

Optimization of Direct Somatic Embryogenesis in *Ferula gummosa*

Arman Haghazari^{1*} , Mohammad Reza Azimi², Ali Amarlou³

^{1*}Corresponding author MSc Graduate in plant genetics, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran

Email: arman.2423224@gmail.com

² Associate professor, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran.

³ Associate professor, Research Institute of Modern Biological Techniques, University of Zanjan, Zanjan, Iran

Received: 2024/9/23

Accepted: 2024/12/18

Abstract

Background and Objective

Direct somatic embryogenesis is a crucial technique in plant biotechnology that facilitates rapid propagation, genetic improvement, and conservation of endangered species. Unlike indirect embryogenesis, this method forms embryos directly from somatic cells without passing through a callus phase, reducing the likelihood of unwanted genetic alterations. Due to its efficiency, somatic embryogenesis is considered a superior propagation method and is influenced by various factors, including plant growth regulators. *Ferula gummosa*, commonly known as galbanum, is an important medicinal plant known for its valuable secondary metabolites. However, its production is facing challenges due to overharvesting and germination difficulties. These issues threaten its sustainability, making somatic embryogenesis a promising approach for cryopreservation and sustainable utilization. The present study aims to investigate the feasibility of direct somatic embryogenesis in *F. gummosa* and evaluate the effects of plant growth regulators on the induction and development of embryos.

Materials and Methods

To establish optimal conditions for direct somatic embryogenesis, *F. gummosa* seeds were collected from Abadeh, Fars Province, and stored at 4°C to preserve their viability and prevent dormancy-related decline. The seeds were sterilized, and their embryos were cultured in MS1/2 medium. After a month of cultivation, the resultant seedlings were used to prepare leaf explants for somatic embryogenesis. Leaf explants, approximately one centimeter in size, were cultured in MS1/2 medium supplemented with varying concentrations of NAA and BAP hormones. These hormonal treatments were maintained at 20°C in complete darkness for three months to prevent chlorophyll formation, thereby promoting somatic embryogenesis. The number of embryos formed in each experimental condition was recorded. The study employed a 3×3 factorial experimental design within a completely randomized design (CRD) framework, with three replications per treatment. Data analysis was performed using SPSS software to identify statistically significant variations among treatments.

Results



Copyright: © 2025 by the authors. This is an open access, peer-reviewed article published by Research Institute of Forests and Rangelands (<http://ijrfpbgr.areeo.ac.ir/>) and distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

The study revealed that NAA and BAP effectively induce somatic embryogenesis in *F. gummosa*. Variance analysis demonstrated that NAA concentration ($P < 0.01$), BAP concentration ($P < 0.05$), and their interaction ($P < 0.05$) significantly influenced embryo formation. Comparative analysis of means indicated that the culture medium containing 0.5 mg/L NAA and 0.5 mg/L BAP resulted in the highest number of somatic embryos, making it the most effective combination for embryo induction. Additionally, the medium containing 1 mg/L NAA and 1 mg/L BAP provided favorable conditions for embryo development, yielding stronger embryos compared to other treatments. Further analysis identified 1 mg/L NAA and 0.5 mg/L BAP as the optimal concentration for embryo induction and development. These findings highlight the significance of plant growth regulators in somatic embryogenesis and emphasize the potential for refining culture conditions to improve embryo yield and quality.

Conclusion

The results indicate that direct somatic embryogenesis using NAA and BAP is an efficient method for propagating *F. gummosa*. Given the prolonged seed dormancy and endangered status of this plant, somatic embryogenesis provides a viable approach for large-scale propagation, conservation of genetic resources, and restoration of natural populations. The study underscores the importance of optimizing growth regulator concentrations for improved embryogenesis and suggests that further research could explore additional factors influencing the process. These findings contribute to advancing propagation techniques for endangered medicinal plants and serve as a valuable foundation for future studies in plant tissue culture and biotechnology. By refining propagation methods, researchers and cryopreservation can ensure sustainable utilization of *F. gummosa* while preserving its genetic integrity and medicinal value.

Keywords: Micropropagation, Plant Growth Regulators, Somatic Embryogenesis, Tissue Culture

بهینه‌سازی جنین‌زایی سوماتیکی مستقیم در باریجه (*Ferula gummosa*)

آرمان حق نظری^{۱*}، محمدرضا عظیمی^۲ و علی عمارلو^۳

^{۱*}نویسنده مسئول، کارشناس ارشد رشته ژنتیک و به‌نژادی گیاهی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران پست‌الکترونیک: arman.2423224@gmail.com

^۲دانشیار، گروه تولید و ژنتیک گیاهی دانشکده کشاورزی دانشگاه زنجان، زنجان، ایران

^۳دانشیار، پژوهشکده فناوریهای نوین زیستی دانشگاه زنجان، زنجان، ایران

پذیرش: آذر ۱۴۰۳

دریافت: مهر ۱۴۰۳

چکیده

سابقه و هدف:

جنین‌زایی سوماتیکی مستقیم، روشی کلیدی در بیوتکنولوژی گیاهی برای تکثیر سریع، بهبود ژنتیکی و حفاظت از گونه‌های در معرض خطر است که در آن جنین‌ها به‌طور مستقیم از سلول‌های سوماتیکی و بدون مرحله کالوس تشکیل می‌شوند. این روش با کاهش احتمال تغییرات ژنتیکی ناخواسته، مزایایی نسبت به جنین‌زایی غیرمستقیم دارد و به عوامل مختلفی از جمله تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی وابسته است. گیاه باریجه (*Ferula gummosa*) به دلیل متابولیت‌های ثانویه ارزشمندش اهمیت دارویی دارد، اما برداشت بی‌رویه و خواب بذر، تولید آن را محدود کرده است. جنین‌زایی سوماتیکی راهکاری برای حفاظت و بهره‌برداری پایدار از این گیاه است و هدف این مطالعه، بررسی امکان انجام این روش در باریجه و ارزیابی اثر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر القا و توسعه جنین است.

مواد و روش‌ها:

در این پژوهش، شرایط مناسب برای القاء جنین‌زایی سوماتیکی مستقیم در گیاه باریجه (*F. gummosa*) بررسی شد. بذرهای گیاه از شهرستان آباء، استان فارس جمع‌آوری و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید تا از کاهش قدرت جوانه‌زنی جلوگیری شود. پس از سترون‌سازی، جنین‌های بذر در محیط کشت MS1/2 کشت شده و پس از یک ماه، گیاهچه‌های حاصل برای تهیه ریزنمونه‌های برگ برای جنین‌زایی سوماتیکی مورد استفاده قرار گرفتند. ریزنمونه‌های برگ با ابعاد حدود یک سانتی‌متر در محیط کشت MS1/2 حاوی غلظت‌های مختلفی از هورمون‌های اکسین (NAA) و سیتوکینین (BAP) کشت شدند. تیمارهای هورمونی مختلف به مدت سه ماه در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد و در تاریکی نگهداری شدند تا از تشکیل کلروفیل جلوگیری شود. در این آزمایش تعداد جنین‌های حاصل از هر محیط مورد مطالعه قرار گرفت. آزمایش به صورت فاکتوریل ۳×۳ در قالب طرح کاملاً تصادفی (CRD) با سه تکرار انجام شد و داده‌ها با نرم‌افزار SPSS تحلیل شدند.

یافته‌ها:

هورمون‌های NAA و BAP در القای جنین‌زایی سوماتیکی در باریجه مؤثر بودند. تجزیه واریانس نشان داد که اثر غلظت‌های NAA (در سطح احتمال ۱ درصد) و BAP (در سطح احتمال ۵ درصد) و اثر متقابل آنها (در سطح احتمال ۵ درصد) معنی‌دار بود. محیط کشت حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP بهترین نتیجه را در القای جنین‌زایی سوماتیکی مستقیم داشت و بیشترین تعداد جنین‌ها را ایجاد کرد. همچنین محیط کشت حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP نیز محیط مناسبی بود و جنین‌های قوی‌تری تولید کرد. تجزیه میانگین اثر هورمون NAA غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر و هورمون BAP غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر را به عنوان غلظت مناسب معرفی کرد.

نتیجه‌گیری:

القای جنین‌زایی سوماتیکی مستقیم با استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد NAA و BAP، روشی کارآمد برای تکثیر گیاه باریجه بود. با توجه به خواب طولانی بذر این گیاه و قرار گرفتن آن در معرض خطر انقراض، این روش تکثیر می‌تواند به عنوان یک راهکار مؤثر برای

تولید انبوه، حفظ ذخایر ژنتیکی در فراسرد (Cryopreservation) و احیای جمعیت‌های طبیعی آن مورد استفاده قرار گیرد. این یافته‌ها، گامی مهم در راستای توسعه روش‌های تکثیر و حفاظت از گیاهان دارویی در معرض خطر انقراض محسوب می‌شود و می‌تواند به‌عنوان مبنایی برای تحقیقات بیشتر در این زمینه استفاده شود.

واژه‌های کلیدی: تنظیم‌کننده‌های رشد، جنین‌زایی سوماتیکی، ریزازدیادی، کشت بافت

مقدمه

جنین‌زایی سوماتیکی مستقیم، یک روش کلیدی در بیوتکنولوژی گیاهی است که در آن جنین‌ها به‌طور مستقیم از سلول‌های سوماتیکی و بدون عبور از مرحله کالوس تشکیل می‌شوند (Almemary, 2020; Tomiczak et al., 2019). این فرایند در تکثیر رویشی سریع، بهبود ژنتیکی و حفاظت از گونه‌های گیاهی، به‌ویژه گونه‌های نادر، در معرض خطر یا مقاوم به روش‌های سنتی اصلاح‌نات، اهمیت بسزایی دارد (Nic-can et al., 2015).

جنین‌زایی سوماتیکی به‌عنوان روشی کارآمد برای تکثیر گیاه، بیش از ۲۵ سال است که در تیره Gentianaceae مورد مطالعه قرار گرفته است (Tomiczak et al., 2019). محققان با استفاده از این روش می‌توانند بر مشکلات مربوط به روش‌های سنتی اصلاح‌نات و تکثیر غلبه کرده، تولید گیاهانی با صفات مطلوب را تسریع نمایند و زمینه را برای تولید انبوه گیاهچه‌ها در کشاورزی و باغبانی فراهم کنند (Faisal et al., 2021). جنین‌زایی سوماتیکی مستقیم در مقایسه با نوع غیرمستقیم آن مزایایی دارد، ازجمله کاهش احتمال ایجاد تغییرات ژنتیکی ناخواسته (تنوع سوماکلونال)، کوتاه شدن دوره‌های کشت و امکان حفظ یکنواختی ژنتیکی در گیاهان باززایی شده (Simonović et al., 2020). از آنجا که در این روش مرحله کالوس‌زایی حذف می‌شود، احتمال بروز جهش‌های ژنتیکی و ناهنجاری‌های کروموزومی که در طول کشت طولانی مدت کالوس ممکن است رخ دهند، به حداقل می‌رسد. در نتیجه، گیاهان باززایی شده از لحاظ ژنتیکی به بافت اولیه گیاه والد شباهت بیشتری خواهند داشت (Mondal & Mondal, 2020). القای جنین‌زایی سوماتیکی مستقیم به عوامل مختلفی ازجمله تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی،

تیمارهای تنش و دستکاری ژنتیکی بستگی دارد (Guan et al., 2016). تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مانند اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها، با اثرگذاری بر تمایز، تکثیر و توسعه سلول‌ها، نقش مهمی در شروع و تنظیم فرایند جنین‌زایی سوماتیکی ایفا می‌کنند (Giri & Tamta, 2013). البته شناخت سازوکارهای مولکولی دخیل در جنین‌زایی سوماتیکی مستقیم، برای بهینه‌سازی روش‌ها و گسترش کاربرد آن در گونه‌های گیاهی مختلف ضروریست.

گیاه *F. gummosa* (باریجه) یک گیاه علفی چندساله است که بومی ایران و بخش‌هایی از آسیای مرکزی است (Karamzadeh et al., 2018). این گونه به‌دلیل داشتن متابولیت‌های ثانویه ارزشمند، به‌ویژه صمغ رزین، دارای اهمیت دارویی است. گیاه باریجه منبع غنی از ترکیبات کومارینی، ترپنوئیدی و فیل پروپانوئیدی است که خواص دارویی متنوعی ازجمله ضدسرطانی، ضدالتهابی، آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی دارند (Eizadifard et al., 2023). این ترکیبات ارزشمند، باریجه را به گزینه‌ای مناسب برای استفاده در صنایع دارویی و غذایی تبدیل کرده است و تلاش‌های پژوهشی برای افزایش تولید و بهره‌برداری از آن را افزایش داده است.

یکی از چالش‌های اصلی در تولید صمغ رزین، برداشت بی‌رویه این گیاه از رویشگاه‌های طبیعی است که می‌تواند اثرهای مخربی بر جمعیت‌های گیاهی و اکوسیستم‌ها داشته باشد. علاوه بر این، خواب بذر و درصد جوانه‌زنی پایین نیز از دیگر مشکلات مربوط به این گیاه است (Nadjafi et al., 2006; Salehi et al., 2019). جنین‌زایی سوماتیکی راهکاری امیدبخش برای حفاظت و بهره‌برداری پایدار از *F. gummosa* است. در این روش، سلول‌های سوماتیکی به

شود.

در مرحله بعد، جنین‌ها در شرایط کاملاً سترون (زیر هود لامینار) از بذر جدا شدند و در محیط کشت MS1/2 (نصف غلظت محیط کشت موراشیگه و اسکوگ) کشت گردیدند. پس از کشت جنین‌ها، پلیت‌های حاوی محیط کشت در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد و در اتاقک رشد (Growth Chamber) نگهداری شدند. پس از گذشت یک ماه از کشت بذرها و رشد گیاهچه‌ها، از این گیاهچه‌ها به‌عنوان منبع ریزنمونه برای انجام آزمایش جنین‌زایی سوماتیکی استفاده شد.

جنین‌زایی سوماتیکی:

برای القاء جنین‌زایی سوماتیکی مستقیم، از بافت برگ گیاهچه‌های یک ماهه (که در مرحله قبل به‌دست آمده بودند) ریزنمونه‌هایی به ابعاد تقریبی یک سانتی‌متر تهیه شد. انتخاب بافت برگ به‌دلیل سهولت دسترسی و توانایی بالای این بافت در پاسخ به تیمارهای القاء جنین‌زایی انجام گردید. ریزنمونه‌های برگ‌ی تهیه شده، به‌منظور القاء جنین‌زایی سوماتیکی، در محیط کشت MS1/2 حاوی غلظت‌های مختلفی از هورمون‌های تنظیم‌کننده رشد گیاهی کشت شدند. در این آزمایش از دو هورمون NAA (نفتالین استیک اسید) به‌عنوان یک اکسین و BAP (بنزیل آمینوپورین) به‌عنوان یک سیتوکینین استفاده شد. غلظت‌های مورد استفاده از هورمون NAA شامل ۰، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر و غلظت‌های مورد استفاده از هورمون BAP نیز شامل ۰، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر بود. ترکیب‌های مختلف این غلظت‌ها به‌منظور یافتن بهترین تیمار هورمونی برای القاء جنین‌زایی سوماتیکی مورد بررسی قرار گرفتند. ریزنمونه‌ها به‌مدت سه ماه در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد و در شرایط تاریکی به‌دلیل جلوگیری از تشکیل کلروفیل و بهبود فرایند القاء جنین‌زایی در انکوباتور نگهداری شدند.

طرح مورد استفاده و آنالیز آماری:

این آزمایش به صورت فاکتوریل ۳×۳ در قالب طرح کاملاً تصادفی (CRD) با سه تکرار انجام شد. فاکتور اول

جنین تبدیل می‌شوند. جنین‌زایی سوماتیکی مستقیم در *F. gummosa* با فراهم کردن امکان تکثیر سریع و حفاظت از ذخایر ژنتیکی، نویدبخش غلبه بر خواب بذر این گیاه است. هدف از این مطالعه، بررسی امکان انجام جنین‌زایی سوماتیکی مستقیم در *F. gummosa* و ارزیابی اثر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر القا و توسعه جنین بود.

مواد و روش‌ها

بذرها و محل جمع‌آوری آنها:

به‌منظور شناسایی محیط کشت مناسب برای القاء جنین‌زایی سوماتیکی مستقیم در گیاه باریجه (*F. gummosa*)، آزمایشی در پژوهشکده فناوری‌های نوین زیستی دانشگاه زنجان انجام شد. برای انجام این آزمایش، از اکوتیپ فارس گیاه باریجه استفاده گردید. بذرها از شهرستان آباد، واقع در استان فارس، جمع‌آوری شدند. پس از جمع‌آوری، بذرها به‌منظور حفظ کیفیت و جلوگیری از کاهش قدرت جوانه‌زنی، در یخچال و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردیدند. این شرایط دمایی به حفظ رطوبت مناسب و کاهش فعالیت‌های متابولیکی بذرها کمک کرده و از تخریب و فساد آنها جلوگیری می‌کند.

کشت جنین برای دستیابی به گیاهچه:

کشت جنین بذرها به‌منظور دستیابی به گیاهچه‌های اولیه که به‌عنوان منبع ریزنمونه برای القاء جنین‌زایی سوماتیکی مستقیم مورد استفاده قرار می‌گیرند، انجام شد. ابتدا بذرها به‌مدت ۲۴ ساعت (یک روز کامل) در آب مقطر سترون قرار داده شدند. این عمل به‌منظور نرم شدن پوسته بذر و تسهیل فرایند جداسازی جنین انجام شد. پس از آن بذرها وارد مرحله سترون‌سازی سطحی شدند. بدین منظور، ابتدا بذرها به‌مدت پنج دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد قرار داده شدند. سپس به‌مدت یک دقیقه در الکل اتانول ۷۰ درصد غوطه‌ور گردیدند. پس از انجام سترون‌سازی، بذرها سه مرتبه با آب مقطر سترون شستشو داده شدند تا بقایای مواد سترون‌کننده از سطح آنها زدوده

سوماتیکی مشاهده شدند. این موضوع می‌تواند نشان‌دهنده ظرفیت ذاتی بافت‌های گیاه باریجه برای جنین‌زایی باشد، اما تعداد و کیفیت جنین‌های تشکیل شده در محیط‌های حاوی هورمون به‌طور چشمگیری تفاوت داشت.

تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۱) حکایت از آن داشت که اثر غلظت‌های مختلف هورمون NAA در سطح احتمال ۱ درصد و اثر غلظت‌های مختلف هورمون BAP در سطح احتمال ۵ درصد روی صفت تعداد جنین تشکیل شده از نظر آماری معنی‌دار بود. این بدان معناست که تغییر در میزان این هورمون‌ها تأثیر قابل توجهی بر تعداد جنین‌های سوماتیکی تولید شده دارد. به عبارت دیگر، با تنظیم دقیق غلظت این هورمون‌ها، می‌توان فرایند جنین‌زایی را بهینه کرد و به نتایج بهتری دست یافت.

غلظت هورمون NAA در سه سطح و فاکتور دوم غلظت هورمون BAP در سه سطح بود. در این آزمایش تعداد جنین‌های سوماتیکی هر نمونه اندازه‌گیری و تحلیل شدند. مقایسه میانگین تیمارها با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال ۵٪ انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS ورژن ۲۶ انجام شد.

نتایج

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که استفاده از غلظت‌های مختلف هورمون‌های NAA و BAP به‌طور مؤثری می‌تواند فرایند جنین‌زایی سوماتیکی را در بافت‌های گیاه باریجه القا کند. نکته قابل توجه آن است که حتی در محیط کشت شاهد که فاقد هرگونه هورمون بود نیز جنین‌های

جدول ۱- تجزیه واریانس صفت تعداد جنین‌های تشکیل شده از هر ریزنمونه

Table 1. Analysis of variance for the number of embryos formed from each subsample.

SOV	df	MS
NAA	2	804.33**
BAP	2	157*
NAA×BAP	4	96.66*
Error	18	27.81

NAA (Naphthaleneacetic acid), BAP (6-Benzylaminopurine)

* و **: به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد

* and **: Significant at 5% and 1% levels of probability levels, respectively

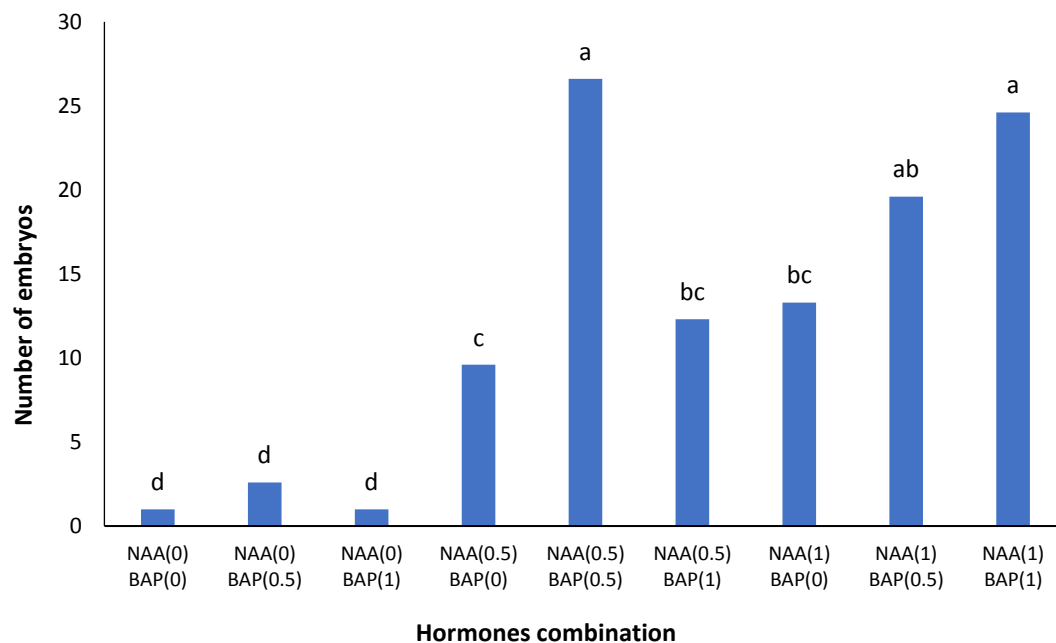
سوماتیکی مستقیم داشته است و بیشترین تعداد جنین‌ها از این محیط به‌دست آمد. این نتیجه نشان می‌دهد که این غلظت‌ها می‌توانند به‌عنوان غلظت‌های بهینه برای القای جنین‌زایی سوماتیکی در گیاه باریجه در نظر گرفته شوند. با این حال، یادآوری می‌شود که محیط کشت حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP نیز نتایج خوبی نشان داد و جنین‌های قوی‌تری ایجاد کرد.

تجزیه میانگین اثر هورمون NAA (شکل ۲) نشان داد که غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر این هورمون برای القای جنین‌زایی سوماتیکی مناسب است. همچنین تجزیه میانگین اثر هورمون BAP (شکل ۳) غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر را به‌عنوان

علاوه بر این، اثر متقابل هورمون‌های NAA و BAP نیز در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار شد. این بدان معناست که تأثیر این دو هورمون بر فرایند جنین‌زایی سوماتیکی مستقل از یکدیگر نیست و ترکیبی از آنها می‌تواند نتایج بهتری را به همراه داشته باشد. به عبارت دیگر، برای دستیابی به حداکثر بازدهی در جنین‌زایی سوماتیکی، باید به اثرهای متقابل این دو هورمون توجه کرد و غلظت‌های آنها را به گونه‌ای تنظیم کرد که اثرهای هم‌افزایی داشته باشند.

مقایسه میانگین داده‌ها (شکل ۱) نشان داد که استفاده از محیط کشت حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP، بهترین نتیجه را در القای جنین‌زایی

غلظت مناسب معرفی کرد.

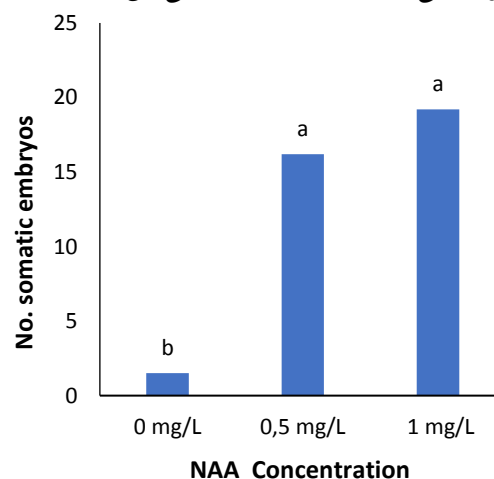


شکل ۱- مقایسه میانگین اثر هورمون‌های NAA و BAP بر تعداد جنین‌های تشکیل شده

Figure 1: Comparison of the average effect of NAA and BAP hormones on the number of embryos formed.

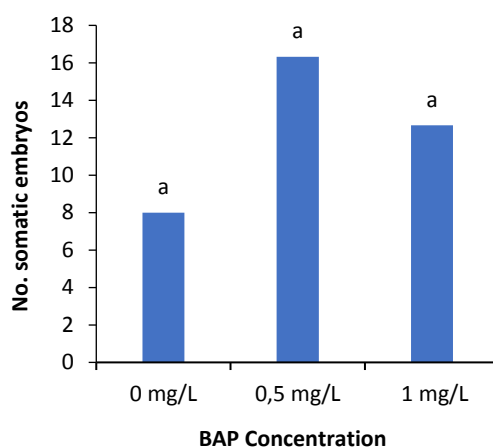
باریجه القا کرد و به تولید تعداد زیادی جنین با کیفیت بالا دست یافت. این یافته‌ها می‌توانند در راستای تولید انبوه و حفظ ذخایر ژنتیکی این گیاه ارزشمند مورد استفاده قرار بگیرند.

به‌طور خلاصه، نتایج این آزمایش نشان می‌دهد که با استفاده از غلظت‌های مناسب هورمون‌های NAA و BAP، می‌توان به‌طور مؤثری فرایند جنین‌زایی سوماتیکی را در گیاه



شکل ۲- مقایسه میانگین اثر هورمون NAA بر تعداد جنین‌های سوماتیکی

Figure 2: Comparison of the averages effect of the hormone NAA on the number of somatic embryos



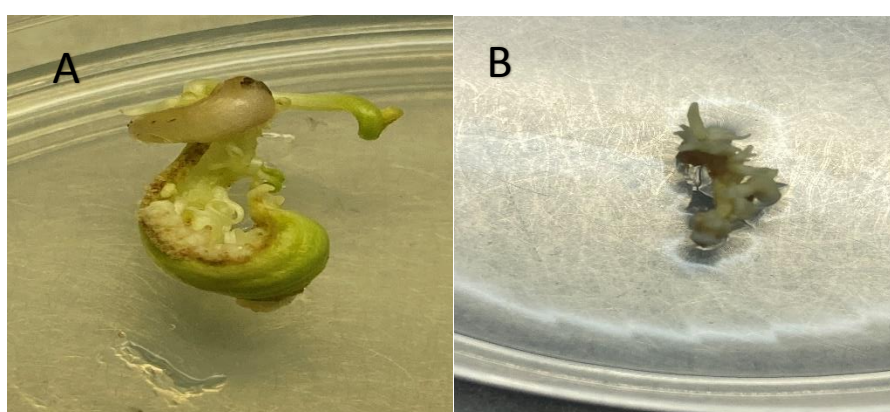
شکل ۳- مقایسه میانگین اثر هورمون BAP بر تعداد جنین‌های سوماتیکی

Figure 3: Comparison of the average effect of the hormone BAP on the number of somatic embryos.



شکل ۴- مراحل جنین‌زایی سوماتیکی: A: مرحله کروی، B: مرحله قلبی‌شکل، C: مرحله اژدری، D: شروع رشد جنین‌ها

Figure 4: Stages of somatic embryogenesis: A. Globular stage - B. Heart-shaped stage - C. Torpedo stage - D. Initiation of embryo to seedling conversion



شکل ۵- A: جنین به‌دست آمده از محیط حاوی ۰/۵ میلی‌گرم BAP و NAA - B: جنین به‌دست آمده از محیط حاوی ۱ میلی‌گرم BAP و NAA

Figure 5: A) Embryo obtained from medium containing 0.5 mg/L BAP and NAA - B) Embryo obtained from medium containing 1 mg/L BAP and NAA

بحث

نتایج حاصل از این پژوهش، تأییدی بر امکان القای جنین‌زایی سوماتیکی مستقیم در گیاه دارویی ارزشمند باریجه (*F. gummosa*) با استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهیست. مشاهده جنین‌های سوماتیکی بر روی ریزنمونه‌های برگ‌ی در محیط کشت پایه MS1/2 فاقد هورمون، ظرفیت جنین‌زایی ذاتی بافت‌های این گیاه را آشکار می‌سازد. این پدیده، اگرچه در مقایسه با تیمارهای هورمونی از نظر کمیت و کیفیت جنین‌های تولیدی محدودتر است اما با گزارش‌های متعددی در زمینه وجود مسیرهای مولکولی و ژن‌های کلیدی دخیل در جنین‌زایی سوماتیکی که حتی در شرایط *in vitro* فاقد محرک‌های هورمونی نیز فعال می‌شوند، همخوانی دارد (Fehér, 2015). به‌طور مثال، بیان ژن‌های LEAFY COTYLEDON (LEC) و FUSCA3 (FUS3) و ABSCISIC ACID (ABI3) INSENSITIVE3 که نقش محوری در تنظیم مراحل اولیه جنین‌زایی دارند، در برخی گونه‌ها بدون نیاز به القای هورمونی مشاهده شده است (Gazzarrini & McCourt, 2001).

تجزیه واریانس داده‌ها، اثر معنی‌دار هورمون‌های اکسین (NAA) و سیتوکینین (BAP) به تنهایی و اثر متقابل آنها بر فرایند جنین‌زایی را تأیید نمود. این یافته، اهمیت تنظیم دقیق نسبت و غلظت این دو گروه هورمونی در بهینه‌سازی مسیر جنین‌زایی در باریجه را برجسته می‌سازد. اکسین‌ها، به‌ویژه NAA، با تحریک تقسیم سلولی و القای تمایز سلول‌های سوماتیکی به سلول‌های جنینی، نقش اساسی در آغاز فرایند جنین‌زایی ایفا می‌کنند (Raghavan, 2004). سیتوکینین‌ها نیز با تأثیر بر تنظیم چرخه سلولی، مورفوز و تشکیل ساختارهای قطبی جنینی، به پیشبرد مراحل بعدی جنین‌زایی کمک می‌کنند (Werner et al., 2003). اثر متقابل این دو هورمون که در این پژوهش نیز مشاهده شد، بیانگر وجود شبکه‌های پیچیده تنظیم هورمونی در کنترل مسیر جنین‌زایی سوماتیکی است (Liao et al., 2018).

نتایج نشان داد محیط کشت حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر

NAA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP، بیشترین تعداد جنین سوماتیکی را تولید می‌کند. این نتیجه، مؤید این نظریه است که نسبت بهینه اکسین به سیتوکینین برای القای جنین‌زایی سوماتیکی مستقیم در هر گونه گیاهی، منحصر به فرد است و به عوامل مختلفی از جمله ژنوتیپ، نوع بافت و شرایط محیطی بستگی دارد (Jiménez, 2005). در غلظت‌های بالاتر NAA و BAP (۱ میلی‌گرم در لیتر) جنین‌ها از بنیه بیشتری برخوردار بودند. این مشاهده، این فرضیه را مطرح می‌کند که غلظت‌های بالاتر هورمونی، ممکن است با تسریع تمایز سلولی و افزایش بیان ژن‌های مرتبط با جنین‌زایی، کیفیت جنین‌های تولیدی را بهبود بخشند، اما در عین حال، با ایجاد تنش فیزیولوژیکی، مانع از تشکیل تعداد زیادی جنین شوند (Pérez-Núñez et al., 2006).

کاربرد روش جنین‌زایی سوماتیکی در تکثیر و حفظ ذخایر ژنتیکی گیاه باریجه، به‌دلیل اهمیت دارویی و صنعتی این گیاه، از ارزش ویژه‌ای برخوردار است. باریجه، منبع اصلی صمغی با ارزش به نام (oleo gum resin) است که در صنایع داروسازی، غذایی و آرایشی بهداشتی کاربرد فراوانی دارد (Koocheki et al., 2012). توسعه یک شیوه‌نامه کارآمد برای تکثیر این گیاه از طریق این روش، می‌تواند به تولید انبوه گیاهان یکنواخت با کیفیت بالا، کاهش فشار بر منابع طبیعی و حفظ تنوع ژنتیکی این گونه ارزشمند کمک کند. در همین راستا، پیشنهاد می‌شود که در پژوهش‌های آینده، اثر سایر تنظیم‌کننده‌های رشد و همچنین ترکیبات آلی (مانند پرولین و پلی‌آمین‌ها) بر فرایند جنین‌زایی در باریجه مورد بررسی قرار گیرد. علاوه بر این، بررسی اثرهای شرایط محیطی (مانند نور، دما و رطوبت) و بهینه‌سازی ترکیب محیط کشت (به‌ویژه منابع کربن و نیتروژن) می‌تواند به افزایش بازدهی و بهبود کیفیت جنین‌های سوماتیکی تولیدشده کمک کند (Castro & Ricardo, 2003). همچنین با توجه به اینکه استفاده از محیط کشت مایع باعث رشد یکنواخت سلول‌ها می‌شود، بنابراین استفاده از این محیط به‌منظور دستیابی به جنین‌های یکدست پیشنهاد می‌شود.

نتیجه‌گیری

این آزمایش نشان داد، القای جنین‌زایی سوماتیکی مستقیم در گیاه دارویی *F. gummosa* از طریق کشت ریزنمونه‌های برگ‌ی در محیط کشت MS1/2 حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد NAA و BAP امکان‌پذیر است. مشاهده جنین‌های سوماتیکی در محیط کشت فاقد هورمون، ظرفیت جنین‌زایی ذاتی بافت‌های این گیاه را آشکار کرد، اما تیمارهای هورمونی به‌طور معنی‌داری کمیت و کیفیت جنین‌های تولید شده را بهبود بخشیدند. بهترین نتیجه در این آزمایش با استفاده از محیط کشت حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP به‌دست آمد که نشان‌دهنده اهمیت تنظیم دقیق نسبت اکسین به سیتوکینین در القای جنین‌زایی سوماتیکی در این گونه است.

نتایج این تحقیق، گامی مهم در راستای توسعه روش‌های تکثیر رویشی کارآمد و تولید انبوه گیاه *F. gummosa* محسوب می‌شود. با توجه به اهمیت دارویی و اقتصادی این گیاه، توسعه شیوه‌نامه‌های جنین‌زایی سوماتیکی می‌تواند نقش مهمی در تأمین مواد اولیه دارویی، حفظ ذخایر ژنتیکی و کاهش فشار بر منابع طبیعی ایفا کند. در نهایت، پیشنهاد می‌شود که تحقیقات بیشتری در زمینه بهینه‌سازی محیط کشت و شرایط پرورشی، بررسی اثرهای سایر تنظیم‌کننده‌های رشد و مطالعه سازوکارهای مولکولی دخیل در جنین‌زایی سوماتیکی در *F. gummosa* انجام شود تا بتوان از این روش به‌طور مؤثرتری در راستای اهداف تولیدی و حفاظتی بهره برد.

References

- Almemary, A. 2020. Callus induction and differentiation. The Future of Agriculture, (3), 5-9.
- Castro, A. J., & Ricardo, C. P. 2003. Somatic embryogenesis: a model system for studying plant development. In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 39(4), 333-342.
- Eizadifard, F., Tafrihi, M., & Mohadjerani, M. 2023. Antioxidant, cytotoxic, and genotoxic potentials of the gum of *Ferula gummosa* Boiss on PC-3 cells. Avicenna Journal of Phytomedicine, 13(3), 316.
- Faisal, M., Abdel-Salam, E. M., Alatar, A. A., & Qahtan, A. A. 2021. Induction of somatic embryogenesis in *Brassica juncea* L. and analysis of regenerants using ISSR-PCR and flow cytometer. Saudi Journal of Biological Sciences, 28(1), 1147-1153.
- Fehér, A. 2015. Somatic embryogenesis—stress-induced remodeling of plant cells. Protoplasma, 252(1), 87-102.
- Gazzarrini, S., & McCourt, P. 2001. Genetic analysis of hormone signalling. The Arabidopsis Book, 2001, e0033.
- Giri, D., & Tamta, S. 2013. Induction of somatic embryogenesis in vulnerable medicinal plant *Hedychium spicatum* Buch-Ham ex Smith. Plant Tissue Culture and Biotechnology, 23(2), 147-155.
- Guan, Y., Li, S. G., Fan, X. F., & Su, Z. H. 2016. Application of somatic embryogenesis in woody plants. Frontiers in Plant Science, 7, 938.
- Jiménez, V. M. 2005. Involvement of plant hormones and plant growth regulators on in vitro somatic embryogenesis. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 81(3), 305-315.
- Karamzadeh, L., Jafarian, V., & Vatankhah, E. 2018. Ecological and phytochemical attributes of endemic *Ferula gummosa* Boiss. at vegetative and generative stages. Turkish Journal of Biochemistry, 43(4), 393-402.
- Koocheki, A., Azimi, R. 2012. *Ferula gummosa* Boiss. oleo-gum-resin: a comprehensive review of its botany, ethno-pharmacology and phytochemistry. Journal of Ethnopharmacology, 141(2), 607-617.
- Liao, X., 2018. A comprehensive analysis of hormone signaling pathways during plant somatic embryogenesis. Frontiers in Plant Science, 9, 1452.
- Mondal, T. K., & Mondal, T. K. 2020. Somatic embryogenesis and alternative in vitro techniques. Tea: Genome and Genetics, 85-126.
- Nadjafi, F., Bannayan, M., Tabrizi, L., & Rastgoo, M. 2006. Seed germination and dormancy breaking techniques for *Ferula gummosa* and *Teucrium polium*. Journal of Arid Environments, 64(3), 542-547.
- Nic-Can, G. I., Galaz-Ávalos, R. M., Dela Peña, C., AlcazarMagaña, A., Wrobel, K., & Loyola-Vargas, V. M. 2015. Somatic embryogenesis: Identified factors that lead to embryogenic repression. A case of species of the same genus. Plos one, 10(6), e0126414.
- Pérez-Núñez M.T, Chan J.L, Sáenz L 2006 Improved somatic embryogenesis from *Cocos nucifera* (L.) plumule explants. In Vitro Cell Dev Plant 42:37-43

- Raghavan, V. 2004. Molecular embryology of flowering plants. Cambridge University Press. P 17
- Salehi, M., Naghavi, M. R., & Bahmankar, M. 2019. A review of *Ferula* species: Biochemical characteristics, pharmaceutical and industrial applications, and suggestions for biotechnologists. *Industrial Crops and Products*, 139, 111511.
- Simonović, A. D., M. Trifunović-Momčilov, M., Filipović, B. K., Marković, M. P., Bogdanović, M. D., & Subotić, A. R. 2020. Somatic embryogenesis in *Centaurea erythraea* Rafn—Current status and perspectives: A review. *Plants*, 10(1), 70.
- Tomiczak, K., Mikuła, A., Niedziela, A., Wójcik-Lewandowska, A., Domżańska, L., & Rybczyński, J. J. 2019. Somatic embryogenesis in the family Gentianaceae and its biotechnological application. *Frontiers in Plant Science*, 10, 762.
- Werner, T., Motyka, V., & Strnad, M. 2003. Regulation of plant development by cytokinin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(14), 8030-8035.