مجله علوم كشاورزي ايران
دوره ۳۸، شماره ٤، ۱۳۸٦ (٦٤٤-٦٥٩)

توليد پينه از ريزنمونه‌هاي كاج مطبق (*Araucaria excelsa* L.) در شرايط درون شيشه اي

محمود اثني‌عشري،*[1] اميد كرمي [2] و عقيل محمودي‌پور[3]
۱، ۲، ۳، استاديار، مربی و كارشناس دانشكده كشاورزی دانشگاه بوعلی سينا
(تاريخ دريافت: ٦/٧/ ٨٤- تاريخ تصويب : ٨٥/٣/٣)

چكيده

شرايط لازم برای توليد پينه از ريزنمونه‌های ساقه و برگ كاج مطبق (*Araucaria excelsa* L.) به منظور بازرائی گياه مورد مطالعه قرار گرفت. بدين منظور محيط‌های كشت موراشيگ و اسكوگ (MS) و گوبتا و پولمن (BM) حاوی اسيد آلفا- نفتالين استيک (NAA)، ايندول بوتريک اسيد (IBA)، 2,4-D (٤،٢- دی كلروفنوكسی استيک اسيد) و پيكلورام (٤ - آمينو- ٣،٥،٦ – ٢- پيريدين كربوكسيليک اسيد) هر يک به ميزان ۰/۲، ۰/۵، ۱، ۲ و ٤ ميلی‌گرم در ليتر همراه با ۳۰ گرم در ليتر ساكارز استفاده شد. پينه‌زايی در هر دو محيط كشت تنها در حضور پيكلورام و فقط در تاريكی مشاهده گرديد. اما در محيط كشت BM كالوس‌های بيشتری نسبت به محيط كشتMS توليد شد و ميزان آن در ريز نمونه‌های ساقه نسبت به برگ زيادتر بود. به منظور ايجاد رويان‌های بدنی، پينه‌ها به محيط‌های كشت BM و MS حاوی غلظت‌های پايين NAA ، IBA، 2,4-D و پيكلورام هر يک به ميزان ۰/۱ و۰/۲ ميلی‌گرم در ليتر و همچنين محيط بدون اكسين حاوی ۳۰ گرم در ليتر مانيتول، ۳۰ ميلی‌گرم در ليتر آبسزيک اسيد (ABA)، ٤ گرم در ليتر پلی اتيلن گليكول (PEG) (با وزن مولكولی ٦۰۰۰) و ۸۰ گرم در ليترساكارز منتقل شدند، اما بر روی هيچ يک از محيط‌های كشت مذكور رويان بدنی ايجاد نشد.

واژه‌هاي كليدي: پينه، رويان بدنی ،كاج مطبق، درون شيشه ای

مقدمه

كاج مطبق (*Araucaria excelsa* L.) يك گياه سوزني برگ بسيار زيبا از خانواده Araucariaceae مي‌باشد كه شاخه‌هاي مطبق و افقي آن شهرت فراوان دارد. به طور معمول كاج مطبق جزء گياهان گلخانه‌اي و آپارتماني مي‌باشد اما در شمال كشور در خارج از گلخانه نيز كشت مي‌شود. ازدياد اين گياه اصولاً با مشكلاتي مواجه است به طوريكه گياهان حاصل از بذر معمولاً مطبق نيستند (۳). از آنجايي كه زينتي بودن اين گياه به دليل مطبق بودن آن است به همين دليل ضرورتاً از قلمه تكثير مي‌شود اما قلمه‌هاي آن نيز به سختي ريشه دار شده و در صد كمي از آنها به گياه كامل تبديل مي شوند. بنابراين استفاده از روش‌هاي كشت بافت به منظور دست يابي به فنآوري ريزازدیادي كاج مطبق مي‌تواند از اهميت قابل توجه‌اي برخوردار باشد.

توليد كالوس از ريز نمونه‌هاي اين گياه در شرايط درون شيشه اي يكي از ضروري‌ترين مراحل مطالعات كشت بافت آن مي باشد. پينه توده سلولي بي‌شكل و تمايز نيافته است كه معمولا از بافت‌های تمايز يافته گياه حاصل مي‌شود. در جريان ايجاد پينه بيان ژن‌هاي كنترل كننده فعاليت‌هاي حياتي گياه در شرايط تمايز يافته به ويژه فتوسنتز متوقف شده و به جاي آن ژن‌هائي كه با فعاليت‌هايي از قبيل متابوليسم اوليه، سنتز ديواره سلولي، تقسيم سلول و مقابله با استرس‌ها در ارتباط هستند فعال مي‌شوند (۱۰). كشت پينه براي مطالعه جداسازي پرتوپلاست، گزينش سلول، رويان زايي بدني، اندام زايي و توليد فرآوردهاي ثانويه

*نويسنده مسئول: محمود اثنی عشری تلفن:۰۹۱۲-۳۱۵۵۱۲۶ E-mail:m.esnaashari@basu.ac.ir

Archive of SID
www.SID.ir

استفاده مي‌شود (٤). توليد كالوس زياد و قابل نگهداري كه در تعداد زيادي از گونه‌هاي گياهي مشاهده شده است نشان دهنده سازگاري اين گياهان و آسان بودن دست ورزي آنها در شرايط درون شيشه اي است. در حاليكه كارهاي كشت بافت در تعدادي زيادي از ديگر گونه‌هاي گياهي همراه با مشكلاتي مواجه است. گياهان دسته دوم كه اصطلاحا سرسخت[1] ناميده شده اند در شرايط درون شيشه اي به بسياري از تيمارها به سختي پاسخ داده و غالباً نتيجه قابل توجه از آنها حاصل نمي‌شود. كار با چنين گياهاني در شرايط درون شيشه اي مستلزم وقت و دقت بيشتر و اعمال مراقبت‌هاي ويژه مي باشد تا بتوان به نتايج مطلوبي دست يافت (۱۹). كاج مطبق از جمله گياهان سرسخت جنس Araucaria در شرايط درون شيشه‌اي گزارش شده است (۲). در گونه *Araucaria angustifolia* كه يكي از مهم ترين گونه‌هاي چوبي جنس *Araucaria* مي‌باشد و در جنوب برزيل مي روييد مطالعات متعدد كشت بافت به ويژه توليد جنين سوماتيكي صورت گرفته است (۵، ٦، ۱۱، ۱٦). در همه اين گزارشات از ريزنمونه رويان بذري براي ايجاد رويان‌هاي بدني روي محيط‌هاي كشت حاوي 2,4-D و NAA استفاده شده است. تا كنون هيچ بررسي مشابهي روي كاج مطبق (*Araucaria excelsa*) انجام نگرديده و در اين مطالعه براي اولين بار ايجاد پينه از ريزنمونه‌هاي جوان برگ و ساقه كاج مطبق گزارش داده شده است.

مواد و روش‌ها

مواد گياهي از كاج مطبق در حال رشد در شرايط گلخانه در همدان تهيه گرديد و سرشاخه‌هاي جوان روي شاخه‌هاي فرعي از گياه مادري جدا شدند. سطح خارجي سرشاخه‌ها با محلول ۲ درصد هيپوكلريد سديم (سفيد كننده تجارتي وايتكس) به مدت ۲۰ دقيقه استريل شده و سپس سه بار با آب مقطر استريل شستشو داده شدند. ريزنمونه‌هاي برگ و ساقه از سرشاخه‌ها جدا و به قطعاتي با طول تقريبي ٤-۳ ميلي متر برش داده شدند و براي ايجاد پينه روي محيط هاي كشت MS و BM حاوي NAA، IBA، 2,4-D و پيكلورام هر يک به ميزان ۰/۲، ۰/۵، ۱، ۲ و ٤ ميلي‌گرم در ليتر همراه با ۳۰ گرم در ليتر ساكارز قرار داده شدند. نمونه‌ها در دماي ۲±۲۵ درجه سانتي گراد در دو شرايط تاريكي مداوم و ۱٦ ساعت روشنايي با استفاده از لامپ‌هاي فلورسنت سفيد سرد با شدت روشنايي µmol m^{-2} s^{-1} ۳۰ نگهداري شدند. بعد از ٦ هفته، تعداد ريزنمونه‌هاي داراي پينه شمارش گرديدند و سپس پينه‌ها در محيط كشت تازه واكشت شدند. به منظور ايجاد رويان بدني، پينه‌هاي ايجاد شده به محيط‌هاي كشت MS و BM حاوي غلظت‌هاي پايين NAA، IBA، 2,4-D و پيكلورام هر يک به ميزان۰/۱ و ۰/۲ ميلي‌گرم در ليتر و بدون اكسين حاوي ۳۰ گرم در ليتر مانيتول، ۳۰ ميلي گرم در ليتر ABA, ٤ گرم درليتر PEG و غلظت بالاي ساكارز (۸۰ گرم در ليتر) منتقل شدند و در دماي ۲±۲۵ درجه سانتي گراد در شرايط تاريكي مداوم و تحت ۱٦ ساعت روشنايي با استفاده از لامپ‌هاي فلورسنت سفيد سرد با شدت روشنايي µmol m^{-2} s^{-1} ۳۰ نگهداري شدند. اسيديته همه محيط‌هاي كشت قبل از اتوكلاو نمودن با استفاده از NaOH يک نرمال تا حد ۵/۸ تنظيم گرديد و براي بسته شدن محيط‌هاي كشت از آگار (Agar-Agar, Merck) به ميزان ۷ گرم در ليتر استفاده شد. به منظور بررسي اثر نوع محيط كشت و مقادير مختلف پيكلورام روي توليد كالوس از ريز نمونه‌ها، اين آزمايش در قالب طرح كاملا تصادفي اجرا گرديد و پانزده ريزنمونه براي هر تيمار و هر يک در سه تكرار منظور شد. تجزيه و تحليل داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS صورت پذيرفت و نهايتاً ميانگين‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌اي دانكن مقايسه شدند.

نتايج و بحث

ايجاد پينه

در بيشتر گونه‌هاي گياهي كارهاي كشت بافت با ايجاد پينه آغاز شده است (٤). در اين بررسي ۲۵ روز بعد از شروع كشت، تنها در محيط‌هاي كشت حاوي پيكلورام در محل برش ريزنمونه‌هاي ساقه (شكل ۱ A) و برگ (شكل۱ B) دو نوع پينه ايجاد گرديد. پينه‌هاي نوع اول داراي رنگ زرد مايل به قهوه‌اي (شكل۱ C) و رشد سريع بودند اما به

1. Recalcitrant

Archive of SID

www.SID.ir

فاصله ۳-۲ هفته رشد آنها متوقف و نهايتاً نكروز و سياه شدند. پينه‌هاي مذكور قبل از سياه شدن به محيط كشت تازه منتقل گرديدند اما مجدداً رشد آنها متوقف و سياه شدند. پينه‌هاي نوع دوم داراي رنگ سفيد كرمي(شكل۱ D) و سرعت رشد پايين بودند. برخلاف پينه‌هاي نوع اول، اين پينه‌ها بر روي محيط‌هاي كشت MS و BM همچنان به رشد خود ادامه دادند. به نظر مي رسد كه در كاج مطبق محل انتخاب ريز نمونه روي شاخه و نوع آن كه ارتباط مستقيم با سن و شرايط فيزيولوژيكي نمونه دارد در توليد كالوس و نوع قابل نگهداري آن موثر است.

جدول ۱- اثر محيط‌هاي كشت MS و BM روي توليد پينه از ريزنمونه‌هاي برگ و ساقه كاج مطبق در حضور يك ميلي‌گرم در ليتر پيكلورام ٦ هفته بعد از كشت

محيط كشت	تعداد ريزنمونه‌هاي برگ داراي پينه	تعداد ريزنمونه‌هاي ساقه داراي پينه
MS	۷/۳۳b	٤b
BM	۱۲a	۹a

مقايسه ميانگين‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه اي دانكن در سطح ۵% انجام شده و حروف غير مشابه در هر ستون نشانگر اختلاف معني‌دار بين تيمارها است

اثر عوامل مختلف بر ايجاد كالوس

الف: اثر محيط **MS** و **BM**

نيازهاي تغذيه‌اي اكثر گونه‌هاي گياهي در شرايط درون شيشه‌اي جهت رشد مطلوب متفاوت است. بنابراين نمي‌توان محيط كشت واحدي را براي همه گياهان توصيه نمود. لذا انتخاب محيط كشت مناسب به منظور رسيدن به رشد مطلوب براي هر گياهي ضروري است. در اكثر گونه‌هاي گياهي كار كشت بافت با استفاده از محيط كشت MS آغاز شده است، زيرا اين محيط كشت بطور موفقيت آميزي در كشت بافت و سلول اكثر گونه‌هاي گياهي به كار رفته است (۲). در اين مطالعه اثر دو نوع محيط كشت MS وBM بر توليد پينه از ريزنمونه‌هاي كاج مطبق بررسي شد. در دو محيط كشت پينه ايجاد شد اما ميزان توليد آن در محيط BM (در ريزنمونه‌هاي برگ حدود ۸۵ درصد و در ريزنمونه‌هاي ساقه حدود ٦۰ درصد) بيشتر بود (جدول شماره۲). استفاده از محيط كشت BM در مطالعات كشت بافت گونه *Araucaria angustifolia* نيز براي ايجاد كالوس موفقيت آميز بوده است (١٦). محيط كشت MS نسبت به محيط كشتBM داراي نيترات بالاتري است كه به نظر مي‌رسد توليد كالوس از ريزنمونه‌هاي برگ و ساقه كاج مطبق به نحوي تحت تاثير مقدار آن قرار مي گيرد. به همين جهت در بيشتر سوزني‌برگان استفاده از محيط كشت داراي نيترات پائين موفقيت آميزتر بوده است (۲).

ب: اثر تنظيم كننده‌هاي رشد

تشكيل پينه در شرايط درون شيشه‌اي تحت تاثير نوع و مقدار مواد تنظيم كننده رشد است كه به محيط كشت اضافه مي‌شود (۱۸). از بين تنظيم كننده‌هاي استفاده شده در اين مطالعه، تنها در محيط كشت حاوي پيكلورام از جداكشت‌ها پينه ايجاد شد. جدول شماره ۱ اثر مقادير مختلف پيكلورام بر ايجاد پينه از ريزنمونه‌هاي ساقه و برگ كاج مطبق را نشان مي دهد. در گونه *Araucaria angustifolia* و تعدادي ديگر از گونه‌هاي سوزني برگ، استفاده از 2,4-D براي ايجاد پينه موفقيت آميز بوده است (١٦). در حاليكه در اين بررسي 2,4-D روي ايجاد كالوس از ريزنمونه‌هاي كاج مطبق اثر نداشت. اين مسئله ممكن است با ژنوتيپ كاج مطبق در ارتباط باشد، زيرا بررسي‌هاي مربوط به بسياري از سوزني برگان نشان داده است كه تفاوت‌هاي زيادي در بين ژنوتيپ‌هاي نيمه خواهري آنها وجود دارد (۲).

ج: اثر ريز نمونه

در بسياري از مطالعات كشت بافت دامنه متفاوتي از ميزان توليد پينه در بين ريزنمونه‌هاي مختلف يك گونه گياهي نشان داده شده است (۱۷). در اين بررسي توليد پينه از ريز نمونه‌هاي ساقه در مقايسه با برگ بيشتر (حدود ۹۰ درصد) بود (جداول ۱ و ۲). پينه‌هاي ايجاد شده روي ريزنمونه ساقه اكثراً از پينه‌هاي نوع دوم و قابل نگهداري بودند. پاسخ‌هاي متفاوت ريز نمونه يك گونه به شرايط يكسان از نظر تغذيه و تنظيم كننده رشد مي‌تواند با حالت‌هاي ويژه درون سلولي ريزنمونه‌هاي از قبيل الگوي بيان ژن و نوع ومقادير هورمون‌هاي رشد داخلي در ارتباط باشد. در كشت بافت گونه*Araucaria angustifolia* و

Archive of SID

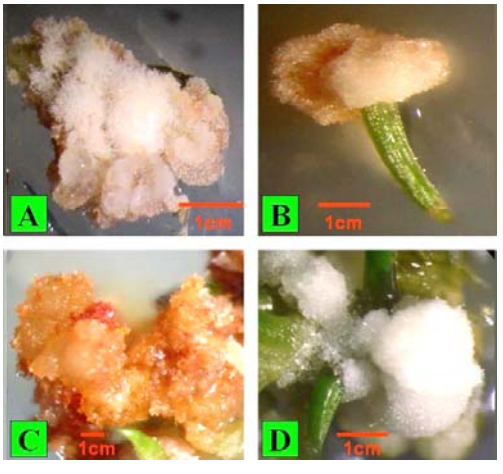
www.SID.ir

اكثر سوزني برگ‌ها از رويان‌هاي بذري به عنوان ريز نمونه براي رويان‌زائي بدني استفاده شده است (۷، ۱٤ ، ۱٦). استفاده از رويان بذري به عنوان ريزنمونه براي كشت بافت كاج مطبق زينتي ممكن است نامناسب باشد، زيرا گياهان حاصل از رويان بذري در شرايط طبيعي غير مطبق مي‌شوند و احتمال زيادي وجود دارد كه گياهان باززايي شده از جنين‌هاي بذري در شرايط درون شيشه‌اي نيز غير مطبق شوند كه البته اثبات اين مطلب نياز به مطالعات بعدي دارد.

جدول ۲- اثر مقادير مختلف پيكلورام روي توليد پينه از ريزنمونه‌هاي برگ و ساقه كاج مطبق با استفاده از محيط كشت BM ٦ هفته بعد از كشت

پيكلورام (ميلي گرم در ليتر)	تعداد ريزنمونه‌هاي برگ داراي پينه	تعداد ريزنمونه‌هاي ساقه داراي پينه
۰/۲	٤/۳۳ b	٦/۳۳ b
۰/۵	۵ b	۸ b
۱	۹ a	۱۲ a
۲	۹/۳۳ a	۱۳a
٤	۱۰ a	۱۲/۳۳ a

مقايسه ميانگين‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه اي دانكن در سطح ۵% انجام شده و حروف غير مشابه در هر ستون نشانگر اختلاف معني دار بين تيمارها است.



شكل ۱- توليد پينه از ريزنمونه‌هاي كاج مطبق روي محيط كشت BM حاوي يك ميلي گرم در ليتر پيكلورام. پينه روي ريز نمونه ساقه (A)،پينه روي ريز نمونه برگ (B). پينه نوع يك با رنگ قهوه اي مايل به زرد (C). پينه نوع دو با رنگ سفيد (D).

د: اثر نور

گياهان از نظر نياز به نور براي القاي پينه در شرايط درون شيشه‌اي با يكديگر متفاوت هستند به طوريكه بعضي از آنها در نور و بعضي در تاريكي پينه مي‌دهند (۱). در اين مطالعه ريز نمونه‌هاي نگهداري شده در معرض روشنائي در هيچ يک از تيمارهاي مورد بررسي پينه ايجاد نكردند و حتي انتقال پينه‌هاي ايجاد شده در شرايط تاريكي مداوم به شرايط روشنايي سياه شدند. به نظر مي‌رسد كه نور عامل بازدارنده در ايجاد و رشد پينه در كاج مطبق باشد. در گونه *Araucaria angustifolia* نيز از تاريكي مداوم براي ايجاد پينه استفاده شده است (۱۱ ، ۱٦).

بررسي ايجاد رويان سوماتيكي از پينه

در بيشتر گونه‌هاي گياهي پينه بر روي محيط كشت حاوي غلظت نسبتا بالايي از اكسين‌ها توليد مي‌شود و براي ايجاد رويان‌هاي بدني، كالوس‌هاي مذكور به محيط كشت مشابه اما حاوي غلظت پاييني از اكسين‌ها و يا فاقد تنظيم كننده‌هاي رشد منتقل مي‌شوند (۱۵). پينه‌هاي ايجاد شده در اين بررسي به محيط‌هاي كشت مشابه اما حاوي غلظت‌هاي پايين پيكلورام، 2,4-D، NAA و IBA هر يک به ميزان ۰/۱ و ۰/۲ ميلي گرم در ليتر منتقل شدند اما بر روي هيچ يک از محيط‌ها مذكور رويان بدني ايجاد نشد. استفاده از محيط‌هاي كشت MS و BM فاقد تنظيم كننده رشد حاوي ABA، PEG، مانيتول و غلظت بالاي ساكارز (۸۰ گرم در ليتر) نيز در ايجاد جنين‌هاي سوماتيكي تاثيري نداشت. در حاليكه در بسياري از بررسي‌ها نشان داده شده كه تركيباتي از قبيل ABA، PEG، مانيتول و ساكارز بالا ايجاد و توسعه رويان در كشت پينه گياهان به ويژه در سوزني برگان را تحريك مي‌كنند (۹، ۱۲ ، ۱۳). در بسياري از گونه‌هاي گياهي سرسخت نمي‌توان به آساني از پينه رويان‌هاي بدني تهيه نمود (۸). گونه‌هاي جنس*Araucaria* جزء گياهان سرسخت براي باززايي به حساب آمده اند (۲). با توجه به نتايج بدست آمده از اين آزمايش كاج مطبق نيز ممكن است براي جنين‌زائي در محيط درون شيشه‌اي جزء گياهان سرسخت به حساب آيد. زيرا استفاده از روش‌هاي متداولي كه براي ايجاد رويان سوماتيكي از پينه ساير انواع

Archive of SID

www.SID.ir

کاج‌ها معمول است در کاج مطبق موفقیت آمیز نبود. به هرحال براي دست‌يابي به رويان‌هاي بدني از پينه کاج مطبق بايد مطالعات بيشتري به عمل آيد.

در يك نگاه كلي مي‌توان چنين نتيجه گيري نمود كه توليد پينه از ريزنمونه‌هاي كاج مطبق در شرايط درون شيشه‌اي به فاکتورهايي از قبيل نوع و ميزان تنظيم کننده‌هاي رشد ، نوع ريزنمونه و محيط کشت بستگي دارد. نتايج اين آزمايش مي‌تواند در پژوهش‌هاي ديگري از قبيل رويان‌زايي بدني، کشت سوسپانسيون سلولي و اندام زايي کاج مطبق مورد استفاده قرار گيرد.

منابع مورد استفاده **REFERENCES**

١. احسان‌پور، ع. و ف. اميني. ١٣٧٩. کشت سلول و بافت گياهي. انتشارات جهاد دانشگاهي اصفهان. ص ٦٦

٢. باقري، ع.، س. م. زيات نيا و م. حسيني. ١٣٨٣. کشت بافت درختان (ترجمه). انتشارات دانشگاه فردوسي مشهد.

٣. خليقي، ا. ١٣٧٣. گلکاري. انتشارات دانشگاه تهران.

٤. معين، ا. و د. کهريزي. ١٣٧٢. کشت بافت گياهي.انتشارات سازمان بسيج دانشجوئي. ص ٤٧

5. Astarita, L.V.& M.P. Guerra. 1998. Early somatic embryogenesis in A. angustifolia – induction and maintenance of embryonal-suspensor mass cultures. Brazilian Journal of Plant Physiology. 10: 113-118.

6. Astarita, L.V. & M.P. Guerra. 2000. Conditioning of culture medium by suspension cells and formation of somatic proembryo in *Araucaria angustifolia* (Coniferae). *In Vitro* Cell. Dev. Biol.-Plant. 36: 194-200.

7. David, H. 1982. *In vitro* propagation of gymnosperms. In: JM Bonga and DJ Durzan (eds) tissue culture in forestry, Matinus Nijhoff/Dr W Junk Publishers, Thr Hague. Pp:72-108.

8. Dixon, R. A. & R. A. Gonzales. 1996. Plant cell culture. Oxford university press. Pp: 99-125

9. Dudits, D., G. Gyorgyey & L. Bako. 1995. Molecular biology of somatic embryogenesis. In Thorpe TAed *in vitro* embryogenesis in plants pp:276-308 Kluwer Academic PublisherDordrecht

10. Feher, A., T. P. Pasternak & D. Dudits. 2003. Transition of somatic plant cell to an embryogenic state. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 74: 201-228

11. Guerra, M. P., V. Silveira, A. L. W. Santos, L. V. Astarita, & R.O. Nodari. 2000. Somatic embryogenesis in *Araucaria angustifolia* (Bert) O. Ktze. In-Somatic embryogenesis in woody plants, eds. S. Jain, P. Gupta & R. Newton. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, v. 6, pp. 457-4

12. Gupta, P. K& Pullman, G. 1991. Method for reproducing coniferous plant by somatic embryogenesis using abscisic acid and osmotic potential variation, U.S. Pattent NO. 5: 036-007.

13. Kamada, H., K. Kobayashi, T. Kiyosue, & H. Harada. .1989. Stress induced somatic embryogenesis in carrot and its application to synthetic seed production. *In vitro* Cell. Dev. Biol. 25: 1163-1166

14. Liane, E & A. David.1990. Somatic embryogenesis in immature embryo and protoplast of *pinus caribeae*. Plant Science. 69: 215-224

15. Merkele, S. A., W. A. Parrott & B. S. Flin. 1995. Morephgenic aspect of somatic emberyogenesis. In: Thorpetaed *in vitro* embryogenesis in plant. pp :155-203 Klauwer Academhc Publishers DordrechtBosta London.

Archive of SID

www.SID.ir

16. Santos, A.L.W., V. Silveira , N. Steiner, M. Vidor, & Guerra M. P. 2002.Somaticembryogenesis in parana pine (Araucaria angustifolia (Bert) O. Ktze). Brazilian Journal of Plant Physiology.45: 97-106.
17. Williams, E. G. & Maheswaran, G. 1986. Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behavior of cell as an embryogenic group. *Ann Bot*. 57: 443-462
18. Bennici, A., T. Grifoni, S. Schiff& R. Bovelli. 1997. Studies on callus growth and morphogenesis in several species and lines of *Amaranthus*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 49: 29–33, 1997.
19. Pierik, R.L.M. 1998. *In vitro* culture of higher plants. Kluwer Academic Publishers. Pp.215-220.

Archive of SID

www.SID.ir