

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

خدیجه قاسمیان^۱، سنبل ناظری^{۱*}، عبدالکریم چهرگانی راد^۲، اصغر میرزایی اصل^۱ Ph.D.

۱- همدان، دانشگاه بوعلی سینا همدان، دانشکده کشاورزی، گروه بیوتکنولوژی

۲- همدان، دانشگاه بوعلی سینا همدان، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: snblnazeri@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۱۱/۱۷

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۱۰/۵

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 نمو رویان‌های سوماتیکی پس از تهیه برش‌های میکروتومی از کالوس‌ها و با استفاده از روش بافت‌شناسی بررسی شد.

نتایج: از میان ریزنمونه‌های مختلف مورد بررسی، رویان‌های بذری موفق به تشکیل کالوس‌های رویان‌زا شدند. هورمون اکسین به طور موثر میزان رویان‌زایی 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، رویان‌زایی سوماتیکی در گیاه وشا در شرایط آزمایشگاهی و با استفاده از رویان بذری این گیاه امکان‌پذیر است و بررسی‌های بافت‌شناسی کالوس‌های رویان‌زا، وجود مراحل مختلف رویانی را تایید نمود.

واژگان کلیدی: وشا، رویان‌زایی سوماتیکی، بافت‌شناسی

مقدمه

رویان زایی 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 می کند (۲۰۱). 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 گوچه ای، رویان قلبی شکل، رویان اژدری و لپه ای است که از مسیری غیرجنسی رخ می دهد (۴ و ۳). مطالعه درباره رویان زایی سوماتیکی جنبه های علمی و کاربردی زیادی دارد. رویان زایی سوماتیکی به دلیل امکان تولید بیشتر و تکثیر مداوم توده رویان زاء، 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 روش های 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 می روید 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، ضد تشنج، ضد میکروب و ضد اکسیداسیون می باشد (۷ و ۸). در سال های اخیر به علت استفاده بی رویه و برداشت های نامناسب، رویشگاه های این گیاه در کشور تخریب شده و گیاه در معرض خطر انقراض قرار گرفته است (۹). گیاه وشا به طور مرسوم توسط بذر تکثیر می شود 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 از دیادی از طریق رویان زایی سوماتیکی روشی است که می تواند به طور گسترده برای کوتاه کردن چرخه جنسی و غلبه بر مشکلات مربوط به بذر به کار رود (۱۱).

مواد و روش ها

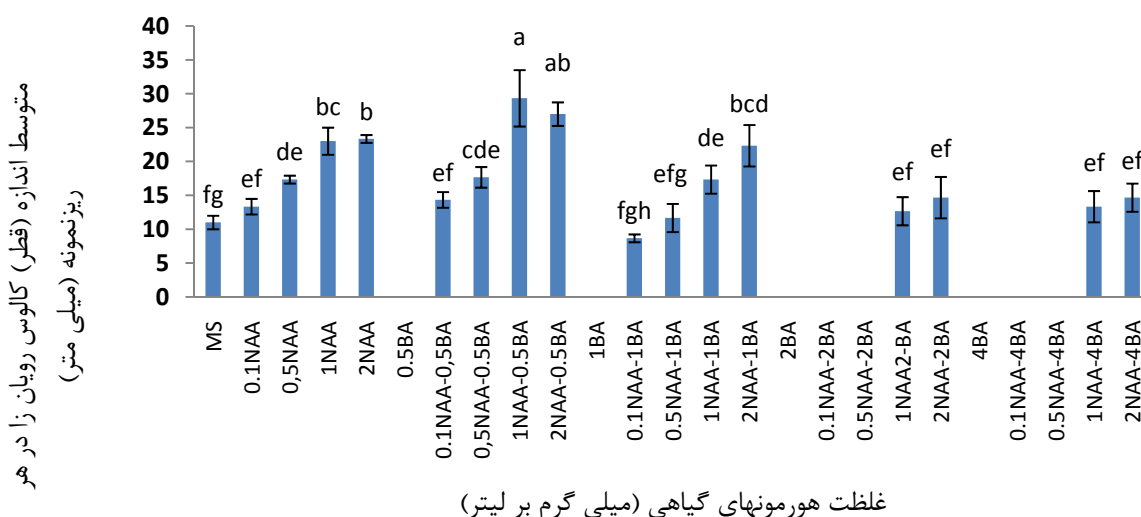
بذرهای گیاه وشا از رویشگاه طبیعی آن، استان فارس، شهرستان آباده، جمع آوری شدند. به منظور ضد عفونی، به مدت یک دقیقه در اتانول ۷۰ درصد قرار گرفتند و سپس ۳ بار با آب مقطر استریل به خوبی شستشو داده شدند. پس از آن به مدت ۱۵ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد قرار گرفته و در

نهایت با آب مقطر، سه بار، شستشو شدند تا تمامی آثار محلول ضد عفونی کننده از بین برود. ضد عفونی تحت شرایط استریل و زیر هود صورت گرفت. بذرها به دو صورت مورد استفاده قرار گرفتند: در گروه اول بذرها مستقیماً جهت جوانه زنی به پتری دیش های حاوی محیط MS ۱/۴ (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 ضد عفونی 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 بذرها فوق بیرون آورده شدند. از قسمت های مختلف (ریشه چه، هیپوکوتیل و کوتیلدون) گیاهچه های حاصله و همچنین از رویان های بذری خارج شده از بذرها، به عنوان ریز نمونه استفاده شد. ریز نمونه ها بر روی محیط های با پایه MS حاوی ۳۰ گرم بر لیتر ساکارز و ۷ گرم بر لیتر آگار به همراه هورمون های α -NAA (۲ میلی گرم در 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 نمونه ها بر روی محیط های قبلی صورت گرفت. دو هفته بعد، واکشت دوم نمونه ها به محیط کشت مشابه ولی فاقد هورمون انجام شد. در مراحل مختلف، محیط های کشت در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد و فشار ۱/۵ اتمسفر به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو شدند و کشت ها در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و در شرایط ۱۶ ساعت روشنایی در اتاق رشد نگهداری شدند. آزمایش در قالب طرح کاملاً 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 کالوس های ایجاد شده، مراحل مختلف رویانی (کروی، قلبی، اژدری و کوتیلدونی) و مورفولوژی ظاهری رویان ها در کالوس ها، 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 زاء به مدت ۲۴ ساعت در محلول تثبیت کننده FAA (فرمالدئید، استیک اسید، اتانول ۱۰۰ درصد به ترتیب با

هماتوکسیلین - اتوزین برای رنگ آمیزی نمونه‌ها استفاده شد (۱۲) و سپس لام‌ها به وسیله 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.

نسبت‌های ۱:۲:۱۷) قرار داده شدند. پس از شستشو، با درجات رو به افزایش اتانول آب‌گیری شدند و در آخر اشباع سازی به کمک مخلوط تولون- پارافین و سپس پارافین خالص صورت گرفت. نمونه‌ها در پارافین قالب‌گیری شدند و با استفاده از دستگاه میکروتوم برش‌های ۸-۷ میکرومتری از بافت‌ها تهیه شد. برش‌ها بر روی لام‌های شیشه‌ای چسبانیده شده و از تولون به عنوان حلال پارافین استفاده شد. پس از زدودن پارافین، از



غلظت هورمونهای گیاهی (میلی گرم بر لیتر)

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 \pm انحراف معیار سه تکرار است.)

نتایج

رویان‌ها بر روی کالوس‌ها به میزان بیشتری مشاهده شدند. شکل ۲ الف-د، مراحل مختلف رشدی رویان‌های سوماتیک را بر روی 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 ۵۲).

مطالعات بافت‌شناسی، 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 نمو 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 ۳ الف)، در مقابل، سلول‌های رویان‌زا سلول‌هایی به هم فشرده، کوچک با هسته بزرگ و سیتوپلاسم متراکم بودند

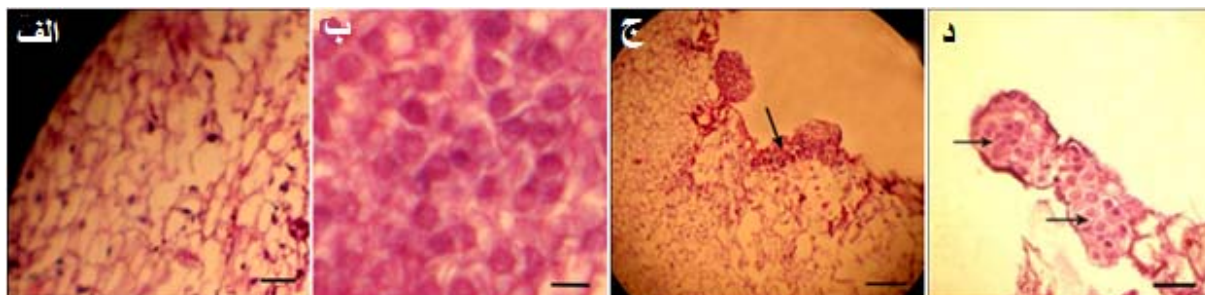
۸ هفته پس از کشت، کالوس‌های حاصل از ریز نمونه‌های (Explants) مختلف در محیط کشت پایه MS محتوی هورمون‌های بنزیل آمینو پورین و نفتالین استیک اسید، با استفاده از استریومیکروسکپ مورد مطالعه و ارزیابی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که کالوس‌های رویان‌زا تنها از ریز نمونه‌های حاصل از رویان زیگوتی، به وجود آمدند. 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 رویان‌زا 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 تنظیم‌کننده‌های رشد، مراحل بلوغ

به این ترتیب ساختار اولیه لپه‌ها تشکیل و رویان‌ها ظاهری قلبی شکل پیدا کردند. شکل ۴ مرحله ابتدایی تری از رویان قلبی و شکل ۴ج مرحله پیشرفته تری از ساختار 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 رویان‌های 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 ۴ه).

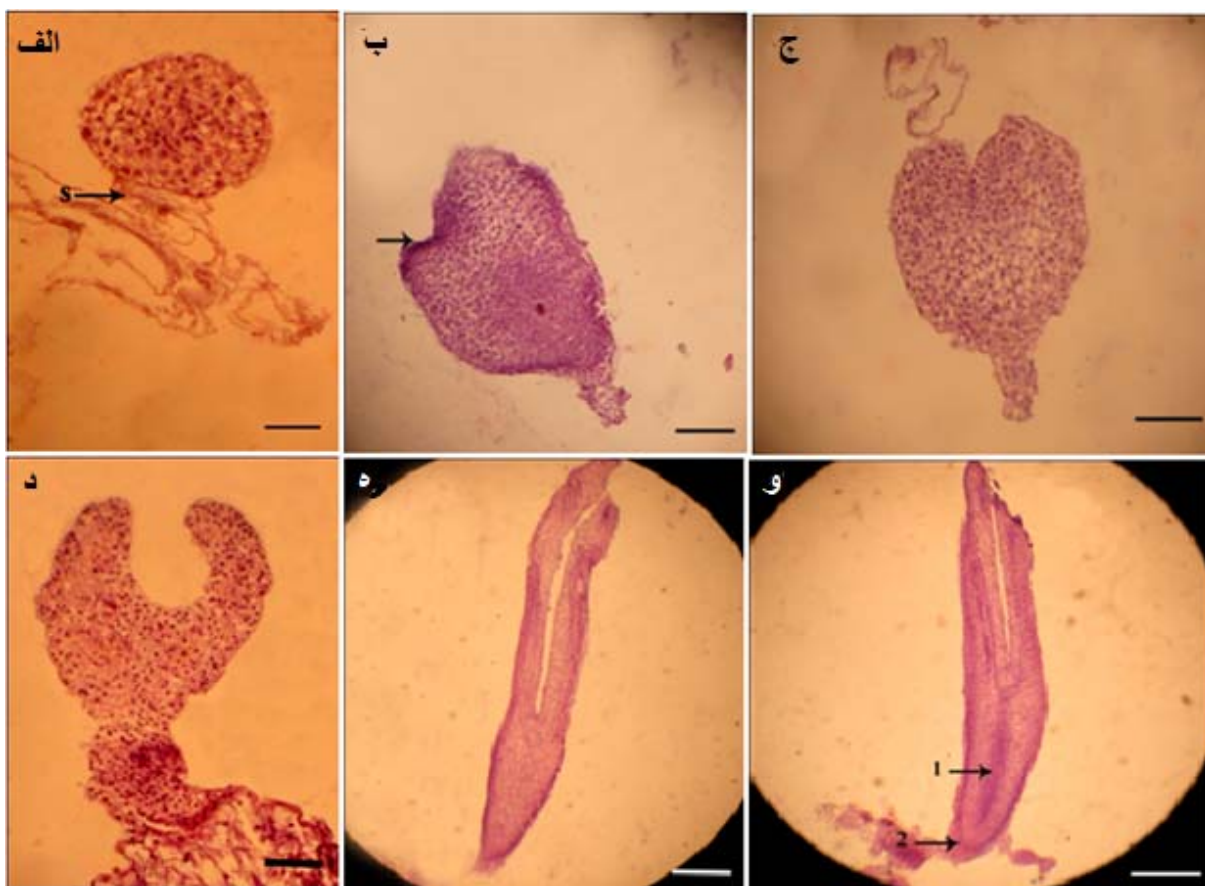
(شکل ۳ب). در حاشیه کالوس‌های رویان‌زاه، نواحی با فعالیت مریستمی قابل رویت بودند که در این نواحی تقسیمات متوالی منجر به تشکیل رویان‌های سوماتیکی می‌شوند (شکل ۳ج). سلول‌های رویانی در برش‌ها، سلول‌های کوچک به هم فشرده بودند که سیتوپلاسم آنها شدیداً رنگ آمیزی شده و حجم بالایی هسته در آنها مشخص بود. این سلول‌های 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 ۴الف). 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.



شکل ۲: مشاهده استریومیکروسکوپی مراحل نمو 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 (سوسپانسیون، S) (خط نشانه = ۴۰۰ میکرومتر). ب) مراحل ابتدایی‌تر تکوین رویان قلبی شکل با سلول‌های 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 ابتدایی‌تر (خط نشانه = ۵۰۰ میکرومتر). و) مقطعی از رویان لپه ای که در آن فلش ۱ دستجات آوندی و فلش ۲ کلاهدک ریشه را نشان می‌دهد (خط نشانه = ۵۰۰ میکرومتر).

بحث

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 می‌توان به سطح هورمون‌های درونی ریز نمونه‌ها نسبت داد و اینکه سطح هورمون‌های درون‌زا

در این مطالعه اثر نوع بافت و غلظت‌های مختلف هورمونی بر رویان‌زایی سوماتیکی از گیاه وشا مورد مطالعه قرار گرفت. اگرچه همه سلول‌های گیاه حاوی تمام اطلاعات ژنتیکی لازم برای به

اکسین و سیتوکینین (۰/۵ میلی گرم بر لیتر BA و ۱ میلی گرم بر لیتر NAA)، می توان سیستم رویان زایی سوماتیک گیاه وشا را فعال نمود و رویان هایی 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 آزمایشگاه های بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی و سلولی ملکولی دانشکده علوم دانشگاه بوعلی سینا، در فراهم نمودن امکانات و تجهیزات در انجام این پژوهش تشکر می نمایند.

منابع

1. Ammirato PV, Evans DA, Sharp WR, Yamado Y. Embryogenesis. Plant Cell Culture. 1983; 1: 82-123.
2. Vicent 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 K.J. 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. Volume 2. Tehran: The Tehran university press. 1996.

با استعداد رویان زایی ریز نمونه ها 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 کالوس های رویان زا و تولید رویان است که این نتیجه با گزارشات پیشین در مورد نحوه رویان زایی گیاهان هویج، گلپر و زیره هم خوانی دارد (۱۶، ۱۷، 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 میلی گرم بر لیتر)، حداکثر تولید کالوس های رویان زا را به دنبال داشت (شکل ۱). سلول ها به هورمون ها گیاهی به ویژه اکسین و سیتوکینین برای فعال شدن سلول های سوماتیک و ورود به چرخه سلولی نیازمندند (۲۰ و ۲۱). با قرار گرفتن کالوس های تشکیل شده در محیط های القای کالوس، بر روی محیط بدون هورمون، بلوغ رویان های سوماتیک مشاهده شد. رشد و نمو رویان های سوماتیک بر روی محیط فاقد هورمون، پاسخ متداولی در بین تعدادی از گونه های چتریان است (۱۸). انتقال رویان های بالغ به محیط جوانه زنی نشان داد که آن ها توانایی تشکیل گیاهچه های طبیعی را دارند. در بررسی حاضر اشکال مختلف رویان های سوماتیک با مطالعات بافت شناختی مطالعه شدند. در تمام سلول های رویان زا ویژگی های مشابهی مشاهده گردید: اندازه کوچک، محتوای سیتوپلاسمی غنی و متراکم، هسته بزرگ، واکوئل کوچک و دانه های نشاسته کم. یافته های ما با گزارشات پیشین هم سویی دارد (۲۲). تراکم هسته سلول های رویانی به این دلیل است که رویان های سوماتیک از سلول های کوچکی که توسط تقسیم نامتقارن سلول اولیه ایجاد شده اند تشکیل می شوند (۲۳). کالوس های رویان زا برای مطالعات بافت شناسی در تعدادی از سیستم های گیاهی خانواده چتریان و سایر گیاهان استفاده شده است. مطالعه بافت شناسی سیستم رویان زایی سوماتیکی در این پژوهش، وجود و شباهت مراحل مختلف رویان زایی سوماتیکی با تکوین رویان حاصل از زیگوت بذر را نشان داد.

نتیجه گیری

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که با استفاده از ریز نمونه مناسب (رویان زیگوتی) و ترکیب غلظت های موثر هورمون های

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 *Dorema 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 Academic 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 Hussein H. Somatic Embryogenesis of *Ferula assafoetida*. 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.

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