تاثیر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر رشد درون‌شیشه‌ای فندق (*Corylus avellana*) و تولید تاکسول در کالوس

رقیه حضرتی جهان[۱]، ناصر زارع[۱*]، سارا دژستان[۱]، پریسا شیخ‌زاده مصدق[۱] و منوچهر فرجامی‌نژاد[۲]

[۱] اردبیل، دانشگاه محقق اردبیلی، گروه زراعت و اصلاح نباتات

[۲] اردبیل، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اردبیل، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی

تاریخ دریافت: ۹۴/۶/۱۷ تاریخ پذیرش: ۹۵/۴/۲۶

چکیده

در این تحقیق، تاثیر نوع و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مختلف (2,4-D, NAA, Kin, BAP, IBA, TDZ) بر کالوس‌زایی ریزنمونه‌های مختلف، تکثیر درون‌شیشه‌ای فندق با استفاده از ریزنمونه گره و همچنین میزان تاکسول در کالوس مورد بررسی قرار گرفت. ریزنمونه‌های بذر، برگ و ساقه فندق پس از ضدعفونی سطحی، روی محیط کشت MS حاوی ۱، ۲ و ۴ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و NAA در ترکیب با Kin و BAP (۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) کشت شدند. علاوه بر این، بمنظور تکثیر درون‌شیشه‌ای، ریزنمونه‌های تک گره فندق تهیه شده و روی محیط کشت MS حاوی سطوح مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی کشت شدند. نتایج نشان داد که درصد کالوس‌زایی ریزنمونه برگ بطور معنی‌داری بیشتر از بذر و ساقه است. بیشترین درصد کالوس‌زایی و وزن تر کالوس در محیط MS حاوی دو میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP مشاهده گردید. در ریزنمونه‌های تک گره فندق بیشترین درصد ریشه‌زایی در محیط MS حاوی دو میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۵ میلی-گرم در لیتر Kin و در محیط MS حاوی چهار میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin مشاهده شد. بیشترین تعداد برگ نیز در محیط MS حاوی BAP به‌همراه ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر IBA و محیط MS حاوی ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر TDZ و ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر IBA مشاهده شد. بیشترین مقدار تاکسول در کالوس‌های حاصل از ریزنمونه بذر و برگ در محیط کشت MS حاوی یک میلی‌گرم در لیتر 2,4-D به‌همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP به‌دست آمد.

واژه های کلیدی: ریزازدیادی، کشت بافت، متابولیت ثانویه، *Corylus avellana*

* نویسنده مسئول: ۰۴۵-۳۳۵۱۰۱۴۰، پست الکترونیکی: nzare@uma.ac.ir

مقدمه

فندق با نام علمی *Corylus avellana* متعلق به راسته فاگالیس (Fagales) از خانواده غان (Betulaceae) و از زیرخانواده کوریلوئیده (Coryluideae) می‌باشد (۱۲). فندق با سطح پلوئیدی ۲n=2x=۲۲ درختچه‌ای خزان‌کننده، تک پایه و خودناسازگار است و کشورهای ترکیه، ایتالیا و اسپانیا از جمله کشورهای تولیدکننده عمده آن هستند (۲۳). فندق یکی از مهم‌ترین محصولات آجیلی در جهان (۸) و منبع غنی از انرژی و حاوی ۶۰-۴۰ درصد لیپید می-باشد که به‌خاطر روغن زیاد، اسیدهای چرب ضروری، استرول‌ها، آنتی‌اکسیدان‌ها، مواد معدنی و داشتن ویتامین E در جلوگیری از بیماری‌های دیابت و سرطان موثر است (۹). همچنین در تحقیقات انجام گرفته وجود ماده تاکسول در برگ‌ها و پوسته فندق و همچنین کشت سلولی فندق ثابت شد (۵، ۷، ۱۶، ۲۷). تاکسول یک ماده ضدسرطان بسیار موثر است که برای درمان انواع سرطان‌ها به‌کار گرفته شده (۳۶) و برای اولین بار از پوست درخت سرخدار

(*Taxus baccata*) استخراج شده است. به‌علت ارزش اقتصادی بالای تاکسول، کمبود درخت سرخدار، هزینه بالای سنتز آن و به‌دلیل تقاضای رو به رشد برای این دارو، منابع طبیعی دیگری مانند فندق جهت تولید این ترکیب مورد بررسی قرار گرفته است (۷). امروزه با شناخت بهتر این گیاه، کاربردهای ویژه‌ای در صنعت و پزشکی برای آن در نظر گرفته شده است تا جایی که از آن در بیودیزل، بیوپلاستیک، درمان سرطان و غیره استفاده می‌گردد (۱۵).

اولین گام در دستیابی به متابولیت ثانویه، تولید گیاه مناسب و به‌مقدار کافی است که نیازمند زمان و هزینه بالا می‌باشد. تکثیر در شرایط درون‌شیشه‌ای زمان دستیابی به تعداد زیاد گیاه با ژنوتیپ یکسان را کوتاه‌تر می‌کند و همچنین تولید متابولیت ثانویه در کشت درون‌شیشه‌ای نسبت به استخراج آن از گیاهان موجود در طبیعت دارای بهره‌وری بیشتری است (۳۴). استخراج متابولیت ثانویه موردنظر از کالوس نسبت به استخراج آن از گیاه کامل باصرفه‌تر و مفیدتر است (۲۵). کالوس توده سلولی گیاهی است که از سازمان‌یافتگی کمی برخوردار بوده و در اثر زخم در بافت‌ها و اندام‌های تمایزیافته به‌وجود می‌آید. ژنوتیپ گیاه، نوع ریزنمونه، نوع و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی از عوامل مهمی هستند که تشکیل کالوس در محیط کشت را تحت تاثیر قرار می‌دهند. غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی برای هر گونه گیاهی متفاوت است و بستگی به منبع ریزنمونه یا گیاه موردنظر دارد (۲ و ۳).

هافمن و همکاران (۱۵) تاکسول و تاکسان‌های مربوط به آن را در شاخه، ساقه و برگ گیاه فندق شناسائی و گزارش کرده اند. تحقیقات بعدی نشان داده‌اند که گیاه فندق و کشت سلولی آن نیز ترکیبات تاکسان از جمله تاکسول تولید می‌کند (۷ و ۱۶). بستوسو و همکاران (۷) با کشت جداکشت‌های مختلف از فندق و تولید کالوس تحت تاثیر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مختلف از نظر غلظت و ترکیبات، تولید کالوس جهت ایجاد کشت سلولی را بررسی کردند و سطوح تاکسول به‌دست آمده از کشت فندق را مشابه کشت سرخدار قابل ملاحظه دانستند. آن‌ها نتیجه گرفتند که فندق نیز دارای آنزیم‌هایی برای تولید تاکسول است که تا به حال به‌عنوان مسیر منحصر به‌فرد جنس سرخدار در نظر گرفته می‌شد. رضایی و همکاران (۵) جهت القا و تولید کالوس از بذرهای تازه فندق، از محیط MS حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد 2,4-D و BAP به ترتیب با غلظت‌های ۱ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر استفاده کردند. ایشان از کالوس نرم تولید شده برای تهیه کشت سوسپانسیون در محیط کشت MS با ترکیبات تنظیم‌کننده-های رشد گیاهی ذکرشده استفاده کرده و گزارش نمودند که تولید و آزادسازی تاکسول تحت تاثیر محرک‌ها قرار می‌گیرد (۵ و ۲۷).

در کشت بافت درختان مشکلاتی وجود دارد که در کشت بافت گیاهان علفی از اهمیت چندانی برخوردار نیست. به-عنوان مثال، در تهیه ریزنمونه از درختی مانند فندق در اغلب موارد باید از درختان باغی یا جنگلی استفاده کرد. به‌دلیل اینکه شرایط آب و هوایی قابل کنترل نیست، اختلافات آب و هوایی در زمان‌های متفاوت نمونه‌گیری باعث می‌گردد که ریزنمونه‌های انتخاب‌شده از درختان در زمان‌های متفاوت، واکنش‌های فیزیولوژیکی متفاوتی را در کشت بافت نشان دهند. این امر باعث بروز مشکلاتی در پاسخ کشت بافتی می‌گردد (۶). میزان بالای آلودگی میکروبی از عوامل اصلی دیگر محدودکننده موفقیت در کشت بافت درختان است. آلودگی مواد گیاهی (ریزنمونه) در کنار قابلیت کم ریخت‌زایی از محدودیت‌های عمده ریزازدیادی درون‌شیشه‌ای فندق می‌باشد. بطوریکه گزارش‌شده حدود ۹۵ درصد ریزنمونه‌های جمع‌آوری‌شده از باغ‌ها یا رویشگاه‌های طبیعی احتمال آلودگی دارند (۱۰). بنابراین، یکی از مهم‌ترین جنبه‌های کشت بافت گونه‌های چندساله انتخاب ریزنمونه و ضدعفونی آن‌ها و به‌دست آوردن ریزنمونه‌ها و کشت‌های بدون آلودگی و در حال رشد است (۶).

با توجه به کمبود مطالعه در مورد کشت بافت فندق بومی جنگل فندقلو، این پژوهش به‌منظور بررسی تاثیر تنظیم-کننده‌های رشد گیاهی و غلظت‌های مختلف آن‌ها بر کالوس‌زایی ریزنمونه‌های مختلف فندق و همچنین مقدار تولید تاکسول در کالوس انجام گرفت. علاوه بر این، تاثیر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر ریزازدیادی درون‌شیشه‌ای فندق با استفاده از ریزنمونه تک گره مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها

مواد گیاهی: در این پژوهش، سرشاخه‌های حاوی برگ و ساقه رشد سالانه گیاه فندق که جوان و در حال رشد بودند، از اواسط بهار تا اواخر تابستان و بذور رسیده و تازه فندق نیز در اواسط تابستان از جنگل فندقلو (رویشگاه جنگلی فندقلو مستقر روی تپه‌ای به‌نام آرپاتپه در فاصله ۲۵ کیلومتری شهرستان اردبیل و ۱۰ کیلومتری جنوب شهر نمین در خط‌الراس گردنه حیران جنب روستای فندقلو قرار گرفته است) جمع‌آوری گردید.

ضدعفونی نمونه‌های گیاهی: نمونه‌های گیاهی به‌مدت پنج دقیقه با مایع ظرفشویی شستشو شده و ۲۰ دقیقه آبشویی شدند و پس از یک دقیقه غوطه‌ورسازی در الکل ۹۶ درصد، به‌مدت ۲۰ دقیقه با هیپوکلریت سدیم ضدعفونی گردیدند و در نهایت سه بار با آب استریل شستشو شدند. به‌منظور تعیین غلظت مناسب هیپوکلریت سدیم برای ضدعفونی سطحی ریزنمونه‌های مختلف (برگ، ساقه و بذر)، غلظت‌های ۱، ۲/۵ و ۵ درصد هیپوکلریت سدیم مورد بررسی قرار گرفت. برای تهیه غلظت‌های مختلف هیپوکلریت سدیم از محلول وایتکس خانگی (حاوی ۵ درصد هیپوکلریت سدیم فعال) استفاده شد.

تهیه ریزنمونه و کشت آن‌ها: برگ‌ها و ساقه‌ها به قطعات ۰/۵ تا ۱ سانتی‌متری برش داده شده و به‌عنوان ریزنمونه روی محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف تنظیم-کننده‌های رشد گیاهی طبق جدول ۱ برای تولید کالوس کشت شدند. کشت‌ها در اتاقک رشد در شرایط تاریکی و دمای ۲±۲۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. حدود ۶ هفته پس از کشت، درصد کالوس‌زایی و میزان رشد کالوس‌ها (وزن تر کالوس) اندازه‌گیری شدند.

جدول ۱- تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی استفاده شده در کالوس‌زایی ریز نمونه های بذر، برگ و ساقه فندق

شماره محیط	2,4-D (mg/l)	NAA (mg/l)	Kin (mg/l)	BAP (mg/l)
۱	۱	–	۰/۵	–
۲	۱	–	۱	–
۳	۱	–	–	۰/۵
۴	۱	–	–	۱
۵	۲	–	۰/۵	–
۶	۲	–	۱	–
۷	۲	–	–	۰/۵
۸	۲	–	–	۱
۹	۴	–	۰/۵	–
۱۰	۴	–	۱	–
۱۱	۴	–	–	۰/۵
۱۲	۴	–	–	۱
۱۳	–	۱	۰/۵	–
۱۴	–	۱	۱	–
۱۵	–	۱	–	۰/۵
۱۶	–	۱	–	۱
۱۷	–	۲	۰/۵	–
۱۸	–	۲	۱	–
۱۹	–	۲	–	۰/۵
۲۰	–	۲	–	۱
۲۱	–	۴	۰/۵	–
۲۲	–	۴	۱	–
۲۳	–	۴	–	۰/۵
۲۴	–	۴	–	۱
۲۵	–	–	–	–

برای تهیه ریزنمونه بذری، بذور تهیه شده از جنگل فندقلو ضدعفونی‌شده به چهار قسمت تقسیم و در محیط کشت MS حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی طبق جدول ۱ کشت گردید. پس از گذشت ۴ تا ۵ هفته صفات درصد کالوس‌زایی، ریشه‌دهی، ساقه‌دهی و وزن تر کالوس یادداشت شدند.

باززایی: به‌منظور بررسی امکان باززایی درون‌شیشه‌ای، کالوس‌های حاصل از ریزنمونه‌های بذر، برگ و ساقه که در محیط کشت MS حاوی یک میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP رشد کرده بودند به محیط‌های MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP، MS حاوی ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر BAP، و MS حاوی ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر Kin منتقل شدند و در اتاقک رشد با ۱۶ ساعت روشنایی با شدت نور ۱۵۰۰ تا ۲۰۰۰ لوکس و ۸ ساعت تاریکی در دمای ۲ ± ۲۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند.

تکثیر درون‌شیشه‌ای ریزنمونه‌های تک گره فندق: بذرهای رسیده فندق پس از ضدعفونی سطحی با هیپوکلریت سدیم ۵ درصد روی محیط کشت MS جامد کشت شدند. پس از جوانه‌زنی و رشد گیاهچه‌ها، ریزنمونه‌های تک گره تهیه شده و روی محیط کشت MS حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی NAA، IBA و TDZ، BAP و Kin کشت شدند (جدول ۲). کشت‌ها در اتاقک رشد با ۱۶ ساعت روشنایی با شدت نور ۱۵۰۰ تا ۲۰۰۰ لوکس و ۸ ساعت تاریکی در دمای ۲±۲۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. صفات رشدی شامل تعداد برگ تازه رشد کرده و ریشه‌زایی ریزنمونه‌ها حدود ۴ هفته پس از کشت یادداشت شدند.

جدول ۲- تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی استفاده شده در تکثیر درون‌شیشه‌ای ریزنمونه‌های تک‌گره فندق

شماره محیط کشت	NAA (mg/l)	Kin (mg/l)	BAP (mg/l)	IBA (mg/l)	TDZ (mg/l)
۱	۴	۱	–	–	–
۲	۲	۱	–	–	–
۳	۲	۰/۵	–	–	–
۴	۴	۰/۵	–	–	–
۵	۱	۰/۵	–	–	–
۶	–	–	–	۰/۰۵	–
۷	–	–	۲/۵	۰/۰۵	–
۸	–	–	۵	۰/۰۵	–
۹	–	–	۷/۵	۰/۰۵	–
۱۰	–	–	–	۰/۰۵	۲/۵
۱۱	–	–	–	۰/۰۵	۵
۱۲	–	–	–	۰/۰۵	۷/۵
۱۳	–	–	–	۳	–
۱۴	–	–	۲	–	–
۱۵	–	–	–	–	۰/۱
۱۶	–	–	–	–	–

استخراج تاکسول و اندازه‌گیری آن با استفاده از HPLC: بمنظور بررسی میزان تاکسول در بافت کالوس حاصل از ریزنمونه‌های مختلف، از کالوس‌های رشدکرده در محیط کشت‌های MS حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مختلف (جدول ۳) تاکسول استخراج و اندازه‌گیری شد. عصاره-گیری مطابق روش خسروشاهی و همکاران (۱۷) انجام شد. ۱۰ میلی‌لیتر متانول به ۰/۵ گرم کالوس وزن شده اضافه شده و ۳-۲ دقیقه در هاون له گردید و به‌مدت ۴۰ دقیقه تحت امواج فراصوت به‌طور کامل لیز شد. سپس از فیلتر ۰/۲۲ میکرومتر عبور داده شد و در آون و در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد تغلیظ شد. عصاره تغلیظ شده در دو میلی‌لیتر متانول فیلترشده حل گردید. برای اندازه‌گیری میزان تاکسول از دستگاه HPLC (Agilent HPLC system 1200 Series, Diode Array Detector) و ستون

(Eclipse XDB-C18, 5mm, 4.6-150 mm) استفاده شد. فاز متحرک شامل ترکیب استونیتریل و آب به نسبت ۶۰ به ۴۰ بود که با شدت جریان یک میلی‌لیتر در دقیقه از ستون عبور می‌کرد. میزان تاکسول هر نمونه، با استفاده از شناساگر در طول موج ۲۲۷ نانومتر و مقایسه با استاندارد تاکسول (شرکت Sigma) اندازه‌گیری شد.

جدول ۳- تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی در محیط کشت برای ریزنمونه‌های کالوس مورد استفاده برای بررسی محتوای تاکسول

شماره محیط کشت	تنظیم کننده‌های رشد گیاهی			ریزنمونه
	2,4-D	Kin	BAP	
۱	۱	۰/۵	–	بذر
۲	۲	–	۱	ساقه
۳	۱	–	۰/۵	بذر
۴	۲	–	۰/۵	بذر
۵	۱	–	۰/۵	برگ
۶	۴	۰/۵	–	بذر

طرح آزمایشی و تجزیه و تحلیل آماری: آزمایش‌های مربوط به تیمارهای ضدعفونی، کالوس‌زایی و باززایی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام گرفت. تکثیر درون‌شیشه‌ای و اندازه‌گیری تاکسول به‌صورت طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. محاسبات آماری و تجزیه و تحلیل داده‌ها با نرم‌افزار SPSS 19 و مقایسه میانگین با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام گرفت.

نتایج

تعیین روش مناسب ضدعفونی ریزنمونه‌ها: اثر غلظت‌های مختلف هیپوکلریت سدیم و نوع ریزنمونه بر ریزنمونه دارای آلودگی قارچی، درصد ریزنمونه‌های زنده غیرآلوده، درصد ریزنمونه‌های قهوه‌ای شده و برهمکنش آنها بر ریزنمونه دارای آلودگی قارچی و درصد ریزنمونه‌های قهوه‌ای‌شده در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۴).

نتایج حاصل از مقایسه میانگین نشان داد که درصد آلودگی قارچی در ریزنمونه‌های برگ و ساقه بطور معنی‌داری بیشتر از ریزنمونه بذری بوده و از طرف دیگر درصد ریزنمونه‌های زنده غیرآلوده بذری بطور معنی‌داری بیشتر از ریزنمونه‌های برگ و ساقه بود (جدول ۵).

جدول ۴- تجزیه واریانس تاثیر تیمارهای مختلف ضدعفونی بر میزان آلودگی و پاسخ رشدی ریزنمونه‌های فندق

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		ریزنمونه دارای آلودگی قارچی	ریزنمونه زنده و غیرآلوده	ریزنمونه قهوه‌ای‌شده
تیمار ضدعفونی	۲	۱۱۸۴۸/۲۴**	۲۸۶۳/۰۶**	۶۴/۵۱۳**
ریزنمونه	۲	۱۱۴۱/۲۱**	۳۲۴۳/۹**	۵/۷۴۴**
تیمار ضدعفونی × ریزنمونه	۴	۲۸۲/۵**	۳۴/۴۷^{ns}	۱/۰۱۰**
خطا	۱۸	۲۵/۶۲	۱۱۳/۵۰۲	۰/۱۶۱
ضریب تغییر (درصد)	–	۱۰/۷	۳۲/۶۴	۶/۱۶

**: معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد؛ ^{ns}: غیرمعنی‌دار

بیشترین درصد ریزنمونه‌های زنده غیرآلوده در ریزنمونه بذر و ضدعفونی با هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد (۶۸/۳۳ درصد)، و همچنین هیپوکلریت سدیم ۵ درصد (۵۸/۳۳ درصد) مشاهده شد. بیشترین درصد آلودگی قارچی (۱۰۰ درصد و ۹۷ درصد) و همچنین کمترین ریزنمونه‌های زنده و غیرآلوده (صفر درصد و ۳/۳۳ درصد) در ضدعفونی با هیپوکلریت سدیم ۱ درصد و بترتیب در ریزنمونه‌های برگ و ساقه مشاهده شد. کمترین درصد آلودگی قارچی در تیمار ضدعفونی هیپوکلریت سدیم ۵ درصد و بترتیب در ریزنمونه بذر (۱۱/۶۶ درصد) و ساقه (۱۳/۳۳ درصد) مشاهده شد. بیشترین ریزنمونه‌های قهوه‌ای‌شده در تیمار ضدعفونی هیپوکلریت سدیم ۵ درصد و بترتیب در ریزنمونه‌های برگ (۵۷/۶۶ درصد) و ساقه (۵۰ درصد) به‌دست آمد (جدول ۵).

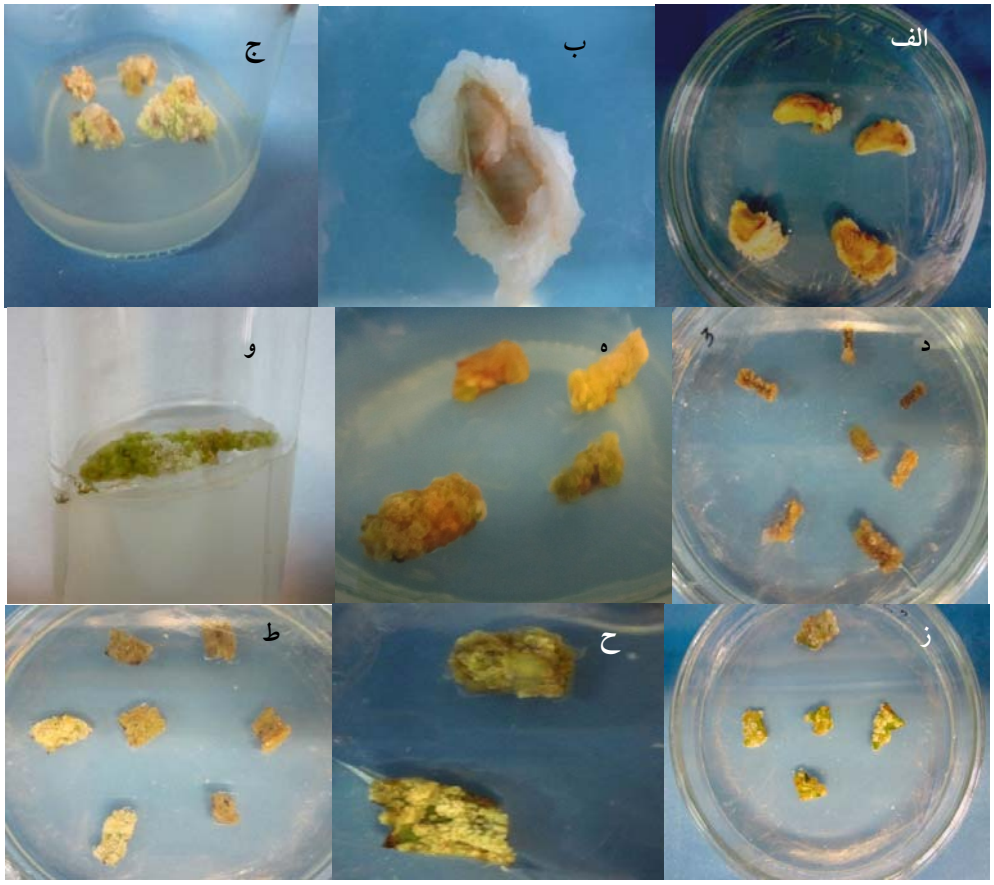
جدول ۵- اثر غلظت هیپوکلریت سدیم بر درصد ریزنمونه‌های زنده و غیرآلوده، قهوه‌ای‌شده و دارای آلودگی قارچی در تیمارهای ضدعفونی مختلف ریزنمونه‌های فندق در شرایط درون شیشه‌ای

تیمار ضدعفونی	نوع ریزنمونه	ریزنمونه دارای آلودگی قارچی (درصد)	ریزنمونه زنده و غیرآلوده (درصد)	ریزنمونه قهوه‌ای‌شده (درصد)
هیپوکلریت سدیم ۵ درصد	بذر	۱۱/۶۶ g	۵۸/۳۳ ab	۳۰/۰۰ b
	برگ	۲۱/۶۶ ef	۲۰/۶۶ de	۵۷/۶۶ a
	ساقه	۱۳/۳۳ fg	۳۶/۶۶ cd	۵۰/۰۰ a
هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد	بذر	۲۷/۳۳ e	۶۸/۳۳ a	۴/۳۳ c
	برگ	۴۰/۰۰ d	۲۹/۸۹ cd	۳۰/۱۱ b
	ساقه	۵۱/۱۳ c	۴۲/۲ bc	۶/۶۶ c
هیپوکلریت سدیم ۱ درصد	بذر	۶۳/۸۸ b	۳۴/۴۴ cd	۱/۶۶ c
	برگ	۱۰۰/۰۰ a	۰/۰۰ f	۰/۰۰ c
	ساقه	۹۷/۰۰ a	۳/۳۳ ef	۰/۰۰ c

میانگین‌های دارای حروف مشترک، براساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪ اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند

کالوس‌زایی: کالوس‌زایی ریزنمونه‌های مختلف تحت تاثیر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مختلف (2,4-D، NAA، Kin و BAP) مورد بررسی قرار گرفت. در اکثر محیط‌های کشت ریزنمونه‌های برگ و ساقه بعد از گذشت ۳ تا ۴ هفته و ریزنمونه‌های بذر بعد از گذشت ۱۰ تا ۱۵ روز، شروع به آماس و تولید کالوس (معمولاً از ناحیه برشی) نمودند (شکل ۱). نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۶) نشان داد که تاثیر ترکیبات تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، نوع ریزنمونه و اثر متقابل بین آن‌ها بر درصد کالوس‌زایی و وزن تر کالوس در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار است. به‌طور کلی درصد کالوس‌زایی ریز نمونه برگ و ساقه بیشتر از ریزنمونه بذر بود، درحالی‌که وزن تر کالوس در ریزنمونه بذر بیشتر از ریزنمونه‌های برگ و ساقه بود (جدول ۷). نتایج حاصل از مقایسه میانگین (جدول ۷) نشان داد که درصد کالوس‌زایی ریزنمونه بذر در محیط‌های دارای 2,4-D بطور معنی‌داری بیشتر از محیط‌های دارای NAA بود. بطوریکه بیشترین درصد کالوس‌زایی (۱۰۰ درصد) در محیط MS حاوی یک میلی-گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin، محیط MS حاوی یک میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP، محیط MS حاوی دو میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و یک میلی‌گرم در لیتر Kin، محیط MS حاوی دو میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP، محیط MS حاوی دو میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و یک میلی‌گرم در لیتر BAP و محیط MS حاوی چهار میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و یک میلی‌گرم در لیتر BAP مشاهده گردید. بیشترین وزن تر کالوس (۲/۴۸، ۲/۶۸ و ۲/۵۹ گرم) در ریزنمونه بذر و محیط‌های MS حاوی یک میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin، محیط MS حاوی دو میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و محیط MS حاوی چهار میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin مشاهده شد (جدول ۷).

در اغلب مطالعات از وزن تر کالوس به‌عنوان شاخصی برای اندازه‌گیری میزان رشد کالوس استفاده می‌شود. در ریزنمونه برگ بیشترین عملکرد (وزن تر) کالوس (۰/۵۲۲ و ۰/۴۱ گرم) بترتیب در محیط MS حاوی یک میلی‌گرم در لیتر 2,4-D در ترکیب با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP یا ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin ولی در ریزنمونه ساقه (۰/۶۷۵ گرم) در محیط MS حاوی دو میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و یک میلی‌گرم در لیتر BAP مشاهده گردید (جدول ۷).



شکل ۱- کالوس‌زایی درون‌شیشه‌ای فندق؛ الف) شروع کالوس‌زایی ریزنمونه‌های بذر در محیط MS حاوی یک میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۵ میلی-گرم در لیتر BAP، ۱۰ روز پس از کشت؛ ب) کالوس ایجاد شده در محل‌های برش ریزنمونه بذر دو هفته پس از کشت در محیط MS حاوی یک میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP؛ ج) کالوس‌های حاصل از ریزنمونه بذر در محیط MS حاوی یک میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin، سه هفته پس از کشت؛ د) شروع کالوس‌زایی ریزنمونه ساقه در محیط MS حاوی یک میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۵ میلی-گرم در لیتر BAP سه هفته پس از کشت؛ ه و و) کالوس‌های حاصل از ریزنمونه ساقه در محیط MS حاوی دو میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و یک میلی-گرم در لیتر BAP؛ ز) شروع کالوس‌زایی ریزنمونه برگ در محیط MS حاوی یک میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP؛ ح و ط) کالوس‌های حاصل از ریزنمونه برگ در محیط MS حاوی یک میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP.

جدول ۶- تجزیه واریانس درصد کالوس‌زایی و وزن تر کالوس ریزنمونه‌های فندق تحت تاثیر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مختلف

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		درصد کالوس‌زایی	وزن تر کالوس
تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی	۲۴	۳۷۶۳/۴۵۴**	۱۲/۷۰۸**
نوع ریزنمونه	۲	۱۱۹۷۶/۲۲۲**	۱۹۱/۳۴۳**
تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی × نوع ریزنمونه	۴۸	۱۱۶۰/۶۳۴**	۷/۳۹۶**
خطا	۱۵۰	۵۱۳/۴۶۳	۰/۰۳۹
ضریب تغییر (درصد)	-	۲۸/۳۶	۶/۱

**: معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد

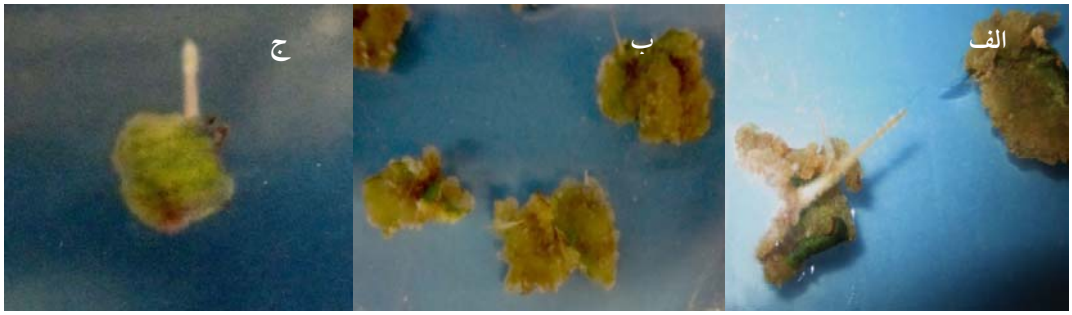
جدول ۷- اثر نوع ریزنمونه و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر درصد کالوس‌زایی، وزن تر کالوس و درصد ریشه‌زایی ریزنمونه های بذر، برگ و ساقه

ریزنمونه	تنظیم‌کننده رشد گیاهی (mg/l)				درصد کالوس‌زایی	وزن ترکالوس(gr)	درصد ریشه-زایی
	2,4-D	NAA	Kin	BAP			
بذر	۱	–	۰/۵	–	۱۰۰^{a}	۲/۴۸	–
	۱	–	۱	–	۹۱/۶۶^{ab}	۱/۵۲۹	–
	۱	–	–	۰/۵	۱۰۰^{a}	۲/۰۴	–
	۱	–	–	۱	۶۱/۱۰^{abcdef}	۰/۶۷	–
	۲	–	۰/۵	–	۷۱/۶۶^{abcd}	۰/۷۶۵	–
	۲	–	۱	–	۱۰۰^{a}	۰/۵۸۴	–
	۲	–	–	۰/۵	۱۰۰^{a}	۲/۶۸۱	–
	۲	–	–	۱	۱۰۰^{a}	۱/۴۶۶	–
	۴	–	۰/۵	–	۷۷/۷۷^{abcd}	۲/۵۹۴	–
	۴	–	۱	–	۸۸/۸۸^{abc}	۲/۰۱	–
	۴	–	–	۰/۵	۸۸/۸۸^{abc}	۱/۲۸۷	–
	۴	–	–	۱	۱۰۰^{a}	۱/۴۶۶	–
	–	۱	۰/۵	–	۲۵^{efgh}	۰/۳۵۹	–
	–	۱	۱	–	۸/۳۳^{gh}	۰/۰۲۶	–
	–	۱	–	۰/۵	۷۲/۲۲^{abcd}	۰/۳	–
	–	۱	–	۱	۸۳/۳۳^{bcdefg}	۰/۰۴۵	–
	–	۲	۰/۵	–	۲۲/۲۲^{efgh}	۰/۰۸۸	–
	–	۲	۱	–	۴۴/۴۴^{cdefg}	۰/۸۲۹	–
	–	۲	–	۰/۵	۶۶/۶۶^{abcde}	۰/۱۸۷	–
	–	۲	–	۱	۵۰^{bcdefg}	۰/۲۶۶	–
	–	۴	۰/۵	–	۴۴/۴۴^{cdefg}	۰/۲۲۶	–
	–	۴	۱	–	۸۶/۶۶^{abcd}	۱/۲۲	–
	–	۴	–	۰/۵	۵۵/۵۵^{efgh}	۰/۸۶۶	–
	–	۴	–	۱	۶۱/۱۱^{abcdef}	۰/۶۱۹	–
	–	–	–	–	۱۶/۶۶^{fgh}	۰/۰۰۳	–
برگ	۱	–	۰/۵	–	۱۰۰^{a}	۰/۴۱	–
	۱	–	۱	–	۱۰۰^{a}	۰/۲۷۶	–
	۱	–	–	۰/۵	۱۰۰^{a}	۰/۵۲۲	–
	۱	–	–	۱	۱۰۰^{a}	۰/۳۶۳	–
	۲	–	۰/۵	–	۱۰۰^{a}	۰/۱۲۶	–
	۲	–	۱	–	۱۰۰^{a}	۰/۱۹۳	–
	۲	–	–	۰/۵	۹۱/۶۶^{ab}	۰/۱۳۶	–
	۲	–	–	۱	۱۰۰^{a}	۰/۳۴۱	–
	۴	–	۰/۵	–	۱۰۰^{a}	۰/۲۴۷	–
	۴	–	۱	–	۹۴/۴۴^{ab}	۰/۱۵۴	–
	۴	–	–	۰/۵	۸۸/۸۸^{abc}	۰/۲۸۶	–
	۴	–	–	۱	۶۶/۶۶^{abcde}	۰/۲۱۵	–
	–	۱	۰/۵	–	۱۰۰^{a}	۰/۱۵۳	۲۰
	–	۱	۱	–	۱۰۰^{a}	۰/۰۶۹	۲۰
	–	۱	–	۰/۵	۸۰/۹۵^{abcd}	۰/۱۱۹	–

	–	۱	–	۱	۶۶/۶۶ abcde	۰/۱۳۶	–
برگ	–	۲	۰/۵	–	۱۰۰ a	۰/۲۰۸	–
	–	۲	۱	–	۱۰۰ a	۰/۱۴۶	۴۰
	–	۲	–	۰/۵	۸۸/۸۸ abc	۰/۳۱۴	–
	–	۲	–	۱	۸۸/۸۸ abc	۰/۱۱	–
	–	۴	۰/۵	–	۱۰۰ a	۰/۳۷	–
	–	۴	۱	–	۱۰۰ a	۰/۳۷۵	۱۶/۶۶
	–	۴	–	۰/۵	۱۰۰ a	۰/۱۳۳	–
	–	۴	–	۱	۱۰۰ a	۰/۱۵۶	–
	–	–	–	–	۰ h	۰	–
	۱	–	۰/۵	–	۱۰۰ a	۰/۱۳۸	–
	۱	–	۱	–	۱۰۰ a	۰/۰۸۶	–
	۱	–	–	۰/۵	۱۰۰ a	۰/۱۱۵	–
	۱	–	–	۱	۱۰۰ a	۰/۰۶۳	–
	۲	–	۰/۵	–	۹۱/۶۶ ab	۰/۱۲۹	–
	۲	–	۱	–	۱۰۰ a	۰/۰۵۸	–
	۲	–	–	۰/۵	۱۰۰ a	۰/۱۱۲	–
	۲	–	–	۱	۱۰۰ a	۰/۶۷۵	–
	۴	–	۰/۵	–	۱۰۰ a	۰/۱۲	–
	۴	–	۱	–	۴۹/۰۷ bcdefg	۰/۲۱۴	–
	۴	–	–	۰/۵	۸۸/۸۸ abc	۰/۱۲۵	–
ساقه	۴	–	–	۱	۵۵ abcdef	۰/۱۰۸	–
	–	۱	۰/۵	–	۱۰۰ a	۰/۰۹۵	–
	–	۱	۱	–	۵۸/۳۳ abcdef	۰/۱۲	–
	–	۱	–	۰/۵	۶۶/۶۶ abcde	۰/۱	–
	–	۱	–	۱	۱۰۰ a	۰/۰۵۶	–
	–	۲	۰/۵	–	۴۱/۶۶ defgh	۰/۰۴۸	–
	–	۲	۱	–	۱۰۰ a	۰/۱۳۳	–
	–	۲	–	۰/۵	۸۳/۳۳ abcd	۰/۱۴۴	–
	–	۲	–	۱	۵۵/۵۵ abcd	۰/۱۱	–
	–	۴	۰/۵	–	۸۳/۳۳ abcd	۰/۲۴۱	–
	–	۴	۱	–	۱۰۰ a	۰/۱۱۲	–
	–	۴	–	۰/۵	۱۰۰ a	۰/۱۱۹	–
	–	۴	–	۱	۱۰۰ a	۰/۱۰۸	–
	–	–	–	–	۰ h	۰	–
LSD						۰/۳۱۶	

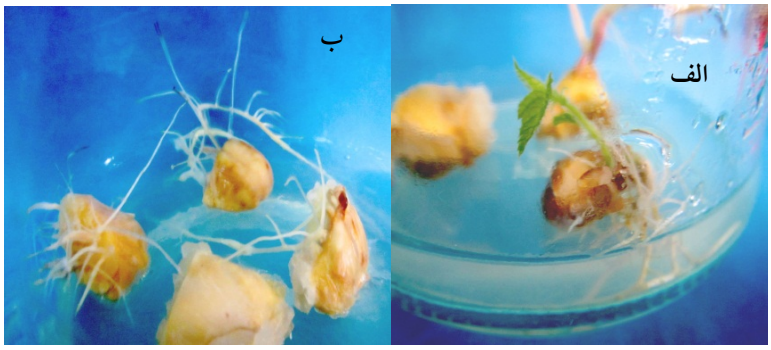
میانگین‌های دارای حروف مشترک، براساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪ اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند

در آزمایش کالوس‌زایی در برخی از تیمارها ریشه‌زایی نابجا از ریزنمونه برگ مشاهده شد (شکل ۲). از جمله این تیمارها می‌توان به محیط کشت MS حاوی یک میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin، یک میلی‌گرم در لیتر NAA و یک میلی‌گرم در لیتر Kin، دو میلی‌گرم در لیتر NAA و یک میلی‌گرم در لیتر Kin، چهار میلی‌گرم در لیتر NAA و یک میلی‌گرم در لیتر Kin که بترتیب ۲۰ درصد، ۲۰ درصد، ۴۰ درصد و ۱۶/۶۶ درصد ریشه‌زایی نابجا در آن‌ها مشاهده شد، اشاره نمود (جدول ۷). این نتایج نشان می‌دهد که ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشد NAA و Kin در القاء ریشه نابجا در ریزنمونه برگ موثر هستند.



شکل ۲- ریشه‌های به‌وجودآمده از ریزنمونه برگ در محیط MS حاوی الف) دو میلی‌گرم در لیتر NAA به‌همراه یک میلی‌گرم در لیتر Kin؛ ب و ج) یک میلی‌گرم در لیتر NAA به‌همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin سه هفته پس از کشت

در ریزنمونه‌های بذری در برخی از محیط‌های کشت به‌جای تولید کالوس یا علاوه‌بر آن، ساقه یا ریشه و یا هر دو رشد کردند (شکل ۳). نتایج حاصل از تجزیه واریانس (جدول ۸) نشان داد که بین تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مختلف از نظر ساقه‌دهی و ریشه‌دهی ریزنمونه بذری اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد وجود دارد.



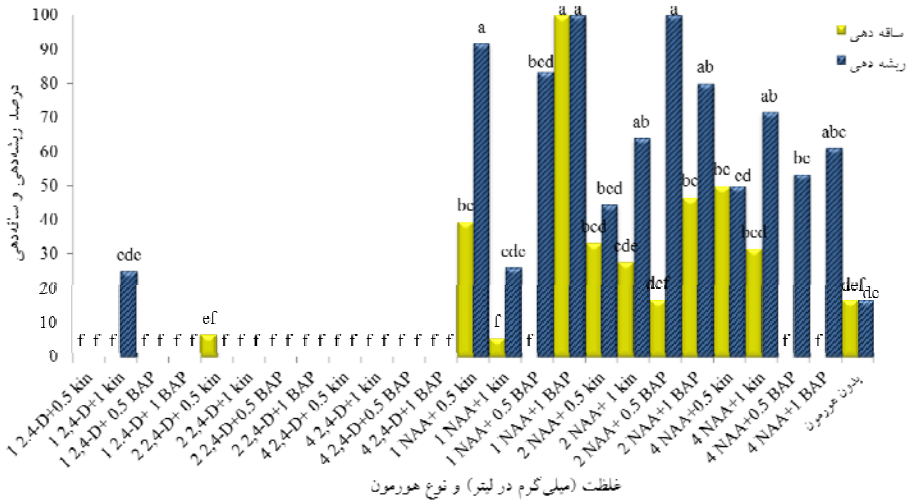
شکل ۳- ریشه‌دهی و ساقه‌دهی درون‌شیشه‌ای ریزنمونه بذری فندق. الف) ساقه‌دهی در محیط کشت MS حاوی یک میلی‌گرم در لیتر NAA و یک میلی‌گرم در لیتر BAP؛ ب) ریشه‌دهی در محیط کشت MS حاوی دو میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP ۱۰ روز پس از کشت.

جدول ۸- تجزیه واریانس ساقه‌دهی و ریشه‌دهی ریزنمونه بذری در تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مختلف

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		ساقه‌دهی	ریشه‌دهی
تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی	۲۴	۰/۳۶۹**	۱/۲۰۷**
خطا	۵۰	۰/۱۴۵	۰/۰۶۵
ضریب تغییر (درصد)	-	۵۱/۴۵	۲۲/۳۷

**: معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد

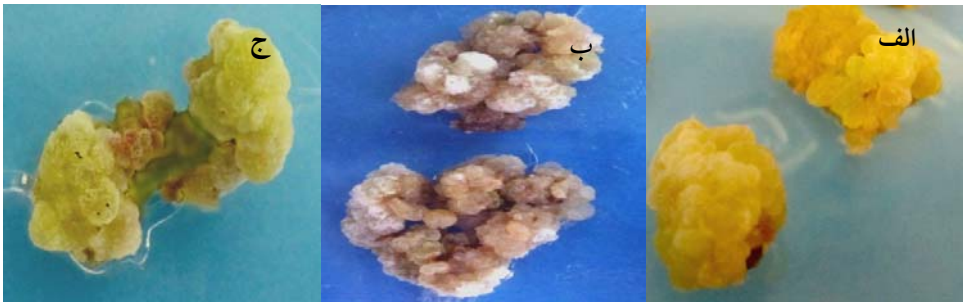
در محیط کشت‌های حاوی 2,4-D، به‌جز محیط کشت MS حاوی یک میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و یک میلی‌گرم در لیتر Kin رشد ریشه‌زایی مشاهده نشد ولی در تمام محیط‌های حاوی NAA ریشه‌دهی مشاهده گردید که بیشترین آن (۱۰۰ درصد) در محیط کشت MS حاوی یک میلی‌گرم در لیتر NAA و یک میلی‌گرم در لیتر BAP و محیط کشت MS حاوی دو میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و همچنین ۹۱/۶۶ درصد در محیط کشت MS حاوی یک میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin به‌دست آمد (شکل ۴).



شکل ۴- ساقه‌دهی و ریشه‌دهی ریزنمونه بذری فندق در شرایط درون‌شیشه‌ای در تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مختلف (میانگین‌های دارای حروف مشترک، براساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند)

ساقه‌دهی در مقایسه با کالوس‌زایی و ریشه‌دهی با درصد کمی در محیط‌های حاوی NAA مشاهده شد. بیشترین میزان ساقه‌دهی (۱۰۰ درصد) در محیط کشت MS حاوی یک میلی‌گرم در لیتر NAA و یک میلی‌گرم در لیتر BAP مشاهده گردید. در محیط MS فاقد تنظیم‌کننده رشد گیاهی (شاهد) نیز ۱۶/۶۶ درصد ریشه‌دهی و ساقه‌دهی مشاهده شد (شکل ۴). می‌توان گفت NAA با تحریک بهتر و موثر در مرحله القای ریشه باعث رشد بهتر آن‌ها در مرحله رشد ریشه می‌گردد. علت این اثر مثبت NAA بر ریشه‌دهی را می‌توان به تاثیر آن در تحریک تقسیم اولین سلول آغازگر ریشه مربوط دانست (۱۸).

باززایی: در کالوس‌های منتقل‌شده به محیط‌های کشت فاقد اکسین و دارای سایتوکینین در محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP اشکال متورمی (شبیه به ساختارهای پیش‌جنینی) تشکیل و مشاهده شد (شکل ۵) ولی تولید جنین سوماتیکی، اندام ساقه یا ریشه در آن صورت نگرفت.



شکل ۵- تشکیل ساختارهای کروی شکل شبه پیش‌جنینی روی کالوس‌های حاصل از ریزنمونه‌های بذر (الف)، برگ (ب)، ساقه فندق (ج) پس از انتقال به محیط MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP

نتایج حاصل از مقایسه میانگین (شکل ۶) نشان داد که بیشترین رشد کالوس و در نتیجه وزن تر کالوس (۱/۲ گرم) در ریزنمونه بذر و محیط کشت MS حاوی ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و کمترین وزن تر کالوس (۰/۵۸۴ و ۰/۵۹۵ گرم) بترتیب در ریزنمونه برگ در محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ریزنمونه ساقه در محیط کشت MS حاوی ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر Kin وجود دارد.

شکل ۶- رشد کالوس حاصل از ریزنمونه‌های مختلف فندق پس از انتقال به محیط‌های فاقد اکسین (میانگین‌های دارای حروف مشترک، براساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند)

تکثیر درون‌شیشه‌ای: پس از آن که ریزنمونه‌های تک گره در محیط‌های دارای ترکیبات تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مورد نظر برای رشد و تکثیر قرار گرفتند، پاسخ‌های رشدی متفاوتی ایجاد نمودند. بطوریکه برخی ریشه و برخی ساقه و برگ تولید کردند و یا هر دو را نشان دادند (شکل ۷). نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۹) نشان داد که بین ترکیبات تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مختلف از نظر درصد ریشه‌زایی و تعداد برگ رشدکرده اختلاف معنی‌دار وجود دارد. گیاهچه‌های دارای رشد طولی بیش از ۵ سانتی‌متر و حاوی برگ‌های کاملا توسعه یافته، از محیط درون‌شیشه‌ای خارج شده و پس از انتقال به گلدان مرحله‌ی سازگاردهی با محیط طبیعی صورت گرفت (شکل ۷-ه).

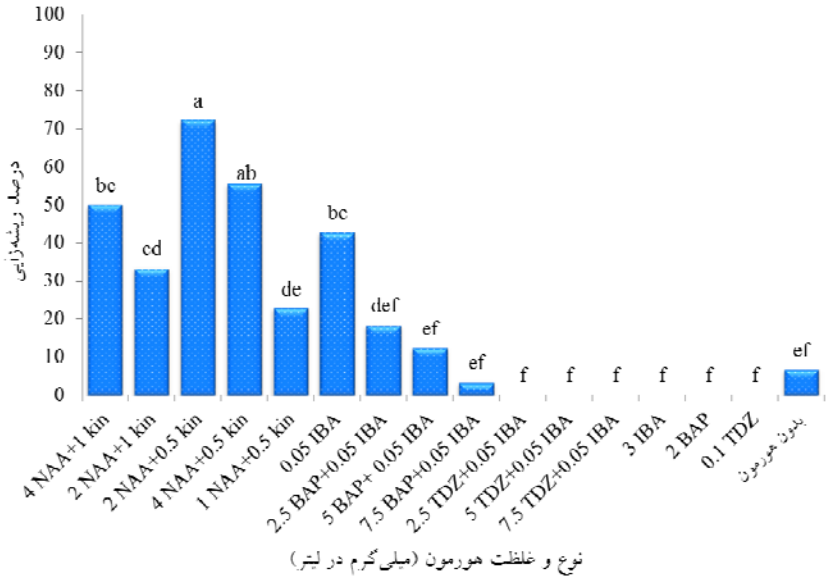
شکل ۷- رشد درون‌شیشه‌ای ریزنمونه‌های تک گره فندق. الف و ب) ریشه‌دهی و رشد ریشه در ریزنمونه‌های کشت‌شده روی محیط MS حاوی دو میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin؛ ج و د) رشد ساقه و تولید برگ‌های تازه در ریزنمونه‌های کشت‌شده روی محیط MS حاوی پنج میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر IBA؛ ه) گیاهچه انتقال‌یافته به شرایط گلخانه‌ای پس از سازگارسازی.

جدول ۹- میانگین مربعات شاخص‌های رشدی اندازه‌گیری‌شده ریزنمونه‌های تک گره فندق در محیط‌های حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مختلف

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		تعداد برگ	درصد ریشه‌دهی
تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی	۱۵	۳/۵۴**	۱۴۸۰/۴۱۰**
خطا	۳۲	۰/۵۲۱	۹۴/۲۴۰
ضریب تغییر (درصد)	-	۴۶/۱۹	۴۶/۲۴

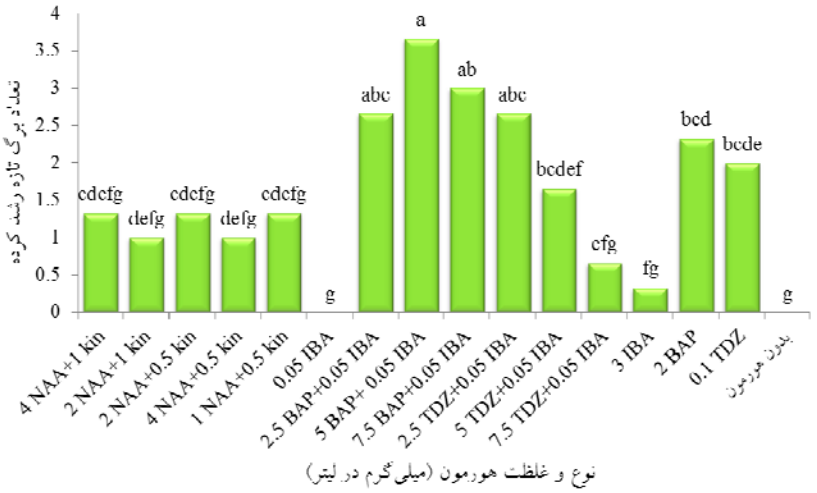
**: معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد

بیشترین درصد ریشه‌زایی (۷۲/۲۲ درصد و ۵۵/۵۵ درصد) بترتیب در محیط کشت MS حاوی دو یا چهار میلی‌گرم در لیتر NAA و در ترکیب با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin مشاهده شد. در حالیکه در محیط‌های کشت حاوی TDZ به‌تنهایی یا در ترکیب با IBA و محیط‌های کشت حاوی BAP (دو میلی‌گرم در لیتر) و IBA (سه میلی‌گرم در لیتر) به تنهایی هیچ گونه ریشه‌زایی مشاهده نشد. در محیط بدون تنظیم‌کننده رشد تنها ۶/۶۶ درصد ریشه‌زایی مشاهده شد. در بین سایتوکنین‌های به‌کاررفته تاثیر Kin بر ریشه-زایی بطور معنی‌داری بیشتر از BAP و TDZ بود (شکل ۸).



شکل ۸- میانگین درصد ریشه‌زایی ریزنمونه‌های تک گره فندق در تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مختلف (میانگین‌های دارای حروف مشترک، براساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند)

بیشترین تعداد برگ تازه رشد کرده در محیط MS حاوی ۲/۵، ۵ و ۷/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP به‌همراه ۰/۰۵ میلی-گرم در لیتر IBA و محیط MS حاوی ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر TDZ و ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر IBA به‌دست آمد. در محیط MS حاوی ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر IBA و محیط MS بدون تنظیم‌کننده رشد هیچ برگ تازه‌ای رشد نکرد (شکل ۹). با افزایش غلظت TDZ از ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر به ۵ و ۷/۵ میلی‌گرم در لیتر رشد ساقه و تعداد برگ‌ها بطور معنی‌داری کاهش یافته است. در حالیکه در محیط کشت‌های حاوی BAP با افزایش غلظت از ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر به ۵ و ۷/۵ میلی‌گرم در لیتر تعداد برگ‌های تازه رشدکرده افزایش یافت، هر چند که این افزایش از نظر آماری معنی‌دار نبود (شکل ۹).



شکل ۹- میانگین تعداد برگ تازه رشد کرده از ریزنمونه‌های تک‌گره فندق در تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مختلف (میانگین‌های دارای حروف مشترک، براساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند)

اندازه‌گیری تاکسول: نتایج تجزیه واریانس نشان داد (جدول ۱۰) که بین تیمارهای مورد بررسی از نظر میزان تاکسول در سطح احتمال یک درصد اختلاف معنی‌داری وجود دارد.

جدول ۱۰- تجزیه واریانس مقدار تاکسول در ریزنمونه‌ها و تنظیم-کننده‌های رشد گیاهی مختلف

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات
تیمار	۵	۷/۳۹۲**
خطا	۶	۰/۶۴۲
ضریب تغییر (درصد)		۱۴/۵۳

** : معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد

بطوریکه بیشترین مقدار تاکسول با مقادیر ۷/۹۲ و ۷/۲۹ میلی‌گرم در لیتر و عملکرد ویژه ۳۱/۶۸ و ۲۹/۱۶ میکروگرم در گرم وزن تر کالوس بترتیب در کالوس‌های حاصل از ریزنمونه بذر و برگ در محیط کشت MS حاوی یک میلی‌گرم در لیتر 2,4-D بهمراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP به‌دست آمد. کمترین مقدار تاکسول (با میانگین ۲/۹۷ میلی‌گرم در لیتر و عملکرد ویژه ۱۱/۸۸ میکروگرم در گرم وزن تر کالوس) نیز در کالوس حاصل از ریزنمونه بذر روی محیط کشت MS حاوی ۴ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D بهمراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin مشاهده شد (جدول ۱۱).

جدول ۱۱- میانگین تاکسول به‌دست‌آمده در عصاره ریزنمونه‌ها، در حضور تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مختلف محیط کشت

شماره محیط کشت	تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی 2,4-D	Kin	BAP	ریزنمونه	غلظت تاکسول (میلی‌گرم در لیتر)	عملکرد ویژه (میکروگرم در گرم کالوس)
۱	۱	۰/۵	–	بذر	۴/۹۱ bc	۱۹/۶۴ bc
۲	۲	–	۱	ساقه	۵/۱۵ b	۲۰/۶ b
۳	۱	–	۰/۵	بذر	۷/۹۲ a	۳۱/۶۸ a
۴	۲	–	۰/۵	بذر	۳/۸۶ bc	۱۵/۴۴ bc
۵	۱	–	۰/۵	برگ	۷/۲۹ a	۲۹/۱۶ a
۶	۴	۰/۵	–	بذر	۲/۹۷ c	۱۱/۸۸ c

میانگین‌های دارای حروف مشترک، براساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪ اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند

بحث

نتایج ضدعفونی ریزنمونه‌های مختلف نشان داد که برای حصول نتیجه مطلوب بسته به ریزنمونه مورد استفاده بهتر است غلظت‌های بهینه هیپوکلریت سدیم استفاده شود. بطوریکه در ریزنمونه برگ و ساقه هرچند در ضدعفونی با هیپوکلریت سدیم ۵ درصد، درصد ریزنمونه‌های دارای آلودگی قارچی کمتر است ولی با توجه به بافت حساس‌تر آن‌ها این تیمار باعث ایجاد سوختگی و از بین رفتن ریزنمونه شده و درصد ریزنمونه‌های قهوه‌ای‌شده بیشتر است. بنابراین ضدعفونی هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد مناسب‌تر می‌باشد. در ریزنمونه بذر درصد ریزنمونه‌های قهوه‌ای شده در ضدعفونی هیپوکلریت سدیم ۵ درصد بیشتر از هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد ولی بطور معنی‌داری کمتر از ریزنمونه‌های برگ و ساقه بود. علاوه بر این، بین هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد و ۵ درصد از نظر درصد ریزنمونه زنده و غیرآلوده بذر تفاوت معنی‌داری وجود نداشته و درصد آلودگی قارچی در تیمار ضدعفونی هیپوکلریت سدیم ۵ درصد بطور معنی‌داری کمتر از هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد بود، بنابراین تیمار ضدعفونی هیپوکلریت سدیم ۵ درصد در ریزنمونه بذر مناسب‌تر به‌نظر می‌رسد (جدول ۵).

کالوس‌زایی در ریزنمونه‌های برگ و ساقه در تمام ترکیبات تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مورد استفاده به‌جز محیط MS حاوی چهار میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و یک میلی‌گرم در لیتر Kin با ۴۹/۰۷ درصد و دو میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin با ۴۱/۶۶ درصد در ریزنمونه ساقه و محیط MS بدون تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، که در آن هیچ کالوس‌زایی مشاهده نشد، در بقیه تیمارها درصد کالوس‌زایی تفاوت معنی‌داری با ۱۰۰ درصد نداشت ولی از نظر عملکرد (وزن تر) کالوس تفاوت زیادی بین تیمارها وجود داشت (جدول ۷). تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مورد استفاده یکی از عوامل بسیار مهم است که کالوس‌زایی و رشد سلول‌های گیاه در شرایط درون شیشه ای را تحت تاثیر قرار می‌دهد ولی نوع و غلظت موردنیاز برای هر گیاه و یا حتی برای هر ژنوتیپ باید بهینه‌سازی شود. در این تحقیق، در بین اکسین‌های مورد استفاده، 2,4-D در ترکیب با Kin یا BAP در مقایسه با ترکیب NAA با این سایتوکنین‌ها شرایط مساعدتری را برای القاء تقسیم و تکثیر سلول‌های فندق مهیا کرد. برای تقسیم و ریخت‌زایی سلول‌ها و همچنین موقع انتقال سلول‌ها از مرحله G_1 به S و از مرحله G_2 به M حضور اکسین‌ها و سایتوکینین‌ها لازم است. در گیاهان مختلف گزارش شده که مهم‌ترین عامل در القای کالوس اکسین‌ها هستند و سایتوکنین‌ها این نقش را تسهیل می‌نمایند. اکسین‌ها با تحریک اسیدی شدن دیواره سلولی انبساط-پذیری (extensibility) آن را افزایش می‌دهند. همچنین اکسین‌ها رونویسی mRNAهای رمزکننده پروتئین‌های دخیل در رشد سلولی را القاء می‌کنند. سایتوکنین‌ها نیز از طریق تنظیم تولید پروتئین‌های درگیر در رشته‌های دوک، به‌طور مستقیم چرخه سلولی را تحت تاثیر قرار می‌دهند (۲۶، ۳۲، ۳۱).

ابراهیمی و همکاران (۱) با هدف بررسی شرایط کالوس-زایی در فندق با استفاده از ریزنمونه‌های دمبرگ و جوانه جانبی فندق، ترکیب غلظت‌های مختلف 2،4-D و BA را بررسی نموده و گزارش کردند که تمام تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی حداکثر تاثیر را روی کالوس‌زایی جوانه داشتند. بیشترین وزن تر و خشک در تیمارهای ۰/۵ میلی گرم در لیتر 2،4-D در ترکیب با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA به‌دست آمد. رضانژاد و طراحی (۴) نیز در مطالعه کالوس زایی رز گالیکا (*Rosa gallica* L.) بیان کردند که نوع، غلظت ونسبت تنظیم‌کننده‌های رشد در تولید کالوس موثر هستند و نسبت ۲ تا ۳ میلی‌گرم در لیتر BAP برای تحریک کالوس‌زایی جداکشت‌های مختلف موثر بودند. تحقیق حاضر نیز همانند نتایج مطالعات دیگر مانند گیبسون و همکاران (۱۴) و فرنس (۱۳) در کشت سلولی سرخدار

و بستوسو و همکاران (۷) در کشت سلولی فندق نشان می‌دهد که ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی گروه اکسین به‌ویژه 2,4-D در تمایززدایی، تحریک تقسیم و تکثیر سلولی و تولید کالوس نقش مهمی دارند و همراه با سایتوکینین‌ها از جمله BAP در تولید و رشد کالوس فندق مؤثرتر هستند.

نتایج حاصل از تکثیر درون‌شیشه‌ای نشان داد که حضور NAA به‌همراه Kin در محیط کشت موجب تحریک ریشه-زایی می‌گردد ولی تعداد برگ کمتری را ایجاد می‌کنند. حضور IBA در غلظت کم در کنار غلظت بالای BAP بیشترین تاثیر را در رشد ساقه و تولید برگ تازه از ریزنمونه‌های تک گره داشت. این در حالی است که در محیط کشت حاوی فقط IBA با همان غلظت هیچ برگی تولید نشده و حدود ۴۲ درصد از ریزنمونه‌ها ریشه تولید نمودند (شکل‌های ۸ و ۹). در محیط کشت حاوی فقط BAP به‌تنهایی نیز اگرچه برگ رشد کرده ولی کمتر از هنگامی است که در ترکیب با IBA بوده است. به‌نظر می-رسد IBA اثر BAP در تحریک و رشد ساقه و ایجاد برگ را تقویت می‌کند. دامیانو و همکاران (۱۰) نیز در مطالعه‌ای روی رقم‌های مختلف فندق در ایتالیا گزارش کردند دو میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر IBA برای مرحله شاخه‌زایی مناسب می‌باشد. همچنین پیوندی و همکاران (۳) در ریزازدیادی گیاه اسطوخودوس (*Lavandula vera*) بیان کردند که سرعت رشد ریزنمونه‌ها در محیط کشت دارای BAP افزایش معنی‌داری را نشان داده است و موجب افزایش در تعداد نوساقه‌ها و جداکشت شده است. سایتوکنین‌ها در تشکیل مستقیم یا غیرمستقیم شاخساره بسیار موثر هستند و معمولاً در ترکیب با اکسین-ها به‌کار می‌روند. تعادل بین اکسین و سایتوکنین به‌طور معمول در ریخت‌زایی سلول‌های گیاهی و همچنین در گیاه کامل نقش بسیار مهمی دارد (۳۱ و ۳۲).

تولید متابولیت‌های ثانویه در سلول‌های کالوس و کشت سوسپانسیون تحت تاثیر عوامل مختلفی مانند ژنوتیپ سلول‌ها، ترکیب محیط کشت به‌ویژه از نظر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی و شرایط رشد قرار می‌گیرد (۲). در مطالعه حاضر، مقایسه میزان تاکسول در کالوس رشدکرده روی محیط کشت‌های حاوی سطوح مختلف 2,4-D نشان می-دهد که با افزایش غلظت 2,4-D میزان تاکسول بطور معنی-داری کاهش پیدا کرد. طبق نتایج به‌دست آمده به‌نظر می‌رسد کالوس حاصل از محیط کشت MS حاوی BAP و غلظت‌های کم 2,4-D، تاکسول بیشتری تولید می‌کند. برای مثال در دو محیط کشت شماره ۳ و ۴ (جدول ۱۱) مقدار BAP ثابت بوده و با افزایش غلظت 2,4-D از یک میلی-گرم در لیتر در محیط کشت شماره ۳ به دو میلی‌گرم در لیتر در محیط کشت شماره ۴، مقدار تاکسول تقریباً به نصف کاهش یافته است. همچنین در درجه‌ی بعدی در محیط‌های شماره ۱ و ۶ که در هر دو غلظت Kin یکسان است، با افزایش غلظت 2,4-D از یک میلی‌گرم در لیتر به چهار میلی‌گرم در لیتر مقدار تاکسول ۳۹/۵ درصد کاهش نشان داد (جدول ۱۱). بستوسو و همکاران (۷) نشان دادند که فندق دارای آنزیم‌هایی برای تولید تاکسول است که به-عنوان یک مسیر خاص فقط در جنس سرخدار در نظر گرفته می‌شد و می‌تواند به‌عنوان منبع تجاری تولید تاکسان‌ها مورد استفاده قرار گیرد. تاثیر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر میزان تولید متابولیت ثانویه در مطالعات زیادی گزارش شده است. لوو و همکاران (۱۹) در کشت سلولی *Panax ginseng* تعاملی مخالف بین متیل جاسمونات و 2,4-D را گزارش کردند بطوریکه اثرات بهینه وقتی به‌دست آمد که این تنظیم‌کننده رشد از محیط کشت حذف شد. عملکرد camptothecin در کشت‌های مایع توسعه یافته از کشت‌های کالوس *Camptotheca acuminate* که روی محیط کشت MS حاوی 2,4-D و Kin به‌وجود آمده بودند حدود ۰/۰۰۲۵ درصد وزن خشک بود (۲۹). وقتی کالوس‌ها روی محیط MS حاوی NAA

رشد کردند تجمع camptothecin به ۰/۹۹۸ میلی‌گرم در لیتر رسید (۳۵). در اکثر موارد غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی فاکتور تعیین کننده‌ای در تجمع متابولیت‌های ثانویه است (۱۱). نوع و غلظت اکسین یا سایتوکنین یا نسبت اکسین به سایتوکنین رشد سلول‌های گیاهی کشت شده و تولید محصول را به‌طور چشمگیری تحت تاثیر قرار می-دهد (۲۰). در بسیاری از موارد مشاهده گردیده که تنظیم-کننده رشد گیاهی 2,4-D مانع تولید متابولیت‌های ثانویه می‌شود. برای مثال، حذف 2,4-D و یا جایگزینی آن با NAA یا IAA باعث افزایش تولید آنتوسیانین در کشت سوسپانسیون *Daucus carota*، نیکوتین در کشت سوسپانسیون *Nicotiana tabacum*، شیکونین در کشت سوسپانسیون *Portulaca grandiflora* می‌شود (۲۸، ۳۳، ۲۴). با این وجود، تحریک توسط 2,4-D در بیوسنتز کارتنوئید در کشت سوسپانسیون *Daucus carota* و تولید آنتوسیانین در کشت کالوس *Oxolis linearis* گزارش شده است (۲۲، ۲۱). سایتوکنین‌ها بسته به نوع متابولیت و گونه گیاهی اثرات متفاوتی دارند. برای مثال، Kin تولید آنتوسیانین را در کشت *Haplopappus gracilus* تحریک می‌کند ولی مانع تولید آن در کشت سلول Populus می‌شود (۲۲، ۳۰).

منابع

۱- ابراهیمی، چ، سلوکی، م، امیدی، م، فروتن، م، ۱۳۹۱. بررسی اثر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی و نوع ریزنمونه بر کالزایی فندق (*Corylus avellana*). ویژه‌نامه دوازدهمین کنگره ژنتیک ایران، تهران، ۵-۱.

۲- باقری، ع، صفاری، م، ۱۳۷۶. مبانی کشت بافت‌های گیاهی. دانشگاه فردوسی مشهد، ۴۰۶ ص.

۳- پیوندی، م، کاظمی، ل، مجد، ا، ۱۳۹۴. تاثیر سیتوکینین‌های مختلف بر ریزازدیادی گیاه اسطوخودوس (*Lavandula vera*)، مجله پژوهش‌های گیاهی (زیست شناسی ایران)، ۲۸ (۲): ۲۶۳-۲۵۷.

۴- رضانژاد، ف، طراحی، ر، ۱۳۹۲. اثر نور و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر کالوس‌زایی و تجمع آنتوسیانین در کالوس‌های حاصل از جداکشت‌های مختلف در رز گالیکا (*Rosa gallica* L.)، مجله پژوهش‌های گیاهی (زیست شناسی ایران)، ۲۶ (۲): ۱۹۵-۱۸۴.

۵- رضایی، ا، قناتی، ف، بهمنش، م، ۱۳۹۰. افزایش تولید و آزادسازی تاکسول توسط متیل جاسمونات، امواج فراصوت و دی‌بوتیل فتالات در کشت سلولی فندق، مجله زیست‌شناسی گیاهی، ۳ (۷): ۵۵-۲۷.

۶- فارسی، م، باقری، ع، ۱۳۸۳. اصول اصلاح نباتات. مشهد: انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد، صص ۲۴۳-۲۳۹.

7- Bestoso F, Ottaggio L, Armirotti A, Balbi A, Damonte G, Degan P, Mazzei M, Cavalli F, Ledda B, Miele M (2006). *In vitro* cell cultures obtained from different explants of *Corylus avellana* produce taxol and taxanes. BMC Biotechnilogy 6 (45): 1-11.

8- Carlos Bada J, Leon- Camacho M, Prieto M, Alonso L (2004). Characterization of oils of hazelnut oils from Asturias, Spain. European Journal of Lipid Science and Technology 106: 294-300.

9- Crews C, Hough P, Godward J, Brereton P, Lees M, Guiet S, Winkelmann W (2005). Study of the main constituents of some authentic hazelnut oils. Journal of Agricultural Food Chemistry 53: 4843-4852.

10- Damiano C, Catenaro E, Ginovinazzi A, Caboni E (2005). Micropropagation of hazelnut (*Corylus avellana*). Acta Horticulturae 686: 227-226.

11- DiCosmo F, Towers GHN (1984). Stress and secondary metabolism in cultured plant cells. In: Timmerman BN, Steelink FA, Loewus FA. Recent advances in phytochemistry,. New York: Plenum 18: 97 – 175.

12- Erdogan V, Mehlenbacher S. A (2000). Interspecific hybridization in hazelnuts. Journal of the American Society for Horticultural Science 125: 489-497.

13- Frense D (2007). Taxanes: perspectives for biotechnological production. Applied Microbiology and Biotechnology 73: 1233-1240.

14- Gibson DM, Ketchum REB, Vance NC, Christen AA (1993). Initiation and growth of cell lines of *Taxus brevifolia* (Pacific Yew). Plant Cell Reports 12: 479-482.

15- Hoffman A, Khan W, Worapong J, Strobel G, Griffin D, Arbogast B (1998). Bioprospecting for taxol in angiosperm plant extracts-using high performance liquid chromatography-Thermospray Mass Spectrometry to Detect the Anticancer Agent and its Related Metabolites in. Spectroscopy-Eugene 13(6): 22-32.

16- Hoffman A, Shahidi F (2009). Paclitaxel and other taxanes in hazelnut. Journal of Functional Foods 1: 33-37.

17- Khosroshahi A, Valizadeh M, Ghasempour A, Khosrowshahli M, Naghdibadi H, Dadpour MR, Omidi Y (2006). Improved taxol production by combhnation of inducing factors in suspension cell culture of *Taxus baccata.* Cell Biology International 30: 262-269.

18- Loach K (1996). Enviromental conditions for rooting cutting: importantce, measurment and control. Acta Horticulturae 374: 632-636.

19- Lu M.B, Wong HL, Teng WL (2001). Effects of elicitation on the production of saponin in cell culture of *Panax ginseng***.** Plant Cell Reports 20:674–677.

20- Mantell SH, Smith H (1984). Cultured factors that influence secondary metabolite accumulation in plant cell and tissue cultures. Plant biotechnology. Cambridge University Press 75-108.

21 - Meyer HJ, Van Staden J (1995). The in vitro production of a anthocyanin from callus culture of Oxalis linearis. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 40: 55-58.

22- Mok MC, Gabelman WH, Skoog F (1976). Carotenoid synthesis in tissue cultures of *Daucus carota.* Journal of the American Society for Horticultural Science 101: 9-442.

23- Olsen J (2003). Growing hazelnuts in the Pacific Northwest. Published by Oregon State University, Extension service 1-45.

24- Rajendran L, Ravishankar GA, Venkataraman LV, Prathiba KR (1992). Anthocyanin production in callus cultures of *Daucus carota* L. as influenced by nutrient stress and osmoticum. Biotechnology Letters. 14: 14-707.

25- Rao SR, Ravishankar GA (2002). Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. Biotechnology Advances 20: 101-153.

26- Richard D, Lescot M, Inze D, De Veylder L (2002). Effect of auxin, cytokinin, and sucrose on cell cycle gene expression in *Arabidopsis thaliana* cell suspension cultures. Plant Cell Tissue and Organ Culture 69: 167–176.

27- Safari M, Ghanati F, Hajnoruzi A, Rezaei A, Abdolmaleki P, Mokhtari-Dizaji M (2012). Maintenance of membrane integrity and increase of taxanes production in hazel (*Corylus avellana* L.) cells induced by low-intensity ultrasound. Biotechnology Letter 34: 1137-1147.

28- Sahai OP, Shuler ML (1984). Enviromental parameters influencing phenolics production by batch cultures of *Nicotiana tabacum*. Biotechnology and Bioengineering 26: 20-111.

29- Sakato K, Misawa M (1974). Effects of chemical and physical conditions on growth of *Camptotheca acuminate* cell cultures. Agricultural and biological chemistry 38: 491-497.

30- Seitz HU, Hinderer W (1988). Anthocyanins. In: Constabel F, Vasil I. Cell culture and osmotic cell genetics of plants. San Diego: Academic Press 5: 49-76.

31- Silveira V, Floh EIS, Handro W, Pedro Guerra M (2004). Effect of plant growth regulators and levels of intracellular protein, starch and polyamines in embryogenic suspension cultures of Pinus taeda . Plant Cell, Tissue and Organ Culture 76: 53-60.

32- Stals H, Inze D (2001). When plant cells decide to divide. Trends Plant Science 8: 359–364.

33- Tabata M, Fujita Y (1985). Production of shikonin by plant cell cultures. Biotechnology in Plant Science. Orlando: Academic Press 18-207.

34- Tripathi L, Tripathi JN (2003). Role of biotechnology in medicinal plants. Tropical Journal of Pharmaceutical Research 2: 243-253.

35- Van Hengal AJ, Harkes MP, Witchers HJ, Hesselinic PGM, Buitglaar RM (1992). Characterization of callus formation and camptothecin production by cell lines of *Camptotheca acuminate*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 28: 11-18.

36- Woo DD, Miao SY, Pelayo JC, Woolf AS (1994). Taxol inhibits progression of congenital polycistic kidney disease. Nature 368:750-753.

The effect of plant growth regulators on *in vitro* growth of hazelnut (*Corylus avellana*) and taxol production in the callus

Hazrati Jahan R.[1], Zare N.[1], Dezhsetan S.[1], Sheikhzadeh Mosaddeg P.[1] and Farjami Nezhad M.[2]

[1] Agronomy and Plant Breeding Dept., Faculty of Agriculture, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, I.R. of Iran

[2] Medicinal Plants Research Center, Ardabil Branch, Islamic Azad University, Ardabil, I.R. of Iran

Abstract

In this research, the effects of type and concentration of plant growth regulators (2,4-D, NAA, Kin, BAP, IBA, TDZ) on callus induction from different explants, *in vitro* micropropagation of hazelnut via single node explants and also amount of taxol in callus were investigated. For this, seed, leaf and stem explants surface sterilized with different treatment and cultured on MS medium containing 2,4-D or NAA (1, 2 and 4 mg/l) in combination with Kinetin and BAP (0.5 and 1 mg/l). In addition, in order to *in vitro* micropropagation, single node explants were prepared and cultured on MS medium containing different levels of plant growth regulators. The results indicated that the percentage of callus induction from leaf explants was significantly ($p\leq 0.01$) higher than that of seed and stem. The highest percentage of callus induction and fresh weight of callus was observed on MS medium containing 2 mg/l 2,4-D and 0.5 mg/l BAP. The highest percentage of root induction in single node explants of hazelnut was observed on MS medium containing 2 mg/l NAA and 0.5 mg/l Kin and the MS medium containing 2 or 4 mg/l NAA and 0.5 mg/l Kin. The highest number of leaves was obtained on MS medium containing BAP and 0.05 mg/l IBA and MS medium containing 2.5 mg/l TDZ and 0.05 mg/l IBA. The highest content of taxol was observed in the calli derived from seed and leaf explants on MS medium supplemented with 1 mg/l 2,4-D and 0.5 mg/l BAP.

Key words: *Corylus avellana*, Micropropagation, Secondary metabolite, Tissue culture