# بررسی تیمار هورمونی، ریزنمونه ومحیط کشت بر کالزایی گیاه سرخدار (*Taxus baccata*)

**بهارک بهجت ساسان (۱)، منصور امیدی (۲)، محمدرضا نقوی (۳)، سپیده کلاته جاری (۴) و علیرضا اطمینان (۵)**

۱- دانشجوی مقطع کارشناسی ارشد گروه باغبانی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات تهران، ۲- استاد دانشکده پردیس دانشگاه تهران و عضو هیئتت علمی گروه بیوتکنولوژی، ۳- دانشیار دانشکده پردیس دانشگاه تهران، عضو هیئت علمی گروه بیوتکنولوژی، ۴- مربی دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات تهران عضو هیئت علمی گروه باغبانی، ۵- پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی تهران

**چکیده**

سرخدار یک گیاه رو به انقراض بوده و زادآوری آن به طور طبیعی بسیار اندک است. آزمایشی به منظور بهینه سازی کالزایی انجام گرفت. در این تحقیق دو نوع محیط کشت (MS و B5) و دو نوع ریزنمونه (ساقه و برگ) و همچنین دو نوع ترکیب هورمونی (BAP و NAA+2,4-D+Kin) به شکل فاکتوریل در قللب طرح کاملاً تصادفی مورد بررسی قرار گرفت. از نظر تولید کالوس در بین دو نوع محیط کشت، تفاوت معنی‌داری مشاهده گردید اما در بین ریزنمونه ها تفاوتی مشاهده نشد. همچنین بین ترکیب هورمونی هم تفاوت معنی‌داری مشاهده گردید، به طوری که بهترین تیمار در تولید کالوس مربوط به محیط کشت MS همراه با $4\ mgl^{-1}$ NAA + $0.3\ mgl^{-1}$ 2,4-D + $0.3\ mgl^{-1}$ Kin در ریزنمونه ساقه به دست آمد. در نتایج مربوط به اندازه کالوس مشاهده گردید که بین دو نوع ریزنمونه تفاوت معنی داری وجود دارد، همچنین بین اثر متقابل محیط کشت و ترکیب هورمونی و اثر متقابل ریزنمونه و ترکیب هورمونی تفاوت معنی داری وجود دارد. بهترین تیمار از نظر بزرگتر بودن اندازه کالوس مربوط به محیط کشت MS به همراه $1\ mgl^{-1}$ BAP با ریز نمونه برگ بود.

**مقدمه**

مطالعه سرخدار به دلیل موقعیت بسیار بالایش به لحاظ دیرینه شناسی درخت و دیر زیستی بالایش بسیار با اهمیت است از پوست و شاخه های درختان سرخدار (.Taxus spp ) ترکیبی بنام پاکلی تاکسل بدست می آید که جزء مؤثرترین داروهای ضد سرطان شناخته شده است(٤). متأسفانه بخاطر تخریب جنگلها و بهره برداری نامناسب از این درخت سبب شده تراکم و فراوانی آن بسیار پائین بیاید و حتی خطر انقراض آن وجود دارد (۱).تاکنون محیط های کشت و تنظیم کننده های رشد گونا گون در القاء کالوس گونه های سرخدار مورد پژوهش و مطالعه قرار گرفته است. که اولین پژوهش در زمینه کشت بافت سرخدار در سالهای ۱۹۹٦ تا ۱۹۹۹ با استفاده از محیط کشت B5 در *T.cuspidata* صورت گرفته است (٦،۷).

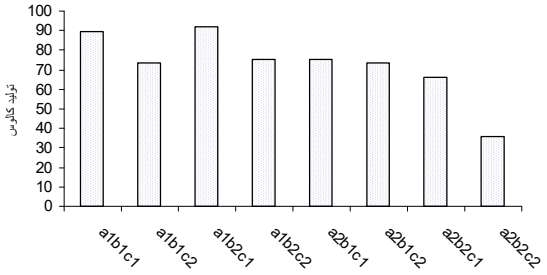
**مواد وروش‌ها**

جهت تهیه ماده گیاهی و ریز نمونه های کشت از گیاه سرخدار که بومی شمال کشور بود از گلخانه دانشگاه تهران خریداری شد و مورد استفاده قرار گرفت. پس از شستشوی کامل ساقه وبرگ ریز نمونه ها در محلول ۷۰ ٪ اتانول به مدت ۳۰ ثانیه قرار داده شدند.سپس با آب مقطرشستشو داده شد. سپس به مدت ۷ دقیقه در محلول ۱٪کلرید جیوه قرار داده شدند و بعد از آن با آب مقطر تحت آب شویی قرار گرفت. محیط های B5 و MS به اضافه ۳۰ گرم ساکارز و ۷ گرم آگار در این محیط ها

استفاده شد.آزمایش بصورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار و بطور متوسط ۱۰ ریز نمونه در هر ظرف کشت انجام گردید. فاکتورهای ریز نمونه (ساقه و برگ)، محیط کشت (MS , B5) و ترکیب های هورمونی ( $4mgl^{-1}$ Kin $0.3mgl^{-1}$ 2,4-D + $0.3mgl^{-1}$ NAA) و ($1mgl^{-1}$ BAP) در این تحقیق بکار برده شد و درصد کالزایی و اندازه کالوس مورد ارزیابی قرار گرفت. به منظور جلوگیری از قهوه ای شدن کالوس ها هر ١٤ روز یکبار عمل واکشت صورت پذیرفت.داده ها پس از جمع آوری مورد آزمون نرمال بودن قرار گرفتند و از برنامه های کامپیوتری MSTAT برای تجزیه آماری و EXCEL برای رسم نمودارها مورد استفاده قرار گرفت.

نتایج و بحث

با توجه به جدول تجزیه واریانس ملاحظه می گردد که اثر محیط کشت بر روی درصد کالزایی در سطح ٪۵ معنی دار می باشد. همچنین بین دو نوع ترکیب هورمونی بکار رفته در آزمایش از لحاظ تأثیر بر میزان کالزایی تفاوت معنی داری مشاهده می گردد. اما بین ریزنمونه های مختلف تفاوتی در میزان القاء کالوس دیده نمی شود. از سوی دیگر هیچ یک از اثرات متقابل فاکتور ها از نظر آماری معنی دار نبوده و این بدان مفهوم است که فاکتورهای مورد مطالعه از نظر تأثیر بر روی صفت مورد مطالعه بصورت مستقل از یکدیگر عمل می کنند.باتوجه به نمودار ۱ بیشترین درصد کالزایی (a1b2c1) در محیط MS با ترکیب هورمونی NAA، 2,4-D و Kin با استفاده از ریزنمونه ساقه حاصل می گردد. و با در نظر گرفتن کلیه عوامل مورد بررسی (نمودار ۳) ملاحظه می گردد که بطور کلی درصد کالزایی نمونه ها در محیط MS بهتر از محیط B5 می باشد.




نمودار۱: مقایسه میانگین ترکیبات تیماری در القاء کالوس

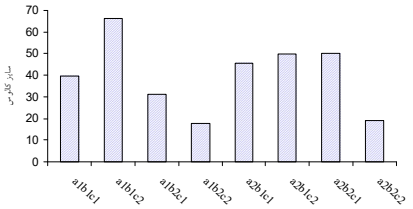
| منابع تغییر | df | میانگین مربعات صفت مورد مطالعه | |
|---|---|---|---|
| | | درصد کالزایی | اندازه کالوس |
| محیط کشت | ۱ | ۳۳۲۰/٦* | ۳۱/۳ |
| ریزنمونه | ۱ | ٦۸۲/٦ | ۲۵۷۵/۹** |
| محیط کشت×ریزنمونه | ۱ | ۹٦۲/٦ | ۳۵۸/۳* |
| ترکیب هورمونی | ۱ | ۱۵٦۸/۱* | ۷۰/۹ |
| محیط کشت×ترکیب هورمونی | ۱ | ۰/۱٦۷ | ۵۹٦/٤* |
| ریزنمونه×ترکیب هورمونی | ۱ | ۳۰۸/۱ | ۲۱۵۷/٦** |
| محیط کشت×ریزنمونه×ترکیب هورمونی | ۱ | ۲۸۰/۱ | ۱۱/۲ |
| خطای آزمایش | ۸ | ٤۳۰/۵ | ۱۱۱/۸ |

جدول تجزیه واریانس (میانگین مربعات) صفات کالزایی و اندازه کالوس

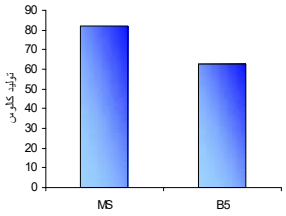
با توجه به جدول تجزیه واریانس در رابطه با کالوس بین دو نوع محیط کشت تفاوتی در اندازه کالوس دیده نمی شود. ولی بین ریزنمونه ها تفاوت معنی داری در سطح ٪۱ از نظر اندازه کالوس وجود دارد. ترکیب هورمونی مختلف هم تفاوت معنی داری از نظر این صفت ندارد. معنی دار بودن اثر متقابل محیط کشت×ترکیب هورمونی و ریز نمونه×ترکیب هورمونی بترتیب در سطوح احتمال ٪۵ و٪۱ بیانگر آن است که تأثیر این فاکتورها بر روی صفت اندازه کالوس باید با توجه به سطوح فاکتور دیگر صورت گیرد. همانطور که در نمودار٤ ملاحظه می گردد در مقایسه دو نوع ریزنمونه مورد مطالعه ریزنمونه برگ قابلیت تولید کالوس های بزرگتر نسبت به ساقه دارا می باشد و بطور کلی برای دستیابی به بیشترین اندازه کالوس بهتر است از محیط MS با ترکیب هورمونی BAP ($mgl^{-1}$ ۱) و ریزنمونه برگ استفاده گردد.(a1b1c2) (نمودار۲).

**بحث**

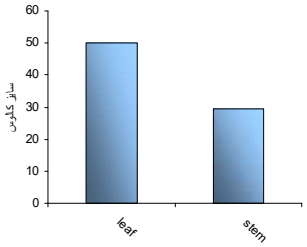
محیط کشت MS و B5 به منظور القاء کالوس در گونه های مختلف جنس *Taxus* مورد استفاده قرار گرفته است. میحال جویک و همکاران (۲۰۰۲) برای القاء کالوس در *Taxus baccata* از جنین های بالغ و ساقه های جوان روی محیط MS حاوی NAA ، 2,4-D و Kin استفاده کردند.که نتیجه بدست آمده در مورد کالوس های ایجاد شده از جنین های بالغ مربوط به در محیط کشت MS با هورمون های 2,4-D و Kin بوده است. ودر رابطه با کالوس های ایجاد شده از ساقه در محیط کشت MS با ترکیب هورمونی NAA و Kin بوده است (۸). نتایج این آزمایش نشان می دهد که مقادیر بالای NAA و 2,4-D و Kin در القاء کالوس از ریزنمونه ساقه و برگ مناسب تر است که در تولید کالوس ارجحتر از برگ می باشد. نتایج آزمایشات خسرو شاهی و همکاران (۲۰۰۵) بر روی القاء کالوس در *Taxus baccata* نشان دهنده ان است که القائ کالوس در این گیاه در محیط B5 با ریزنمونه ساقه نتیجه بهتری در پی دارد که به نتایج حاصل در این آزمایش مغایرت دارد (۵). پارک و همکاران در آزمایشاتی که از ریزنمونه های ریشه، ساقه و برگ برای القاء کالوس استفاده کردند به این نتایج دست یافتند که ریشه بیشتر از ساقه و ساقه بیشتر از برگ تولید کالوس می کند (۹). که با نتایج این آزمایش یعنی بر بهتر بودن ریزنمونه ساقه نسبت به برگ از نظر تولید کالوس مطابقت دارد.همچنین نتایج این آزمایش با نتایج کوسید وهمکاران (۱۹۹۹) در کالزایی مؤثر در محیط B5 مطابقت دارد(٦).




نمودار۲: مقایسه ترکیبات تیماری در اندازه کالوس




نمودار۳: مقایسه میانگین محیط کشت در تولید کالوس




نمودار٤: مقایسه میانگین ریزنمونه در اندازه کالوس

## منابع


۱. اسماعیل زاده، ا. حسینی، م. وطبری، م. ۱۳۸٦. بررسی جوامع جنگلی سرخدار *Tazxus baccata* ذخیرگاه افراتخته. فصلنامه پژوهش وسازندگی شماره ۷٤.

۲. سهیلا نراقی، ط. ۱۳۸۳. تکثیر درون شیشه ای سرخدار ( *T.baccata* ) از طریق کشت جنین های جنسی. فصلنامه تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران شماره۱۸، ص۳٤٤-۳۳۵.

۳. عصاره، م.ح. نیکوش، ن. قربانلی، م. و قمری زارع، ع. ۱۳۸٦. بررسی ساختار تشریحی ریشه زایی و نیز علل سخت ریشه دهی در قلمه های سرخدار *Taxus baccata* . فصلنامه پژوهش وسازندگی شماره۷٤.

٤. قربانلی، م. و دلاور، ک. ۱۳۸۱. بررسی ومقایسه غلظت تاکسول در اندامهای مختلف درخت سرخدار *Taxus baccata L.* در دو منطقه گرگان و نور. فصلنامه پژوهش و سازندگی شماره ۵٤.

۵. یاری خسرو شاهلی، ا. ولیزاده، م. قاسم پور، ع. خسرو شاهی، م. و نقدی بادی، ح. ۱۳۸۵. اثر محیط کشت، ریزنمونه و تنظیم کننده های رشد در کالزایی وتولید کالوس در سرخدار، *Taxus baccata* . مجله علوم وکشاورزی ایران جلد۱-۳۷ شماره۱، ص۷٦-٦۹.

6. Cusido, R. M., J. Palazon, A. Navia- Osario, M. Bonfill, C. Morales, & M. T. Pinol. 1999. Production of taxol and baccatin III by a selected Taxus baccata callus line and its derived cell suspension culture. Plant Science, 146: 101-107.

7. Ketchum, R. E. B., C. D. Rithner, D. qiu, Y. S. Kim, R. M. Williams, & R. B. Croteau. 2003. Taxus metabolomics: methyl jasmonate preferentially induced of taxoid oxygenated at c-13 in *Taxus* X *madia* cell cultures. Phytochemistry, 62: 901-909.
8. Mihaljevic, S., I. Bjedov, M. Kovac, D. L. Levanic, & S. Jelaska. 2002. Effect of explant source and growth regulators on in vitro callus growth of *Taxus baccata* L. Washingtonii. Food Technol. Biotechnol. 40 (4): 299-303.
9. Parc, G., A. Canaguier, P. Lander, R. Hocquemiller, D. chriqui, & M. Meyer. 2002. Production of taxoids with biological activity by plants and callus culture from selected *Taxus* genotypes. Phytochemistry 59: 725-730.

## The study of hormon, explant, and media treatments on *Taxus baccata* callus induction

Baharak behjat sasan[1], Mansor omidi[2], Mohamadreza naghavi[3],Sepide kalate jari[4], Alireza etminan[5].
1, MSC, student of Horticultural Islamic university of science and research branch.
2, Professor of Tehran university and scientific sttaf of Institute of Medicinal Plants
3, Associated professor of Tehran university.
4, Asistant Professor of Islamic Azad university, Science and research branch.
5, Scientific member of Islamic Azad university of kermansha.

**Abstract**

*Taxus baccata* is an endangered forest tree species with low regeneration. A factorial experiment was carried out to find the best combination of media, explant and plant regulators for callus induction. In this research two kind media( B5 , MS), two various plant regulators(NAA+2,4-D+kin and BAP) and two explants (leaf and stem) were studied in a completely randomized design with three replication. The results showed that there is a significant difference between B5 and MS media in callus induction but two explants were not different. On the other hand there was significant difference between plant regulators in callus induction. As a result the best treatment for callus induction was the use of stem culture in MS media with $4mgl^{-1}$ NAA , $0.3mgl^{-1}$ 2,4-D and $0.3mgl^{-1}$ Kin. these results showed that there is a significant difference between two explants for callus size. in addition media×hormon and explant×hormon interactions were significant in alpha=0.05 and alpha=0.01 respectively. As a result the best treatment for callus size was the use of leaf culture in MS media with $1mgl^{-1}$ BAP.