جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی - پژوهشی)
جلد ۳، شماره ۱، بهار ۱۳۹۱، ۲۷-۲۱

مراحل رویان‌زایی سوماتیکی حاصل از رویان بذری در گیاه وشا (*Dorema ammoniacum* D.)

خدیجه قاسمیان M.Sc.[۱]، سنبل ناظری Ph.D.[۱*]، عبدالکریم چهرگانی راد Ph.D.[۲]، اصغر میرزایی اصل Ph.D.[۱]

۱- همدان، دانشگاه بوعلی سینا همدان، دانشکده کشاورزی، گروه بیوتکنولوژی
۲- همدان، دانشگاه بوعلی سینا همدان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی
* پست الکترونیک نویسنده مسئول: snblnazeri@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۱۰/۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۱۱/۱۷

چکیده

هدف: هدف از این تحقیق بررسی و تایید بافت شناختی مراحل رویان‌زایی سوماتیکی در گیاه وشا، به عنوان روشی موثر در تکثیر گیاهانی که با محدودیت کشت مواجه هستند، به کمک روش‌های کشت بافت بود.

مواد و روش‌ها: ریزنمونه‌های مختلف بر روی محیط کشت موراشیگ و اسکوگ (Murashige and Skoog) حاوی غلظت‌های مختلف اکسین و سیتوکینین قرار گرفتند. پس از ۸ هفته، تولید کالوس‌های رویان‌زا بررسی شد. مراحل مختلف نموی رویان‌های سوماتیکی پس از تهیه برش‌های میکروتومی از کالوس‌ها و با استفاده از روش بافت‌شناسی بررسی شد.

نتایج: از میان ریز نمونه‌های مختلف مورد بررسی، رویان‌های بذری موفق به تشکیل کالوس‌های رویان زا شدند. هورمون اکسین به طور موثر میزان رویان زایی را افزایش داد. بیشترین میزان تولید کالوس‌های رویان‌زا مربوط به محیط موراشیگ اسکوگ حاوی ۱ میلی‌گرم بر لیتر نفتالین استیک اسید (α-Naphthaleneacetic acid) و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آدنین (N6-Benzyladenine) بود. با مقاطع گرفته شده از نمونه‌ها، مراحل مختلف رشدی رویان‌های سوماتیک شامل مرحله پیش رویانی، رویان کروی، رویان قلبی شکل، رویان اژدری و رویان لپه‌ای مشاهده شدند.

نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج، رویان زایی سوماتیکی در گیاه وشا در شرایط آزمایشگاهی و با استفاده از رویان بذری این گیاه امکان پذیر است و بررسی‌های بافت‌شناسی کالوس‌های رویان زا، وجود مراحل مختلف رویانی را تایید نمود.

واژگان کلیدی: وشا، رویان‌زایی سوماتیکی، بافت‌شناسی

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقدمه

رویان‌زایی سوماتیکی عبارت از تشکیل رویان از سلول غیرجنسی در شرایط آزمایشگاهی است که مشابه با رویان بذری قادر به نمو بوده و به صورت گیاهچه کامل نمو پیدا می‌کند (۱و۲). یک رویان سوماتیکی از نظر فرآیند رویان زایی شبیه یک رویان بذری است. از رویان زایی سوماتیکی به عنوان یک مدل برای مطالعه رویان زایی بذری نیز استفاده شده است. رویان زایی سوماتیکی نظیر رویان زایی بذری شامل مراحل مختلف: ایجاد پیش رویان، رویان گویچه ای، رویان قلبی شکل، رویان اژدری و لپه‌ای است که از مسیری غیرجنسی رخ می‌دهد (۳و۴). مطالعه درباره رویان زایی سوماتیکی جنبه‌های علمی و کاربردی زیادی دارد. رویان زایی سوماتیکی به دلیل امکان تولید بیشتر و تکثیر مداوم توده رویان زا، روشی مناسب برای تکثیر است (۵) و در برخی موارد به دلیل فراهم نمودن امکان تکثیر انبوه گیاهان با استفاده از بیوراکتورها، نسبت به سایر روش‌های تکثیر غیرجنسی برتری دارد (۶).

گیاه وشا (کندل) با نام علمی *Dorema ammoniacum* D. از خانواده Apiaceae یک گونه دارویی و صنعتی است که در آسیای مرکزی و از جمله ایران می‌روید و در درمان بیماری هایی نظیر برانشیت مزمن، تنگی نفس بیماری های ریوی و آلرژی تنفسی کاربرد دارد. این گیاه همچنین دارای خواص محرک، قاعده آور، خلط آور، ضدتشنج، ضدمیکروب و ضداکسیداسیون می باشد (۷و۸). در سال های اخیر به علت استفاده بی رویه و برداشت‌های نامناسب، رویشگاه‌های این گیاه در کشور تخریب شده و گیاه در معرض خطر انقراض قرار گرفته است (۹). گیاه وشا به طور مرسوم توسط بذر تکثیر می‌شود اما تکثیر این گیاه به دلیل وجود خواب بذر با محدودیت مواجه است (۱۰). هدف این تحقیق یافتن روشی سریع برای ریز از دیادی این گیاه بود. ریز ازدیادی از طریق رویان زایی سوماتیکی روشی است که می‌تواند به طور گسترده برای کوتاه کردن چرخه جنسی و غلبه بر مشکلات مربوط به بذر به کار رود (۱۱).

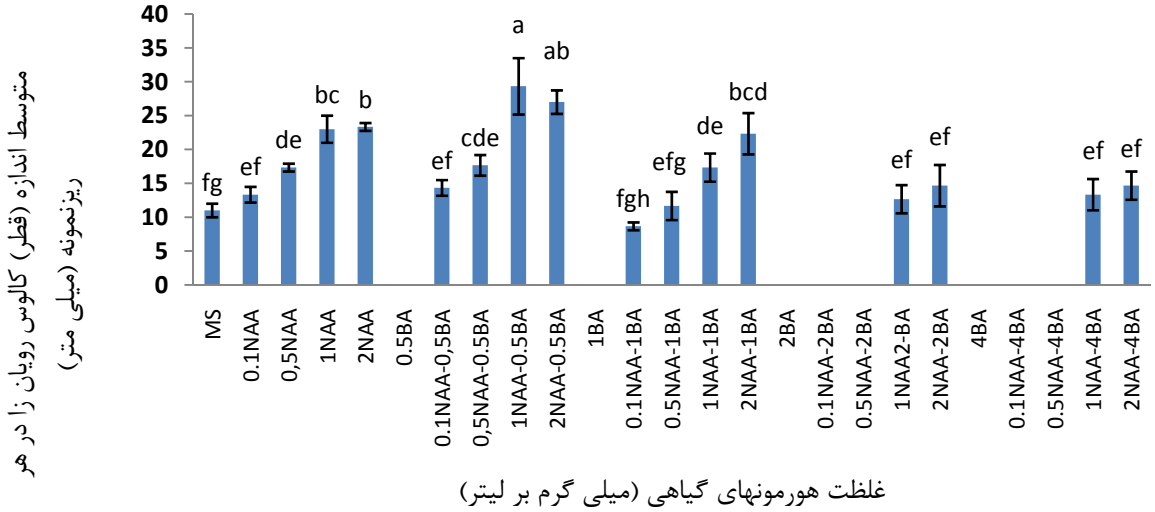
مواد و روش‌ها

بذرهای گیاه وشا از رویشگاه طبیعی آن، استان فارس، شهرستان آباده، جمع آوری شدند. به منظور ضدعفونی، به مدت یک دقیقه در اتانول ۷۰ درصد قرار گرفتند و سپس ۳ بار با آب مقطر استریل به خوبی شستشو داده شدند. پس از آن به مدت ۱۵ دقیقه درمحلول هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد قرار گرفته و در نهایت با آب مقطر، سه بار، شستشو شدند تا تمامی آثار محلول ضدعفونی کننده از بین برود. ضدعفونی تحت شرایط استریل و زیر هود صورت گرفت. بذرها به دو صورت مورد استفاده قرار گرفتند: در گروه اول بذرها مستقیما جهت جوانه زنی به پتری دیش‌های حاوی محیط ۱/۴MS (موراشیگ اسکوگ) منتقل شدند و ریز نمونه های حاصل از گیاهچه های فوق جهت بررسی تولید کالوس مورد استفاده قرار گرفتند. در گروه دوم برای تولید مستقیم کالوس از رویان بذری، تعدادی از بذرها پس از ضدعفونی سطحی، در آب مقطر استریل و در دمای ۴ درجه سانتی گراد قرار گرفتند. بعد از ۷-۵ روز بذرها کمی متورم شده و در این مرحله، در شرایط استریل، رویان ها از بذرهای فوق بیرون آورده شدند. از قسمت های مختلف (ریشه‌چه، هیپوکوتیل و کوتیلدون) گیاهچه های حاصله و همچنین از رویان‌های بذری خارج شده از بذرها، به عنوان ریز نمونه استفاده شد. ریز نمونه‌ها بر روی محیط های با پایه MS حاوی ۳۰ گرم بر لیتر ساکارز و ۷ گرم بر لیتر آگار به همراه هورمون‌های NAA (α-Naphthaleneacetic acid) با غلظت های ۰ تا ۲ میلی گرم در لیتر، و BA (N6-Benzyladenine) در غلظت های ۰ تا ۴ میلی گرم در لیتر، کشت شدند. پس از چهار هفته، به منظور تجدید عناصر غذایی، اولین واکشت نمونه‌ها بر روی محیط‌های قبلی صورت گرفت. دو هفته بعد، واکشت دوم نمونه‌ها به محیط کشت مشابه ولی فاقد هورمون انجام شد. در مراحل مختلف، محیط های کشت در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱/۵ اتمسفر به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو شدند و کشت ها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و در شرایط ۱۶ ساعت روشنایی در اتاق رشد نگهداری شدند. آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی طراحی شد. برای هر تیمار، سه تکرار و پنج ریز نمونه در هر تکرار در نظر گرفته شد. تجزیه های آماری با استفاده از نرم افزار SAS و مقایسه میانگین ها با استفاده از آزمون دانکن و در سطح احتمال ۵ درصد انجام گرفت. در رسم نمودار از نرم افزار Excel استفاده شد.

بررسی کالوس‌های ایجاد شده، مراحل مختلف رویانی (کروی، قلبی، اژدری و کوتیلدونی) و مورفولوژی ظاهری رویان‌ها در کالوس‌ها، توسط استریومیکروسکپ مدل ZEISS صورت گرفت (شکل ۱، الف-د). به منظور بررسی و تشخیص روند رویان زایی سوماتیکی، مطالعات بافت شناسی انجام شد، به این صورت که کالوس های رویان زا به مدت ۲۴ ساعت در محلول تثبیت کننده FAA (فرمالدئید، استیک اسید، اتانول ۱۰۰ درصد به ترتیب با

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

نسبت‌های ۲:۱:۱۷) قرار داده شدند. پس از شستشو، با درجات رو به افزایش اتانول آب گیری شدند و در آخر اشباع سازی به کمک مخلوط تولوئن- پارافین و سپس پارافین خالص صورت گرفت. نمونه‌ها در پارافین قالب گیری شدند و با استفاده از دستگاه میکروتوم برش‌های ۸-۷ میکرومتری از بافت ها تهیه شد. برش‌ها بر روی لام‌های شیشه‌ای چسبانیده شده و از تولوئن به عنوان حلال پارافین استفاده شد. پس از زدودن پارافین، از هماتوکسیلین – ائوزین برای رنگ آمیزی نمونه‌ها استفاده شد (۱۲) و سپس لام ها به‌وسیله میکروسکوپ نوری مدل ZEISS مشاهده و از نمونه‌های مناسب عکس برداری شد. رویان‌های کوتیلدونی با رشد مناسب (طول بیشتر از ۳ میلی‌متر) از کالوس‌ها جدا شده و به منظور جوانه‌زنی بر روی محیط ۱/۲MS بدون هورمون قرار گرفتند.



شکل ۱: متوسط اندازه (قطر) کالوس رویان‌زا حاصل از ریز نمونه رویان بذری در محیط‌های مختلف هورمونی (حروف غیر یکسان نشان دهنده تفاوت معنی دار بین تیمارها در سطح احتمال ۵ درصد بر طبق آزمون دانکن است و هر داده معرف میانگین ± انحراف معیار سه تکرار است.)

نتایج

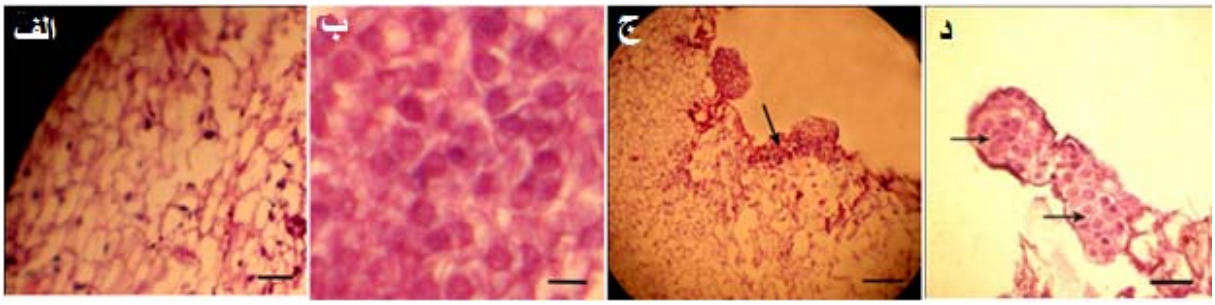
۸ هفته پس از کشت، کالوس‌های حاصل از ریز نمونه‌های (Explants) مختلف در محیط کشت پایه MS محتوی هورمون‌های بنزیل آمینو پورین و نفتالین استیک اسید، با استفاده از استریومیکروسکپ مورد مطالعه و ارزیابی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که کالوس‌های رویان‌زا تنها از ریز نمونه‌های حاصل از رویان زیگوتی، به وجود آمدند. بیشترین میزان کالوس زایی در تیمار ۰/۵ میلی گرم بر لیتر BA و یک میلی گرم بر لیتر NAA بدست آمد. همچنین مشاهده شد که با افزایش غلظت NAA (در غلظت ثابت BA) میزان کالوس رویان‌زا افزایش یافت و بر عکس در غلظت ثابت NAA، افزایش غلظت BA سبب کاهش قطر متوسط کالوس‌های رویان زا گردید (شکل ۱). پس از حدود چهار هفته تشکیل رویان‌های سوماتیک بر روی کالوس‌ها قابل مشاهده بود. پس از واکشت کالوس‌ها بر روی محیط MS بدون تنظیم کننده‌های رشد، مراحل بلوغ رویان‌ها بر روی کالوس‌ها به میزان بیشتری مشاهده شدند. شکل ۲ الف- د، مراحل مختلف رشدی رویان‌های سوماتیک را برروی کالوس‌های رویان‌زا نشان می‌دهد. رویان‌های کوتیلدونی با قرارگیری بر روی محیط مناسب (۱/۲MS) توانایی تشکیل برگ و ریشه و تبدیل به گیاهچه را داشتند (شکل ۲ه).

مطالعات بافت شناسی، مراحل مختلف رویان‌زایی سوماتیکی را تایید نمودند. مراحل مختلف رویانی در مقطع‌های گرفته شده از توده‌های رویان‌زا قابل مشاهده بود که این مراحل عبارت بودند از: مرحله پیش رویانی، مرحله کروی، قلبی شکل، اژدری و کوتیلدونی. اشکال فوق شباهت مراحل نموی رویان‌های سوماتیکی را با رویان زایی بذری در گیاه نشان می‌دادند.

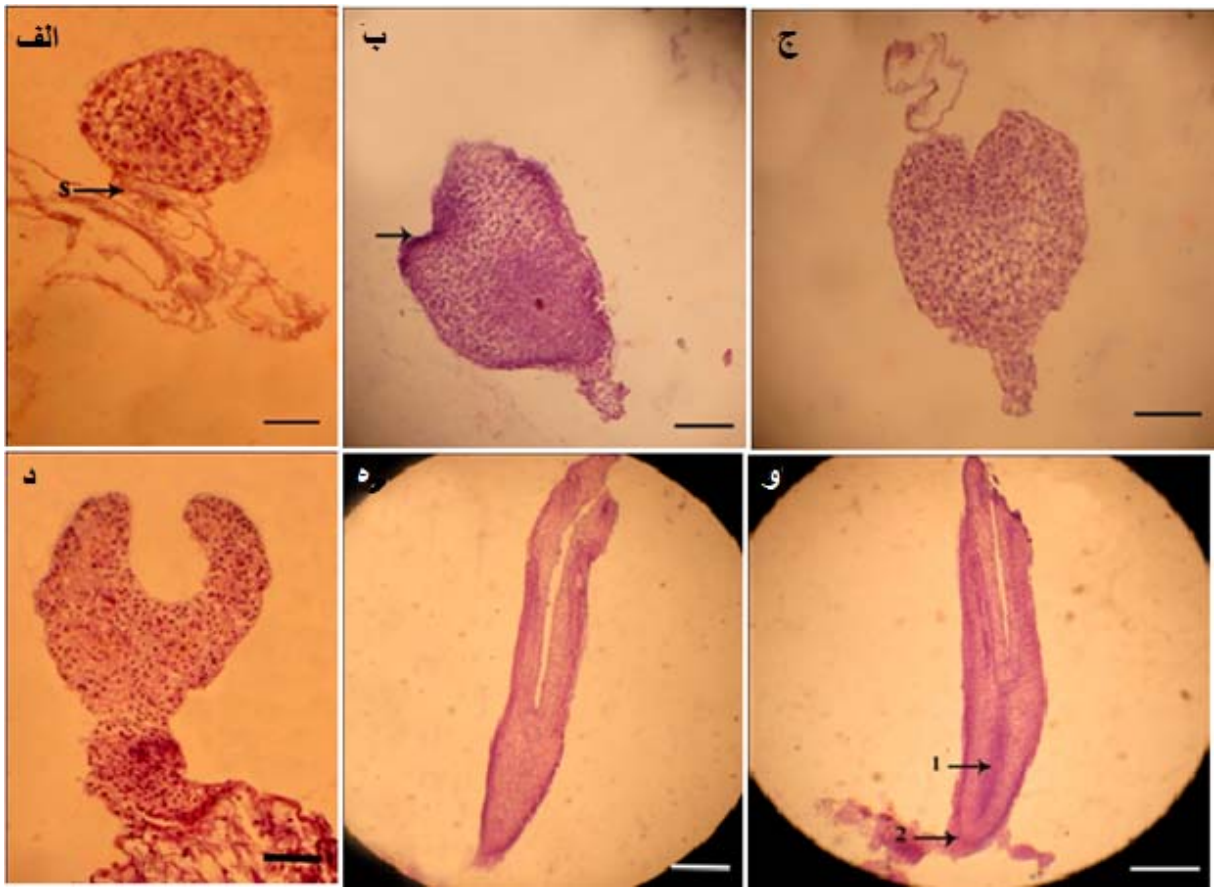
سلول‌های غیررویانی (در مقایسه با سلول‌های رویانی) سلول‌هایی بزرگ با هسته‌های کوچک بودند که تراکم سیتوپلاسم در آن‌ها کم بود (شکل ۳الف)، در مقابل، سلول‌های رویان‌زا سلول‌هایی به‌هم فشرده، کوچک با هسته بزرگ و سیتوپلاسم متراکم بودند

(شکل ۳ب). در حاشیه کالوس‌های رویان‌زا، نواحی با فعالیت مریستمی قابل رویت بودند که در این نواحی تقسیمات متوالی منجر به تشکیل رویان‌های سوماتیکی می‌شوند (شکل۳ج). سلول‌های رویانی در برش‌ها، سلول‌های کوچک به‌هم فشرده بودند که سیتوپلاسم آنها شدیدا رنگ آمیزی شده و حجم بالای هسته در آنها مشخص بود. این سلول‌های کوچک می‌توانند با ادامه تقسیمات سلولی، منجر به تشکیل رویان‌های سوماتیک جدید شوند (شکل ۳د). رویان‌های کروی از سلول‌های کالوس‌های رویان‌زا تشکیل شده و توسط ساختار نگهدارنده (سوسپانسور) به سلول‌های زیرین متصل بودند (شکل ۴الف). رویان‌های کروی سطحی براق و صاف داشتند (شکل ۲الف). رویان‌ها به راحتی قابل جدا شدن از بافت کالوس بودند. با تقسیمات سلولی در دو قطب رویان‌ها، رویان‌های کروی به تدریج شروع به کشیده شدن کرده و به سمت دو قطبی شدن رفتند. به این ترتیب ساختار اولیه لپه‌ها تشکیل و رویان‌ها ظاهری قلبی شکل پیدا کردند. شکل ۴ب مرحله ابتدایی تری از رویان قلبی و شکل ۴ج مرحله پیشرفته تری ازساختار قلبی شکل را نشان می‌دهد. در این مرحله نیز ساختار نگهدارنده قابل رویت بود. پس از این مرحله ساختار اژدری شکل مشاهده شد که کوتیلدون‌ها رشد بیشتری داشته و ساختار نگهدارنده (سوسپانسور) همچنان قابل رویت بود (شکل ۴د). تقسیمات متوالی در دو قطب رویان منجر به توسعه رویان‌ها و در نهایت ظهور رویان‌ها به صورت رویان های لپه‌ای (کوتیلدونی) بالغ شدند که در آن‌ها لپه‌ها رشد کامل داشتند (شکل ۴ه). به تدریج دستجات آوندی در رویان‌های کوتیلدونی تشکیل شده و در انتهای ریشه نیز تشکیل کلاهک ریشه قابل دیدن است (شکل ۴و). رویان‌های بالغ با رشد مناسب از سلول‌های مادری جدا و روی محیط جوانه زنی قرار داده شدند و برگ و ریشه تولید نمودند (شکل ۲ه).

شکل ۲: مشاهده استریومیکروسکپی مراحل نموی رویان‌های سوماتیک گیاه وشا. الف) مرحله کروی (خط نشانه= ۰/۴ میلی‌متر). ب) مرحله قلبی شکل همراه با ساختار نگهدارنده (خط نشانه= ۰/۶ میلی‌متر). ج) رویان اژدری (خط نشانه= ۰/۶ میلی‌متر). د) رویان لپه‌ای (خط نشانه= ۰/۵ میلی‌متر). ه) گیاه چه حاصل از رویان سوماتیکی (خط نشانه= ۱ سانتی‌متر).



شکل ۳: مقاطع سلول‌های رویانی و غیررویانی. الف) سلول‌های غیررویانی با اندازه بزرگ‌تر، هسته کوچک و تراکم پایین سیتوپلاسم (خط نشانه= ۵۰ میکرومتر). ب) سلول‌های رویانی با هسته بزرگ و تراکم بالای سیتوپلاسم (خط نشانه= ۲۰ میکرومتر). ج) منطقه فعال مریستمی در حال تشکیل رویان‌های سوماتیک (فلش) (خط نشانه= ۵۰۰ میکرومتر). د) دو رویان سوماتیک در حال تشکیل، در پی تقسیمات متوالی سلول‌های رویانی (خط نشانه= ۲۰۰ میکرومتر).



شکل ۴: مقاطع تهیه شده از مراحل مختلف تکوین رویان سوماتیک. الف) رویان کروی به همراه ساختار نگهدارنده (سوسپانسور،S) (خط نشانه= ۴۰۰ میکرومتر). ب) مراحل ابتدایی‌تر تکوین رویان قلبی شکل با سلول های در حال تقسیم در قطب لپه‌ای (فلش) (خط نشانه= ۴۰۰ میکرومتر). ج) رویان قلبی شکل بدون اتصال به بافت زمینه (خط نشانه= ۴۰۰ میکرومتر). د) رویان اژدری متصل به بافت زیرین (خط نشانه= ۴۰۰ میکرومتر). ه) رویان بالغ (لپه ای) در مراحل ابتدایی تر (خط نشانه= ۵۰۰ میکرومتر). و) مقطعی از رویان لپه ای که در آن فلش ۱ دستجات آوندی و فلش ۲ کلاهک ریشه را نشان می‌دهد (خط نشانه= ۵۰۰ میکرومتر).

بحث

در این مطالعه اثر نوع بافت و غلظت‌های مختلف هورمونی بر رویان‌زایی سوماتیکی از گیاه وشا مورد مطالعه قرار گرفت. اگرچه همه سلول های گیاه حاوی تمام اطلاعات ژنتیکی لازم برای به وجود آوردن یک گیاه کامل هستند (۱۳)، اما نتایج نشان داد که ریز نمونه‌های مختلف برای تولید کالوس‌های رویان‌زا توانایی یکسانی ندارند. علت این مسئله را می توان به سطح هورمون‌های درونی ریز نمونه‌ها نسبت داد و اینکه سطح هورمون‌های درون زا

با استعداد رویان‌زایی ریز نمونه‌ها مرتبط است (۱۴). گزارشات نشان داده است که در گیاه رازیانه و هویج نیز مانند گیاه وشا رویان زایی سوماتیکی در مرحله القای کالوس رخ داده است (۱۵). بر اساس نتایج پژوهش حاضر، حضور اکسین عامل موثری بر تولید کالوس‌های رویان زا و تولید رویان است که این نتیجه با گزارشات پیشین در مورد نحوه رویان زایی گیاهان هویج، گلپر و زیره هم‌خوانی دارد (۱۶،۱۷و ۱۸). نتایج در مطالعه حاضر نشان داد که تشکیل کالوس تنها تحت تاثیر سیتوکینین قرار ندارد که این نتیجه با برخی گزارشات در مورد گیاه آنغوزه مشابه است (۱۹). حضور مقدار کم سیتوکینین (۰/۵ میلی گرم بر لیتر) به همراه غلظت های بالای اکسین (۱-۲ میلی‌گرم بر لیتر)، حداکثر تولید کالوس‌های رویان زا را به دنبال داشت (شکل ۱). سلول‌ها به هورمون‌ها گیاهی به ویژه اکسین و سیتوکینین برای فعال شدن سلول‌های سوماتیک و ورود به چرخه سلولی نیازمندند (۲۰و۲۱). با قرار گرفتن کالوس‌های تشکیل شده در محیط‌های القای کالوس، بر روی محیط بدون هورمون، بلوغ رویان‌های سوماتیک مشاهده شد. رشد و نمو رویان‌های سوماتیک بر روی محیط فاقد هورمون، پاسخ متداولی در بین تعدادی از گونه‌های چتریان است (۱۸). انتقال رویان‌های بالغ به محیط جوانه زنی نشان داد که آن‌ها توانایی تشکیل گیاه‌چه‌های طبیعی را دارند.

در بررسی حاضر اشکال مختلف رویان‌های سوماتیک با مطالعات بافت شناختی مطالعه شدند. در تمام سلول‌های رویان‌زا ویژگی‌های مشابهی مشاهده گردید: اندازه کوچک، محتوای سیتوپلاسمی غنی و متراکم، هسته بزرگ، واکوئل کوچک و دانه‌های نشاسته کم. یافته‌های ما با گزارشات پیشین هم‌سویی دارد (۲۲). تراکم هسته سلول‌های رویانی به این دلیل است که رویان‌های سوماتیک از سلول‌های کوچکی که توسط تقسیم نامتقارن سلول اولیه ایجاد شده‌اند تشکیل می‌شوند (۲۳). کالوس‌های رویان زا برای مطالعات بافت شناسی در تعدادی از سیستم‌های گیاهی خانواده چتریان و سایر گیاهان استفاده شده است. مطالعه بافت شناسی سیستم رویان‌زایی سوماتیکی در این پژوهش، وجود و شباهت مراحل مختلف رویان زایی سوماتیکی با تکوین رویان حاصل از زیگوت بذر را نشان داد.

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که با استفاده از ریز نمونه مناسب (رویان زیگوتی) و ترکیب غلظت‌های موثر هورمون‌های اکسین و سیتوکینین (۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BA و ۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA)، می‌توان سیستم رویان‌زایی سوماتیک گیاه وشا را فعال نمود و رویان‌هایی را به دست آورد که قابلیت تبدیل به گیاه کامل را دارند.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با استفاده از حمایت مالی معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه بوعلی سینا انجام شده است. نویسندگان مقاله از همکاری مسئولین محترم آزمایشگاه‌های بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی و سلولی ملکولی دانشکده علوم دانشگاه بوعلی سینا، در فراهم نمودن امکانات و تجهیزات در انجام این پژوهش تشکر می‌نمایند.

منابع

1. Ammirato PV, Evans DA, Sharp WR, Yamado Y. Embryogenesis. Plant Cell Culture. 1983; 1: 82-123.

2. Vicient MC, Martinez FX. The potential uses of somatic embryogenesis in agroforestry are not limited to synthetic seed technology. Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal. 1998; 10: 1-12.

3. Simola L. Hrry Waris, apineer in somatic embryogenesis, In: Tain SM, Gupta PK, Newton KJ. somatic embryogenesis in woody plants. 2000; 73: 61-6.

4. Tarre E, Magioli C, Margis-Pinheiro M, Martins G. In vitro somatic embryogenesis and adventitious root initiation have a common origin in (*Solanum melongena* L.). Revista Brasil. Bot. 2004; 27: 79-84.

5. Khosravi S, Azghandi AV, Hadad R, Mojtahedi, N. In vitro micrpropagation of *Lilium longiflorum*. Journal of Agricultural Research: Seed and Plant. 2007. 23: 159- 168.

6. Karkonen A. Plant tissue culture as models for tree: somatic embryogenesis of *Tilia cordata* and lignin biosynthesis in Picea abies suspension cultures as case studies, division of plant physiology univer sity of Helsinki. 2001; 75: 22-23.

7. Leaman DJ. Medicinal plant conservation. newsletter of the medicinal plant specialist group of the IUCN species survival commission. Silphion. 2006.

8. Zargai A. Medicinal plants. Valume 2. Tehran: The Tehran university press. 1996.

9. Ghasemi Arian A, Izadi J, Saeid Afkhamoshoara MR, Ejlali R. [Germination improvement in seeds of gum ammoniac (*Dorema ammoniacum*)]. Journal of Range and Desert Reseach. 2009; 15: 455-463. (Persian).

10. Irvani N, Solouki M, Omidi M, Zare AR, et al. Callus induction and plant regeneration in *Dorem ammoniacum*., an endangered medicinal plant. Plant Cell Tissue Organ Culture . 2010; 100: 293–299.

11. Chandrasekhar T, Mohammad Hussain T, Rama Gopal G, Srinivasa Rao JV. Somatic embryogenesis of Tylophora indica (Burm.f.) Merril, an important medicinal plant. Int. J. Appl. Sci. Eng. 2006; 4(1): 33-40.

12. Yeung E. Histological and histochemical staining procedures. In: Vasil IK. (eds). Cell culture and somatic cell genetics of plants. Orlando Florida: Academics press. 1984; 689-697.

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

14 .Merkle SA, Parrott WA, Flinn BS. Morphogenic aspects of somatic embryogenesis, In vitro embryogenesis in plants. The Netherland. Kluwerr Academic Publisher. 1995.

15. Hunault, G, Desmarest, P, Manoir, J.D. *Foeniculum vulgare* Miller: cell culture, regeneration and the production of anethole In: Bajaj YPS Ed. Biotechnology in Agriculture and Forestry, Medicinal and Aromatic Plants. Berlin, Germany: Springer-Verlag; 1989; 185-212.

16. Wakhlu AK, Sharma RK. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Heracleum candicans.* Wall. Plant Cell Rep. 1998; 17: 866–869.

17. Imani J, Thi LT, Langen G, Arnholdt-Schmitt B, et al. Somatic embryogenesis and DNA organization of genomes from selected Daucus species. Plant Cell Rep. 2001; 20: 537–541.

18. Tawfik Azza A, Noga G. Cumin regeneration from seedling derived embryogenic callus in response to amended kinetin. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 2002; 69: 35-40.

19. Hassani B, Saboora A, Radjabia T, Fallah Husseini H. Somatic Embryogenesis of Ferula assa-foetida. JUST. 2008; 33(4): 15-23.

20. Pasternak TP, Prinsen E, Ayaydin F, Miskolczi P, et al. The Role of Auxin, pH, and Stress in the Activation of Embryogenic Cell Division in Leaf Protoplast-Derived Cells of Alfalfa. Plant Physiol. 2002; 129: 1–13.

21. Pola SR, Sarada MN. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration in Sorghum bicolor (L.) Moench, from leaf segments. J. Cell Mol. Biol. 2006; 5: 99-107.

22. Zimmerman JL. Somatic Embryogenesis: A Model for Early Development in Higher Plants. Plant Cell. 2003; 5:1411-1423.

23. Onay A. Histology of Somatic Embryogenesis in Cultured Leaf Explants of Pistachio (Pistacia vera L). Turk J Bot. 2000; 24: 91–95.

Journal of Cell & Tissue (JCT) *Research Article*
Spring 2012; 3(1): 21-27

The Stages of Somatic Embryogenesis Derived from Zygotic Embryo of *Dorema ammoniacum* D.

Ghasemian Kh, M.Sc.[1], Nazeri S, Ph.D.[1*], Chehregani Rad A, Ph.D.[2], Mirzaie Asl A, Ph.D.[1]

1. Hamedan, Bu-Ali-Sina University, Faculty of Agriculture, Department of Biotechnology

2. Hamedan, Bu-Ali-Sina University, Faculty of Science, Department of Biology

* Email corresponding author: snblnazeri@yahoo.com

Received: 26 Dec. 2011 Accepted: 6 Feb. 2012

Abstract

Aim: The aim was to study the histology of somatic embryogenesis stages in *Dorema ammoniacum* D. using tissue cultures as an efficient method for propagation of the plants with restriction in cultivation.

Material and methods: Various explants were cultured on MS (Murashige and Skoog) medium containing 30 g l^{-1} sucrose and 7 g l^{-1} agar as well as supplemented with different concentrations of auxin and cytokinin. After eight weeks, different stages of development of somatic embryos in embryogenic callus were evaluated using histological method.

Results: Out of different explants, only zygotic embryo was able to induce embryogenic callus. Presence of NAA (α-Naphthaleneacetic acid) increased callus induction and somatic embryogenesis. The highest callus formation was observed in MS medium supplemented with 1 mg/L NAA and 0.5 mg/L BA (N6-Benzyladenine). Different stages of somatic embryos including: globular, heart-shaped, torpedo and cotyledonus stages were observed in the prepared sections of callus.

Conclusion: Using zygotic embryo the *in vitro* somatic embryogenesis of *Dorema ammoniacum* D. was possible. In addition the histological examinations of embryogenic callus showed the existence of the different stages of embryonic development.

Keywords: *Dorema ammoniacum*, Histology, Somatic embryogenesis