



مقایسه میزان کالزاوی گیاه سرو کوهی در محیط کشت‌های MS و WPM با غلظت‌های مختلف هورمون‌های NAA، 2,4-D و Kin

حسن برآورده^۱، غلامعلی رنجبر^۲ و سوده کمالی فرج آبادی^۳

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، (تویینده مسؤول: h.baravardi@gmail.com)

۲- دانشیار و کارشناس، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

۳- تاریخ دریافت: ۹۳/۸/۱ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۱/۱۵

چکیده

سره کوهی (*Juniperus excels L.*) گیاهی با رشد بسیار بطيئی و متعلق به خانواده سرو (*Cupressaceae*), دارای خصوصیات دارویی و سرشار از روغن‌های معطر ضروری است که در صنعت داروسازی و عطر سازی بسیار با ارزش تلقی می‌شود. به همین منظور با استفاده از کشت بافت آزمایشی با ریزنمونه جوانه جانی در شرایط درون‌شیشه‌ای صورت گرفت. آزمایش حاضر به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سال ۱۳۹۳ در تکرار در سال ۳ در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری اجرا شد. ریزنمونه‌های جوانه جانی جهت القاء کالوس در محیط کشت پایه موراشیگ و اسکوگ (MS) و محیط کشت اختصاصی گیاهان چوبی (Woody Plant Medium) در دو آزمایش مجزا: با غلظت‌های مختلف Kin (mgl^{-1}) $0.0/0.1/0.2/0.4/0.6/0.8$ و 2,4-D (mgl^{-1}) $0.0/0.1/0.2/0.4/0.6/0.8$ با $NAA 3 mgl^{-1}$ در ترکیب با $NAA 4 mgl^{-1}$ در ترکیب با $WPM 2,4-D 3 mgl^{-1}$ و بیشترین میانگین قطر کالوس در محیط WPM حاوی $3 mgl^{-1}$ در ترکیب با $Kin 0.0/0.1/0.2/0.4/0.6/0.8 mgl^{-1}$ و بیشترین میانگین درصد کالزاوی نیز در محیط WPM حاوی $3 mgl^{-1}$ در ترکیب با $2,4-D 3 mgl^{-1}$ بدست Kin $0.0/0.1/0.2/0.4/0.6/0.8 mgl^{-1}$ آمد.

واژه‌های کلیدی: ریزنمونه جوانه جانی، سرو کوهی (*Juniperus excelsa L.*), کالزاوی، هورمون گیاهی

مهارکنندگی در برابر میکروارگانیزم‌ها می‌باشد (۸). اورس در حجاز برای مطالعه سل ریوی و برقان مصرف سنتی داشته است و در گزارشی اعلام شده است که عصاره برگ و دانه آن علیه باکتری‌های گرم مثبت بیماریزا مانند *Bacillus* و *Staphylococcus aureus* و *S. subtilis* تأثیر قابل توجهی داشته است (۴). از خواص ضد میکروبی اورس تأثیر علیه *Bacillus subtilis* *Staphylococcus aureus* و *S. durans* و *Staphylococcus aureus* نیز می‌توان اشاره کرد و همچنین عصاره الکلی و متانولی اورس بر باسیل سل استاندارد *Mycobacterium tuberculosis* H37RV اثر مهارکنندگی قابل ملاحظه‌ای دارد (۹).

کشت بافت گیاهی عبارت است از کشت درون‌شیشه‌ای اجزای گیاهی (بافت، اندام، جنین، تک سلول، پروتوبلاست)، که بر روی محیط کشت‌های غذائی و تحت شرایط استریل انجام می‌گیرد. هر قسمت از یک گیاه ممکن است در شرایط مناسب و ویژه بتواند یک جنین کامل ایجاد نماید (۲). تولید گیاهان کامل از پروتوبلاست، سلول‌های منفرد و قطعات کوچکی از بافت گیاه امکان‌پذیر است زیرا سلول‌های گیاهی دارای خاصیت توئی پتنسی^۱ هستند (۳). به این معنی که سلول گیاهی در شرایط کشت مناسب و در یک دوره

مقدمه سرو کوهی (*Juniperus excelsa L.*) درختی است با قامت متوسط که تا ارتفاع بین ۳ تا ۱۵ متر رشد می‌کند و متعلق به خانواده *Cupressaceae* است. جنس *Juniperus* شامل ۶۰ گونه است و گونه‌های این جنس از گروه گیاهان بسیار مقاوم با تحمل دامنه وسیع شرایط اکولوژیکی می‌باشند. سرو کوهی گیاهی است دو پایه از خانواده سرو (*Juniperus*) یکی از محدود سوزنی برگ‌های بومی شمال ایران و درخت مقاوم و زیبای مناطق جنگلی و کوهستانی به ویژه شمال کشور محسوب می‌شود. منطقه رویش این درخت از شرق تا غرب تا امتداد دامنه‌های جنوبی رشته کوه‌های البرز از شمال غربی تا جنوب در امتداد زاگرس را در بر می‌گیرد (۵). اورس یا سرو کوهی به علت مقاومت در برابر خشکی و سرما در شرایط سخت قدرت رشد خود را حفظ می‌کند و به علت دارا بودن بوی نامطبوع سبب فرار مار، عقرب و حشرات گزنه می‌شود و خواص ضد میکروبی آن نیز بسیار مورد توجه است. سرشاخه‌های آن دارای انسانسی به نام سایبن است که به شدت محرک پوست و مخاط می‌باشد. مطالعات انجام شده روی انسانس سرو کوهی نشان داد که این متابولیت روی گونه‌های متعددی از قارچ‌های بیماریزا دارای خاصیت

1- Totipotency

کورنما و همکاران (۴) گزارش دادند که بهترین محیط کشت برای کالزالایی سرخدار را محیط کشت TM5 با یک میلی‌گرم در لیتر پیکولورام به علاوه ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر GA3 و ۰/۱ میلی‌گرم برلیت کینتین است.

کیری و همکاران (۹) بیان داشتند که هم فرم و مقدار نیتروژن در محیط کشت اثر معنی‌داری روی درصد، رشد سلولی، تقسیم و توتی پتانسی سلولی دارد و همچنین دریافتند که نیتروژنی که برای کشت ریز نمونه ریشه در محیط کشت استفاده می‌شود از مقدار نیتروژنی که برای کشت کالوس و پرتوپلاست استفاده می‌شود کمتر است.

اثنی عشری و همکاران (۲) بیان کردند که کالوس زایی در کاج مطبق هم در محیط کشت MS و BM فقط در حضور پیکولورام و در شرایط تاریکی مشاهده می‌شود اما در محیط کشت BM کالوس بیشتری نسبت به MS تولید می‌شود و میزان آن در ساقه نسبت به برگ زیادتر است.

صادقی و همکاران (۱۳) بیان کردند که اثر هورمون ۲,4-D برای رشد کالوس حاصل از ریز نمونه‌های کاج از هورمون NAA بیشتر است و غلظت هورمون مذکور تا ۷/۵ میلی‌گرم در لیتر باعث افزایش میزان کالزالایی می‌گردد اما در واکنش‌های پس از کالزالایی میزان رشد کالوس در غلظت‌های پایین‌تر بهتر است و در ضمن رشد بهینه کالوس کاج تهران در غلظت‌های ۰/۵ تا ۷/۵ میلی‌گرم در لیتر ۲,4-D است که بودن هورمون کینتین در کنار آن باعث تحریک رشد کالوس می‌شود.

ناصری و همکاران (۱۲) اثر تنظیم کننده‌های رشد گیاهی بر القای بافت جنین‌زا در چهار گونه کاج بررسی نمودند و به این نتیجه رسیدند که اثر تنظیم کننده‌های رشد گیاهی و گونه بر القای بافت جنین‌زا معنی‌دار بوده و بهترین نتیجه در گونه *Pinus brutia* L. و در تیمار هورمونی ۱۰ میکرومول ۲,4-D و ۵ میکرومول BA است.

مواد و روش‌ها

ضدغفونی جوانه‌های نابجا: نمونه‌های گیاهی مورد نیاز این آزمایش از درختچه موجود در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری تهیه گردید. بدین منظور از شاخه‌های سالم و جوان گیاه که فاقد عالیم بیماری و کمبود بودند نمونه برداشی انجام شد. به منظور سترون کردن ریزنمونه‌ها از روش صالحی شانجانی (۱۴) استفاده گردید بدین منظور ابتدا جوانه‌های جانبی سرو کوهی (*Juniperus excelsa* L.) حدود ۱۰ دقیقه در آب خیسانده شدند. سپس به منظور کاهش کشش سطحی و تماس بهتر مواد ضدعفونی کننده با ریزنمونه‌ها، ریزنمونه‌ها را درون مایع

برنامه‌ریزی شده قابلیت تشکیل گیاهان کامل جدید را دارد. گیاه تولید شده همانند گیاه مادری اولیه است. باززائی گیاه از طریق کشت بافت در حال حاضر یک فرآیند ضروری و اساسی در بیوتکنولوژی و اصلاح نباتات بشمار می‌رود. امروزه برای تکثیر غیرجنسی بسیاری از گیاهان زراعی و باغی از روش‌های مختلف کشت بافت استفاده می‌شود (۲). ریزنمونه‌های نظری برگ‌های بالغ، ریشه، ساقه، دمبرگ و اجزای گل، می‌توانند با موفقیت برای تولید گیاهچه به روش اندازایی در گیاهان مختلف مورد استفاده قرار گیرند. فصل، سن و وضعیت فیزیولوژیکی گیاه والد، محیط کشت پایه و ترکیب مناسب هورمون‌ها نیز در موفقیت اندازایی از کشت‌های سلولی سهیماند (۷).

صالحی شانجانی (۱۴) در بررسی کشت بافت گیاه سرو کوهی به این نتیجه رسید که اضافه کردن مکمل گلوتامین به محیط کشت ۱/۲ MS ۱/۲ تولید کالوس در گیاه سرو کوهی را تحریک می‌کند. وی هم چنین دریافت که تیمار نیتروژن به فرم نیترات هیچ گونه کاللوسی در محیط کشت تولید نمی‌کند. علاوه بر این در تحقیق ایشان نشان داده شد که میزان و نوع اکسین بر روی درصد کالزالایی و رشد کالوس اثر دارد و اثر هورمون BAP از Kin بیشتر است، ولی اگر غلظت این دو هورمون از یک میلی‌گرم در لیتر بستر شود در رشد کالوس اثر منفی دارد.

اسرارزیدی و همکاران (۱) مریستم‌های نوک ساقه در گیاه سرو کوهی را روی محیط کشت MS و WPM و N6 که با غلظت‌های متفاوت هورمون‌های IAA و BAP کشت کردند و به این نتیجه رسیدند که محیط کشت WPM با غلظت نیم میلی‌گرم در لیتر ۲,۴-D در ترکیب با BAP بهترین القاء کالوس را دارد. رنگ کالوس در محیط‌های کشت قهوه‌ای مایل به سبز بود.

توشیو مورانکا و همکاران (۱۹) در طی تحقیقی بیان کردند که هیچ کاللوسی از برگ سرو چینی در محیط قادر هورمون تشکیل نمی‌شود و همچنین اعلام کردند که بهترین محیط کشت برای القای کالوس می‌باشد کشت SH و غلظت مطلوب تنظیم کننده‌های رشد ۳ میلی‌گرم در لیتر NAA در ترکیب با ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر Kin است.

بررسی کالزالایی در سوزنی برگان دیگر هم انجام شده به عنوان مثال:

هوسیان و همکاران (۷) بهترین محیط برای القای کالوس سرخدار را در محیط MS همراه با ۲ میلی‌گرم در لیتر ۲,۴-D و ۵ میلی‌گرم در لیتر زغال فعل بعد از دو هفته کشت از ریز نمونه ساقه بدست آورده وی موفق به بازیابی از کالوس‌های به وجود آمده نشدند.

۰/۲ میلی گرم در لیتر) قرار گرفتند. این آزمایش در سه تکرار و در هر تکرار ۱۵ قطعه جدا کشت بکار برده شد. پس از کشت ریزنمونه‌ها، درب ظروف (پتربی دیش) با پارافیلم مسدود شده و در دمای 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد در اتفاق رشد در تاریکی قرار داده شدند و عمل واکشت هر ۲۰ روز یک بار انجام شد.

آنالیز داده‌ها و محاسبات آماری
داده‌های بدست آمده در در ۴ آزمایش فاکتوریل (ترکیب توامان هورمون‌های 2,4-D با Kin در محیط MS و WPM و ترکیب توامان هورمون‌های NAA و Kin در دو محیط‌های MS و WPM) 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 SAS ۹.۰ انجام گردید در ضمن پس از آماربرداری، برای تجزیه واریانس، جهت نرمال کردن داده‌ها از فرمول $\text{Arcsin} \sqrt{X + 0.1}$ استفاده شد.

نتایج و بحث

ریزنمونه‌ها بعد از گذشت ۲۱ روز در محیط کالوس‌دهی، بتدریج متورم شدند و بعد از ۶ هفته ریزنمونه‌ها بطور کامل کالوس‌زائی کردند. جدول ۱ نتایج حاصل از تجزیه واریانس اثر ترکیب هورمون‌های NAA، 2,4-D و Kin روی وزن (گرم)، قطر (میلی‌متر) و درصد کالوس تشکیل شده از کشت جوانه جانبی را در محیط کشت MS و WPM نشان می‌دهد (شکل ۱).

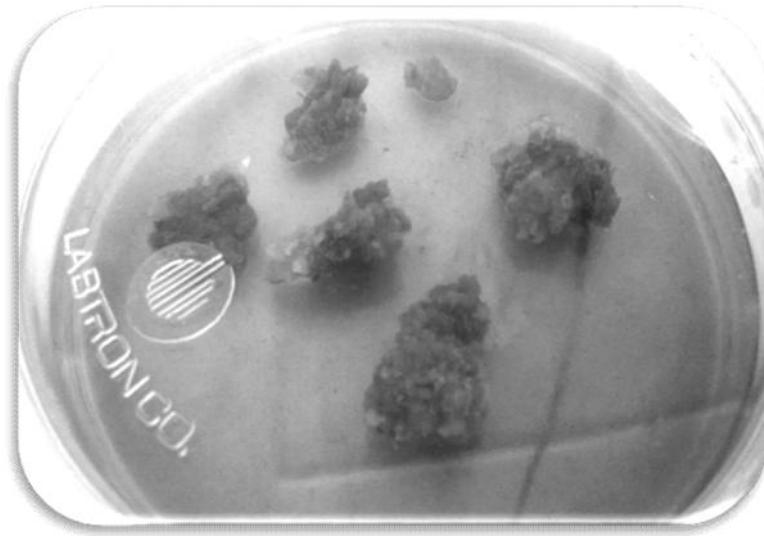
ظرفشویی به مدت ۵ قرار داده شدند، بعد ۳ مرتبه با آب مقطر شستشو داده شدند و در ادامه در آب مقطر به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفتند. در مرحله بعد به مدت ۱۵ دقیقه در قارچکش بنومیل ۲ در ۱۰۰۰ قرار گرفتند و سپس ۳ مرتبه با آب مقطر شسته شدند. این جوانه‌های جانبی آنگاه در محلول هیپوکلریت سدیم 20% به مدت ۸ دقیقه قرار داده شدند و باز هم ۳ بار با آب مقطر و هر بار ۲ دقیقه مورد شستشو قرار گرفتند. در مرحله آخر ریز نمونه‌ها را به مدت ۳۰ ثانیه درون اتانول ۷۰٪ قرار داده شدند و در این مرحله نیز سه بار با آب مقطر شسته شدند و در نهایت به منظور تمیه کالوس، ریز نمونه‌های ضدغوفونی شده روی کاغذ صافی استریل قرار گرفتند تا کاملاً خشک شوند. سپس بر روی محیط کشت‌های MS و WPM با هورمون (تکمیل شده با $3\% \text{ ساکاروز}$ ، $0.7\% \text{ درصد آگار}$ ، $100 \text{ mgL}^{-1} \text{ میوانوزیتول}$ و $5/8 \text{ pH}$) کشت شدند.

القای کالوس: در این آزمایش از محیط‌های کشت MS و WPM که تمام شرایط آزمایش (محل آزمایش، زمان، شرایط دمایی، سن ریزنمونه، نوع هورمون استفاده شده و ...) یکسان بود استفاده شد. به محیط‌های کشت ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۷ گرم در لیتر آگار اضافه گردید و به منظور جلوگیری از قهوه‌ای شدن کالوس‌ها $0.5\% \text{ گرم}$ در لیتر زغال فعال استفاده گردید. سپس قطعات جدا کشت جوانه جانبی تحت تیمار تنظیم‌کننده‌های NAA و 2,4-D در چهار سطح (0 ، 2 ، 3 و 4 میلی‌گرم در لیتر) که هر کدام از این دو هورمون به صورت مجزا در ترکیب با Kin در سه سطح ($0/1$ و $0/2$ و $0/3$)

جدول ۱- تجزیه واریانس تاثیر کاربرد توامان هورمون‌های Kin-2,4-D و Kin-NAA روی وزن، قطر و درصد کالوس حاصل از کشت جوانه جانبی در محیط کشت MS و WPM

میانگین مربعات							منابع تغییر
درصد		قطر		وزن		درجه آزادی	
WPM	MS	WPM	MS	WPM	MS		
۰/۰۰۵*	۰/۰۰۷**	۵/۱۲*	۳/۰۶**	۰/۰۰۷*	۰/۰۱۷**	۲	Kin
۰/۹۹۰**	۰/۹**	۱۹۱/۲۴**	۱۹۲/۴۴**	۰/۲۲۱**	۰/۲۰۳**	۳	NAA
۰/۰۰۸*	۰/۰۰۸**	۲/۲۶*	۲/۲۶**	۰/۰۰۶*	۰/۰۱۵**	۶	Kin×NAA
۰/۰۰۵	۰/۰۰۰۲	۱/۱۲	۰/۰۵۷	۰/۰۰۲	۰/۰۰۰۱	۲۴	اشتباه
۱۶/۰۱	۳/۱۹	۱۶/۲۲	۱/۶۹	۲۰/۶۰	۱/۸۶		ضریب تغییرات
۰/۰۱	۰/۰۱۵	۲/۹۲**	۴/۵۷**	۰/۰۱۴**	۰/۰۰۹**	۲	Kin
۰/۷۷**	۰/۷۰۱**	۱۷۹/۰۹**	۱۷۶/۳۹**	۰/۲۲۷**	۰/۲۲۸**	۳	2,4-D
۰/۰۰۷**	۰/۰۰۵**	۰/۶۵**	۰/۸۳**	۰/۰۰۲ns	۰/۰۰۲**	۶	Kin×2,4-D
۰/۰۰۱	۰/۰۰۰۲	۰/۱۲	۰/۰۲	۰/۰۰۱	۰/۰۰۰۲	۲۴	اشتباه
۸/۷۳	۳/۳۷	۵/۶۵	۲/۳۳	۲۰/۴۱	۲/۱۱		ضریب تغییرات

*، ** و ns به ترتیب معنی دار در سطح ۱ درصد، ۵ درصد و عدم معنی داری.



شکل ۱- کالوس تولید شده از جوانه جانبی سرو کوهی

شاهد (فاقد هورمون) (شکل ۵، الف)، بیشترین قطر کالوس مربوط به تیمار 4 mgL^{-1} NAA در ترکیب با 0.1 mgL^{-1} Kin $(11/22)$ میلی‌متر) و کمترین قطر مربوط به تیمار فاقد هورمون (شکل ۵، ب) و بیشترین درصد کالوس‌دهی در تیمار 3 mgL^{-1} ۲,۴-D در ترکیب با 0.2 mgL^{-1} Kin $(7/78)$ بود (شکل ۴، ج).

اسرار زیدی و همکاران (۱) با استفاده از هورمون‌های 0.5 mgL^{-1} BAP و 0.5 mgL^{-1} ۲,۴-D MS میزان کالوس‌زایی *Juniperus excelsa* در محیط را 50 درصد و در محیط WPM را 90 درصد گزارش نمود. علت تفاوت در میانگین کالزالزایی در این گزارش با تحقیق حاضر می‌تواند مربوط به تفاوت در نوع ریز نمونه، و نیز در نوع و مقدار هورمون بکار گرفته شده باشد. توشیو و همکاران (۱۹) بیشترین میزان کالزالزایی در *Juniperus chinensis* را در غلظت 3 میلی‌گرم در لیتر NAA و 0.2 میلی‌گرم در لیتر Kin معرفی کردند که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد. گزارش صالحی شانجانی (۱۴) مبنی بر اینکه افزودن هورمون‌های سیتوکینین باعث افزایش رشد و درصد کاللوس‌دهی در گیاه سرو کوهی می‌شود این نتیجه را تأیید می‌کند.

در گیاه سرخدار گزارش شده که بهترین رشد کالوس در محیط WPM همراه با تنظیم کننده‌های رشد ۲,۴-D توام با BAP در ریزنمونه رویان بالغ بوده است (۵) که با مطالعه حاضر از لحاظ نوع محیط کشت و اکسین به کار رفته مطابقت دارد.

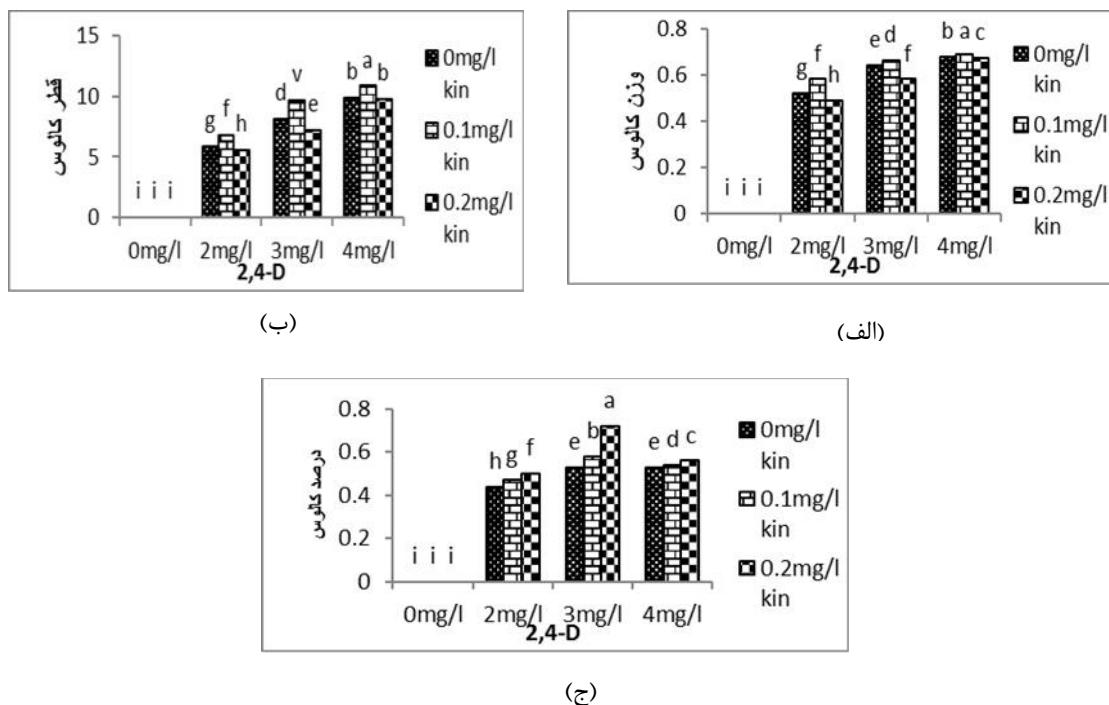
بر اساس نتایج حاصل در محیط کشت MS، اثر سطوح مختلف تیمارهای هورمونی ۲,۴-D، NAA، Kin، ۲,۴-D با Kin و اثر توامان NAA با Kin بر وزن، قطر و درصد کالوس‌دهی در ضریب اطمینان ($P < 0.01$) معنی‌دار بود. بیشترین میانگین وزن کالوس در تیمار هورمونی 4 mgL^{-1} ۲,۴-D در ترکیب با 1 mgL^{-1} Kin $(6/69)$ و کمترین مربوط به تیمار شاهد (فاقد هورمون) (شکل ۲، الف)، بیشترین قطر کالوس مربوط به تیمار 4 mgL^{-1} NAA در ترکیب با 1 mgL^{-1} Kin $(11/06)$ میلی‌متر) و کمترین قطر مربوط به تیمار فاقد هورمون (شکل ۳، ب). بیشترین درصد کالوس‌دهی در تیمار هورمونی 0.5 mgL^{-1} NAA در ترکیب با 1 mgL^{-1} Kin $(7/74)$ و کمترین مربوط به تیمار بیشترین درصد کالوس‌دهی در تیمار هورمونی 0.5 mgL^{-1} NAA در ترکیب با 0.5 mgL^{-1} Kin $(7/78)$ بود (شکل ۳، ج). نتایج حاصل از تجزیه واریانس (جدول ۱) ترکیب هورمون‌های NAA و Kin روی وزن، قطر و درصد کالوس تشکیل شده از کشت جوانه جانبی در محیط کشت WPM نشان داد که اثر تیمار هورمونی NAA بر وزن، قطر و درصد کاللوس‌دهی با ضریب اطمینان ($P < 0.01$) و اثر تیمار Kin و اثر توامان NAA با ضریب اطمینان ($P < 0.05$) معنی‌دار بود و Kin با ضریب اطمینان ترکیب هورمون‌های ۲,۴-D همچنین تجزیه واریانس ترکیب هورمون‌های ۲,۴-D Kin روی وزن، قطر و درصد کالوس تشکیل شده، معنی‌داری اثر ۲,۴-D و Kin با ضریب اطمینان ($P < 0.01$) را نشان داد ولی اثر توامان ۲,۴-D با Kin روی وزن تر کالوس معنی‌دار نبود. بیشترین میانگین وزن کالوس در تیمار هورمونی 3 mgL^{-1} NAA در ترکیب با

جداکشت‌های سرخدار صورت نمی‌گیرد و یا بسیار اندک است اما در محیط‌های حاوی ۰/۰ میلی‌گرم بر لیتر از هورمون Kin درصد کالزالی بسیار بالاست.

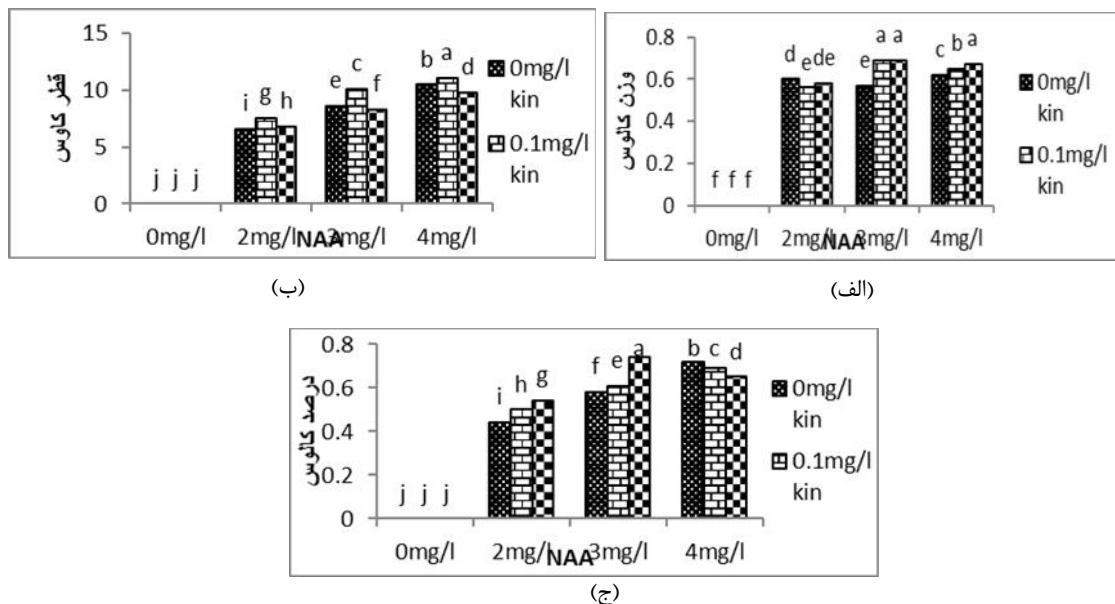
خسرو شاهی و همکاران (۱۰) بیان کردند که بیشترین درصد کالزالی مربوط به ریزنمونه ساقه گیاه سرخدار به میزان ۹۷/۴۶٪ در محیط کشت B5 تکمیل شده با NAA (۰/۰ میلی‌گرم در لیتر)، ۲,۴-D (۰/۰۲ میلی‌گرم در لیتر) و Kin (۰/۰۲ میلی‌گرم در لیتر) است که با نتایج این پژوهش اختلاف دارد که علت این تفاوت را می‌تواند به دلیل نوع محیط کشت و نوع گیاه مورد مطالعه باشد. با توجه نتایج این آزمایش می‌توان پیشنهاد کرد که اگر هدف تولید کالوس است از محیط کشت WPM با ترکیب هورمونی ۳ میلی‌گرم در لیتر ۲,۴-D با ۰/۰۲ میلی‌گرم در لیتر Kin استفاده شود.

در این پژوهش کالزالی از سطوح برش یافته که به داخل محیط کشت فرو نرفته بودند آغاز می‌شد. جداکشت‌های جوانه زودتر از جداکشت‌های برگ شروع به کالزالی کردند. درصد کالوالس زایی جوانه‌های جانبی به طور معنی‌داری ($P=0/001$) از جداکشت‌های برگ بالاتر بود که این مسئله با یافته‌های قربانعلی و دلاور (۸) که روی گیاه سرخدار (سوزنی برگ) انجام گرفت مطابقت دارد.

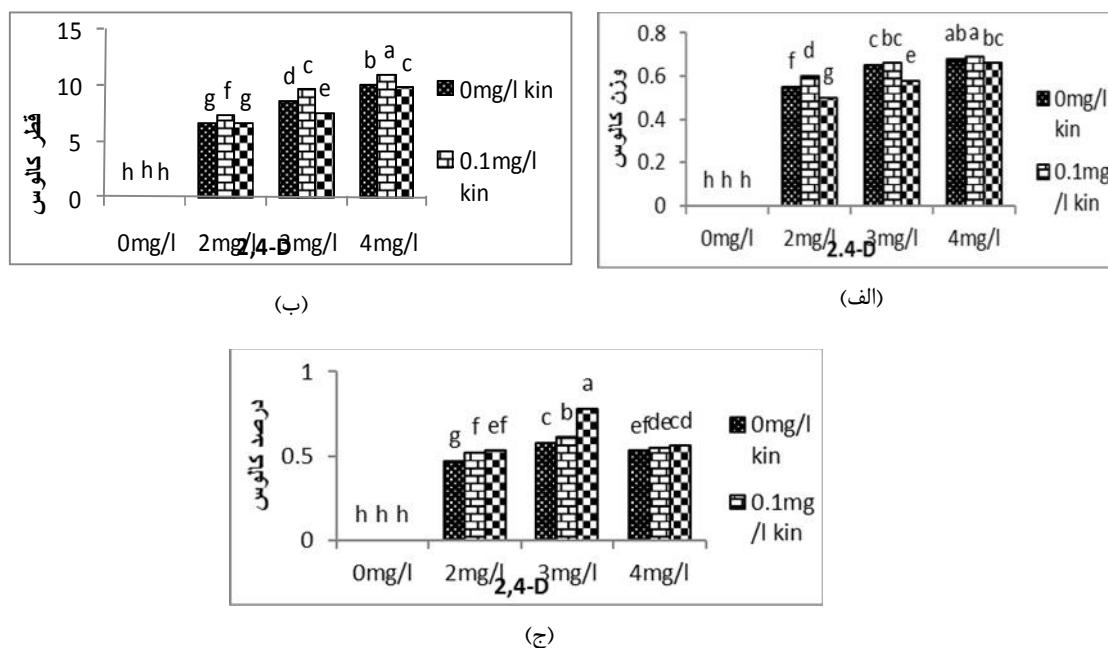
در آزمایش‌های مربوط به تنظیم‌کننده‌های رشد نتایج نشان داد که ۲,۴-D برای کالزالی جداکشت‌های جوانه جانبی بهتر از NAA عمل می‌کند و غلطت‌های کم Kin (۰/۰۱ و ۰/۰۲) روی کالزالی اثر مشتبث دارد در این زمینه ویکرمزینه و آرتکا (۲۰) نشان دادند که در محیط‌های دارای ۲ میلی‌گرم در لیتر از هورمون Kin و غلطت‌های مختلف از اکسین هیچ‌گونه کالزالی در



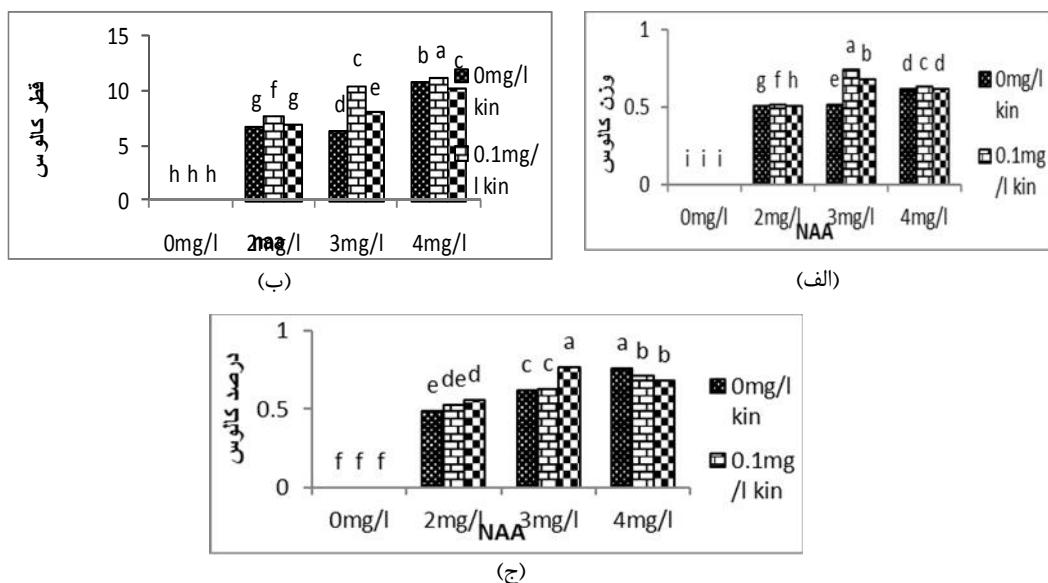
شکل ۲- مقایسه میانگین اثر توامان هورمون ۲,۴-D و KIN روی صفات: (الف) درصد تشکیل کالوس، (ب) قطر کالوس و (ج) وزن کالوس در محیط کشت MS



شکل ۳- مقایسه میانگین اثر توانان هورمون NAA و KIN روی صفات: (الف) وزن کالوس،
ب) قطر کالوس و ج) درصد تشکیل کالوس در محیط کشت MS



شکل ۴- مقایسه میانگین اثر توانان هورمون 2,4-D و KIN روی صفات: (الف) وزن کالوس، ب)
قطر کالوس و ج) درصد تشکیل کالوس در محیط کشت WPM



شکل ۵- مقایسه میانگین اثر توامان هورمون NAA و KIN روی صفات: (الف) وزن کالوس، (ب) قطر کالوس و (ج) درصد تشکیل کالوس در محیط کشت WPM

منابع

- Asrar, Zaidi, M., S. Khan, N. Jahan, A. Yousafzai and A. Mansoor. 2012. Micropropagation and Conservation of Three Juniperus Species (cupressaceae). Pakistan journal of Botany, 44: 301-304.
- Asnaashari, M., O. Karami and A. Mahmoodipour. 2007. In Vitro Callus Production from Leaf and Stem Explant of Norfolk Island pine (*Araucaria Excelsa* L.). Journal of Agricultural Sciences, 38: 659-664.
- Bhojwanis, S. 1989. Theory and Practice Plant Tissue Culture. 767 pp., Publishing campany Inc., New York.
- Correa, Y.M., J. Nino and Y. Mosquera. 2006. Cuantification the taxol y baccatin III EN callos de *Taxus baccata* por cromatografia liquida de alta eficiencia (HPLC). Scientia et Technica, 32: 431-435.
- Datta, M.M., A. Majumder and S. Jha. 2006. Organogenesis and plant regeneration in *Taxus wallichiana* (Zucc.). Plant Cell Reports, 25: 11-18.
- Evan, D.E., J.O.D. Coleman and A. Kerans. 2003. Plant Cell Culture. BIOS Scientific Publisher-Taylor and Francis Group. ISBN: 1 85996 320 X, 194 pp.
- Hussain, A., I.A. Qarshi H. Nazir, I. Uliah, M. Rashid and Z.Kh. Shinwari. 2013. In vitro callogenesis and organogenesis in *Taxus wallichiana* zucc.the Himalayan yew. Pakistan Journal of Botany 45: 1755-1759.
- GHorbanli, M. and K. Delavar. 2001. Effect of the type and Concentration of Sugars on Taxol in callus of *Taxus Baccata* L.Iranian Journal Agriculture Sciences, 32: 575-583.
- Kirby, E.G., T. Leustek and M.S. Lee. 1987. Nitrogen nutrition. In: Bonga,J.M. and D.J. Durzan, (eds.), *Cell and Tissue Culture in Forestry*, 1: 237 pp.
- KHosroshahi, M., M. Valizade, A. GHasempour, M. KHosroshahli and H. Naghdi. 2006. The effect of Culture Media, Explant and growth regulators on callus and Taxol production in *Taxus baccata* L. Journal of Agricultural Sciences, 1: 69-78.
- Muhammad, I., J.S. Mossa and F.S. El-Feraly. 1992. Antibacterial diterpenes from the leaves and seeds of *Juniperus excelsa* M. Bieb. Phytotherapy Research, 6: 261-2. 95.
- Nasseri, E., S. Kalantari and R. Naderi. 2013. The effect of culture media type and species on embryogenic tissue induction in somatic embryogenesis of pine genus. Iranian Journal of Forest and Poplar Research, 20: 679-690.
- Sadghi, H., K.A. KHavari-Nejad, H. Fahimi and F. Falahian. 2006. The effect of growth regulators on callus production potential and growth in the stem explant of Tehran Pine (*Pinus Eldrica* M.). Journal of Agricultural Sciences, 13: 650-664.
- Salehi Shanjani, P. 2006. Seasonal variation of the leaf and cone oil of *Juniperus Excelsa* M.B Journal of Medicinal Plants, 17: 50-8.
- Salehi Shanjani, P. 2003. Nitrogen Effect on Callus Induction and Plant Regeneration of *Juniperus excelsa*. International Journal of Agriculture and Biology, 5: 419-422.

16. Skala, A. and A. Wysokinska. 2006. In vitro Regeneration of (*Salvia nemorosa* L.) from shoot tips and leaf explants. Department of Biology and Pharmaceutical Botany, 1: 90-151.
17. Sokovic, M.D., M. Ristic and D. Grubisic. 2004. Chemical Composition and Antifungal Activity of the Essential Oil from *Juniperus excelsa* Berries. Pharmaceutical Biology, 42: 328-31.
18. Topcu, G., R. Erenler, O. akmak, C.B. Johansson, C. Lelik, H.B. Chai and J.M. Pezzuto. 1999. Diterpenes from the berries of *Juniperus excelsa*. Phytochem. Phytochemistry, 50: 1195-1197.
19. Toshio, M., M. Masaru, I. Kazutaka and T. Sanro. 1998. Production of Podophyllotoxin in *Juniperus Chinensis* Callus Cultures Treated with Oligosaccharides and a Biogenetic Precursor. Phytochemistry, 49: 491-496.
20. Wickremesinhe, S.Y.P. and N. Arteca. 1993. Taxus callus culture: Initiation optimization, optimization and Taxol production. Plant Cell Tiss.Org, 35: 181-193.

Comparison of Amount of Callus Induction in *Juniperus Excelsa* on MS and WPM Culture Media Using Different Concentration of NAA, 2,4-D and Kin

Hassan Baravardi¹, Gholam Ali Ranjbar² and Sodeh Kamali Farah Abadi³

1- M.Sc. Student, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University
(Corresponding author: h.baravardi@gmail.com)

2 and 3- Associate Professor and Expert, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University
Received: October 23, 2014 Accepted: February 4, 2015

Abstract

Juniper (*Juniperus excelsa* L.), a plant with very slow growth and belong to *Cupressaceae* family, has medicinal characteristics and is rich in aromatic essential oils and valuable in Pharmaceutical and perfumery industries. Therefore, to use tissue culture an experiment was undertaken using lateral buds explants. Present study has been fulfilled using factorial experiments based on completely randomized designs with 3 replications using MS (Murashige and Skoog) and WPM (Woody Plants Medium) in two separate experiments that supplemented with different concentrations of Kin (0, 0.1, 0.2 mg l⁻¹) with 2,4-D (0, 1, 2, 3, 4 mg l⁻¹) and NAA (0, 1, 2, 3, 4 mg l⁻¹) with Kin (0, 0.1, 0.2 mg l⁻¹). The highest average weight of calli was produced on WPM medium containing 3 mg l⁻¹ NAA in combination with 0.2 mg l⁻¹ Kin. The highest diameter of calli was formed on WPM medium containing 4 mg l⁻¹ NAA in combination with 0.1 mg l⁻¹ Kin and the highest percentage of callus induction was also obtained on WPM medium containing 3 mg l⁻¹ 2,4-D in combination with 0.2 mg l⁻¹ Kin.

Keywords: Callus Induction, Phytohormone, *Juniperus Excelsa* L., Lateral Buds Explants