

# INDUCTION DES CALS DE L'IF COMMUN (*TAXUS BACCATA* L.) EN VUE DE L'OPTIMISATION DU RENDEMENT DE TAXOL

ABDELLATIF Nabila<sup>1</sup>,  
CHAOUIA Cherifa<sup>2</sup>, SAIDI  
Fairouz<sup>1</sup>, et AIZER  
Nassima<sup>1</sup>.

1. Département de  
Biologie et Physiologie  
Cellulaire, Faculté des  
Sciences de la Nature et  
de la Vie, Université de  
Blida 1. B.P. 270, route de  
soumaa ; Blida, Algérie.  
Email :  
bionab0@gmail.com

2. Laboratoire de  
Biotechnologie des  
Productions Végétales.  
Faculté des Sciences de la  
Nature et de la Vie,  
Université de Blida 1. B.P.  
270, route de soumaa,  
Blida, Algérie. Email :  
chercha1925@yahoo.fr.

Reçu le 11 septembre  
2016, accepté le 5  
novembre 2016

## Résumé

*Taxus baccata* communément appelé l'if commun, regroupe les arbres connus par leur contenu en taxanes, particulièrement le taxol, agent anticancéreux prometteur. L'étude de l'aptitude à la callogenèse de *Taxus baccata* L. en vue d'optimiser la production du taxol a montré qu'après deux mois de culture, les explants issus de pousses ont donné la meilleure induction (100%) avec une prolifération des cals de 3,29 g de poids frais sur le milieu B5(M<sub>4</sub>) (1mg/l de 2,4-D + 1mg/l de Kinétine + 0,5 mg/l de GA3). Quant aux explants foliaires, la meilleure induction (100%) est obtenue sur le milieu B5(M<sub>4</sub>). Par ailleurs, la meilleure croissance est obtenue sur le milieu B5(M<sub>1</sub>) (0,75mg/l de 2,4-D + 0,75mg/l de kinétine) avec de 0,133 g de poids frais des cals. L'étude comparative des deux types d'explants pour un fort pouvoir callogène a permis de choisir les pousses comme étant les explants les plus callogènes.

**Mots clés :** *Taxus baccata* L., taxol, induction des cals, pouvoir callogène.

## INTRODUCTION

Le genre *Taxus*, appartenant à la famille des Taxacées, constitue un petit groupe des gymnospermes extrêmement toxiques [1]. Il est principalement présent dans l'hémisphère Nord [2]. Toutefois, les espèces de ce genre ont connu une importance particulière ces dernières années du fait de leur contenu en taxol (paclitaxel), agent anticancéreux prometteur [3]. Cependant, la demande de cet agent antinéoplasique augmente approximativement chaque année par 20% [4]. De plus le paclitaxel utilisé en cliniques est extrait à partir des écorces des arbres de *Taxus*, populations sous pression dû à leur contenu plutôt bas en paclitaxel. Ces espèces sont en voie de

disparition en Europe [3]. Ce ci souligne le besoin d'une source alternative de taxol tels que la culture cellulaire. Une telle culture permet d'éviter d'importantes variations climatiques, des risques induits par les agents pathogènes et elle est indépendante des conditions du sol [5]. Le passage par le stade de callogenèse est une étape capitale et incontournable pour optimiser la production du taxol en suspension cellulaire. L'étude entreprise consiste à étudier la réaction des explants, l'effet de la composition minérale du milieu de culture et l'effet de l'apport des régulateurs de croissance sur l'aptitude à la callogenèse de *Taxus baccata* L. provenant de parc national de Chréa (Algérie).

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 1. Matériel végétal

Le matériel végétal choisi est représenté par des organes juvéniles de l'année, aiguilles et pousses de *Taxus baccata* L. La stérilisation se fait sur les pousses entières. Ce n'est qu'à l'issue de la procédure que l'on sectionne les aiguilles à mettre en culture. Le matériel végétal est rincé à l'eau courante puis immergé successivement dans les solutions suivantes ; 1 min dans l'éthanol à 70°, 5 min dans NaClO (13°) dilué à 50%, 15 min sous agitation dans une solution de : H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10V) plus quelques gouttes de TWEEN 20 à 1 % v/v, et en fin rincé 5 fois à l'eau distillée stérile en changeant l'eau à chaque rinçage pendant 15, 15, 10,

10 et 5 minutes respectivement. Les aiguilles et les pousses désinfectées de 1 cm de long ont été placées horizontalement sur le milieu de culture dans des tubes de 20 cm. L'incubation a eu lieu à l'obscurité à 25 ± 2°C dans une chambre de culture.

### 2. Milieux de culture

Trois milieux de base ont été utilisés ; le milieu de culture de MURASHIGE et SKOOG (MS) [6], le milieu de GAMBORG (B5) [7] et le milieu de culture Woody Plant Medium (WPM) [8]. A chaque milieu de base, 100 mg/l de l'acide ascorbique, 20 g/l de sucrose, 7 g/l d'agar et 0,5 g/l de charbon actif ont été ajoutés.

Les hormones de croissance testées sont ; l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D), la kinétine (Kin) et l'acide gibbéréllique 3 (GA3). Ces régulateurs de croissance sont apportés seuls ou combinés entre eux à différentes doses dans les trois milieux de base (MS, B5 et WPM) soit au total 15 combinaisons testées. Les mêmes milieux sont testés pour les explants provenant de pousses et d'aiguilles à raison de 30 explants pour chaque essai soit au total 450 pour chaque type d'explant (tableau 1). Les résultats ont été traités par l'analyse ANOVA à un et à deux facteurs (ANOVA simple « one-way » et ANOVA factorielle « factoriel ANOVA »).

Tableau 1 : Milieux de culture testés.

Milieu de base	Hormones de croissance	Milieu de culture
MS B5 WPM	M <sub>0</sub> : témoin sans hormones	MS (M <sub>0</sub> ) B5 (M <sub>0</sub> ) WPM (M <sub>0</sub> )
MS B5 WPM	M <sub>1</sub> = 0,75 mg/l de Kin + 0,75 mg/l de 2,4-D	MS (M <sub>1</sub> ) B5 (M <sub>1</sub> ) WPM (M <sub>1</sub> )
MS B5 WPM	M <sub>2</sub> = 2 mg/l de 2,4-D	MS (M <sub>2</sub> ) B5 (M <sub>2</sub> ) WPM (M <sub>2</sub> )
MS B5 WPM	M <sub>3</sub> = 2 mg/l de Kin	MS (M <sub>3</sub> ) B5 (M <sub>3</sub> ) WPM (M <sub>3</sub> )
MS B5 WPM	M <sub>4</sub> = 1mg/l de Kin + 1mg/l de 2,4-D + 0,5mg/l de GA3	MS (M <sub>4</sub> ) B5 (M <sub>4</sub> ) WPM (M <sub>4</sub> )

Pour déterminer la croissance mesurée en tant que poids frais, 25 à 30 calcs développés dans les milieux de culture testés ont été pesés séparément sous les mêmes conditions, après 60 jours de culture.

## RÉSULTATS ET DISCUSSION

Des cals à texture friable et lisse. Sont obtenus sur tous les milieux de culture testés (B5, MS et WPM). Les milieux de base utilisés B5 et WPM favorisent la formation de cals à coloration jaune pâle pour les explants issus de pousses, comparés au milieu MS qui donne des cals à aspect chlorophylliens. Quant aux explants foliaires, les cals ont une coloration verte pâle seulement sur le milieu B5. Les milieux de base MS et WPM donnent des cals de couleur jaune pâle.

### 1. Effet de milieux de base sur l'aptitude à la callogenèse

Le meilleur taux d'induction des cals à partir des explants pousses (87%) est obtenue sur le milieu de base B5. Moins efficace mais néanmoins, des taux d'induction considérables obtenues sur les milieux de base MS et WPM avec un pourcentage respectivement de 73% et 76%. Ces résultats sont proches à ceux obtenus pour l'espèce *Taxus chinensis* avec 83,5% sur le milieu B5 et 82,5% sur le milieu MS [9]. Quant à l'espèce *Taxus cuspidata* le milieu B5 donne un taux d'induction très faible de l'ordre de 15% [10].

Concernant la croissance des cals, un effet très hautement significatif ( $P= 0,0000$ ) des milieux de base testés (B5, MS et WPM) est obtenue. Le milieu B5 favorise la plus forte prolifération cellulaire avec une moyenne de 2,0927 g comparé aux milieux WPM et MS avec respectivement 1,3425 g et 1,0729 g (Fig. 1). Ces résultats sont conformes à ceux de WICKREMESINHE et ARTECA [11]. Par contre, les cals issus des pousses de *Taxus brevifolia* ne sont pas influencés par la composition minérale de ces milieux [12]. Quant à *Taxus baccata* L. Washingtonii, le milieu B5 est moins efficace que le milieu MS pour la croissance de leur cals [3].

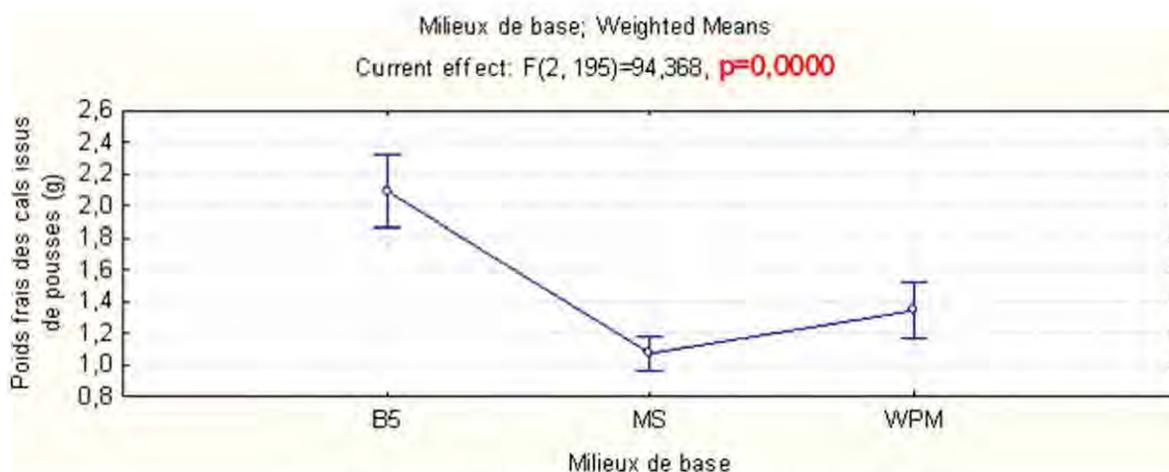


Figure 1 : Effet des milieux de base sur la croissance des cals.

Ainsi pour les explants foliaires, le milieu B5 s'est révélé le plus favorable à l'induction avec un pourcentage de 69%. La prolifération cellulaire de ces cals est favorisée par les milieux B5 (122,64 mg de poids frais final) et WPM (81,22 mg de poids frais final) (Fig. 2). Cela pourrait être dû à la

faible teneur en azote de ces deux milieux par rapport au MS. La composition des macroéléments, particulièrement l'azote, est plus forte pour le milieu MS avec 40 mM du nitrate et 20 mM d'ammonium. Le milieu B5 contient 25 mM du nitrate et 2 mM d'ammonium et le milieu WPM en contient beaucoup

moins soit 10 mM du nitrate et 5 mM d'ammonium [11]. Selon KETCHUM et al., [12], il y a une forte corrélation entre la diminution de  $\text{NH}_4^{++}$  et l'augmentation de la croissance des cals de *T. brevifolia*.

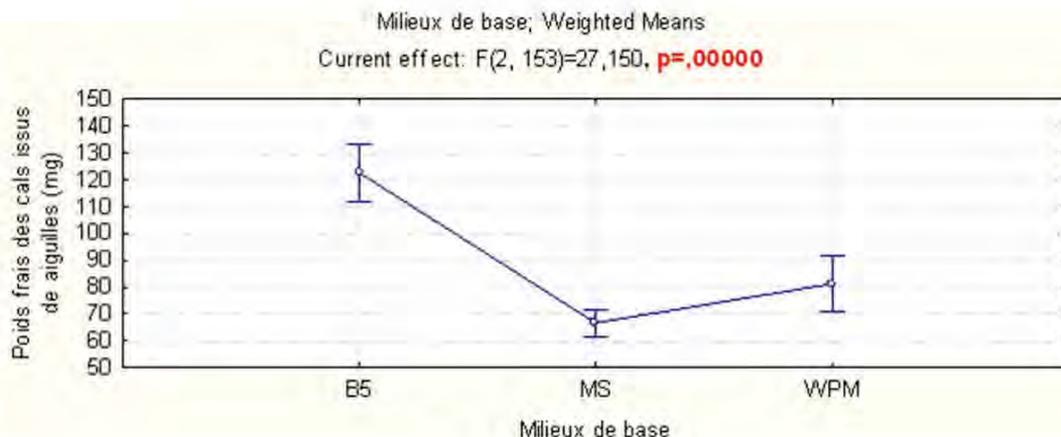


Figure 2 : Effet des milieux de base sur la croissance des cals.

## 2. Effet des hormones de croissance sur l'aptitude de la callogenèse

La mise en culture des explants sur un milieu dépourvu d'hormones de croissance ( $M_0$ ), entraîne une absence totale d'activité cellulaire. Par contre les cals de *Taxus x media* cv. Hicksii y ont été stimulés [13]. La kinétine seule dans le milieu d'induction  $M_3$  (2 mg/l de Kin) s'est révélé inefficace à la callogenèse quelque soit le type d'explant ou le milieu de base utilisé (fig 3). Des résultats pareils obtenus pour *Taxus baccata* cv. Repandens, *T. brevifolia*, *T. cuspidata*, et *T. x media* cv. Hicksii où la kinétine provoque des brûlures des explants [11]. L'apport de l'auxine 2,4-D seul dans le milieu d'induction  $M_2$  (2 mg/l

de 2,4-D), se montre très efficace à l'induction des cals à partir des pousses, quelque soit le milieu de base utilisé, avec un pourcentage de 100%. Le 2,4-D est aussi la meilleure source d'auxine pour l'induction des cals de *T. brevifolia* et *T. baccata* cv. Repandens [11]. La concentration de 2 mg/l est considérablement moins élevée que celle rapportée pour les cals de *Taxus cuspidata* où la meilleure croissance est obtenue à une concentration de 8 mg/l de 2,4-D et 1 mg/l de kinétine [14]. Quant aux explants foliaires, la présence de 2 mg/l du 2,4-D dans le milieu de culture permet d'induire les cals avec un pourcentage de 48%. Cette faible réponse peut être interprétée par une toxicité de l'hormone [15]. L'apport des auxines et des

cytokinines est bénéfique sur le milieu  $M_1$  (0,75mg/l de Kin + 0,75mg/l de 2,4-D). Pour les explants foliaires nous remarquons que ce dernier est le plus stimulant à la callogenèse avec un pourcentage de 95%. L'ajout de la gibbérelline (GA3) dans le milieu  $M_4$  pour les mêmes explants (aiguilles) montre un taux plus faible d'induction où nous enregistrons 59% tandis qu'il favorise significativement leur activité cellulaire. Quant aux explants issus de pousses, la callogenèse est nettement améliorée par l'addition de la GA3 à la kinétine et au 2,4-D dans le milieu  $M_4$  avec un taux de 97% (Fig. 3). L'effet synergique entre ces régulateurs pourrait être à l'origine de cette amélioration [15].

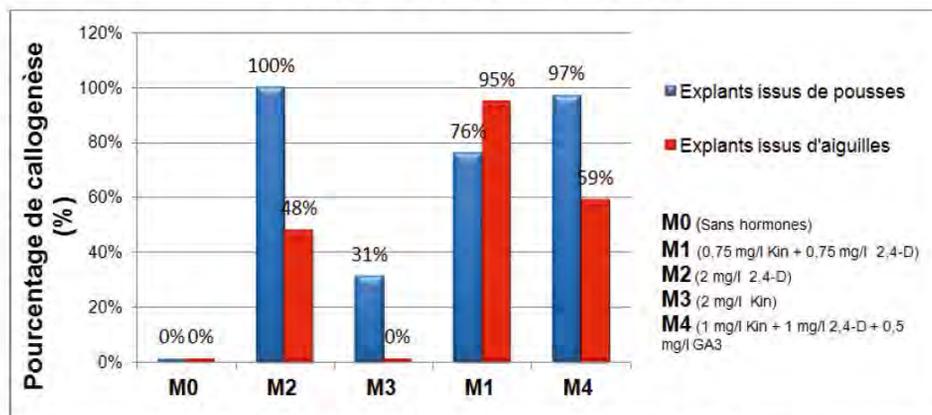


Figure 3 : Effet de l'apport des hormones sur le taux de la callogenèse.

Un effet très hautement significatif ( $p=0,0000$ ) des hormones de croissance testées sur le poids frais des cals issus de pousses est enregistré (Fig. 4). Les poids frais moyens des cals, sur les milieux  $M_2$  (1,8982 g) et  $M_4$  (1,9115

g), sont comparables ( $P=0,8992$ ) (tableau 2). Nous déduisons alors que le 2,4-D, seul ou combiné avec la kinétine et la GA3, a le même effet sur l'intensité de prolifération de cals issus de jeunes pousses après 60 jours de culture. La Kinétine a un

effet inhibiteur significatif sur la croissance des cals ( $p=0,000009$ ), en comparant le milieu  $M_1$  (Kin + 2,4-D), et le milieu  $M_2$  (2,4-D seul). Notons que le milieu  $M_3$  composé uniquement de la Kinétine a donné des résultats nuls.

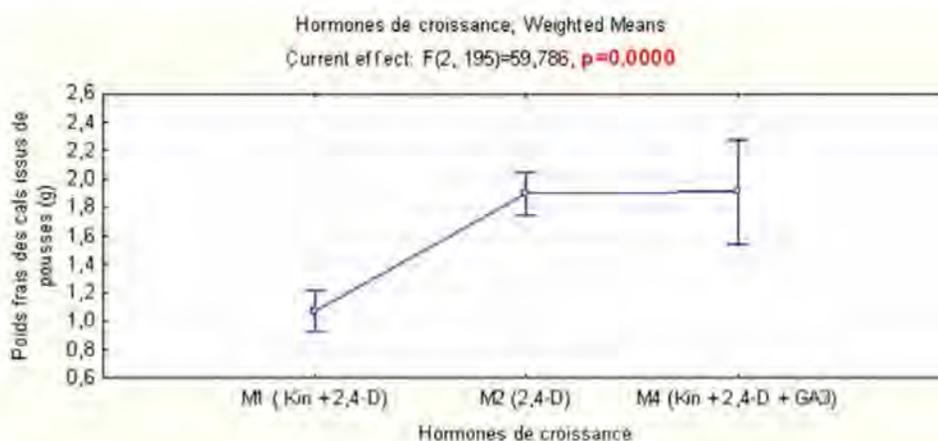


Figure 4 : Effet des hormones de croissance sur le poids frais des cals.

Tableau 2 : Classification des moyennes des poids frais des cals.

Newman-Keuls test; variable Poids frais des cals issus de pousses (g)				
Approximate Probabilities for Post Hoc Tests				
Error: Between MS = ,35508, df = 195,00				
Cell No.	Hormones de croissance	(1)	(2)	(3)
		1,0695	1,8982	1,9115
1	M1 (Kin + 2-4D)		0,000009	0,000022
2	M2 (2-4D)	0,000009		0,899250
3	M4(Kin + 2-4D +GA3)	0,000022	0,899250	

Concernant les explants foliaires, l'analyse statistique (Fig. 5) met en évidence un effet très significative ( $p=0,00459$ ) des hormones de croissance testées sur la prolifération cellulaire de leurs cals. Il ressort que la présence de 2,4-D est nécessaire pour le déclenchement de la callogenèse contrairement à la kinétine. L'ajout de la GA3 augmente consi-

dérablement l'effet callogène du 2,4-D sur les aiguilles avec 109,96 mg de poids frais des cals après 60 jours de culture.

Nous avons observé aussi une couleur rouge-marron des cals, que ce soit pendant l'initiation ou la subculture, et ce malgré l'addition des antioxydants. Ces brunissements sont apparus surtout sur les milieux dont la composition

hormonale est 2 mg/l de 2,4-D. Le 2,4-D est une hormone qui peut induire à la callogenèse, mais peut avoir comme conséquence le brunissement des cultures [9]. Des études récentes, attribuent ce brunissement aux concentrations élevées du sucrose et du glucose dans le milieu de culture [16].

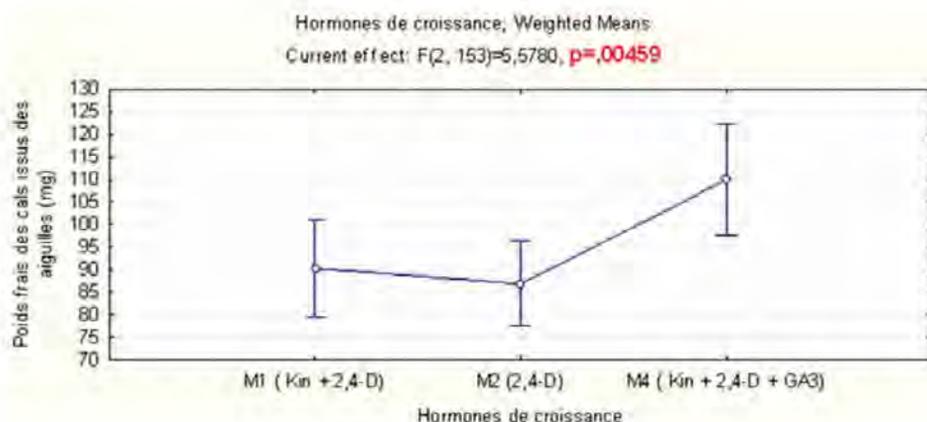


Figure 5 : Effet des hormones sur le poids frais des cals issus des aiguilles.

### 3. Effet de l'interaction milieu de base / hormones de croissance

Une interaction de milieu de base et de la composition hormonale est confirmée par une analyse factorielle (Fig. 6). Concernant les cals issus de pousses, le milieu de base B5 semble interagir

positivement avec le 2,4-D seul ou associé avec la kinétine et la GA3, avec un taux d'induction de 100% (tableau 3.5) et une croissance de cals de 2,4386 g pour le milieu B5(M<sub>2</sub>) (2 mg/l de 2,4-D) et 3,2858g pour le milieu B5(M<sub>4</sub>) (1mg/l de Kin + 1 mg/l de 2,4-D + 0,5 mg/l de GA3). En revanche, l'interaction des

milieu de base MS et WPM avec les différentes combinaisons hormonales testées serait en baisse de la callogenèse. Malgré que cette interaction soit favorable à l'induction des cals (100% pour MS(M<sub>2</sub>) et WPM(M<sub>2</sub>)) elle n'est pas suivie d'une prolifération cellulaire intense.

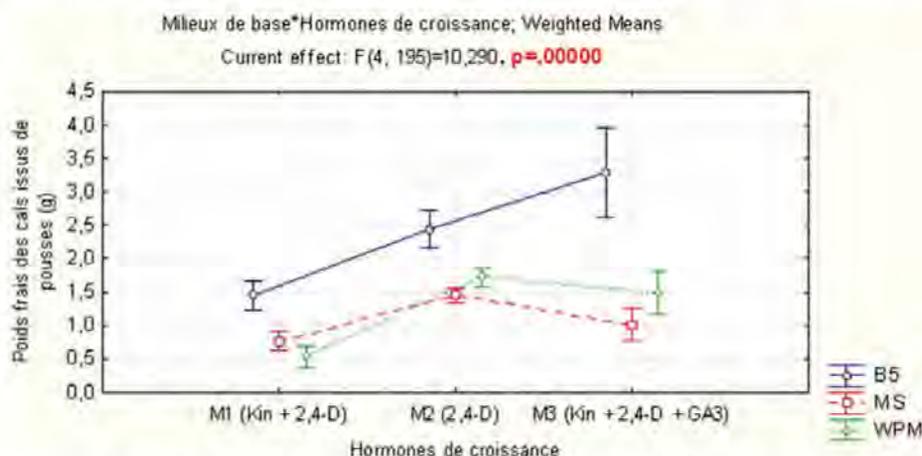


Figure 6 : Effet d'interaction entre les milieux de base et les hormones.

Une interaction négative est enregistrée entre le milieu B5 et la composition hormonale M<sub>1</sub> (Kin + 2,4-D) en inhibant la callogenèse. Le poids frais moyen des cals sur le milieu de base B5 sans tenir compte de l'effet d'hormone de croissance est de 2,0927g (Fig. 7), alors que sur

le milieu B5(M<sub>1</sub>) (l'effet des deux facteurs, milieu de base B5 et la combinaison hormonale M<sub>1</sub>) ce poids chute jusqu'à atteindre 1,4443 g.

La première manifestation des cals issus de pousses sur le milieu B5(M<sub>2</sub>) était à partir du 13<sup>ème</sup> jour et

sur le milieu B5(M<sub>4</sub>) au 15<sup>ème</sup> jour après la mise en culture. La prolifération cellulaire sur le milieu B5(M<sub>2</sub>) est plus précoce que celle sur le milieu B5(M<sub>4</sub>) entre le 20<sup>ème</sup> et le 35<sup>ème</sup> jour (fig 7).

Cependant, après 65 jours de culture, les cals sur le milieu B5(M<sub>4</sub>) ont un poids frais moyen supérieur à celui des cals sur le B5(M<sub>2</sub>). De plus, nous avons remarqué que la plupart

des cals sur le milieu B5(M<sub>2</sub>) ont une couleur marron contrairement au milieu B5(M<sub>4</sub>) où le brunissement était négligeable. Il serait donc intéressant d'induire les cals sur le

B5(M<sub>2</sub>) puis les transférer sur le B5(M<sub>4</sub>) après 30 jours de culture pour avoir une bonne croissance.

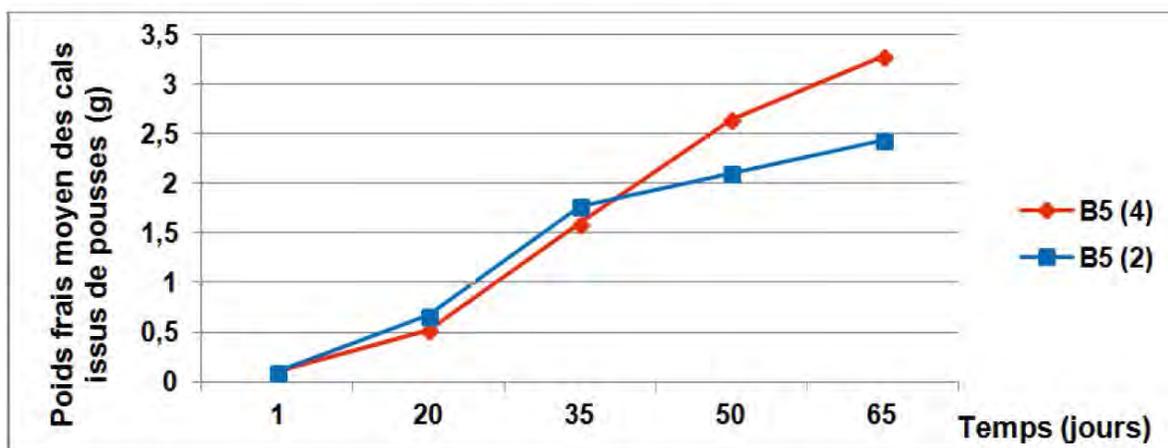


Figure 7 : Croissance des cals issus de pousses.

Contrairement aux explants issus de pousses, les pourcentages d'induction des cals à partir des aiguilles sont moyens à nuls, ils oscillent entre 0% et 45%. Exception faite pour les milieux B5(M<sub>4</sub>), B5(M<sub>2</sub>), MS(M<sub>1</sub>) et B5(M<sub>1</sub>) avec respectivement 100%, 86%, 77% et 70%. Quelque soit le milieu,

l'activité callogène des explants foliaires ne se déclenche qu'à partir du 30<sup>ème</sup> jour de culture et elle se limite au niveau des extrémités sectionnées. Nous constatons une interaction positive entre le milieu de base B5 et les différentes compositions hormonales testées (Fig. 8). Cette interaction est en

faveur d'une callogenèse dont le milieu B5(M<sub>1</sub>) présente le meilleur poids frais des cals estimé à 132,6727 mg après 60 jours de culture. En revanche l'interaction du milieu MS est négative avec les compositions hormonales testées.

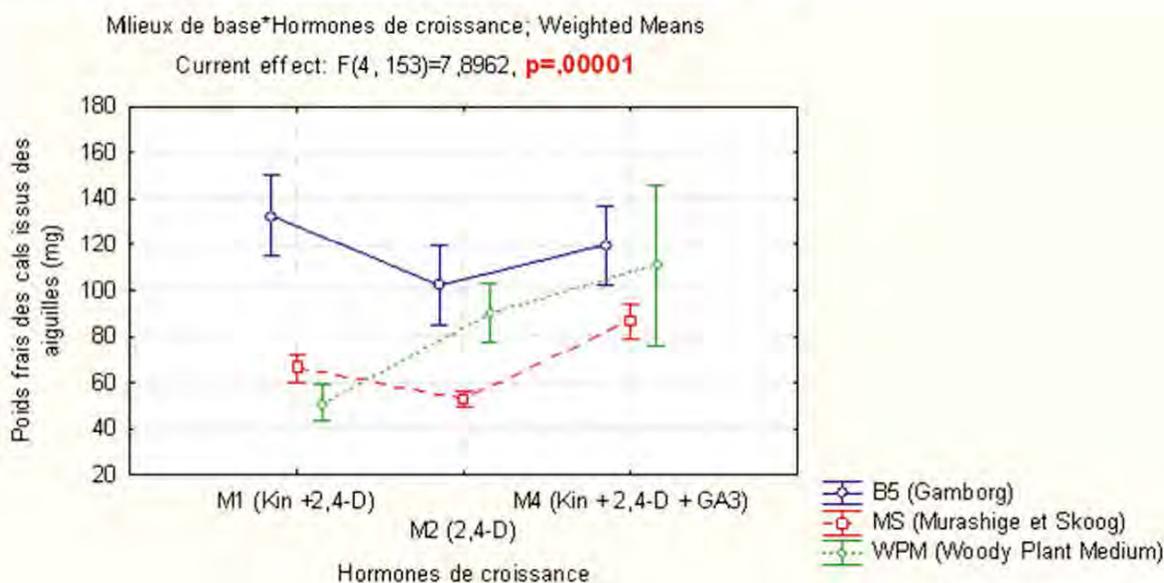


Figure 8 : Interaction entre les milieux de base et les hormones de croissance.

#### 4. Influence de l'explant

Les résultats obtenus, révèlent que les explants issus de pousses réagissent le mieux à la callogenèse. Le pourcentage d'explants callogènes est de 79%, comparé aux explants foliaires qui ont de faibles capacités callogènes, dans les mêmes conditions de culture, estimée à 51%.

Une différence très hautement

significative ( $p=0,0000$ ) entre les poids frais moyens des cals est enregistrée (tableau 3). Les explants issus de pousses se caractérisent par une forte activité callogène avec un poids frais moyen de cals estimé à 1,5682 g. Le déclenchement est entre le 13<sup>ème</sup> et le 21<sup>ème</sup> jour après le repiquage selon le milieu de culture testé. Tandis que, les explants foliaires se caractérisent par une activité cellulaire tardive où

l'apparition des cals n'est observée qu'à partir de 30 jours en se limitant au niveau des zones d'excisions (Fig. 9). Le poids frais final moyen de cals est de 0,0930 g. Des résultats concordants ont été obtenus par WICKREMESINHE et ARTECA [11] sur la même espèce. Notons par ailleurs, qu'après 60 jours de culture, ces cals stoppent leur croissance.

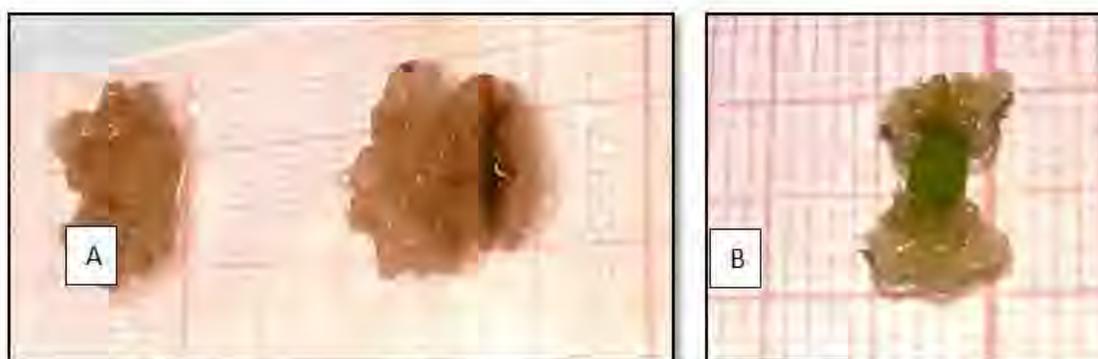


Figure 9 : Aspect des cals après 60 jours de culture.  
A : explant issu de pousse B : explant foliaire.

Tableau 3 : Comparaison de poids frais moyen des cals issus de pousses et aiguilles

variable	T-tests; Grouping: Explant.						
	Groupe 1: Pousses			Groupe 2: Aiguilles			
	Moyenne Pousses	Moyenne Aiguilles	Valeur de t	Degré de liberté	P	Effectif N Pousses	Effectif N Aiguilles
Poids frais des cals (g)	1,568	0,093	20,340	364,0	0,000	204,0	162,0

#### CONCLUSION

Le milieu de GAMBORG (B5) semble être le plus favorable pour l'induction et la prolifération cellulaire et ce quelque soit le type d'explant. L'apport des régulateurs

de croissance paraît nécessaire pour le déclenchement de la callogenèse. La composition hormonale M<sub>1</sub> (0,75mg/l 2,4-D et 0,75mg/l kin) est la plus favorable à l'induction des cals à partir des explants foliaires (95%). De plus la présence

de 2,4-D est nécessaire pour le déclenchement de la callogenèse contrairement à la kinétine. L'ajout de la GA3 augmente l'effet callogène du 2,4-D et de la kinétine sur les aiguilles en favorisant la prolifération cellulaire.

Quant aux explants provenant des pousses, les compositions hormonales M<sub>2</sub> et M<sub>4</sub> se sont révélées les plus favorables à l'induction avec un pourcentage respectivement de 100 et 97%. De plus, la combinaison de la GA3, du 2,4-D et de la Kinétine a un effet synergique sur l'induction et la prolifération cellulaire. Par

conséquent, les milieux B5(M<sub>2</sub>) et B5(M<sub>4</sub>) se sont révélés les plus favorables pour l'induction et la croissance des cals provenant des pousses. Les explants issus de pousses ont un fort pouvoir callogène que les explants foliaires et ce quelque soit le milieu testé. Malgré les précautions prises notamment, la manipulation sur de

jeunes explants, l'addition des antioxydants dans le milieu et l'incubation à l'obscurité, quelques brunissements sont apparus particulièrement sur les milieux contenant 2 mg/l de 2,4-D. Il serait intéressant d'induire les cals sur le B5(M<sub>2</sub>) puis les transférer sur le B5(M<sub>4</sub>) après 30 jours de culture pour avoir une bonne croissance.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1]. Vallata P. (2009). Intérêt pharmaceutique du genre *Taxus* et des Taxanes ; culture *in vitro* et dosage. Thèse de doctorats, Faculté de pharmacie, Université HENRI POINCARÉ - NANCY 1, 106 p.
- [2]. Richard D. (2008). *Poisons et venins dans la nature*. Delachaux et Niestlé SA, Paris. 185 p.
- [3]. Mihaljevic S., Bjedov I., Kovac M., Levanic D.L. & Jelaska S. (2002). Effect of Explant Source and Growth Regulators on *in vitro* Callus Growth of *Taxus baccata* L. *Washingtonii*. *Food Technol. Biotechnol.* Vol.40 (4) : 299-303.
- [4]. Onrubia M., Moyano E., Bonfill M., Exposito O., Palazon J. & Cusido R. M. (2010). An approach to the molecular mechanism of methyl jasmonate and vanadyl sulphate elicitation in *Taxus baccata* cell cultures: The role of txs and bap1 gene expression. *Biochemical Engineering Journal*, Vol.53 : 104-111.
- [5]. Vongpaseuth K. & Roberts S. C. (2007). Advancements in the Understanding of Paclitaxel Metabolism in Tissue Culture. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, Vol.8 (4) : 219-236.
- [6]. Murashige T. & Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plantarum*. Vol.15 : 473-97.
- [7]. Gamborg O.L., Miller R.A. & Ojima K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res*. Vol.50 : 151-8.
- [8]. McCown B.H. & Lloyd G. (1981). Woody Plant Medium (WPM), a mineral nutrient formulation for microculture for woody plant species. *Hortic Sci.* 16-453.
- [9]. Li J., Liu M., Chen H., Wu Z. & Wang J. (1999). Callus initiation and subculture of *Taxus chinensis*. *Journal of Forestry Research*, Vol.10(1) : 11-14.
- [10]. Fett-Neto A.G., DiCosmo F., Reynolds W.F. & Sakata K. (1992). Cell culture of *Taxus* as a source of the antineoplastic drug taxol and related taxanes. *Bio:Technol.* Vol.10 : 1572-1576.
- [11]. Wickremesinhe E. R. M. & Arteca R. N. (1993). *Taxus* callus cultures: Initiation, growth optimization, characterization and taxol production. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. Vol.35 : 181-193.
- [12]. Ketchum R. E. B., Gibson D. M. & Gallo G. (1995). Media optimization for maximum biomass production in cell cultures of pacific yew. *Plant Cell tissue and Organ Culture*, Vol.42 : 185-193.
- [13]. Wickremesinhe, E. R. M. (1992). Callus and cell suspension cultures of *Taxus* as a source of taxol and related taxanes. PhD thesis. The Pennsylvania State University, University Park, Pennsylvania.
- [14]. Fett-Neto A.G., Melanson S.J., Sakata K. & DiCosmo F. (1993). Improved growth and taxol yield in developing calli of *Taxus cuspidata* by medium composition. *Biotechnology II*. 731-734.
- [15]. Margara J. (1989). *Base de multiplication végétative. Les méristèmes et l'organogénèse*. Ed. Institut National de Recherche Agronomique. Paris, 262p.
- [16]. Yari Khosroushahi A., Naderi-Manesh H. & Toft Simonsen H. (2011). Effect of Antioxidants and Carbohydrates in Callus Cultures of *Taxus brevifolia*: Evaluation of Browning, Callus Growth, Total Phenolics and Paclitaxel Production. *Bioimpacts*. Vol.1 (1) : 37-45.