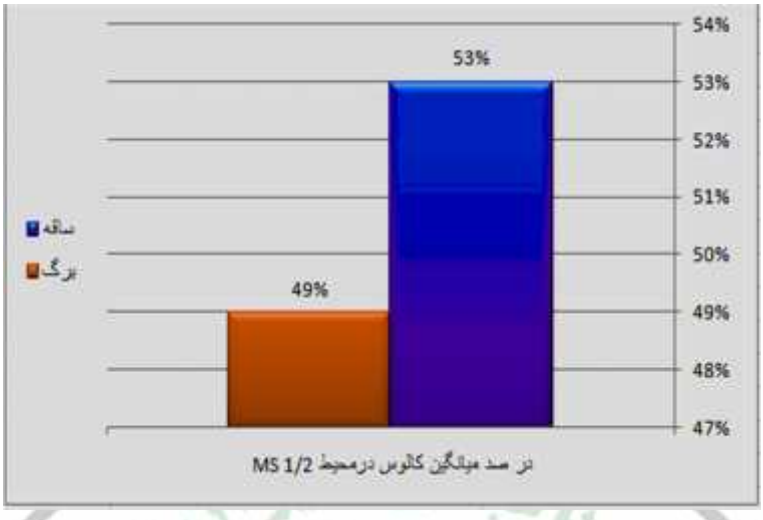
نتایج حاصل از تجزیه ی واریانس داده های مربوط در مورد درصد تشکیل کالوس و ریزنمونه ها در محیط های جدا کشت شده همگی در سطح احتمال (۱٪ P<۰,۰۱) معنی دار می باشد و این نتایج مبنی بر این است که هرنوع محیط کشت مورد استفاده و ریزنمونه های ساقه و برگ دارای تاثیر معنا دار بر روند کالزیی گیاه *T.bacata* داشته اند.بیشترین درصد کالزایی در ۹۶,۴ درصد در محیط B5 با ریزنمونه ساقه به دست آمده و پس از آن محیط کشت MS با درصد و در نهایت محیط کشت 1/2MS با وجود دارد.نوع ریزنمونه در تولید کالوس در این محیط ها تاثیر زیادی داشته به طوری که کالوس تولیده شده ر ریزنمونه ساقه نسبت به ریزنمونه برگ پاسخ بهتری را در هر سه محیط کشت مشاهده گردید.تولید کالوس با توجه به ریزنمونه برگ نیز در محیط B5 با ۶۴درصد پس از آن در محیط MS با ۵۲ درصد و در محیط 1/2MS با ۴۹ درصد مشاهده شد.(برگ ها جهت تولید کالوس بهتر در هر سه محیط در پشت رگبرگ ها خراش شده بودند.)



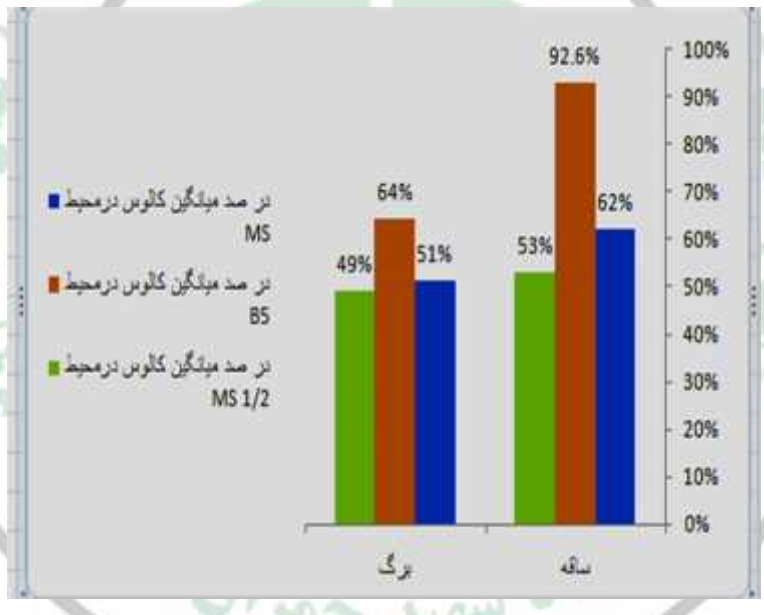
شکل۱- درصد میانگین کالوس در محیط MS



شکل۲-درصد میانگین کالوس در محیط B5



شکل۳- درصد میانگین کالوس در محیط 1/2MS



شکل۴-درصد میانگین کالوس در سه محیط کشت

جدول۱- تجزیه و تحلیل واریانس

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		درصد کالزایی	اندازه کالوس
ترکیب هورمونی	۷	۱۵۸۸,۳۰۲**	۳۷۲,۸۴۹**
محیط کشت	۵	۲۱۱۲,۵۷**	۴۸۳,۶۷۴**
ریزنمونه	۱	۱۳۳۲۰,۶۰۰**	ns۶۷,۴۱۶**
محیط کشت×ریزنمونه	۴	۱۵۴۵,۶۰۰**	۱۵۳,۴۳۸**
خطای آزمایش	۱۶۰	۱۶۹,۹۵۴	۳۰,۰۱۲
ضریب تغییرات(٪)		۲۱,۸۸	۱۰,۳۵

**اختلاف معنی دار بین میانگین ها در سطح ۱٪

برای القای کالوس در بیشتر گیاهان نیاز به استفاده از تنظیم کننده های رشد از نوع اکسین و سیتوکسین میباشد و در منابع مربوط به کشت گیاهان خانواده نیز جهت القای کالوس در قطعات جدا کشت از ضرورت وجود یک منبع اکسین مانند NAA یا 2.4-D به تنهایی یا همراه با یک منبع سیتوکسین مانند BAP و KIN در یک محیط کشت یاد شده است و بیشتر منابع در محیط کشت MS به همراه تنظیم کننده های رشد استفاده می شوند.(LEELAVATHIETAL;2004).بررسی که بر روی القای کالوس جنین های بالغ و ساقه های جوان*T.becata* برروی همین محیط کشت MS حاوی NAA,2.4-D و Kin انجام شده است.(Miheljevicetal ;2002)از نظردرصد کالزایی با نتایج حاصل از مطالعات امیدی و همکاران ۱۳۸۹ مطابقت دارد.در پژوهشی که بر روی ریز نمونه های مختلف گیاه ارس کوهی(*Juniperusexcesr*) برای القای کالوس و تولید شاخساره استفاده شد نتایج نشان داد که برای تولید شاخه های BAP موثرتر از Kin بوده است (Salehi shanjani;2003). در گیاهان *Taxus wallichiana* گزارش شده است که بهترین رشد کالوس در محیط کشت 1/2WPMSH همراه با تنظیم کننده ی رشد 2.4-D توام با BAP در ریز نمونه ی رویان بالغ بوده و همچنین باززایی از کالوس ها در همان محیط کشت کالزایی و تیمار هورمونی البته با تغییر اندکی مقدار اکسین و کاهش سیتوکسین را افزایش داد, اتفاق افتاده است.(Datt A et Al;2006)محققان روی گیاه *Pinuscaribaca*اظهار داشته است که تشکیل کالوس در ترکیب هورمونی اکسین و سایتوکینین اتفاق افتاده و منجر به تولید سلولهای مریستمی شده است(Akaneme&Enohong;2008)

نتایج

نتایج حاصل از تجزیه ی واریانس داده های مربوط به درصد تشکیل کالوس و اندازه ی کالوس بر روی هر قطعه جداکشت نشان داده که اثر هر یک از عوامل ترکیب های تنظیم کننده رشد, محیط کشت و همچنین اثر مقابل دو فاکتور و در سطح احتمال ۱٪(P<۰,۰۱) معنی دار می باشد. این بدان مفهموم است که فاکتورهای مورد مطالعه از نظر تاثیر بر روی صفت مورد مطالعه به صورت مستقل از یکدیگر عمل نم یکنند و وابسته به یکدیگر هستند.

منابع

۱- امیدی ,م.۱۳۹۰.تاثیر تنظیم کننده های رشد ,محیط کشت و ریز نمونه در تولید کالوس گیاه سرخدار *Taxus bacat* L .فصلنامه علمی پژوهشی گیاهان دارویی معطر ایران .جلد ۲۷.شماره ۲. ۱۳۹۰.

۲-لسانی ,م.۱۳۷۸.سرخدار.موسسه تحقیقات جنگل ها و مراتع .شماره ۱۵.

۳-نیک وش ,ن.۱۳۸۳.تولید گیاهک سرخدار *Taxus bacat* L با استفاده از کشت درون شیشه ای و نجات رویان .مجله پژوهش و سازندگی .شماره ۷۱.تابستان۱۳۸۵.

4. Ketchum, R. E. B., C. D. Rithner, D. Qiu, Y. S. Kim, R. M. Williams, & R. B. Croteau. 2003. *Taxus* metabolomics: methyl jasmonate preferntially induced production of taxoids oxygeneted at c-13 in *Taxus* x *media* cell cultures. Phytochemistry, 62: 901-909.
5. Ketchum, R.E.B. & R. Croteau. 1998. Recent progress toward an understanding of taxol biosynthesis in plant cell cultures. Elsevier Science, Amesterdam, pp. 339-348.
6. Kim, S., H. K. Choi, J. H. Kim, H. S. Lee, & S. S. Hong. 2001. Effect of osmotic pressure of paclitaxel production in suspension cell cultures of *Taxus chinensis*. Enz.Mic.Tech., 28: 202-209.
7. Kim,J.H., I. S. Kang, H. K. Choi, S. S. Hong, & H. S. Lee. 2002. A novel prepurfication for paclitaxel from plant cell cultures. Pro. Biochmeistry, 37: 679-682.
8. Kwon, I.C., Y. J. Yoo, J. H. Lee, & J. O. Hyun. 1998. Enhancement of taxol production by *in situ* recovery of product. Proc. Biochmeistry ,Vol., 33, No. 701-707.
9. Menhard, B., W. Eisenreich, P. J. Hylands, A. Bacher, & M. H. Zenk. 1998. Taxoid from cell culture of *Taxus*. Phytochemistry, 49: 113-125.

Effect of medium and explant on callus intduction in ornamental-medical Taxusbacatal

Sh. Montaeri[1*]

*Corresponding aurhor: shayanmontazery@yahoo.com

Abstract

Taxusbacatal is endangered forest tree spies , which its regeneration is very low.Taxol is recognized as a highly effective anti cancerdrug.This research is effective for preserve and protect it. Our explant collected from natural jungle of Lafour in Mazandaran(north of Iran). In this research mediums and explants inused .Meduimin in used were B5,1/2MS and explant contetnt about leaf and stem. Result of this research the bes callus shown in B5 medium whit stem explants and 1/2Ms with leaf explants was the low callus production.

Key words: *Taxus*, ornamental, medical, callus, medium