تولیدات گیاهی (مجله علمی کشاورزی)، جلد ۳۷ شماره ۴، زمستان ۹۳

اثر مواد تنظیم‌کننده‌ی رشد و آنتی‌اکسیدان بر القاء درون شیشه‌ای کالوس در گیاه سرخدار اروپایی (*Taxus baccata* L.)

ابوالقاسم عباسی کجانی[۱]، خلیل عالمی سعید[۲]*، محمد حسین دانشور[۳] و محمد رضا مفید[۴]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی ، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین ،ملاثانی

۲*- **نویسنده مسوول:** استادیار گروه زراعت، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین، ملاثانی (kh_alamisaeid@yahoo.com)

۳- استاد گروه باغبانی دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین، ملاثانی

۴- استادیار گروه بیوشیمی ، دانشکده داروسازی و علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

تاریخ دریافت: ۹۰/۹/۲۱ تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۱/۳۰

چکیده

سرخدار منبع اصلی تاکسول، داروی بسیار مؤثر ضدسرطان، است و کشت سلولی یکی از راه‌های افزایش تولید آن می‌باشد. به منظور تعیین ترکیب هورمونی بهینه و ماده آنتی‌اکسیدان مناسب در محیط کشت کالوس‌زایی سرخدار اروپایی موجود در ایران آزمایشی به‌صورت فاکتوریل شامل چهار ترکیب هورمونی ۱) حاوی ٤/٥ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D، ۱ میلی‌گرم در لیتر کینتین و ۰/۳۳ میلی‌گرم در لیتر جیبرلیک اسید، ۲) حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA ، ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر کینتین، ۳) حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D، ۰/٥ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/٥ میلی‌گرم در لیتر جیبرلیک‌اسید و ٤) حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D، ۰/٥ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/٥ میلی‌گرم در لیتر کینتین در ترکیب با دو نوع آنتی‌اکسیدان مختلف پلی‌وینیل‌پیرولیدین و آسکوربیک اسید و در طول دو دوره یک ماهه از نظر درصد القاء کالوس، وزن کل کالوس تولیدی و نسبت افزایش وزن کالوس، در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۸ تکرار بر پایه محیط B5 اجرا شد. اثر ترکیب‌های هورمونی مختلف و اثر متقابل بر درصد کالوس‌زایی در ماه اول معنی‌داری بود اما بین انواع آنتی‌اکسیدان تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. بین هیچ‌یک از تیمارها از نظر وزن کل کالوس تولیدی، در ماه اول تفاوت معنی‌داری دیده نشد اما در ماه دوم اثر ترکیب‌های هورمونی، آنتی‌اکسیدان‌ها و اثر متقابل آنها معنی‌دار بود. بین ترکیب‌های هورمونی و آنتی‌اکسیدان‌های مختلف از نظر نسبت افزایش وزن کالوس نیز تفاوت معنی‌داری مشاهده شد. بر اساس نتایج، برای دستیابی به حداکثر عملکرد و کیفیت کالوس بالا، فرآیند کشت باید در دو مرحله بر روی دو محیط انجام شود؛ برای دستیابی به حداکثر القاء در شروع دورهٔ کشت از 2,4-D بعنوان منبع اکسینی استفاده گردد ولی در ماه‌های بعد، به نمونه‌های القاء شده اجازه داده شود در محیط کشت دارای NAA به جای 2,4-D رشد کنند تا کالوس بهتری بدست آید. استفاده از آسکوربیک اسید به‌عنوان آنتی‌اکسیدان در هرمحیط کشتی نیز ضروری است.

کلید واژه ها: سرخدار اروپایی (Taxus bacata L.)، هورمون، آنتی‌اکسیدان، کالوس، تاکسول

مقدمه

تاکسول را می‌توان مهم‌ترین داروی ضدسرطانی دانست که تاکنون شناسایی شده است (هان و همکاران[۱]، ۲۰۱۰). این ماده یک آلکالوئید دی‌ترپنوئیدی است که به گروهی از دی‌ترپن‌ها به نام تاکسان تعلق دارد (فرنس[۲]، ۲۰۰۷). به دلیل محتوای بسیار پایین تاکسول در بافتهای گیاه سرخدار و نیز رشد

1- Han *et al.*

2- Frense

بسیار کم این گیاه، تهیه این دارو به مقدار مورد نیاز، مهم‌ترین مسئله پیش روی دانشمندان است. به نظر می‌رسد که کشت سلولی سرخدار یکی از مهم‌ترین راه‌کارهای تولید بلندمدت و پایدار تاکسول باشد (ژانگ[1]، ۲۰۰۲). رسیدن به سطح تجاری تولید برای هر محصول ثانویه گیاهی به قابلیت تولید آن محصول وابسته است. قابلیت تولید بالا نیز به نوبه خود منوط به حصول بالاترین قابلیت تولید بیوماس گیاهی و نیز متابولیت هدف است. در شرایط درون شیشه‌ای اولین گام برای رسیدن به این منظور، القاء کالوس در محیطی مناسب است که ضمن تولید کالوس با کیفیت خوب، بالاترین سطح تولید ثانویه را نیز داشته باشد (دورنبورگ و کنور[2]، ۱۹۹۷). به دلیل اهمیت بالای این دارو، تاکنون آزمایش‌های نسبتاً زیادی در زمینه کشت بافت سرخدار انجام شده است. مشخص شده است که در بین پوست، شاخه، آریل سبز و قرمز، اجزای دانه، ساقه‌های جوان و برگ‌ها برای تولید کالوس در سرخدار، ساقه‌ها بهترین منبع ریزنمونه هستند (ژانگ، ۲۰۰۲؛ هین و همکاران[3]، ۲۰۰۴). بهترین محیط پایه، محیط B5 است و عموماً از 2,4-D در ترکیب با سایر تنظیم‌کننده‌های رشد برای القاء کالوس استفاده می‌شود (گیبسون و همکاران[4]، ۱۹۹۳؛ فرنس، ۲۰۰۷). نتایج مختلفی که تاکنون از تحقیقات متعدد بدست آمده است بیانگر تفاوت‌هایی در شرایط بهینه محیط کشت در بین ژنوتیپ‌ها و گونه‌های مختلف سرخدار است. بنابراین لازم است که برای مطالعه سنتز تاکسول در هر گونه سرخدار، ابتدا ترکیب مناسب محیط کشت از جمله ترکیب و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشدی به منظور دستیابی به بهترین شرایط رشد سلولی مورد ارزیابی قرار گیرد. به همین دلیل، این آزمایش با هدف مقایسهٔ بعضی از مهم‌ترین محیط‌های کشت استفاده شدهٔ قبلی و نیز محیط‌های جدید، برای مطالعه القاء و رشد کالوس در گیاه سرخدار موجود در ایران (گونه *Taxus baccata* L.) طراحی و انجام شد.

مواد و روش‌ها

مرحله آماده سازی و کشت نمونه‌ها: نمونه‌های گیاهی مورد نیاز در این آزمایش، از درختچه موجود در باغ گل‌های اصفهان تهیه گردید. ریزنمونه‌ها از شاخه‌های جوان و سالم گیاه که فاقد علائم بیماری و کمبود بودند، تهیه شد. به منظور سترون‌کردن ریزنمونه‌ها، ابتدا ساقه‌های جوان گیاه جداسازی شد و به خوبی با آب شستشو گردید، سپس به مدت یک دقیقه در اتانل ۷۰ درصد و پس از آن ۲۰ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۱/۵ درصد قرار داده شدند. در نهایت قبل از کشت و در زیر لامینار، سه مرتبه با آب مقطر استریل شستشو شدند تا بقایای عوامل ضد عفونی کننده، به‌طور کامل حذف شوند. در زیر لامینار ریزنمونه‌های سترون‌شده به صورت یکنواخت به قطعاتی به طول ۰/۸ سانتیمتر برش داده و ۱۰ ریزنمونه در هر پتری کشت شد.

طرح آماری: این آزمایش به صورت فاکتوریل با طرح پایهٔ کاملاً تصادفی با ۸ تکرار انجام شد. محیط پایهٔ مورد استفاده در تمام کشت‌ها شامل محیط پایه B5 جامد حاوی ۲۵ گرم در لیتر ساکاروز بود.

عوامل آزمایشی: چهار ترکیب هورمونی مختلف ۱) شامل ۴/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D ، ۱ میلی‌گرم در لیتر کینتین و ۰/۳۳ میلی‌گرم در لیتر جیبرلیک اسید (کاسیدو و همکاران[5]، ۱۹۹۹)، ۲) شامل ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA ، ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر کینتین (یاری‌خسروشاهی و همکاران[6]،

1- Zhong
2- Dornenburg & Knorr
3- Hien *et al.*
4- Gibson *et al.*
5- Cusido *et al.*
6- Yari Khossroushahi *et al.*

۲۰۰۶)، ۳) شامل ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D ، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر جیبرلیک‌اسید و ۴) شامل ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D ، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر کینتین به عنوان عامل آزمایشی اول بودند. همچنین از دو نوع آنتی‌اکسیدان مختلف شامل پلی‌وینیل پیرولیدون (۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) و آسکوربیک اسید (۵۰ میلی‌گرم بر لیتر) به‌عنوان عامل دوم استفاده شد.

اندازه‌گیری میزان القاء و رشد کالوس در نمونه‌ها: محیط‌های حاوی ریزنمونه، در شرایط کشت تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتیگراد قرار گرفتند. پس از یک دوره یک ماهه، تعداد ریزنمونه‌های القاء شده در هر تیمار (پتری) شمارش و پیش از واکشت وزن کل کالوس‌های تولیدی هر پتریدیش با استفاده از ترازویی با دقت ۰/۰۰۰۱ گرم و یک پتری‌دیش استریل زیر هود لامینار اندازه‌گیری شد (کچام و همکاران[1]، ۱۹۹۵). برای درصد القای کالوس تعداد ریزنمونه‌های القا شده در هر پتری به تعداد کل ریزنمونه‌های آن تقسیم و درصد ضرب شد. سپس ریزنمونه‌های القاشده به محیط کشت جدید که حاوی ترکیب مشابه محیط قبل بودند منتقل شده و به‌مدت یک ماه دیگر تحت شرایط کشت مشابه پرورش داده شدند. با استفاده از وزن کل کالوس‌های هر پتری در ماه اول و ماه دوم، میزان و نسبت افزایش وزن کالوس‌ها نیز محاسبه گردید. داده‌های اندازه‌گیری شده تجزیه واریانس و میانگین‌ها با آزمون دانکن در سطح خطای ۱٪ مقایسه شدند. کیفیت کالوس‌ها نیز به روش مشاهده‌ای از نظر تردی[2] و رنگ (آرمسترانگ[3]، ۱۹۸۵) بررسی شد.

نتایج و بحث

در طول ماه اول، ترکیب‌های هورمونی مختلف و نیز اثر متقابل ترکیب هورمونی و آنتی‌اکسیدان، تاثیر معنی‌داری بر درصد القای کالوس داشتند اما بین دو آنتی‌اکسیدان، تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (جدول۱). بنابراین نوع و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشدی بر درصد القاء کالوس در ریزنمونه‌ها اثر قابل توجهی دارد ولی اثر آنتی‌اکسیدان موجود در محیط کشت بر روی درصد القای کالوس، به ترکیب هورمونی مورد استفاده بستگی دارد. بیشترین درصد القای کالوس از محیط حاوی ترکیب هورمونی اول و آنتی‌اکسیدان PVP به میزان ۹۶/۲۵ درصد بدست آمد (جدول۲) و کمترین مقدار مربوط به محیط حاوی ترکیب هورمونی چهارم و آنتی‌اکسیدان آسکوربیک اسید به میزان ۴۸/۹ درصد بود.

از نظر وزن کل کالوس تولیدی در ماه اول، تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای مختلف دیده نشد (جدول۱). بنابراین ترکیب هورمونی، نوع آنتی‌اکسیدان و اثر متقابل آن‌ها تاثیر قابل توجهی بر میزان رشد کالوس در طول ماه اول نداشت. اما وزن کل کالوس تولیدی در ماه دوم تحت تاثیر معنی‌دار ترکیب‌های هورمونی، آنتی‌اکسیدان‌ها و اثر متقابل آن‌ها بود (جدول۱). بیشترین وزن کالوس در ماه دوم، از محیط کشت حاوی ترکیب هورمونی دوم و آنتی‌اکسیدان آسکوربیک اسید به میزان ۱/۱۹ گرم و کمترین مقدار از محیط کشت حاوی ترکیب هورمونی سوم و آنتی‌اکسیدان PVP به میزان ۰/۲۸ گرم بدست آمد (جدول۲). همچنین مشاهدات نشان داد که کیفیت بافت کالوس حاصله از محیط‌های کشت حاوی ترکیب هورمونی دوم بهتر از محیط‌های دیگر بود و کالوس‌های تولیدی سفیدتر و تردتر بودند (شکل۱). از طرف دیگر نتایج نشان می‌دهد که وزن کالوس تولیدی در محیط‌هایی که با آنتی‌اکسیدان آسکوربیک اسید تهیه شده بودند نسبت به محیط‌های حاوی آنتی‌اکسیدان PVP به طور

1- Ketchum *et al.*
2- Friability
3- Armstrong

معنی‌داری بیشتر بود. همچنین مشاهدات در طول دوره به وضوح قدرت بالاتر آسکوربیک اسید را در جلوگیری از اکسیده‌شدن ترکیبات فنلی در محیط کشت نشان می‌داد زیرا محیط‌های حاوی PVP برخلاف محیط‌های حاوی آسکوربیک اسید، پس از گذشت یک تا دو هفته از دوره کشت شروع به قهوه‌ای شدن می‌کردند و در پایان دوره، اختلاف رنگ کالوس‌های پرورش‌یافته روی محیط‌های حاوی PVP با کالوس‌های پرورش‌یافته روی محیط‌های حاوی آسکوربیک‌اسید کاملا آشکار بود (شکل۱).

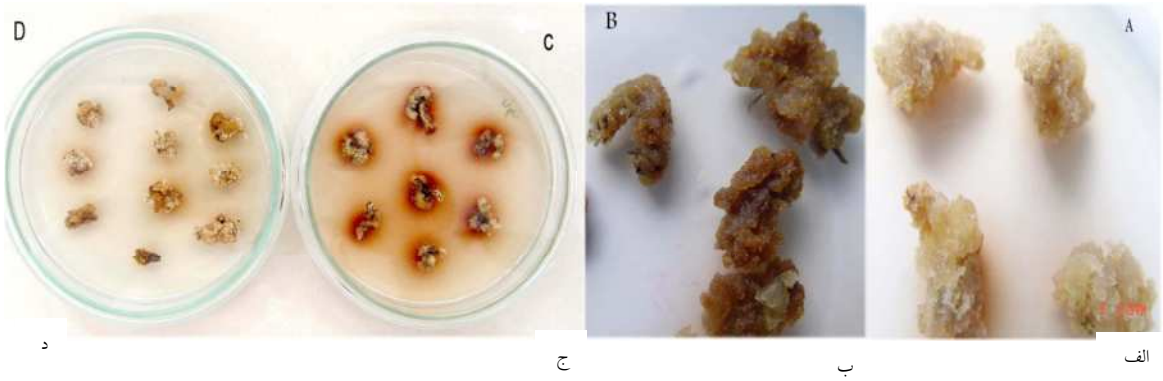
از نظر نسبت افزایش وزن کالوس بین ترکیب‌های هورمونی و نیز آنتی‌اکسیدان‌های مختلف، تفاوت معنی‌داری وجود داشت ولی اثر متقابل آن‌ها معنی‌دار نبود (جدول۱). بیشترین نسبت مربوط به ترکیب هورمونی دوم و آنتی‌اکسیدان آسکوربیک اسید به میزان ۳/۵۵ و کمترین نسبت مربوط به ترکیب هورمونی سوم و آنتی‌اکسیدان PVP به میزان ۰/۹۶ بود. از نظر نوع آنتی‌اکسیدان نیز، اسید آسکوربیک مؤثرتر از PVP بود (جدول۲).

جدول۱- جدول تجزیهٔ واریانس اثر ترکیبات هورمونی و آنتی‌اکسیدانی بر القاء و رشد کالوس سرخدار

منابع تغییرات (S.O.V)	درجه آزادی (Df)	میانگین مربعات (MS)			
		درصد القاء کالوس در ماه اول	وزن کالوس در ماه اول	وزن کالوس در ماه دوم	نسبت افزایش وزن کالوس
ترکیب هورمونی (A)	۳	۰/۰۷۲۸ **	۰/۰۰۸۹ n.s	۰/۵۳۶۵ **	۰/۰۹۵۴ **
آنتی‌اکسیدان (B)	۱	۰/۰۰۰۸ n.s	۰/۰۰۰۰۲ n.s	۲/۱۲۸۳ **	۰/۶۳۳۲ **
اثر متقابل (A×B)	۳	۰/۰۹۲۸ **	۰/۰۴۶۱ n.s	۰/۲۹۸۱ **	۰/۰۰۲۳ n.s
خطا	۵۶	۰/۰۱۷۴	۰/۰۲۰۳	۰/۰۵۴۷	۰/۰۱۶۹
ضریب تغییرات (CV)		۶/۸۷۴۵	۵۰/۹۳	۳۶/۲۴۶	۳/۶۹۰۳

جدول۲- جدول مقایسات میانگین‌های اثر ترکیبات هورمونی و آنتی‌اکسیدان بر کالوس‌زایی سرخدار اروپایی

آنتی‌اکسیدان	ترکیب هورمونی	درصد القاء کالوس	وزن کل کالوس در ماه اول (گرم)	وزن کل کالوس در ماه دوم (گرم)	نسبت افزایش وزن
PVP	۱	۹۶/۲۵ A	۰/۳۳۹۹ A	۰/۷۴۶۳ BC	۲/۲۰ D
	۲	۶۴/۰۰ BC	۰/۲۰۶۱ A	۰/۴۶۷۵ CD	۲/۲۷ D
	۳	۷۸/۹۰ ABC	۰/۳۰۸۵ A	۰/۲۸۳۵ E	۰/۹۲ F
	۴	۷۶/۶۶ AB	۰/۲۳۶۶ A	۰/۳۵۵ DE	۱/۵۰ E
اسید آسکوربیک	۱	۸۳/۳۰ AB	۰/۲۴۱۶ A	۰/۸۱۰۳ B	۳/۳۵ A
	۲	۸۲/۵۰ AB	۰/۳۴۲۱ A	۱/۱۸۷۵ A	۳/۴۷ A
	۳	۸۰/۰۰ AB	۰/۲۷۱۰ A	۰/۶۷۳۱ BCD	۲/۴۸ C
	۴	۴۸/۹۰ C	۰/۲۰۳۵ A	۰/۶۴۰۲ BCD	۳/۱۵ B



شکل۱- الف: کالوس تولیدی در محیط حاوی ترکیب هورمونی دوم، ب: کالوس تولیدی در محیط حاوی ترکیب هورمونی اول (هر دو محیط حاوی آنتی‌اکسیدان آسکوربیک). ج: محیط حاوی آنتی‌اکسیدان PVP و د: محیط حاوی آنتی‌اکسیدان آسکوربیک اسید

بررسی درصد القاء کالوس در محیط‌های مختلف نشان می‌دهد که اکسین 2,4-D نسبت به NAA قدرت القاءکنندگی بیشتری دارد و این نتیجه با توجه به مصنوعی بودن 2,4-D و تجزیه کمتر آن در سلول‌های گیاهی، قابل انتظار است. این مشاهده با گزارش ویکرمزینه و آرتکا[1] (۱۹۹۳) مبنی بر برتری 2,4-D نسبت به NAA و IBA در القاء کالوس در گونه‌های *T. baccata* و *T. brevifolia* مطابقت دارد. مقایسهٔ ترکیب‌های هورمونی سوم و چهارم نشان می‌دهد که در القاء کالوس، جیبرلیک اسید مؤثرتر از کینتین بوده است. کچام و همکاران (۱۹۹۵) نیز بر تأثیر مثبت سیتوکینین‌ها، جیبرلیک‌اسید و آبسیزیک‌اسید در ترکیب با اکسین‌ها بر القاء و رشد کالوس سرخدار اشاره کرده‌اند اما در آزمایش آنها اختلاف معنی‌دار نبود. القاء کالوس در تمامی تیمارها با روند نسبتاً کندی از هفتهٔ سوم به مرور آغاز شد. این حالت در تمامی تیمارها تقریباً مشابه بود و از نظر زمان شروع، شرایط در همهٔ تیمارها تقریباً یکسان بود. این نتایج با مشاهدات هین و همکاران (۲۰۰۴) مطابقت دارد.

معنی‌دار نشدن وزن کالوس در ماه اول، می‌تواند ناشی از کندی القاء کالوس در طول این ماه باشد. به گفته دیگر، از آن‌جا که القاء کالوس از هفته سوم به تدریج شروع شد، نمونه‌های القا شده فرصت چندانی برای رشد بیشتر در طول ماه اول نداشتند. اما در ماه دوم وجود فرصت کافی برای رشد، اختلاف بین تیمارها را کاملاً آشکار کرد. کیفیت بالای کالوس حاصله در محیط‌های حاوی ترکیب هورمونی دوم نسبت به محیط‌های دیگر را می‌توان با نوع اکسین این محیط‌ها مرتبط دانست. در حضور مقادیر بالای 2,4-D، کالوس‌ها قهوه‌ای‌تر می‌شدند در حالی‌که در حضور NAA، کالوس‌ها به مراتب سفیدتر و تردتر بودند. رشد کالوس در حضور آسکوربیک‌اسید نسبت به PVP بهتر صورت می‌گرفت. دلیل این مشاهده را می‌توان به قدرت بالاتر آسکوربیک‌اسید در جلوگیری از اکسیده‌شدن ترکیبات فنلی نسبت داد زیرا با آسکوربیک‌اسید، محیط‌ها روشن‌تر بوده و قهوه‌ای شدن محیط کشت در اثر اکسیداسیون ترکیبات فنلی، به مراتب کمتر رخ می‌داد.

نتیجه گیری

با توجه به نتایج بدست‌آمده، پیشنهاد می‌شود برای دستیابی به حداکثر عملکرد و نیز بالاترین کیفیت بافت کالوس، فرآیند کشت در دو مرحله و بر روی دو محیط مجزا انجام گردد. با توجه به ضعف رشد کالوس، برای

1- Wickremesinhe & Arteca

دستیابی به حداکثر القاء در شروع دورهٔ کشت از محیطی دارای 2,4-D بعنوان منبع اکسینی استفاده و در ماه‌های بعد، به کالوس‌های القاء شده اجازه داده شود تا حداکثر رشد خود را در محیطی کشت دارای۲ میلی‌گرم NAA به جای 2,4-D انجام دهند. نظر به فراوانی ترکیبات فنولی در سلول‌های سرخدار استفاده از آسکوربیک اسید به‌عنوان آنتی‌اکسیدان در محیط کشت ضروری است.

سپاس گزاری

بخشی از این تحقیق در پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی اصفهان انجام شده است که در اینجا مورد تقدیر و سپاسگزاری قرار می‌گیرد.

منابع

1. Armstrong, C.L., and Green, C.E. 1985. Establishment and maintenance of friable embryogenic maize callus and involvement of L-proline. Planta, 164: 207-214.

2. Cusido, R.M., Palazo, J., Osorio, A., Mallol, A., Bonfill, M., Morales, C., and Pinol, T. 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.

3. Dornenburg, H., and Knorr, D. 1997. Challenges and opportunities for metabolite production from plant cell and tissue cultures. Food Technology, 51: 47-54.

4. Frense, D. 2007. Taxanes: perspectives for biotechnological production. Applied Microbiology and Biotechnology 73: 1233–1240.

5. Gibson, D.M., Ketchum, R.E.B., Vance, N.C., and Christen, A.A. 1993. Initiation and growth of cell lines of *Taxus brevifolia* (Pacific Yew). Plant Cell Reports, 12: 479-482.

6. Han, M.G., Jeon, K.Y., Mun, S., and Kim, J.H. 2010. Development of a micelle-fractional precipitation hybrid process for the pre-purification of paclitaxel from plant cell cultures. Process Biochemistry, 45: 1368-1374.

7. Hien, N.T., Khiem, D.V., Vu, N.H., Don, N.T., and Nhut, D.T. 2004. Primary study on the induction and growth of *Taxus wallichiana* Zucc., A valuable medicinal plant in Lam Dong Province. Journal of Agriculture Sciences and Technology, 4: 79-85.

8. Jaziri, M., Zhiri, A., Gue, Y., and Dupont, J. 1996. *Taxus* cell and organ culture as an alternative resource for taxoids production. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 46: 59-75.

9. Ketchum, R.E.B., Gibson, D.M., and Greenspan, L. 1995. Media optimization for maximum biomass production in cell cultures of pacific yew. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 42: 185-193.

10. 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: 299-303.

11. Ramachandra, S.R., and Ravishankar, G.A. 2002. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. Biotechnology Advances, 20: 101–153.

12. 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.

13. Yari Khosroushahi, A., Valizadeh, M., Ghasempour, A., Khosrowshahli, M., Naghdibadi, H., Dadpour, M.R., and Omidi, Y. 2006. Improved Taxol production by combination of inducing factors in suspension cell culture of *Taxus baccata* L. Cell Biology International, 30: 262-269.

14. Zhong, J.J. 2002. Plant cell culture for production of paclitaxel and other taxanes. Journal of Bioscience and Bioengineering, 94: 591-599.