# کاربردها، عوامل و ژن‌های دخیل در جنین‌زایی رویشی گیاهان

نرگس مجتهدی[۱*]، پریسا کوباز[۱]، سولماز خسروی[۲]

[۱] عضو هیات علمی (مربی) پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی، کرج.
[۲] کارشناس پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی، منطقه شمال و شمال غرب ایران، تبریز.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۱۰/۳، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۷/۲۹

## چکیده

علیرغم توسعه روز افزون بیوتکنولوژی و مهندسی ژنتیک در سالیان اخیر و استفاده از جنین‌زایی رویشی به عنوان یکی از کاربردی‌ترین تکنیک‌ها جهت ریزازدیادی و باززایی گیاهان، تاکنون در این زمینه، مطالعات جامع و کاربردی در داخل کشور انجام نشده است. در این مقاله، اصطلاحات مورد استفاده، مراحل القا و تکوین جنین‌زایی رویشی در شرایط درون شیشه‌ای شامل مراحل گلبولی، قلبی شکل و اژدری در دولپه‌ای‌ها، مراحل کروی، شاخی و لپه‌ای شکل در تک‌لپه‌ای‌ها و مراحل جنین زایی در بازدانگان عوامل و فاکتورهای دخیل همچون عوامل وابسته به گونه، رقم، نقش تنظیم کننده های رشد گیاهی، شرایط فیزیولوژیک گیاهان مادری و کاربردهای جنین‌زایی اعم از تولید گیاهان با سطوح پلوئیدی متفاوت و ایجاد گیاهان تراریخته، همچنین تغییر در بیان ژن به خصوص در دوره جنین‌زایی، نشانگرهای مولکولی، بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی مرتبط با استعداد سلول‌های جنین‌زا شامل ایزوزیم‌ها، نشانگرهای مولکولی و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مورد بحث و بررسی قرار گرفته است.

**کلمات کلیدی:** *جنین‌زایی رویشی، القا، فاکتورهای فیزیولوژی، تنظیم کننده‌های رشد گیاهی.*

* نویسنده مسئول: نرگس مجتهدی تلفن: ۰۲۶۳۲۷۰۳۵۳۶ Email: narmojtahedi@gmail.com

**مقدمه**

اندام‌زایی و جنین‌زایی رویشی دو مکانیزم متفاوت است که طی آن از ریزنمونه گیاهی، یک گیاه کامل باززا می‌شود. به طور کلی، در مورد اول، شاخه‌ها و ریشه‌ها به ترتیب در پاسخ به شرایط محیطی مناسب (بسته به نوع و غلظت تنظیم‌کننده‌های موجود در محیط کشت) تشکیل می‌شوند. این نوع از تکوین با وجود ارتباط آوندی بین بافت مادری و بخش باززا شده مشخص می‌شود (Terzi and Lo Schiavo, 1990). اما، جنین‌زایی رویشی فرآیندی است که بوسیله آن سلول‌های رویشی دیپلوئید یا هاپلوئید به ساختارهایی که مشابه جنین‌های زایشی هستند، تکوین می یابند. این فرآیند، مانند تشکیل ساختارهای دو قطبی فاقد هرگونه ارتباط آوندی با بافت مادری است. جنین‌زایی رویشی از طریق یک سری مراحل اختصاصی منظم بدون ترکیب گامت‌ها ایجاد می‌شود (Emons, 1994; Raemakers *et al*., 1995). ویژگی برجسته جنین‌زایی رویشی، رشد دائمی آن می‌باشد که در نتیجه عدم حضور بازدارنده‌های رشد، ایجاد می‌شود (Faure *et al*., 1998). در یک ریزنمونه، هر دو فرآیند اندام‌زایی و جنین‌زایی رویشی مشاهده شده است (He *et al*., 1990) ولی دو فرآیند مذکور از لایه‌های بافتی مشخص یا سلول‌های ویژه‌ای از ریزنمونه منشاء گرفته است (Osternack *et al*., 1999). مثال‌های متعددی در مورد جنین‌زایی رویشی در شرایط آزاد (*in vivo*) در بافت‌های زایشی مثل سلول‌های سینرژید و بافت خورش و همچنین در بافت‌های رویشی مانند سلول‌های تخمدان (آپومیکسی) و سلول‌های حاشیه برگ، گزارش شده است (Merkle *et al*., 1995; Sharma and Thorpe, 1995).

اولین تعاریف جنین‌زایی رویشی توسط Steward و همکارانش در سال ۱۹۵۸ و Reinert در سال ۱۹۵۹ با کار بر روی هویج، ارائه شد (Steward *et al*., 1958; Reinert, 1959). Krikorian و Simola در سال ۱۹۹۹ اعلام کردند که پیشگام اولیه تحقیق بر روی پدیده جنین‌زایی رویشی، Harry Waris بوده است که بر روی گیاه *Oenanthe aquatica* از خانواده چتریان تحقیق نموده است (Krikorian and Simola,1999). تحقیقات اولیه بسیار اهمیت دارند، چرا که پیش‌بینی Haberlandt مبنی بر اینکه جنین‌ها می‌توانند از سلول‌های مجزا در شرایط کشت (فرضیه توتی‌پتانسی[1]) بوجود آیند را تایید می‌کند (Höxtermann, 1997). از آن زمان تاکنون، تعداد گونه‌های گیاهی که می‌توان از آنها جنین رویشی بدست آورد، افزایش یافته است. این پدیده حداقل در ۲۰۰ گیاه نهاندانه و بازدانه به ثبت رسیده است (Raemakers *et al*., 1995). اگرچه برخی از گونه‌ها بسته به منشاء کشت و نوع باززایی، نسبت به بقیه گیاهان سخت‌تر پاسخ می‌دهند (Rao, 1996).

یافتن شرایط مناسب به منظور القاء جنین‌زایی رویشی در گونه‌ها و ارقام مختلف از جمله بررسی تاثیر شرایط و محیط‌های مختلف

[1] Totipotency hypothesis

کشت و نوع و سطوح تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، هنوز بر اساس آزمون و خطا است (Henry *et al.,* 1994). هرچند، نقش ژنوتیپ و شرایط فیزیولوژیکی گیاه در این فرایند، بندرت مطالعه شده است و این امر موجب ایجاد محدودیت در کشت بافت گیاهان به مدت طولانی، توسعه روش‌های الحاق پروتوپلاست و انتقال ژن برای اصلاح گیاهان تک‌لپه‌ای شده است (Henry *et al.,* 1994). بیشتر موفقیت‌های کسب شده در زمینه درک فرآیندهای باززایی گیاه از طریق جنین‌زایی رویشی بوسیله گونه‌های گیاهی مدل بدست آمده است هرچند انتقال این فن‌آوری به گونه‌های زراعی عمده بسیار مشکل و کند می‌باشد (Vasil, 1987). القاء موفق جنین‌های رویشی و بدنبال آن احیاء گیاهان زنده از آنها در بسیاری از گونه‌ها کارآمد نیست (Merkle *et al.,* 1995). البته در سالیان اخیر در بعضی گونه‌های گیاهی سرسخت[1] همچون *Pinus kesiya*, *Pinus patula* و *Pinus roxburghii* با استفاده از مریستم‌های انتهایی شاخه‌ها، جنین‌های رویشی تولید شده است (Malabadi *et al*., 2004; Malabadi and Nataraja, 2006; Malabadi and Van Staden, 2003, 2005). همچنین، محققین از ریزنمونه‌های برگی درختان صد ساله *Quercus robur* جنین‌زایی رویشی غیرمستقیم تولید کرده‌اند و موفق به تشکیل یک گیاه کامل نیز شده‌اند (Corredoira *et al*., 2006). قابلیت درک فرآیندهای درگیر در القاء و بیان جنین‌زایی رویشی در گونه‌های متفاوت، تعداد ژنوتیپ های توانا در باززایی با این روش را افزایش می‌دهد.

## کاربردهای جنین‌زایی رویشی

یکی از اساسی‌ترین کاربردهای جنین‌زایی رویشی، استفاده از این روش در درک رویدادهای اولیه در جنین‌زایی زایشی گیاهان عالی می‌باشد. شاید دلیل پیشرفت محدود در زمینه وقایع تکوینی در جنین گیاهان، کوچک بودن جنین‌های زایشی در گیاهان عالی است که در بین بافت مادری نظیر گل یا میوه‌های نابالغ رشد می‌کنند. همچنین، جمع‌آوری جنین کافی برای بررسی‌های مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی که در ابتدای فرآیند رشد اتفاق می‌افتند، بسیار مشکل است. جنین‌های رویشی یک مدل مناسب برای غلبه بر چنین مشکلاتی هستند (De Jong *et al.,* 1993; Zimmerman, 1993). تکثیر انبوه گیاهان با استفاده از ریزنمونه‌های جنین‌زا، جذابترین کاربرد اقتصادی جنین‌زایی رویشی است (Merkle *et al.,* 1995). جنین‌زایی رویشی دارای فواید بسیاری در مقایسه با اندام‌زایی است:

۱) کشت تعداد زیادی از واحدهای تکثیر[2] شونده به عنوان مثال ۶۰۰۰۰ تا ۱/۳۵ میلیون جنین رویشی در هر لیتر محیط کشت.

۲) امکان تولید جنین بیشتر با کار کمتر.

۳) قابلیت منشاء گرفتن جنین رویشی از یک سلول واحد جهت ایجاد کشت‌های یکنواخت[3].

[1] Recalcitrant

[2] Reproductive unit

[3] Homogene

٤) گیاهان بدست آمده از جنین‌های رویشی نسبت به گیاهان حاصل از اندام‌زایی قابلیت تغییر کمتری دارند درنتیجه پایدارترند (Merkle *et al.*, 1995; Osuga *et al.*, 1999).

جنین‌های رویشی نسبت به جهش ژن‌های مورد نیاز برای تکامل، تحمل کمتری دارند، در حالی‌که مریستم‌های رویشی نسبت به جهش‌ها و تغییرات محیطی تحمل بیشتری دارند که این امر پایداری بیشتر گیاهان حاصل از جنین زایی نسبت به گیاهان حاصل از اندام زایی را توجیه می کند (Merkle *et al.*, 1995).

کاربرد دیگر جنین‌های رویشی در تولید گیاهان با سطوح پلوئیدی متفاوت یعنی ایجاد جنین‌های هاپلوئید به وسیله کشت بساک و افزایش تریپلوئیدی از آندوسپرم می‌باشد (Merkle *et al.*, 1995). ثابت شده است که کشت‌های جنینی، منابع خوبی از پروتوپلاست‌های باززا، در خانواده گندمیان و گونه‌های درختان جنگلی را فراهم می‌کنند. امروزه انتقال ژن به سلول‌های جنینی گیاه با روش اصلاح سنتی رقابت می‌کند و ابزاری ضروری برای اصلاح محصولات زراعی به شمار می‌رود. یکی از مهمترین شروط برای تکثیر گیاهان در شرایط درون شیشه‌ای، قابلیت رشد سلول‌های رویشی در محیط رشد استریل و باززایی گیاهان زنده در این محیط‌ها می‌باشد. بنابراین جنین‌زایی رویشی بهترین روش به منظور ایجاد گیاهان تراریخته است (Litz and Gray, 1995; Vicient and Martinez, 1998). جنین‌زایی ثانویه که حداقل در ۸۰ گونه گزارش شده است، پتانسیل بالایی برای تولید متابولیت‌های جنینی مانند لیپیدها و پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه فراهم می‌کند (Raemakers *et al.*, 1995). اگرچه، به دلیل هزینه بالای استخراج از این طریق که بیش از هزینه استخراج از بذرهای طبیعی است، این فن‌آوری همچنان تجاری نشده است (Namdeo *et al.*, 2007)، اما با استفاده از گیاهان تراریخته و تکنولوژی بیوراکتورها امکان تکثیر و نهایتا استخراج داروها، واکسن‌ها و بعضی از پروتئین‌ها با هزینه کمتر فراهم شده است (Yesil-Celiktas *et al.*, 2010). به نظر می‌رسد که تکامل جنینی سلول‌های رویشی به کاربرد ترکیبات شیمیایی خارجی بیش از رشد یک گیاه کامل یا حتی تولید کشت‌های پینه‌ای، حساس باشد. این امر امکان استفاده از غربالگری درون شیشه‌ای و شناسایی ژنوتیپ‌های گیاهی مقاوم به فاکتورهای خاص نظیر سمیت آلومینیوم یا سموم تولید شده توسط پاتوژن‌ها را فراهم می‌کند (Merkle *et al.*,1995).

## مراحل تکوین جنین‌زایی رویشی

تکامل جنین‌زایی رویشی به دو مرحله اساسی تقسیم شده است:

– مرحله اول که در آن سلول رویشی تمایز یافته، مستعد شده و به صورت سلول‌های جنینی تکثیر می‌شود. این مرحله توسط Komamine و همکاران، فاز صفر (1992)، توسط Rao (1996) مرحله تعیین[1] و توسط Dodeman و Ducreux

[1] Determination

(1997) مرحله القاء نامیده شد. این مرحله، هیچ گونه فاز مشابهی در جنین‌زایی زایشی ندارد (Emons, 1994).

- مرحله دوم که سلول جنینی، توانایی جنینی خود را نشان داده و به جنین‌های رویشی تمایز می‌یابد.

این دو مرحله از یکدیگر مستقلند و بوسیله فاکتورهای مختلفی تحت تاثیر قرار می‌گیرند. در این مرور، کلمه القاء برای مرحله اول و کلمه بیان برای مرحله دوم انتخاب شده است. اصطلاح سلول جنینی محدود به سلول‌هایی است که گذر از حالت رویشی (غیر جنینی) به مرحله بعد را کامل کرده‌اند. در این مرحله، هیچ محرک خارجی دیگر همچون تنظیم‌کننده‌های رشد که برای مرحله اول ضروری بودند، به کار برده نمی‌شود (Komamine *et al.*, 1992; De Jong *et al.*, 1993). سلول‌هایی که به این مرحله رسیده‌اند و قبلا شروع به جنین‌زایی کرده‌اند اما هنوز نیاز به محرک خارجی دارند، به عنوان سلول‌های مستعد شناخته می‌شوند (Mordhorst *et al.*, 1997).

**القاء جنین‌زایی رویشی**

به نظر می‌رسد، القاء رشد جنینی در کشت‌های سلولی هویج، به دو صورت اتفاق می‌افتد. این حالت در بسیاری از گونه‌ها نیز رخ می‌دهد:

۱) به طور مستقیم از یک بافت بالغ نظیر برگ، قطعه‌ای از ساقه، جنین زایشی، پروتوپلاست یا میکروسپورها (سلول‌هایی که به نظر می‌رسد قبلا برای تکامل جنینی، در نظر گرفته شده‌اند، فقط به شرایطی برای بیان نیاز دارند).

۲) به طور غیر مستقیم از یک مرحله حد واسط پینه ای یا سوسپانسیون سلولی (در این موارد از یک محیط پیچیده‌تر باید استفاده کرد که شامل فاکتورهای اضافی برای القای تمایززدایی و آغازش دوباره از تقسیم سلولی سلول‌های تمایز یافته پیشین، قبل از بیان جنین‌زایی است) (Emons, 1994). پس از القای جنین‌زایی به صورت مستقیم و غیرمستقیم، به نظر می‌رسد که هیچگونه اختلاف اساسی بین جنین‌زایی مستقیم و غیرمستقیم وجود ندارد. مشخص شده است که در تعداد زیادی از سیستم‌هایی که جنین‌زایی به صورت غیرمستقیم اتفاق می‌افتد، پینه جنین‌زا از جنین‌های جوان (توده‌های پیش‌جنینی یا جنین‌های پیش گلبولی زایشی) ایجاد می‌شود و تکوین بیشتر آن به طول مدت کاربرد محرک‌های القایی بستگی دارد (Emons, 1994). اگر طول مدت کاربرد محرک‌های القایی کوتاه باشد، جنین‌زایی مستقیم و در صورت طولانی بودن، جنین‌زایی به روش غیرمستقیم انجام خواهد شد. در مورد گیاه مدل هویج، سلول‌های مستعد مجزا، خوشه‌های سلولی جنین‌زا در مجاورت اکسین تشکیل دادند (Komamine *et al.*, 1992). به نظر می‌رسد که این سلول‌های مجزا برای جنین‌زایی، از پیش تعیین شده‌اند. در طول این مرحله، خوشه‌های

سلولی در زمان حذف اکسین توانایی تکوین به صورت جنین رویشی را می‌یابند (Nomura and Komamine, 1985; Komamine *et al.*, 1992). سلول‌های جنینی منحصر به فرد بوده و از لحاظ ظاهری شبیه سلول‌های مریستمی (اندازه کوچک‌تر، دارای شکل منظم، هسته و هستک متراکم‌تر و بزرگ‌تر و سیتوپلاسم متراکم‌تر) هستند (Carman, 1990).

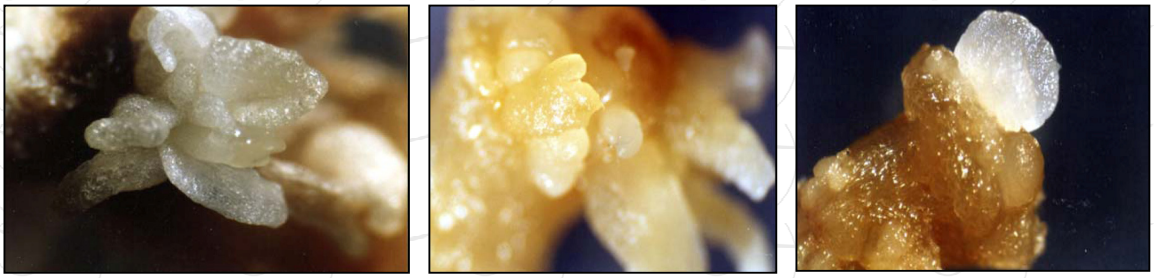
**بیان جنین‌زایی رویشی**

زمانی که مرحله القای جنین‌زایی کامل شد، الگوی جنین‌زایی برای تمام اشکال جنینی اعم از رویشی و زایشی یکسان است (Mordhorst *et al.*, 1997). بنابراین جنین‌های زایشی و رویشی، سیر تکوینی مشابهی شامل مراحل گلبولی، قلبی شکل و اژدری (شکل ۱) را در دولپه‌ای‌ها و مراحل کروی، شاخی و لپه‌ای شکل[1] را در تک‌لپه‌ای‌ها (شکل۲) طی می‌کنند (Gray *et al.*, 1995; Toonen and De Vries, 1996). این تفاوت‌های شکلی به دلیل تکامل خاص هریک از دو گروه عمده گیاهی است به‌طوری‌که جنین تک‌لپه‌ای‌ها یک لپه منفرد ایجاد کرده و به مرحله قلبی شکل نمی‌رسند(Kaplan and Cooke, 1997). نوع دیگری از تکوین جنینی در مخروطیان شامل سه مرحله گلبولی، لپه‌ای اولیه و جنین‌های لپه‌ای موخر (شکل۳) می‌باشد (Dong and Dunstan, 2000).

یک مرحله رشدی میانه، بین مرحله کروی و قلبی شکل به عنوان جنین دوکی شکل در دولپه‌ای‌ها معرفی شده است. اگرچه در مطالعات اولیه، جنین‌های قلبی و اژدری به عنوان مراحل جداگانه در تکوین جنین تعریف شده بودند، اما تشخیص بین آنها، بیشتر بر اساس تفاوت در اندازه می‌باشد (Schiavone and Cooke, 1985). در مدل‌های ارائه شده، مرحله ۱ (اولین مرحله در بیان جنین‌زایی رویشی) با انتقال خوشه‌های سلولی به محیط فاقد اکسین القاء می‌شود. در طی این مرحله، خوشه‌های سلولی به آرامی تکثیر شده و ظاهرا هیچ تمایزی ندارند. پس از این مرحله، تقسیم سریع سلولی در نواحی خاصی از خوشه‌های سلولی اتفاق افتاده که منجر به تشکیل جنین‌های گلبولی می‌شود (مرحله ۲). در مرحله بعدی (مرحله ۳)، گیاهچه‌ها از جنین‌های گلبولی، قلبی و اژدری ایجاد می‌شوند (Komamine *et al.*, 1992). بیان جنین‌زایی رویشی بوسیله فاکتورهای متعددی وابسته به گونه، رقم ، شرایط فیزیولوژیک گیاهان مادری و ... تحت تاثیر قرار می‌گیرد. اگرچه، رایج‌ترین روش جنین‌زایی، افزایش و کاهش غلظت اکسین (بیشتر ۲و٤-دی‌کلروفنوکسی استیک اسید)[2] در محیط کشت القاء کننده است.

[1] Coleoptilar

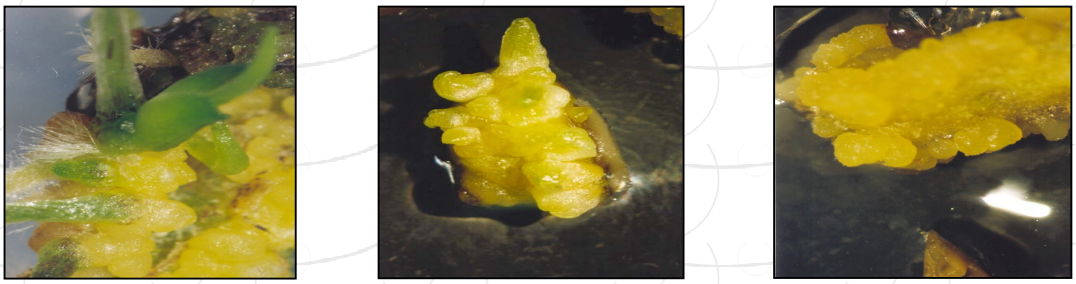
[2] 2,4- D



الف ب ج

شکل ۱- جنین‌های رویشی در کلزا *Brassica napus* L. در مراحل الف) گلبولی ب) مرحله قلبی ج) مرحله اژدری (Valizade *et al.*, 2003).

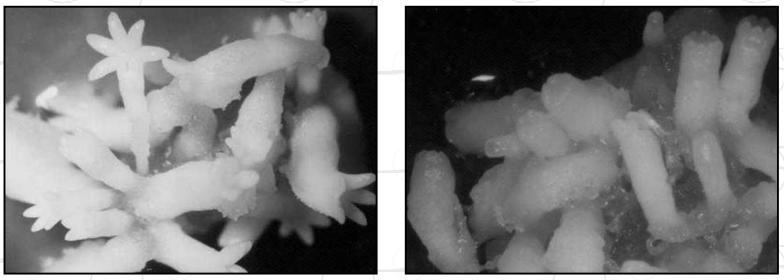
**Table 1- *Brassica napus* somatic embryogenesis stages: a) globular, b)heart shape, c)torpedo shape.**



الف ب ج

شکل ۲- جنین‌های رویشی سوسن در مراحل الف) گلبولی ب) مرحله شاخی ج) مرحله لپه‌ای شکل (Khosravi *et al.*, 2007).

**Table 2- *Lilium* somatic embryogenesis stages: a) globular, b) scultelar, c) coleopetilar stages.**



الف ب

شکل ۳- جنین‌های رویشی *Pinus roxburghii* در مراحل الف)گلبولی و لپه‌ای اولیه ب) مرحله لپه‌ای موخر (Ravindra *et al.*, 2006).

**Table 3-Somatic embryogenesis stages of *Pinus roxburghii*: a) globular and coleopetilar b) late coleopetilar stages.**

**فاکتورهای وابسته به استعداد جنین‌زایی**

القاء جنین‌زایی رویشی می‌تواند خودبخودی بوده و به تیمارهای پیچیده و طولانی نیاز نداشته باشد. سلول‌های ریزنمونه غیرجنینی قابلیت القاء جنینی را دارند. این کار با روش‌های مختلفی از جمله: استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشدگیاهی، تنش pH، تنش گرما و تیمار با مواد شیمیایی مختلف انجام می‌شود. هرچند که هنوز مشخص نیست کدام یک از تغییرات شیمیایی منجر به تبدیل تعداد معدودی از سلول‌های رویشی یک ریزنمونه به سلول جنینی می‌شوند (Toonen and DeVries, 1996).

**فاکتورهای ساختاری**

پیدایش قطبیت در جنین‌ها به عنوان اولین مرحله در جنین‌زایی مد نظر قرار می‌گیرد (Warren Wilson and Waren Wilson, 1993). به عنوان مثال در هویج و یونجه، اولین تقسیم سلولی، ایجاد دو سلول نامتقارن از لحاظ اندازه است (Dudits *et al*., 1991) و در هویج، تنها سلول دختری کوچک‌تر تبدیل به جنین خواهد شد (De Jong *et al*., 1993). تاثیر قطبیت در جنین‌زایی و باززایی مستقیم در دو گونه از سوسن نیز گزارش شده است (Khosravi *et al*., 2007; Mojtahedi *et al*., 2010).

در بیشتر گونه‌هایی که ظرفیت جنین‌زایی دارند، تقسیم نامتقارن به طور مستقیم جنین ایجاد نمی‌کند، بلکه باعث ایجاد توده‌های پیش جنینی[1] می‌شود که در آن تنها تعداد اندکی از سلول‌ها می‌توانند به جنین تبدیل شوند (Komamine *et al*., 1992; Nuti Ronchi and Giorgetti, 1995). بقیه سلول‌های پیش جنینی احتمالا در طی فرآیند مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی حذف می‌شوند. این پدیده در گیاه صنوبر نروژی[2] مشاهده شده است (Filonova *et al*., 2000).

از طرفی، ضرروت جهت گیری تقسیم سلول اولیه (در جنین زایی رویشی و زایشی) برای ایجاد قطبیت در سلول تخم بررسی شده است. مطالعات گسترده در این زمینه روی ۱۹ خانواده گیاهان دولپه ای نشان داده است برخلاف اولین تقسیم مورد انتظار ( تقسیم عرضی)، این تقسیم می‌تواند بصورت طولی، مورب یا متغیر نیز انجام پذیرد. لذا، اولین تقسیم نامتقارن برای جنین‌زایی رویشی یا زایشی تنها شرط ضروری نیست و توزیع نامتقارن اجزای درون سلولی در مراحل اولیه جنین‌زایی بسیار مهم می‌باشد. همچنین، فاکتورهای ساختاری دیگری وجود دارند که می‌توانند بر القای سلول‌های پیش جنینی موثر باشند از جمله ساختار میکروتوبول‌ها، دیواره سلولی و اندازه سلول که به نظر می‌رسد نقش مهمی در جنین‌زایی رویشی ایفا می‌کنند (Toonen and De Vries, 1996). مطالعات نشان داده است که یک آنتی‌ژن بر روی دیواره سلولی سلول‌های جنینی وجود دارد که موجب تقسیم نامتقارن این سلول‌ها می‌گردد. یکی از سلول‌های دختری حاوی آنتی‌ژنی است که با آنتی‌بادی JIM8 شناسایی می‌شود و دیگری

[1] PEM: Proembryogenic mass

[2] Norway spruce

فاقد آنتی‌ژن است و سلول‌های عاری از آنتی‌ژن در نهایت جنین‌های رویشی را تشکیل می‌دهند (McCabe *et al*., 1997).

نکته مهم دیگر، ضرورت وجود سلول‌هایی است که به منظور القای جنین‌زایی، در معرض جدایی فیزیکی قرار می‌گیرند. این مساله در مورد جنین‌های رویشی مشاهده می‌شود که در محیط کشت‌های سوسپانسیونی بوجود آمده‌اند. این جداسازی فیزیکی منجر به درجات متفاوتی از جداسازی فیزیولوژیکی (فقدان پلاسمودسماتا بین سلول‌های مجاور، قطع تداوم سیمپلاستی و کاهش اتصال الکتریکی[1]) می‌شود (Warren Wilson and Warren Wilson, 1993).

## فاکتورهای فیزیولوژیکی

اگرچه تنظیم‌کننده‌های رشد نقش مهمی را در القای جنین‌زایی رویشی بازی می‌کنند، فاکتورهای متعدد دیگری وجود دارند که تمایل یک بافت ویژه برای القای جنین‌زایی رویشی را تحت تاثیر قرار می‌دهند. محدوده تیمارهای ممکن برای القاء نشان می‌دهد که تنها یک مولکول مسؤول القاء کنندگی نیست (Toonen and De Vries, 1996).

مثال‌هایی از فاکتورهای دیگری که باعث تبدیل یک سلول رویشی به سلولی با قابلیت تشکیل ساختارهای جنینی می‌شوند عبارتند از:

- تغییر منبع کربن در کشت‌های سوسپانسیونی از ساکارز به گلیسرول در *Citrus* (Gavish *et al*., 1991; Jimenez and Guevara, 1996)
- تغییرات غلظت آمونیوم و pH در محیط کشت هویج (Smith and Krikorian, 1989, 1990)
- کیفیت نور در *Araujia sericifera* (Torne *et al*.,2001)
- شوک دمایی در میکروسپورهای *Brassica* (Pechan and Keller,1988)
- پیش تیمار گیاهان مادری و مدت زمان واکشت (Morocz *et al*.,1990; Mojtahedi *et al*., 2000)
- پیش تیمار ریزنمونه‌های اولیه تحت تنش خشکی فیزیولوژیک (You *et al*., 2007)

جزئیات بیشتر در مورد برخی از فاکتورها در مقالات دیگر ارائه شده است (Tulecke, 1987; Harada 1999).

تراکم کشت سوسپانسیون سلولی عامل دیگری است که جنین‌زایی رویشی را تحت تاثیر قرار می‌دهد. با وجود آن که تراکم بالایی از سلول‌ها ($10^5$ سلول در هر میلی‌متر) برای تشکیل خوشه‌های سلولی جنینی از سلول‌های واحد مورد نیاز است (Nomura and Komamine, 1985) تراکم کمتری از سلول ($2\times10^4$ سلول در هر میلی‌متر) برای رشد جنین از سلول‌های رویشی ترجیح داده می‌شود (Fujimura and Komamine, 1979). این مساله ممکن است به تراوش پروتئین‌ها یا دیگر فاکتورهای سلولی به داخل محیط کشت مرتبط باشد. در واقع پروتئین‌های ترشحی (خارج سلولی) یا ساختمانی (درون سلولی) نقش بسیار مهمی را در القای جنین‌زایی رویشی بازی می‌کنند (De Vries *et al*., 1988a,b; Gavish *et al*., 1991, 1992)

[1] Electrical coupling

افـزودن پـروتئین‌هـای آرابینوگالاکتـان[1] کـه از محیط‌های کشت جنین‌زایی و دانـه‌هـای خشـک هویج جدا شـده‌انـد، قـادر بـه تحریـک تشـکیل توده‌های پیش‌جنینی، حتی در لایـن‌هـای سـلولی غیرجنینی هویج می‌باشند. پروتئین‌های مشابه، امـا جدا شده از محیط کشت لاین‌های غیـر جنـین‌زا، تاثیر منفی بر تشکیل توده‌های پیش‌جنینـی دارنـد (De Jong *et al*., 1993). مطالعـات نشـان داده است که سلول‌های مستعد برای جنـین‌زائـی، بـه پیام‌های محلول از دیگر سلول‌ها نیـاز دارنـد کـه تصـور مـی‌شـود ایـن پیـام، یـک پـروتئین آرابینوگالاکتـان اسـت (McCabe *et al*., 1997). ساز و کار اثر پروتئین‌های ترشحی بر جنین‌زایـی هنوز مشخص نشده است اما به نظر می‌رسـد کـه این پروتئین‌ها روی پلـی‌مرهـای دیـواره سـلولی موثرند (Van Holst *et al*., 1981).

مطالعات نشان داده است که کشت همزمان جنین‌های رویشی هویج و سوسپانسـیون سـلولی *Arabidopsis thaliana* در محـیط کشـت فاقـد تنظیم‌کننـده‌هـای رشـد گیـاهی موجـب تکـوین جنین‌های رویشـی تـا مرحلـه گلبـولی مـی‌شـود (Meijer *et al*., 1999). علاوه بر ایـن، مطالعـات نشـان داده اسـت کـه جنـین‌زایـی رویشـی در کشت‌های سلولی هویج، زمانی‌که تراکم سلول‌هـا بسیار بالا است، توسط عامل محدود کننـده‌ای بـه نـام ٤-هیدروکسـی بنزیـل الکـل، بـه شـدت محدود می‌شـود (Kobayashi *et al*., 2000). بـه نظـر مـی‌رسـد کـه اخـتلاف در محتـوای قنـد و نشاسـته پینـه‌هـای جنـین‌زا و غیـر جنـین‌زای *Medicago arborea* خصوصیت مهمی است که با استفاده از آن می‌توان پینه های جنـین‌زا و غیـر جنـین‌زا را از یکـدیگر تشـخیص داد. پینـه‌هـای جنـین‌زا حـاوی قنـد بیشـتر و نشاسـته کمتـر در مقایسه با پینه‌های غیر جنین‌زا هستند (Martin *et al*., 2000).

**بیان ژن**

شکل گیری مستقیم یا غیر مستقیم گیاه با تغییر در بیان برخی ژنها به خصوص در دوره جنین‌زایی انجام می‌شود. به عنوان مثال یک ژن کد کننده گیرنده پروتئین کیناز به عنوان یک گیرنده کیناز در جنین زایی رویشی (*SERK*) هویج شناسایی شده است (Schmidt *et al*., 1997). در آرابیدوپسیس، پنج خانواده از فامیل ژنی *SERK* شناسایی شده‌اند (*AtSERK1-5*) به طوریکه بیان ژن *SERK1* که در طی جنین زایی رویشی در پینه های مستعد جنین زایی بیان می شود تا چهار برابر افزایش می یابد (Hecht *et al*., 2001). در ذرت نیز دو ژن مرتبط با جنین زایی *ZmSERK1* و *ZmSERK 2* شناسایی شده است (Baudino *et al*., 2001). *LEC1* ژن دیگر شناسایی شده در آرابیدوپسیس است که بیان آن در طی جنین زایی زایشی افزایش می‌یابد (Lotan *et al*., 1998).

– تخمین تعداد RNA های متفاوت در دانه‌هـای در حال تشکیل.

[1] Arabinogalactan proteins

– بررسی انتشار فضایی و زمانی انواع ویـژه‌ای از RNA.

– جداسازی و تعیـین خصوصـیت ژن‌هـایی کـه پروتئین‌های فراوان دانـه بـه ویـژه پـروتئین‌هـای ذخیره‌ای دانه را کد می‌کنند.

– تعیین توالی‌های تنظیمی پروتئین‌های متصل به DNA (*trans*- acting و *cis*- acting) کـه بیـان ژن‌های خاص دانه را تنظیم مـی‌کننـد (Meinke, 1995).

هرچند اساس مطالعات مولکولی در جنینی‌زایی رویشی، بر پایه مقایسه ژن‌ها و پروتئین‌های در حال بیان در سلول‌های جنینی و غیر جنینی در مراحل مختلف می‌باشد (Rao, 1996)، مطالعات بیان ژن در طی مراحل مختلف فرآیند جنین‌زایی رویشی، نشان داده است که ژن‌های بسیار محدودی در این وقایع نقش دارند (Henry *et al*., 1994; Dong and Dunstan, 2000; Dodeman and Ducreux, 1996; Schrader *et al*., 1997) و تغییر در الگوی پروتئین، غالبا در مرحله پس از رونویسی[1] و در سطح mRNA تنظیم می‌شود (Komamine *et al*., 1992; Wilde *et al*., 1995). مطالعات نشان داده که تغییر در سطوح هورمونی در بافت‌های کشت شده، ممکن است ساخت بعضی از پروتئین‌های دخیل در جنین‌زایی رویشی را تغییر دهد (Dodeman and Ducreux, 1996). دو ژن از هیپوکتیل‌های القاء شده هویج که با غلظت‌های بالای 2,4-D به مدت دو ساعت تیمار شده بودند، جدا شده است. این دو ژن باعث آغاز جنین‌زایی رویشی مستقیم از ریزنمونه‌ها می‌شوند (Kitamiya *et al*., 2000). کشت‌های سلولی هویج، به عنوان پینه‌های سازماندهی نشده در مجاورت 2,4-D، برای مطالعه ژنتیکی در طی بیان جنین‌زایی رویشی استفاده شده‌اند.

بیشتر ژن‌های بیان شده در طول جنین‌زایی رویشی به ژن‌های تاخیری افزاینده جنین[2] تعلـق دارند. عملکرد پیشنهادی برای این خانواده ژنـی، حفاظت ساختارهای سلولی در جنین‌های بالغ در طول خشکیدگی بذر[3] و جلوگیری از جوانـه‌زنـی پیش از موعد جنین‌هـای زایشـی در طـول دوره رشد بذر است (Wilde *et al*., 1995; Dong and Dunstan, 2000). بیان چنـد ژن در جنـین‌هـای رویشی هویج باعث کد شدن پروتئین‌های خارج سلولی ترشحی می‌شوداز جمله:

– EP1 کـــــه دارای تشـــــابه[4] بـــــا گلیکـــوپروتئین‌هـــای جایگـــاه S در *Brassica* می‌باشد، در پینه‌های غیر جنینی وجود دارد ولـی در جنین‌های رویشی مشاهده نمی‌شود.

– ژن دیگری که پـروتئین ناقـل چربـی را تولید می‌کند (*EP2*) به عنوان یک نشـانگر مفیـد بـرای تمـایز سـلول‌هـای اپیـدرمی در طـی دوره جنین‌زایی محسوب مـی‌شـود. نقـش دقیـق ایـن پروتئین‌های خارج سـلولی همچنـان نامشـخص است اما به نظر مـی‌رسـد کـه در تنظـیم، توسـعه سـلول و حفـظ سـاختارهای بیـوفیزیکی بـرای ریخت‌زایی، مورد نیاز هستند.

[1] Posttranscriptional level

[2] Late embryo- abundant genes (*lea*)
[3] Desiccation
[4] Homology

– گلیکوپروتئین ترشحی EP3 موجب حفظ موتان‌های حساس به دما در هویج (*ts11*) در عبور از مرحله کروی به مرحله قلبی شکل در جنین‌زایی رویشی می‌شود (Meinke, 1995; Sugiyama, 2000).

– دسته دیگری از ژن‌ها که در کشت‌های سوسپانسیون سلولی هویج تنظیم می‌شوند، از ژن‌های *ECP31*, *J4e*, *Dc8* و *Dc3* تشکیل شده‌اند و در طی مراحل مختلف رشد جنین در گروه‌های سلولی مختلف از جمله توده‌های پیش جنینی و جنین‌ها بیان می‌شوند (Wilde *et al.*, 1995).

تحقیقات آینده در زمینه زیست‌شناسی مولکولی گیاهان نباید بر اساس جداسازی و شناسایی تعداد زیادی از ژن‌های بیان شده در طی تکامل جنین‌های گیاهی متمرکز گردد بلکه باید اهمیت این ژن‌ها بواسطه اتفاقاتی که به دلیل غیر فعال شدن آنها ایجاد می‌شود، نمایش داده شود. غیر فعال شدن ژن‌ها بوسیله ایجاد گیاهان تراریخته حاوی سازه بی‌معنی[1] یا ایجاد موتان‌های حاوی ژن‌های غیرعملگر[2]، انجام می‌شود (Meinke, 1995). به دلایل مختلف، تمامی ژن‌ها به روش ایجاد موتان‌های حاوی ژن‌های غیرعملگر، شناسایی نمی‌شوند. ازجمله:

- بعضی از ژن‌هایی که در ژنوم دو برابر[3] می‌شوند.
- ژن‌هایی که برای مراحل اولیه گامت‌زایی مورد نیاز می‌باشند.
- ژن‌هایی که دارای عملکردهای غیرضروری بوده و در موقعیت‌های خاصی قابل شناسایی هستند.

لذا، قدرت علم ژنتیک تنها در شناسایی هر واحد نسخه‌برداری در ژنوم خلاصه نشده و توانایی تمرکز بر ژن‌هایی که به منظور رشد و تمایز به شکل طبیعی بیان می‌شوند را فراهم می‌کند (Meinke, 1995). دسته‌های مختلفی از موتان‌های جنینی به منظور درک اتفاقات مراحل جنین‌زایی رویشی در گیاهان شناسایی شده‌اند:

– موتان‌هایی که در مراحل اولیه تقسیم سلولی و ریخت‌زایی دارای نقص می‌باشند.

– دسته‌ای که در جمع‌آوری رنگدانه‌ها و مواد ذخیره‌ای در طی بلوغ جنینی دچار اشکال هستند.

– گروهی از موتان‌ها که در مرحله ایجاد خواب و جوانه‌زنی مشکل دارند.

تعداد زیادی از این موتان‌ها دارای نقص در ژن‌های خانه‌دار[4] هستند که نقش اساسی در تکوین جنین دارند. موتان‌های جنینی در جایگاه‌های اولیه عملکرد ژن‌ها نیز متفاوتند. نقص اولیه در موتان‌های جنینی به بافت آندوسپرم محدود می‌شود. نتیجه غیر مستقیم این نقص، اشکال در تشکیل آندوسپرم، تغییر در تکامل جنین در این موتان‌ها است. بیشتر این موتان‌های غیر عملگر به وسیله موتاژن‌های شیمیایی، اشعه ایکس، عناصر جابجاشونده[5] یا T-

[1] Antisense
[2] Loss-of-function mutations
[3] Duplicated
[4] Housekeeping genes
[5] Transposable elements

DNA مربوط به *Agrobacteruim tumifaciens* ایجاد می‌شوند (Meinke, 1995).

## نشانگرهای مولکولی

تحقیق در مورد نشانگرهای جنین‌زایی، یکی از جنبه‌های مهم اصلاح مدرن محسوب می‌شود (Schel *et al*., 1994). نشانگرهای متعدد مولکولی، بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی مرتبط با استعداد سلول‌های جنین‌زا گزارش شده‌اند که شامل ایزوزیم‌ها، نشانگرهای مولکولی و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی می‌شوند.

ایزوزیم‌ها، ابزار بسیار مفیدی برای درک بهتر مکانیزم‌های پایه تمایز سلولی و رشد گیاهی می‌باشند. ایزوزیم‌ها، علاوه بر استفاده به عنوان نشانگرهایی در مراحل انتهایی رشد (اندام‌زایی یا جوانه‌زنی بذر)، به عنوان نشانگرهایی برای مراحل ابتدایی رشد گیاه (آغاز جنین‌زایی) نیز استفاده شده‌اند. روش کشت بافت به خصوص جنین‌زایی رویشی به دلیل فراهم نمودن مواد گیاهی کافی در مرحله رویشی مورد نظر، امکان کاربرد آنالیز ایزوزیمی را برای مراحل جنین‌زایی رویشی فراهم می‌کند. به عنوان مثال، محققین دریافته‌اند که سیستم استراز برای شناسایی جنین‌زایی در پینه جو قبل از ایجاد جنین‌های رویشی بسیار حساس است (Coppens and Dewitte, 1990). همچنین در هویج، دو سیستم ایزوزیمی استراز به طور مجزا در سلول‌های جنینی و غیرجنینی بیان می‌شود (Chibbar *et al*., 1988). تحقیقات در مورد گیاه *Dactylis glomerata* نشان داده است که یک ایزوزیم استراز اسیدی (۳۶ کیلودالتون با نقطه ایزوالکتریک ۳/۸) تنها در کشت‌های سوسپانسیونی جنینی یافت شده است. همچنین الگوی اسید فسفاتازی، تفاوت‌های کمی بین کشت‌های پینه جنین‌زا و غیرجنین‌زا در قهوه، نشان می‌دهد (Menendez- Yuffa and Garcia, 1996). مرور کاملی از کاربرد ایزوزیم‌ها به عنوان نشانگرهای بیوشیمیایی در جنین‌زایی رویشی منتشر شده است (Schel *et al*., 1994). تعدادی ژن‌های کاندید[1]، به عنوان نشانگرهای مولکولی برای سلول‌های مستعد منفرد، وجود دارند (Schmidt *et al*., 1997). یکی از این ژن‌ها، ژن گیرنده جنین‌زایی رویشی شبه کیناز (SERK) می‌باشد که در سوسپانسیون سلولی مستعد در تشکیل جنین‌های رویشی *Daucus* و *Dactylis*، نقش دارد (Schmidt *et al*., 1997; Somleva *et al*., 2000).

تغییر بیان پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه در طی مراحل مختلف جنین‌زایی رویشی، می‌تواند به عنوان نشانگری جهت تعیین مرحله جنین‌زایی رویشی استفاده شود. چنانچه نتایج مطالعه بر روی *Pisum sativum* نشان داد که تولید پروتئین‌های ذخیره‌ای در جنین‌های رویشی کمتر از بذور خشک بالغ است (Griga *et al*.,2007). مطالعه با استفاده از الکتروفورز دو بعدی در پینه‌های جنین‌زا و غیرجنین‌زای Vitis *vinifera* نشان داد که پنج خانواده پروتئینی مستقل بین

[1] Candidate genes

پینه‌های جنین‌زا و غیرجنین‌زا، تفاوت معنی‌دار نشان می‌دهند و از جنبه عملکردی، ۲۶٪ در فرآیندهای متابولیسمی سلولی، ۱۹٪ در پردازش پروتئین‌ها، ۱۶٪ در تکثیر سلولی، ۱۶٪ در پاسخ به تنش و ۳٪ در انتقال پیام نقش دارند. نتایج این مطالعه، امکان شناسایی پروتئین‌های دخیل در جنین‌زایی رویشی و ژن‌های موثر در فرآیند تمایززدایی و القاء جنین‌های رویشی را فراهم می‌نماید(Marsoni *et al*., 2008).

**برداشت نهایی**

به طور خلاصه می‌توان نتایج را به صورت ذیل دسته‌بندی نمود:

– جنین‌زایی رویشی ابزار ارزشمندی برای دستیابی به محدوده وسیعی از اهداف بیوشیمی پایه تا مطالعات فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی به منظور توسعه روش‌هایی با کاربرد عملی می‌باشد. یکی از اساسی‌ترین کاربردهای جنین‌زایی رویشی، استفاده از این روش در درک رویدادهای اولیه در جنین‌زایی زایشی گیاهان عالی می‌باشد. کاربرد دیگر جنین‌های رویشی در تولید گیاهان با سطوح پلوئیدی متفاوت یعنی ایجاد جنین‌های هاپلوئید به وسیله کشت بساک و افزایش تریپلوئیدی از آندوسپرم می‌باشد. جنین‌زایی رویشی بهترین روش به منظور ایجاد گیاهان تراریخته می‌باشد و پتانسیل بالایی برای تولید متابولیت‌های جنینی مانند لیپیدها و پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه فراهم می‌کند.

– جنین‌زایی رویشی دارای فواید بسیاری در مقایسه با اندام‌زایی است، از جمله: کشت تعداد زیادی از واحدهای تکثیرشونده، امکان تولید بیشتر جنین با کار کمتر، قابلیت منشاء گرفتن جنین رویشی از یک سلول واحد جهت ایجاد کشت‌های یکنواخت، پایداری بیشتر گیاهان بدست آمده از جنین‌های رویشی نسبت به گیاهان حاصل از اندام‌زایی و تحمل کمتر جنین‌های رویشی نسبت به جهش ژن‌های مورد نیاز برای تکامل در مقایسه با مریستم‌های رویشی.

– فاکتورهای متعددی وابسته به گونه، رقم، شرایط فیزیولوژیک گیاهان مادری و ...، بیان جنین‌زایی رویشی را تحت تاثیر قرار می‌دهند اما زمانی که مرحله القای جنین‌زایی کامل شد، الگوی جنین‌زایی برای تمام اشکال جنینی اعم از رویشی و زایشی یکسان است. فاکتورهای ساختاری دیگر موثر بر القای سلول‌های پیش جنینی شامل ساختار میکروتوبول‌ها، دیواره سلولی و اندازه سلول می‌باشد.

– جنین‌های زایشی و رویشی، سیر تکامل مشابهی شامل مراحل گلبولی، قلبی شکل و اژدری را در دولپه‌ای‌ها و مراحل کروی، شاخی و لپه‌ای شکل را در تک‌لپه‌ای‌ها طی می‌کنند. این تفاوت‌های شکلی به دلیل تکامل خاص هریک از دو گروه عمده گیاهی است به طوری که جنین تک‌لپه‌ای‌ها یک لپه منفرد ایجاد کرده و به مرحله قلبی شکل نمی‌رسد. نوع دیگری از تکوین جنینی در مخروطیان شامل سه مرحله گلبولی، لپه‌ای اولیه و جنین‌های لپه‌ای موخر می‌باشد. پیدایش

قطبیت در جنین‌ها به عنوان اولین مرحله در جنین‌زایی مد نظر قرار می‌گیرد.

- تکوین و تمایز گیاه به طور مستقیم یا غیر مستقیم توسط تغییر در بیان ژن به خصوص در دوره جنین‌زایی انجام می‌شود. تحقیق در مورد نشانگرهای جنین‌زایی، یکی از جنبه‌های مهم اصلاح مدرن است. نشانگرهای مولکولی، بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی متعددی مرتبط با استعداد سلول‌های جنین‌زا، گزارش شده‌اند که شامل ایزوزیم‌ها، نشانگرهای مولکولی و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی می‌شوند.

## منابع


Baudino S, Hansen S, Brettschneider R, Hecht VF, Dresselhaus T, Lorz H, Dumas C and Rogowsky PM (2001). Molecular characterisation of two novel maize LRR receptor-like kinases, which belong to the *SERK* gene family. Planta 213: 1-10.

Carman JG (1990). Embryogenic cells in plant tissue cultures: Occurrence and behavior. *In Vitro* Cellular and Developmental Biology 26: 746- 753.

Chibbar RN, Shyluk J, Georges F, Mallard CS, Constabel F (1988). Esterasisozymes as markers of somatic embryogenesis in cultured carrot cells. Journal of Plant Physiology 133: 367-370.

Coppens L, Dewitte D (1990). Esterase and peroxidase zymograms from barley (*Hordeum vulgare* L.) callus as a biochemical marker system of embryogenesis and organogenesis. Plant Science 67: 97-105.

Corredoira E, Valladares S, Viettez M (2006). Morphohistological analysis of the origin and development of somatic embryos from leaves of mature *Quercus robur*. *In Vitro* Cellular and developmental Biology- Plant 42: 525- 533.

De Jong AJ, Schmidt EDL, De Vries SC (1993). Early events in higher plant embryogenesis. Plant Molecular Biology 22: 367-377.

De Vries SC, Booij H, Meyerink P, Huisman G, Wilde DH, Thomas TL, Van Kammen A (1988a). Acquisition of embryogenic potential in carrot cell-suspension cultures. Planta 176: 196-204.

De Vries SC, Booij H, Janssens R, Vogels R, Saris L, Lo Schiavo F, Terzi M, Van Kammen A (1988b). Carrot somatic embryogenesis depends on the phytohormone-controlled expression of correctly glycosylated extracellular proteins. Genes and Development 2: 462-476.

Dodeman VL, Ducreux G (1996). Total protein pattern expression during induction and development of carrot somatic embryos. Plant Science 120: 57-69.

Dong JZ, Dunstan DI (2000). Molecular biology of somatic embryogenesis in conifers. v. 1, p. 51-87. In: Jain, S.M. and Minocha, S.C. (Eds.) Molecular Biology of Woody Plants. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers.

Dudits D, Bögre L, Györgyey J (1991). Molecular and cellular approaches to the analysis of plant embryo development from somatic cells *in vitro*. Journal of Cell Science 99: 475-484.

Emons AMC (1994). Somatic embryogenesis: cell biological aspects. Acta Botanica Neerlandica 43: 1-14.

Faure O, Dewitte W, Nougarède A, Van Onckelen H (1998). Precociously germinating somatic embryos of *Vitis vinifera* have lower ABA and IAA levels than their germinating zygotic counterparts. Physiologia Plantarum 102: 591-595.

Filonova LH, Bozhkov PV, Brukhin VB, Daniel G, Zhivotovsky B, Von Arnold S (2000). Two waves of programmed cell death occur during formation and development of somatic embryos in the gymnosperm, Norway spruce. Journal of Cell Science 113: 4399-4411.

Fujimura T, Komamine A (1979). Mode of action of 2,4-D and zeatin on somatic embryogenesis in a carrot cell suspension culture. Zeitschrift für Pflanzenphysiologie 99: 1-8.

Gavish H, Vardi A, Fluhr R (1991) Extracellular proteins and early embryo development in Citrus nucellar cell cultures. Physiologia Plantarum 82: 606-616.

Gavish H, Vardi A, Fluhr R (1992). Suppression of somatic embryogenesis in *Citrus* cell cultures by extracellular proteins. Planta 186: 511-517.

Gray DJ, Compton ME, Harrell RC, Cantliffe DJ (1995). Somatic embryogenesis and the technology of synthetic seed. v. 30, p. 126-151.In: BAJAJ, Y.P.S. (Ed.) Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed I. Biotechnology in Agriculture and Forestry. Berlin, Springer-Verlag.

Griga M, Horáček J, Klenotičová H (2007). Protein patterns associated with *Pisum sativum* somatic embryogenesis. Biologia Plantarum 51: 201-211.

Harada JJ (1999). Signaling in plant embryogenesis. Current Opinion in Plant Biology 2: 23-27.

Hecht V, Vielle-Calzada JP, Hartog MV, Schmidt ED, Boutilier K, Grossniklaus U and De Vries SC (2001). The Arabidopsis somatic embryogenesis receptor kinase 1 gene is expressed in developing ovules and embryos and enhances embryogenic competence in culture. Plant Physiol. 127: 803-816.

He DG, Yang YM, Bertram J, Scott KJ (1990). The histological development of the regenerative tissue derived from cultured immature embryos of wheat (*Triticum aestivum* L.). Plant Science 68: 103-111.

Henry Y, Vain P, De Buyser J (1994). Genetic analysis of *in vitro* plant tissue culture responses and regeneration capacities. Euphytica 79: 45-58.

Höxtermann E (1997). Cellular 'elementary organisms' *in vitro*. The early vision of Gottlieb Haberlandt and its realization Physiologia Plantarum 100: 716-728.

Jiménez VM, Guevara E (1996). Regeneración *in vitro* mediante embryogenesis somática de variedades de cítricos. II. Efecto del plateo de suspensiones celulares en medio de cultivo con diferentes carbohidratos sobre la inducción de embriones. Agronomía Costarricense 20: 9-16.

Kaplan DR, Cooke TJ (1997). Fundamental concepts in the embryogenesis of dicotyledons: a morphological interpretation of embryo mutants. The Plant Cell 9: 1903-1919.

Khosravi S, Azghandi AV, Hadad R, Mojtahedi N (2007). *In vitro* micrpropagation of *Lilium longiflorum* cv. Ceb-Dazzle. Journal of Agricultural Research: Seed and Plant 23(2): 159- 168.

Kitamiya E, Suzuki S, Sano T, Nagata T (2000). Isolation of two genes that were induced upon the initiation of somatic embryogenesis on carrot hypocotyls by high concentrations of 2,4-D. Plant Cell Reports 19: 551-557.

Kobayashi T, Higashi K, Sasaki K, Asmi T, Yoshida S, Kamada H (2000). Purification from conditioned medium and chemical identification of a factor that inhibits somatic embryogenesis in carrot. Plant and Cell Physiology 41: 268-273.

Komamine A, Kaeahara R, Matsumoto M, Sunabori S, Toyo T, Fujiwara A, Tsukuhara M, Smith J, Ito M, Fukuda H, Nomura K, Fujimura T (1992). Mechanisms of somatic embryogenesis in cell cultures: physiology, biochemistry, and molecular biology. *In Vitro* Cellular and Developmental Biology 28: 11-14.

Krikorian AD, Simola LK (1999). Totipotency, somatic embryogenesis, and Harry Waris

(1893-1973). Physiologia Plantarum 105: 348-355.

Litz RE, Gray DJ (1995). Somatic embryogenesis for agricultural improvement. World Journal of Microbiology and Biotechnology 11: 416-425.

Lotan T, Ohto MA, Yee KM, West MAL Lo R, Kwong RW, Yamagishi K. Fischer R L, Goldberg RB and Harada JJ (1998). Arabidopsis LEAFY COTYLEDON1 is sufficient to induce embryo development in vegetative cells. Cell 93: 1195-1205.

Malabadi RB, Van Staden J (2003). Somatic embryos can be induced from shoot apical domes of mature *Pinus patula* trees. South African Journal of Botany 69: 450-451.

Malabadi RB, Choudhury H Tandon P (2004). Initiation, maintenance and maturation of somatic embryo from thin apical dome section in *Pinus kesiya* (Royle ex. Gord) promoted by partial desiccation and Gellan gum. Scientia Horticulturae 102: 449-459.

Malabadi RB, Van Staden J (2005). Somatic embryogenesis from vegetative shoot apices of mature trees of *Pinus patula*. Tree Physiology 25: 11-16.

Malabadi RB, Nataraja K (2006). Cryopreservation and plant regeneration via somatic embryogenesis using shoot apical domes of mature *Pinus roxburghii* Sarg. Trees. *In Vitro* Cellular and Developmental Biology- Plant 42: 152-159.

Marsoni M, Bracale M, Espen L (2008). Proteomic analysis of somatic embryogenesis in *Vitis vinifera*. Plant Cell Reports 27: 347–356.

Martin AB, Cuadrado Y, Guerra H, Gallego P, Hita O, Martin L, Dorado A, Villalobos N (2000). Differences in the contents of total sugars, reducing sugars, starch and sucrose in embryogenic and non-embryogenic calli from *Medicago arborea* L. Plant Science 154: 143-151.

McCabe PF, Valentine TA, Forsberg LS, Pennel RI (1997). Soluble signals from cell identified at the cell wall establish a developmental pathway in carrot. The Plant Cell 9: 2225-2241.

Meijer EA, De Vries SC, Mordhorst AP (1999). Co-culture with *Daucus carota* somatic embryos reveals high 2,4-D uptake and release rates of *Arabidopsis thaliana* cultured cells. Plant Cell Reports 18: 656-663.

Meinke DW (1995). Molecular genetics of plant embryogenesis. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 46: 369-394.

Menández-Yuffó A, García De García E (1996). Análisede patrones isoenzimáticos en callos embriogénicos y no embriogénicos de café. Phyton - International Journal of Experimental Botany 58: 15-22.

Merkle SA, Parrott WA, Flinn BS (1995). Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. p. 155-203. In: Thorpe, T.A. (Ed.) *In Vitro* Embryogenesis in Plants. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers.

Mojtahedi N, Bernard F, Shaker H (2000). *In vitro* regeneration of mature cotyledons embryos of tea (*Camellia sinensis*). 9th National Iranian Congress of Biology. Tehran, Iran.

Mojtahedi N, Koobaz P, Dabirashrafi O, Habashi AA (2010). Direct *in vitro* bulblet production in *Lilium longiflorum* cv. Gironde. Journal of horticultural science and technology, Iran 11(3): 221-234.

Mordhorst AP, Toonen MAJ, De Vries SC (1997). Plant embryogenesis. Critical Reviews in Plant Sciences 16: 535-576.

Mórocz S, Donn, G. Németh J, Dudits D (1990). An improved system to obtain fertile regenerants via maize protoplasts isolated from a highly embryogenic suspension culture. Theoretical and Applied Genetics 80: 721-726.

Namdeo AG, Jadhav TS, Rai PK, Gavali S, Mahadik KR (2007). Precursor feeding for enhanced production of secondary metabolites. Pharmacognosy Reviews 2: 227-231.

Nomura K, Komamine A (1985). Identification and isolation of single cells that produce somatic embryos at a high frequency in a carrot suspension culture. Plant Physiology 79: 988-991.

Nuti Ronchi V, Giorgetti L (1995). The cells commitment to somatic embryogenesis. v. 30, p. 3-19. In: BAJAJ, Y.P.S. (Ed.) Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed I. Biotechnology in Agriculture and Forestry. Berlin, Springer-Verlag.

Osternack N, Saare- Surminski K, Preil W, Lieberei R (1999). Induction of somatic embryos, adventitious shoots and roots in hypocotyl tissue of *Euphorbia pulcherrima* Willd. ex Klotzsch: Comparative studies on embryogenic and organogenic competence. Journal of Applied Botany 73: 197-201.

Osuga K, Masuda H, Komamine A (1999). Synchronization of somatic embryogenesis at high frequency using carrot suspension cultures: model systems and application in plant development. Methods in Cell Science 21: 129-140.

Pechan PM, Keller WA (1988). Identification of potentially embryogenic microspores in *Brassica napus*. Physiologia Plantarum 74: 377-384.

Raemakers CJJM, Jacobsen E, Visser RGF (1995). Secondary somatic embryogenesis and applications in plant breeding. Euphytica 81: 93-107.

Ravindra B, Malabadi B, Nataraja K (2006). Cryopreservation and plant regeneration via somatic embryogenesis using shoot apical domes of mature *Pinus Roxburghii* Sarg trees. *In Vitro* Cellular and Developmental Biology- Plant 42: 152–159.

Rao KS (1996). Embryogenesis in flowering plants recent approaches and prospects. Journal of Biosciences 21: 827-841.

Reinert J (1959). Uber die kontrolle der morphogenese und die induktion von adventivembryonen an gew- ebekulturen aus karotten. Planta 53: 318–333.

Schel JHN, De Ruijter NCA, Franz PF (1994). Isozymes as markers for embryogenic maize callus. v. 25, p. 456-464. In: BAJAJ, Y.P.S. (Ed.) Maize. Biotechnology in Agriculture and Forestry. Berlin, Springer-Verlag.

Schiavone FM, Cooke TJ (1985). A geometric analysis of somatic embryo formation in carrot cell cultures. Canadian Journal of Botany 63: 1573-1578.

Schmidt EDL, Guzzo F, Toonen MAJ, De Vries SC (1997). A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cell cultures. Development 124: 2049-2062.

Schrader S, Kaldenhoff R, Richter G (1997). Expression of novel genes during somatic embryogenesis of suspension-cultured carrot cells (*Daucus carota*). Journal of Plant Physiology 150: 63-68.

Sharma KK, Thorpe TA (1995). Asexual embryogenesis in vascular plants in nature. Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture 20: 17–72.

Smith DL, Krikorian AD (1989). Release of somatic embryogenic potential from excised zygotic embryos of carrot and maintenance of proembryonic cultures in hormone-free medium. American Journal of Botany 76: 1832-1843.

Smith DL, Krikorian AD (1990). Somatic embryogenesis of carrot in hormone-free medium: external pH control over morphogenesis. American Journal of Botany 77: 1634-1647.

Somleva MN, Schmidt EDL, De Vries SC (2000). Embryogenic cells in *Dactylis glomerata* L. (*Poaceae*) explants identified by cell tracking and by *SERK* expression. Plant Cell Reports 19: 718-726.

Steward FC, Mapes MO, Smith J (1958). Growth and organized development of cultured cells. I. Growth and division of freely suspended cells. American Journal of Botany 45: 693-703.

Sugiyama M (2000). Genetic analysis of plant morphogenesis *in vitro*. International Review of Cytology 196: 67-84.

Terzi M, Loschiavo F (1990). Somatic embryogenesis. p. 54- 66. In: Bhajwani, S.S. (Ed.) Plant Tissue Culture: Applications and Limitations. Amsterdam.

Toonen MAJ, De Vries SC (1996). Initiation of somatic embryos from single cells. p. 173-189. In: Wang, T.L. and Cuming, A. (Eds.) Embryogenesis: the Generation of a Plant. Oxford, Bios Scientific Publishers.

Torné JM, Moysset L, Santos M, Simón E (2001). Effects of light quality on somatic embryogenesis in *Araujia sericifera*. Physiologia Plantarum 111: 405-411.

Tulecke W (1987). Somatic embryogenesis in woody perennials. v. 2, p. 61-91.In: Bonga, J.M. and Durzan, D.J. (Eds.) Specific Principles and Methods: Growth and Developments. Cell and Tissue Culture in Forestry. Dordrecht, Martinus Nijhoff.

You XL, Han JY, Choi YE (2007). Plant regeneration via direct somatic embryogenesis in Panax japonicus. Plant Biotechnol Report 1: 5–9.

Valizade M, Bagheri A, Vesal SR (2003). Effect of different plant growth regulators on callus induction and somatic embryogenesis of *Cicer aritinum* L. The 3rd congress of biotechnology. pp. 513-515.

Van Holst GJ, Klis FM, De Wildt PJM, Hazenberg CAM, Buijs J, Stegwee D (1981). Arabinogalactan protein from a crude cell organelle fraction of *Phaseolus vulgaris* L.. Plant Physiology 68: 910-913.

Vasil IK (1987). Developing cell and tissue culture systems for improvement of cereal and grass crops. Journal of Plant Physiology 128: 193- 218.

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

Warren Wilson J, Warren Wilson PM (1993). Mechanisms of auxin regulation of structural and physiological polarity in plants, tissues, cells and embryos. Australian Journal of Plant Physiology 20: 555-571.

Wilde, HD, Seffens WS, Thomas TL (1995). Gene expression in somatic embryos. v. 30, p. 41-52. In: BAJAJ, Y.P.S. (Ed.) Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed I. Biotechnology in Agriculture and Forestry. Berlin, Springer-Verlag.

Yesil-Celiktas O, Gurel A, Vardar-Sukan F (2010). Large scale cultivation of plant cell and tissue culture in bioreactors Transworld Research Network Kerala, India. pp. 1-54.

Zimmerman, J.L. (1993). Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. The Plant Cell 5: 1411-1423.

# Application, factors and responsible genes in Somatic embryogenesis of plants

**Mojtahedi N.[1*], Koobaz P.[1], Khosravi S[2].**

[1] Academic member of Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Karaj, Iran.
[2] Expert of Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Karaj, Iran.

In spite of rapid progress in plant biotechnology, somatic embryogenesis has been used as one of the most applicable techniques for micropropagation and plant regeneration, lack of comprehensive and systematic studies associated with the somatic embryogenesis still persists up to now. In this review paper, general aspects of *in vitro* somatic embryogenesis such as terminology, factors which are involved in somatic embryogenesis in different species and induction and development stages in the gymnosperm, dicots (globular, heart-shaped and torpedo) and monocots (globular, scuetellar, and coleoptilar stages) have been explained. Plant growth regulators functions, physiological condition of mother plants, application of somatic embryogenesis for transgenic crop production, genetically approaches such as gene expression pattern involved in somatic embryogenesis and finally molecular and physiological markers to distinguish the embryogenic competence cells have been discussed in the present paper.

Keywords: Somatic embryogenesis, Induction, Physiological factors, Plant hormones.

[*] Corresponding Author: Mojtahedi N. Tel: 02632703536 Email: narmojtahedi@gmail.com