Archive of SID

تولید کالوس رویان‌زا از رویان بذری گیاه وشا (*Dorema ammoniacum* D.)

خدیجه قاسمیان[۱]، سنبل ناظری[۱*]، عبدالکریم چهرگانی راد[۲] و اصغر میرزایی اصل[۱]

[۱] همدان، دانشگاه بوعلی سینا همدان، دانشکده کشاورزی، گروه بیوتکنولوژی

[۲] همدان، دانشگاه بوعلی سینا همدان، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی

تاریخ دریافت: ۹۱/۷/۲ تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۰/۲۸

چکیده

گیاه وشا از گیاهان دارویی بومی ایران است که به دلیل برداشت‌های بی‌رویه و تخریب رویشگاه‌های طبیعی آن در کشور، در معرض انقراض قرار دارد. رویان‌زایی سوماتیکی یکی از روش‌های مفید برای تکثیر گیاهان به‌شمار می‌رود. در تحقیق حاضر القای کالوس‌های رویان‌زا از ریزنمونه رویان بذری این گیاه با استفاده از دو محیط پایه MS و MS ۱/۲ و نیز غلظت‌های مختلف هورمون‌های NAA و BA برای اولین بار مورد بررسی قرار گرفت. مشخص گردید که محیط MS حاوی ۱ میلی‌گرم بر لیتر هورمون NAA و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر هورمون BA، بهترین محیط برای تشکیل حداکثر میزان کالوس رویان‌زا و تولید حداکثر تعداد رویان سوماتیکی بود. همچنین، محیط پایه MS نه تنها در تولید کالوس بلکه در رویان‌زایی سوماتیکی، عملکرد بهتری نسبت به محیط پایه MS ۱/۲ نشان داد. القای رویان‌زایی از کالوس‌های بدون رویان، در محیط پایه MS بدون هورمون مشاهده نگردید. گیاهچه‌های کامل، بعد از انتقال رویان‌ها به محیط بدون تنظیم‌کننده رشد باززایی شدند.

واژه‌های کلیدی: القا رویان‌زایی، رویان‌زایی سوماتیکی، هورمون‌های گیاهی.

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۸۱۱۴۴۲۴۳۶۶ ، پست الکترونیکی: snblnazeri@yahoo.com

مقدمه

جنس Dorema، دارای هفت گونه و متعلق به خانواده Apiaceae است. از این جنس دو گونه *D. ammoniacum* D aucheri , گونه‌های بومی ایران هستند. گیاه وشا، چند ساله و علفی با نام علمی *Dorema ammoniacum*، یکی از گیاهان دارویی مهم بومی در بسیاری از نواحی خشک و نیمه خشک ازجمله ایران است. *D. ammoniacum* در زبان فارسی با نامهای کندل، کما، اوشک و وشا خوانده می شود (۲). ماده مؤثره این گیاه با نام Ammoniac gum شناخته می شود که در ساقه، ریشه و دمبرگها یافت شده و دارای خواص دارویی و صنعتی است (۲و۱۸). استفاده از این گیاه در درمان بیماری‌هایی نظیر برانشیت مزمن، تنگی نفس، بیماریهای ریوی و آلرژی تنفسی کاربرد دارد. گیاه وشا همچنین دارای خواص محرک، قاعده آور، خلط آور، ضد تشنج، ضد میکروب و ضد اکسیداسیون است (۱۸و۲۳).

در سالهای اخیر به علت استفاده بی رویه و برداشت‌های نامناسب، رویشگاه‌های این گیاه دارویی در کشور تخریب شده و گیاه در معرض خطر انقراض قرار گرفته است (۳). این گیاه به عنوان گونه‌ای آسیب‌پذیر در کتاب داده‌های قرمز ایران ثبت شده است (۱۴). گیاه وشا به طور مرسوم توسط بذر تکثیر می‌شود اما تکثیر این گیاه به دلیل وجود خواب بذر با محدودیت مواجه است (۱۲). به طور کلی بهبود گیاهان خانواده Apiaceae با روش‌های تکثیر کلاسیک، آرام، پرزحمت و وقت گیر است (۲۵). از این رو، نیاز مبرم به استفاده از روش‌های غیر مرسوم انتشار برای حفاظت از این گیاه دارویی در معرض خطر می‌باشد که می‌توان از تکنیک‌های کشت بافت گیاهی و از تکنیک

www.SID.ir

Archive of SID

رویان‌زایی سوماتیکی به عنوان روشی مؤثر در زمینه تکثیر انبوه گیاه بهره گرفت، که در این بررسی به آن پرداخته شد. القاء کالوس و باززایی گیاه در *D. ammoniacum* ، قبلا گزارش شده است (۱۲).

رویان‌زایی سوماتیکی یک ابزار مهم برای انتشار انبوه را فراهم می کند و همچنین به عنوان ابزاری برای مطالعه پرسش‌های اساسی رشد، تمایز و توسعه است (۱۳و۱۶). رویان‌زایی سوماتیکی در بسیاری از گیاهان دارویی خانواده چتریان گزارش شده است، ازجمله گشنیز (۱۷)، گلپر (۲۷)، چتر گندمی (۶)، هویج (۱۱)، زیره (۲۵) و آنغوزه (۹).

همه سلول‌های گیاه حاوی تمام اطلاعات ژنتیکی لازم برای به وجود آوردن یک گیاه کامل هستند (۷)، اما تحقیقات متعدد نشان داده است که ریزنمونه‌های مختلف برای تولید کالوس‌های رویان‌زا توانایی یکسانی ندارند (۸). این مطالعه با هدف تولید کالوس رویان‌زا از گیاه وشا که یک گونه گیاهی در معرض خطر انقراض است، انجام شده است تا راهی برای تکثیر سریع آن معرفی و روشی برای جلوگیری از انقراض پیشنهاد گردد. همان‌گونه که در گزارش قبل نشان داده شده است (۴) از بین ریزنمونه‌های مختلف گیاه وشا، تنها رویان بذری قادر به تولید کالوس‌های رویان‌زا است (احتمالا به علت سطح هورمون های درونی ریزنمونه فوق باشد)، به همین علت در این تحقیق از ریزنمونه فوق استفاده گردید.

مواد و روشها

تهیه ریزنمونه: به منظور ضدعفونی، ابتدا بذرها و جوانه‌ها به مدت یک دقیقه در اتانول ۷۰ درصد قرار گرفتند و بعد ۳ بار با آب مقطر به خوبی شستشو داده شدند. بعد از آن بذرها به مدت ۱۵ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد قرار گرفته و در نهایت سه بار با آب مقطر شستشو داده شدند تا تمامی آثار محلول ضد عفونی کننده از بین برود (۱۰). به منظور خارج کردن رویان بذری، بذرها پس از ضدعفونی سطحی، در آب مقطر استریل و در دمای ۴ درجه قرار گرفتند. بعد از ۷–۵ روز بذرها کمی متورم شده و در این مرحله، در شرایط استریل، رویان‌ها از بذرهای فوق بیرون آورده شدند.

تهیه محیط کشت و کشت ریزنمونه: رویان‌های بذری در دو محیط کشت پایه MS (موراشیگ و اسکوگ) و ۱/۲MS که حاوی غلظت‌های مختلف BA (بنزیل آدنین)، (صفر، ۰/۵، ۱، ۲ و ۴ میلی‌گرم بر لیتر) و NAA (نفتالین استیک اسید)، (صفر، ۰/۱، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر) بودند، کشت داده شدند. pH محیط‌های کشت، قبل از افزودن ۷ گرم بر لیتر آگار، روی ۰/۵±۵/۷۵ تنظیم گردید. محیط‌های کشت در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱/۵ اتمسفر به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو شدند و پس از تقسیم در پلیت‌های استریل و سرد شدن، ریزنمونه‌ها بر روی آنها کشت داده شده و در دمای ۲±۲۴ درجه سانتیگراد و در شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در اتاق رشد نگهداری شدند.

مطالعه کالوس‌ها: پس از گذشت ۸ هفته از کشت، درصد کالوس‌زایی، اندازه کالوس‌های تشکیل شده، نوع کالوس و تعداد رویان در هر ریز نمونه، در دو محیط پایه MS و ۱/۲MS حاوی تیمارهای مختلف هورمونی مورد آزمایش، اندازه‌گیری شدند.

انتقال کالوس‌ها به محیط بدون هورمون: کالوس‌های حاصل از تیمارهای هورمونی در مرحله القای کالوس، برای بررسی مراحل مختلف نموی و بلوغ رویان‌ها به محیط کشت پایه MS فاقد هورمون منتقل شدند. در این مرحله نه تنها کالوس‌های رویان‌زا بلکه کالوس‌هایی که ویژگی تولید کالوس را نداشتند (نارویان‌زا) نیز برای بررسی القای رویان‌زایی در آنها به این محیط منتقل شد. پس از ۲ هفته وضعیت کالوس‌ها بررسی شد.

مطالعه آماری: آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی طراحی گردید و برای هر تیمار، سه تکرار و در هر تکرار،

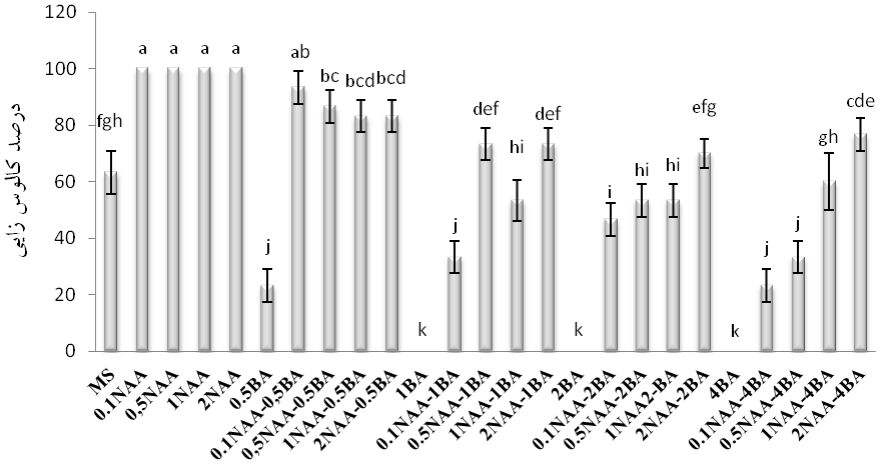
www.SID.ir

Archive of SID

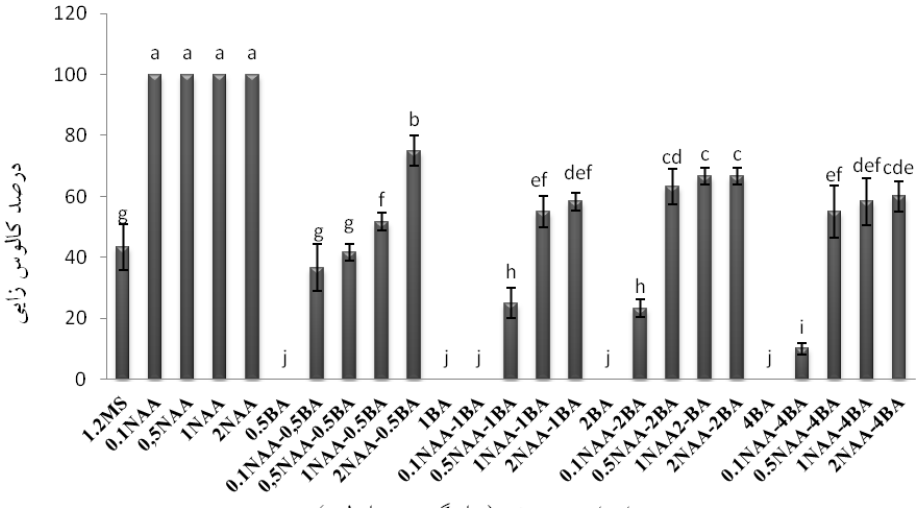
پنج ریزنمونه در نظر گرفته شد. تجزیه‌های آماری با استفاده از نرم افزار SAS و مقایسات میانگین با استفاده از آزمون دانکن و در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

نتایج

درصد کالوس‌زایی: اثر کالوس‌زایی ترکیبات مختلف هورمونی ذکر شده، در محیط‌های پایه MS و MS ۱/۲ با استفاده از ریزنمونه رویان بذری مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان داد اولین علائم از تکثیر سلولی در ریز نمونه‌های رویان سوماتیکی ۷ تا ۹ روز در محیط MS و ۱۰ تا ۱۱ روز در محیط ۱/۲MS، پس از کشت مشاهده گردید. در هر دو محیط پایه MS و ۱/۲MS، بین تیمارهای بکار رفته برای القای کالوس، در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی دار وجود داشت. بیشترین درصد کالوس‌زایی (۱۰۰ درصد)، در هر دو محیط پایه زمانی که هورمون NAA به تنهایی در محیط حضور داشت، مشاهده گردید. در هر دو محیط پایه، زمانی که هورمون BA به تنهایی در محیط حضور داشت، کالوس تشکیل نشد (تنها استثنا تیمار محیط MS با ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BA، با ۲۲ درصد کالوس‌زایی بود) (شکل‌های ۱ و ۲).



شکل۱- نمودار مقایسه میانگین درصد کالوس‌زایی رویان‌های بذری در محیط‌های مختلف هورمونی با پایهMS



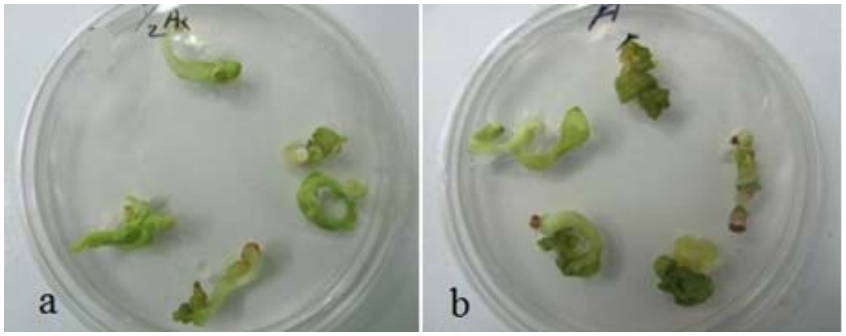
شکل۲- نمودار مقایسه میانگین درصد کالوس‌زایی رویان‌های بذری در محیط‌های مختلف هورمونی با پایه ۱/۲MS

www.SID.ir

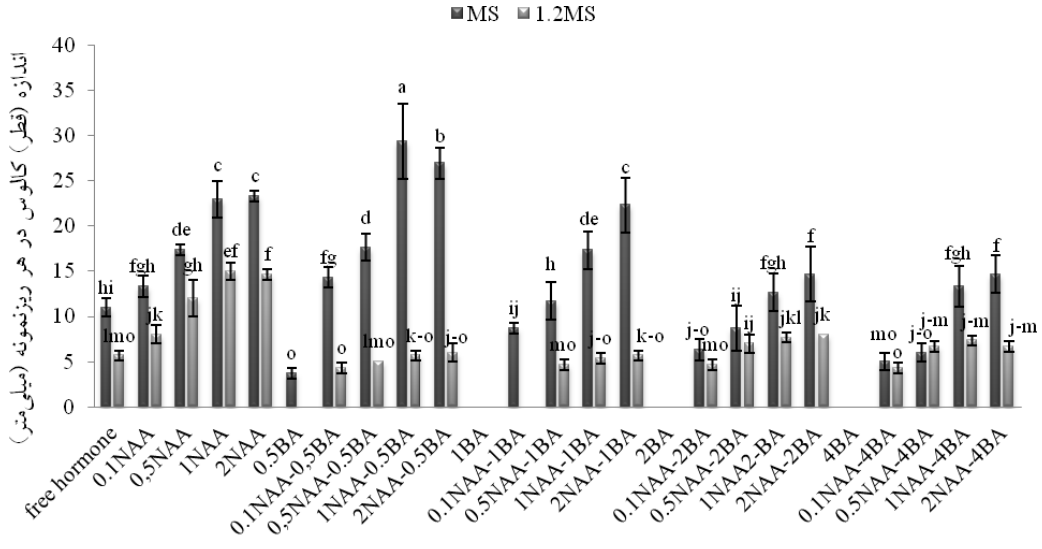
Archive of SID

در محیط‌های حاوی BA به تنهایی، ریزنمونه‌ها گیاهچه‌هایی با اشکال غیر طبیعی و دارای پیچیدگی و همچنین بدون ریشه تولید نمودند (شکل۳).

اندازه (قطر) کالوس: به دلیل تفاوت اندازه در کالوس‌های تشکیل شده، علاوه بر درصد کالوس‌زایی، شاخص اندازه کالوس‌های تولید شده در هر تیمار نیز بررسی شد. در تیمارهای حاوی NAA تنها، هر دو محیط پایه MS و ۱/۲MS، با افزایش میزان هورمون NAA اندازه کالوس‌های تولید شده افزایش یافت (شکل ۴). در بین تمام تیمارهای مورد استفاده، بیشترین قطر کالوس در محیط پایه MS حاوی ۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BA ارزیابی گردید. در محیط‌های MS حاوی تیمارهای هورمونی ۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA + ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BA و نیز ۲ میلی‌گرم بر لیتر NAA + ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BA، با حداکثر قطر کالوس، قطر کالوس‌های تشکیل شده به‌طور قابل ملاحظه و معناداری بیشتر از حداکثر قطر کالوس‌ها در محیط ۱/۲MS (با غلظت هورمونی مشابه) بود. نتایج همچنین نشان داد که در محیط پایه MS، حضور میزان کم BA (۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر) سبب افزایش قطر کالوس در غلظت‌های بالای NAA شد. هرچند استفاده از غلظت‌های بالاتر BA سبب کاهش کالوس‌زایی گردید. در مقایسه، در محیط‌های با پایه ۱/۲MS، حضور BA باعث کاهش قطر کالوس‌ها شد (شکل ۴).



شکل۳- تولید گیاهچه‌های غیر طبیعی در محیطهای حاوی BA به تنهایی و با پایه ۱/۲MS (a) و MS (b)

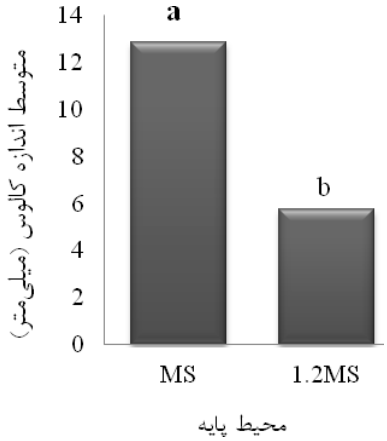


شکل ۴- مقایسه میانگین اندازه (قطر) کالوس‌های تولید شده در تیمارهای هورمونی با پایه MS و ۱/۲MS

www.SID.ir

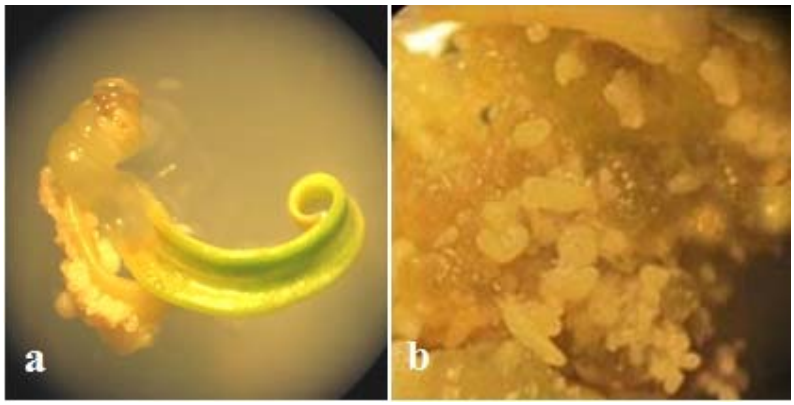
Archive of SID

مقایسه میانگین قطر کالوس در تیمارهای هورمونی نشان داد که در اکثر تیمارها، بین دو محیط پایه MS و ۱/۲MS تفاوت معناداری وجود داشت، و محیط پایه MS محیط مناسب‌تری برای رشد و گسترش کالوس بود (شکل های ۴ و ۵).



شکل ۵- مقایسه میانگین قطر کالوس تولیدشده دو محیط پایه MS و ۱/۲MS

کالوس‌های رویان‌زا و رویان‌زایی سوماتیکی: علاوه بر تشکیل رویان در محیط‌های دارای هورمون، در هر دو محیط پایه بدون هورمون نیز کالوس‌های رویان‌زا تشکیل شد. علاوه بر رویان‌زایی غیرمستقیم از کالوس در محیط MS بدون هورمون، در برخی ریزنمونه‌ها رویان‌زایی سوماتیکی مستقیم نیز دیده شد. به این شکل که رویان‌های بذری بر روی محیط MS مقداری رشد کردند و اندام برگ مانندی تشکیل دادند و بعد از چند روز بر روی برگ‌ها، رویان‌های سوماتیکی تشکیل شد (شکل 6a). در تیمارهایی که نسبت BA به NAA بالا بود کالوس‌های تشکیل شده رویان‌زا نبودند، از آن جمله می‌توان به کالوس‌های تولید شده در تیمارهای حاوی ۲ یا ۴ میلی‌گرم BA در ترکیب با غلظت‌های ۰/۱ و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA و تیمار ۱ میلی‌گرم بر لیتر BA به همراه ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA اشاره کرد.



شکل۶- رویان‌زایی سوماتیکی ناشی از رویان بذری در محیط MS بدون هورمون. a) رویان‌زایی مستقیم b) رویان‌زایی غیر مستقیم

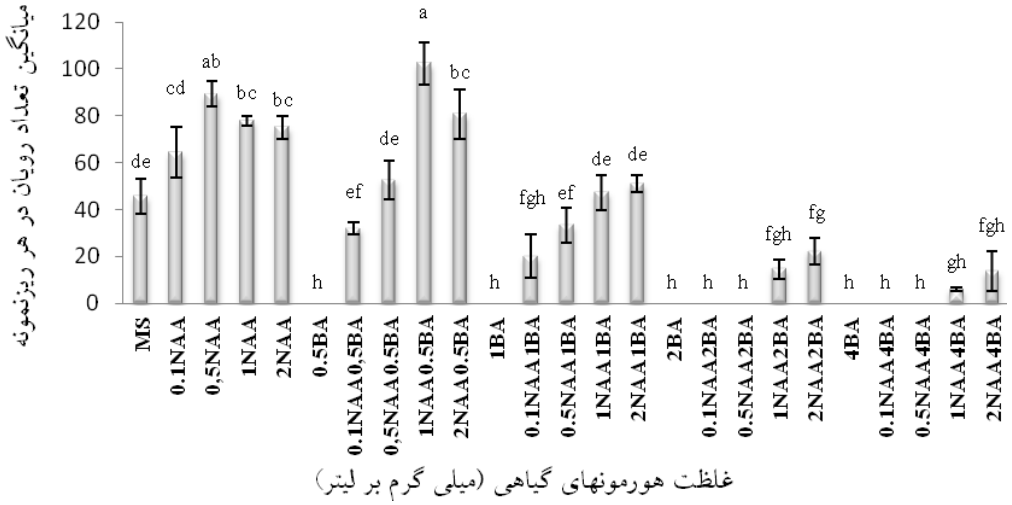
بررسی مقایسه میانگین تعداد رویان تشکیل شده نشان داد که در بین تیمارهای استفاده شده، در هر دو محیط پایه MS و ۱/۲MS، در سطح احتمال ۱ درصد اختلاف معنی‌داری وجود داشت. در محیط پایه MS حاوی سیتوکنین به تنهایی، رویان سوماتیکی بر روی ریزنمونه تشکیل نشد (شکل ۷). بیشترین تعداد رویان بر روی ریزنمونه در محیط حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA و محیط ۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA به همراه ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BA مشاهده گردید. افزایش سیتوکنین BA به محیط‌های حاوی NAA (غیر از غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BA)، سبب کاهش تولید رویان سوماتیکی شد، به طوری‌که در غلظت‌های بالای BA (۲ و ۴ میلی‌گرم بر لیتر) رویان‌زایی به حداقل (صفر) رسید (شکل ۷).

در مقایسه با محیط پایه MS، در محیط پایه ۱/۲MS رویان‌زایی سوماتیکی کمتری مشاهده شد (شکل ۸)، به طوری‌که بالاترین میانگین تعداد رویان در هر ریزنمونه

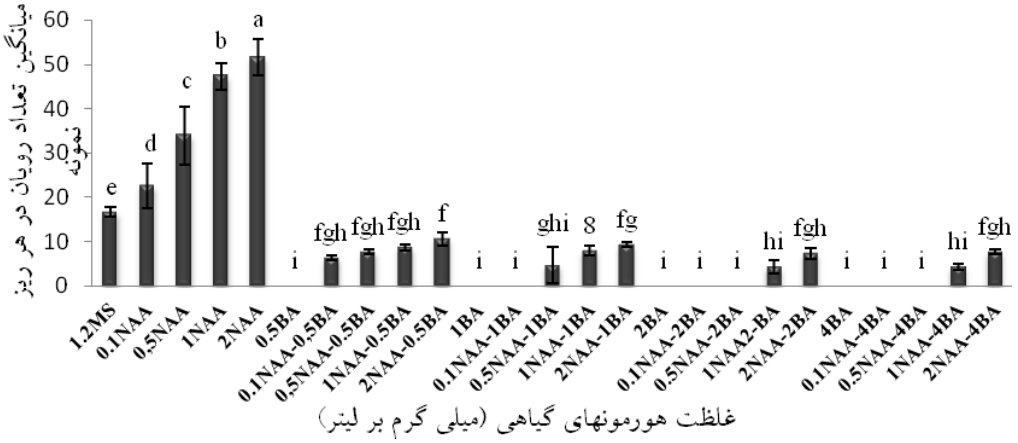
www.SID.ir

Archive of SID

برابر ۴/۱۶ ± ۵۱/۶۷ بود که در مقایسه با محیط پایه MS (برابر ۹/۰۱ ± ۱۰۲/۳۳ رویان در هر ریز نمونه)، این تعداد تقریبا به نصف رسیده بود. در این محیط بیشترین رویان‌زایی در محیط‌های حاوی اکسین به تنهایی مشاهده شد (حداکثر رویان‌زایی در تیمار ۲ میلی‌گرم بر لیتر NAA وجود داشت).



شکل ۷- مقایسه تعداد رویان تشکیل شده در تیمارهای مختلف هورمونی در محیط پایه MS



شکل ۸- مقایسه تعداد رویان تولید شده در تیمارهای مختلف هورمونی در محیط پایه ۱/۲MS

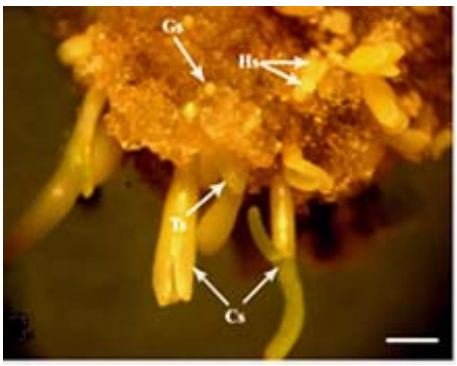
انتقال کالوس‌ها به محیط بدون هورمون: در این تحقیق، در برخی تیمارها (مثل محیط‌های حاوی اکسین به تنهایی)، رویان‌زایی سوماتیکی در کالوس‌های حاصل از رویان بذری همزمان با القای کالوس مشاهده شد. به منظور تحریک رویان‌زایی در کالوس‌های غیر رویان‌زا (مثل کالوس‌های تشکیل شده در تیمار ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA + ۴ میلی‌گرم بر لیتر BA در هر دو محیط پایه MS و ۱/۲MS)، این کالوس‌ها به محیط فاقد هورمون منتقل شدند، اما با بررسی مجدد، در محیط جدید نیز رویان‌زایی مشاهده نگردید. هنگامی که کالوس‌های رویان‌زا به محیط فاقد هورمون منتقل شدند، رویان‌زایی بیشتری صورت گرفت و رویان‌ها قادر به ادامه رشد خود بودند.

مشاهدات استریومیکروسکوپی کالوس‌ها، مراحل مختلف رشدی رویان‌های سوماتیکی را بر روی کالوس‌ها نشان

www.SID.ir

Archive of SID

دادند (شکل ۹). رویان‌های سوماتیکی نه تنها در قسمت‌هایی که در تماس مستقیم با محیط کشت بودند، بلکه در سایر قسمت‌های کالوس نیز تشکیل شدند. رویان‌های کوتیلدونی با قرارگیری بر روی محیط مناسب (۱/۲MS) توانایی تشکیل برگ و ریشه و تبدیل به گیاهچه را داشتند.



شکل ۹- مراحل مختلف رشدی رویان‌های سوماتیکی روی کالوس – Gs : مرحله کروی؛ Hs: مرحله قلبی شکل؛ Ts: مرحله اژدری؛ Cs: مرحله کوتیلدونی.

بحث

تکنیک کشت بافت گیاهی به منظور باززایی و تکثیر گیاه از سلول، اندام و بافت‌های در حال رشد در شرایط درون شیشه مورد استفاده قرار می‌گیرد. یکی از تکنیک‌های مختلفی که در ریزازدیادی گیاهان برای تکثیر انبوه مورد استفاده قرار می‌گیرد رویان‌زایی سوماتیکی است. حضور جنس و گونه های مختلف از خانواده Apiaceae در قسمت های مختلف ایران گزارش شده است (۱و۵). گیاه وشا (*D. ammoniacum*) متعلق به این خانواده و از گیاهان بومی ایران است که در این بررسی، تولید کالوس رویان‌زا از رویان بذری گیاه با استفاده از محیط‌های مختلف هورمونی انجام شد.

در مطالعه حاضر مشاهده گردید که در تیمارهایی که تنها حاوی غلظت‌های مختلف BA بودند، فاقد هورمون NAA، هیچ‌گونه کالوسی تولید نشد و گیاهچه‌هایی با اشکال غیرطبیعی به‌وجود آمد، این مشاهدات نشان می‌دهد که تشکیل کالوس در این گیاه تحت تأثیر غلظت‌های سیتوکینین به تنهایی نیست، حسنی و همکاران نیز نتیجه مشابه را در تحقیقات خود به‌دست آوردند (۹).

حداکثر میزان کالوس‌زایی در حضور میزان کم سیتوکینین (۰/۵ میلی گرم بر لیتر BA) به همراه اکسین، در محیط القای کالوس مشاهده شد. در سایر گیاهان خانواده چتریان مانند رازیانه (۲۵) و آنغوزه (۹) نیز کالوس‌ها در محیط حاوی NAA، در حضور سیتوکینین رشد بیشتری داشتند. مقایسه شکل‌های ۷ و ۸ نشان می‌دهد که محیط پایه MS محیط مناسب‌تری برای تشکیل رویان سوماتیکی نسبت به ۱/۲MS بود.

برای فعال شدن سلول‌های سوماتیک و ورود به چرخه سلولی حضور هورمون‌های خارجی، به ویژه اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها مورد نیاز هستند (۲۱و۲۲). در تحقیق حاضر نیز مشاهده شد که ترکیب مناسب نسبت‌های هورمون‌های اکسین و سیتوکنین منجر به فعال شدن تعداد بیشتری از سلول‌های سوماتیک و رسیدن به حداکثر رویان‌زایی سوماتیکی می گردد. مارتین (۱۹) و حسنی و همکاران (۹) ترکیب سیتوکنین و اکسین را برای رسیدن به حداکثر رویان‌زایی لازم دانستند (۹و۱۹)، از طرفی نتایج این تحقیق نشان داد که ریزنمونه رویان بذری در محیط بدون هورمون نیز کالوس رویان‌زا و رویان‌های سوماتیکی تولید کرد. علت این مسئله را نیز می توان به سطح هورمون‌های درونی این ریزنمونه و ارتباط آن با پتانسیل رویان‌زایی مرتبط دانست (۲۰). سلول‌های حاصل از رویان‌های بذری دارای یک برنامه بیان ژن رویانی هستند که سلول‌های رویانی از پیش تعیین شده (PEDC) نامیده می‌شوند (۸). همان‌طور که در بررسی حاضر مشاهده شد رویان‌زایی سوماتیکی مستقیم از ریزنمونه رویان بذری صورت گرفت، تیمارهای محیطی و هورمونی که برای رویان‌زایی سوماتیکی بکار می‌رود، با توجه به نوع برنامه ژنی ریزنمونه متفاوت است، به طوری‌که ریزنمونه‌ای که دارای

www.SID.ir

Archive of SID

سلول‌های سوماتیکی از نوع PEDC باشند (مانند ریزنمونه رویان بذری) ممکن است در همان تقسیمات اولیه به رویان سوماتیکی تبدیل شود و رویان‌زایی سوماتیکی مستقیم رخ دهد (۲۶).

همان گونه که گفته شد در گیاه وشا رویان‌زایی سوماتیکی در محیط‌های هورمون‌دار و بدون هورمون، در مرحله القای کالوس رخ داد که این نتیجه مشابه با تحقیقات صورت گرفته بر روی گیاه رازیانه و هویج بود (۹و۱۹). هرچند در برخی گیاهان خانواده چتریان مانند زیره (۲۵) و آنغوزه (۹)، هیچگونه تمایز رویانی در محیط القای کالوس صورت نگرفت و برای القای رویان‌زایی، کالوس باید به محیط بدون تنظیم‌کننده رشد منتقل می‌شد. اما در برخی گیاهان، رویان‌زایی سوماتیکی در مرحله القای کالوس رخ نمی دهد اما زمانی‌که کالوس به محیط بدون هورمون منتقل می‌شود، رویان‌زایی صورت می‌گیرد (۹). در آزمایش حاضر، مشاهده گردید که رویان‌های سوماتیکی بر روی محیط بدون هورمون قادر به رشد بودند. وقوع فرایند رشد و نمو رویان در غیاب تنظیم کننده‌های رشد، یک واکنش مشترک با دیگر گونه چتریان است (۱۰و ۱۵و ۲۵).

در مطالعات نشان داده شده است که در بسیاری از گونه‌های گیاهی علاوه بر تنظیم کننده‌های رشد، فاکتورهای دیگری از قبیل نوع و مقدار منبع نیتروژن، اسیدهای آمینه (۱۷)، منبع قند، نوع ریزنمونه و شرایط محیط کشت در رخدادهای مربوط به رویان‌زایی سوماتیکی مؤثر هستند (۲۴). تفاوت رویان‌زایی سوماتیکی مشاهده شده در تحقیق حاضر، بین محیط‌های پایه MS و MS ۱/۲ (که غلظت ترکیبات فوق نصف MS در نظر گرفته شد) را می‌توان ناشی از تفاوت در میزان غلظت ترکیبات موجود در آنها دانست. در تحقیق حاضر در گیاه وشا، رویان‌های سوماتیکی در قسمت‌های مختلف کالوس‌های رویان‌زا تشکیل شدند، در حالی‌که در کالوس‌های برخی گیاهان مانند زیره، رویان‌های سوماتیکی تنها در قسمت‌هایی که در برخورد مستقیم با محیط کشت بودند، تشکیل شدند (۲۵).

نتایج مطالعه حاضر توانایی رویان بذری گیاه وشا برای تولید کالوس رویان‌زا و رویان سوماتیکی را نشان داد که می‌تواند کمکی برای درک و مطالعه بیشتر رویان‌زایی سوماتیکی گیاه وشا از طریق کالوس بوده و در مسیر سایر کاربردهای رویان‌زایی سوماتیکی مورد استفاده قرار گیرد.

منابع

۱- خواجه الدین، ج. یگانه، ح. ۱۳۹۱. *معرفی فهرست، شکل زیستی و گونه های در حال خطر منطقه شکار ممنوع کرکس*. مجله زیست شناسی ایران. دوره ۲۵. شماره ۱. ص ۷- ۲۵.

۲- زرگری، ع. ۱۳۷۵. گیاهان دارویی (جلد دوم). انتشارات دانشگاه تهران. ۹۷۶ صفحه.

۳- قاسمی آریان، ع. ایزی، ج. سعید افخم الشعرا، م . اجلالی، ر. ۱۳۸۷. *بررسی افزایش جوانه زنی بذر گیاه کندل* (*Dorema ammoniacum*). فصلنامه علمی پژوهشی تحقیقات مرتع و بیابان ایران. جلد ۱۵، شماره ۴. ۴۵۵-۴۶۳.

۴- قاسمیان، خ. ناظری، س. چهرگانی راد، ع. میرزایی اصل، ا. ۱۳۹۱. مراحل رویان زایی سوماتیکی حاصل از رویان بذری در گیاه وشا (*Dorema ammoniacum* D.). مجله سلول و بافت. جلد ۳. شماره ۱. بهار ۱۳۹۱. ص ۲۱-۲۷.

۵- کشتکار، ح. یگانه، ح و جبارزارع، ا. ۱۳۹۰. بررسی فلورستیک و اشکال زیستی گیاهان منطقه حفاظت شده قرخود. مجله زیست شناسی ایران. دوره ۲۴. شماره ۳. ص ۴۲۱-۴۳۱.

6- Bang, J.W., D.S., Chung, S.H. and Liu, J.R. 1999. Plant regeneration from embryogenic cells-derived protoplasts of Bupleurum falcatum. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 55, 151–154.

7- Dong J.Z., Dunstan, N. 2002. Molecular biology of somatic embryogenesis in conifers. In: Jan SM, Minocha SC,(eds). Molecular biology of woody plants. Dordecht: Klawer Acadenic Publishers; pp, 51-87.

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

www.SID.ir

Archive of SID

9- Hassani, B., Saboora, A., Radjabian, T. and Fallah Husseini H. 2008. Somatic Embryogenesis of Ferula assa-foetida. Journal of Undergraduate Studies at Trent. 33, 15-23.

10- Hunault G., Desmarest P. and Manoir J.D. 1998. Foeniculum vulgare Miller: cell culture, regeneration and the production of anethole In: Bajaj Y. P. S. (ed) Biotechnology in Agriculture and Forestry 7. Medicinal and Aromatic Plants. pp, 185–212

11- Imani, J., Tran Thi, L., Langen, G., Arnholdt-Schmitt, B., Roy, S., Lein, C. and Kumar, A. 2004 Somatic embryogenesis and DNA organization of genomes from selected Daucus species. Plant Cell Reports. 20, 537–541.

12- Irvani, N., Solouki, M., Omidi, M., Zare, A.R. and Shahnaz, S. 2010. Callus induction and plant regeneration in Dorem ammoniacum., an endangered medicinal plant". Plant Cell Tissue and Organ Culture. 100, 293–299.

13- Ishii, Y., Takamura, T., Goi, M. and Tanaka, M. 1998. Callus induction and somatic embryogenesis of Phalaenopsis. Plant Cell Rep. 17, 446–450.

14- Jalili, A., Jamzad, Z. 1999. Red data book of Iran. Research Institute of Forests and Rangelands. Plants and Botany. P. 748.

15- Janick, J. 1993. Agricalture use of somatic embryos. Acta Horticulturae. 336, 207-215.

16- Jayanthi, M. and Mandal, P.K. 2001.Plant regeneration through somatic embryogenesis and RAPD analysis of regenerated plants in Tylophora indica (Burm. f. Merrill.). In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. 37, 576–580.

17- Karkonen, A. 2001. Plant tissue cultures as models for tree physiology: somatic embryogenesis of Tilia cordata and lignin biosynthesis in Picea abies suspension cultures as case studies. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 77, 113–129.

18- Leaman, D.J. 2006. Medicinal plant conservation newsletter of the medicinal plant specialist group of the IUCN species survival commission. Silphion 12, 25–26.

19- Martin, KP. 2004. Efficacy of different growth regulators at different stages of somatic embryogenesis in ryngium foetiduml—a rare medicinal plant. In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant. 40, 459–463.

20- Merkle, S.A., Parrott, W.A. and Williams, E.G. 1995) Application of somatic embryogenesis and embryo cloning. In: Bhojwani, S. S. (ed.). Plant Tissue Culture: Applications and Limitations. Amsterdam, Elsevier. pp, 67-101.

21- Pasternak T.P., Prinsen, E., Ayaydin, F. and Miskolczi P. 2002. The Role of Auxin, pH, and Stress in the Activation of Embryogenic Cell Division in Leaf Protoplast-Derived Cells of Alfalfa. Plant Physiology.; 129, 1–13.

22- Pola, S.R. and Sarada, M.N. 2006. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration in Sorghum bicolor (L.) Moench, from leaf segments. Journal of Molecular Cell Biology. 5, 99-107.

23- Rajani, M., Saxena, N., Ravishankara, M. N., Desai, N. and Padh, H. 2002. Evaluation of the Antimicrobial Activity of Ammoniacum Gum from Dorema ammoniacum. Pharmaceutical biology. 40, 534 – 541.

24- Ricci, A.P., Filho, F.A.A.M., and Januzzi, B.M. 2002. Somatic embryogenesis in Citrus sinensis, C. reticulate and C. nobilis. Scientia Agricola. 59, 41-46.

25- Tawfik, A.A. and Noga ,G. 2002. Cumin regeneration from seedling derived embryogenic callus in response to amended kinetin. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 69, 35-40.

26- Tetu, T. Sangwan, R.S. 1990. Direct somatic embryogenesis and organogenesis in cultured immature zygotic embryo of pisum. Journal of plant physiology. 137, 102-109.

27- Wakhlu A.K. and Sharma, R.K. 1998. Somatic embryogenesis and plant regeneration in Heracleum candicans Wall. Plant Cell Reports. 17, 866–869.

www.SID.ir

Archive of SID

Producing embryogenic callus from zygotic embryo in *Dorema ammoniacum D.*

Khadijeh Ghasemian[1], Sonbol Nazeri[1*], Abdolkarim Chehregani Rad[2] and Asghar Mirzaie Asl[1]

[1] **Biotechnology Dept., Faculty of Agriculture, Bu-Ali-Sina University, Hamedan, I.R. of Iran**

[2] **Biology Dept., Faculty of Science, Bu-Ali-Sina University, Hamedan, I.R. of Iran**

Abstract

Dorema ammoniacum is a native medicinal plant in Iran, which due to ruinous harvesting practices and destroying its natural habitats in the country, the species is getting endangered. Somatic embryogenesis is considered as a useful method for propagating plants. In the present study, induction of embryogenic callus from zygotic embryo of this plant using MS and ½ MS basal media and different concentrations of NAA and BA hormones was investigated. It was observed that MS medium containing 1 mg/l NAA and 0.5 mg/l BA hormones was the best medium for induction of maximum amount of embryogenic callus and production of maximum number of somatic embryos. Furthermore, MS basal medium compared with ½ MS basal medium showed a better result, not only in the callus formation but also in the somatic embryogenesis. No embryogenesis was observed after sub-culturing of non-embryogenic calluses in hormone-free MS basal medium. When the embryos were transferred to media without growth regulators, whole plantlets were regenerated.

Key words :Induction of embryogenesis, Somatic embryogenesis, Plant hormones.

www.SID.ir