جنین‌زایی بدنی از کالوس گیاه یونجه (*Medicago sativa*) با استفاده از اتینیل استرادیول

علی اکبر احسانپور و رضا طاهری[۱]

چکیده

در پژوهش حاضر اثر اتینیل استرادیول (یکی از مشتقات استروژن) روی باززایی گیاه یونجه بررسی شد. نخست بذرهای یونجه در محیط کشت MS (Murashige & skoog,1962) درشرایط آزمایشگاهی کشت شدند. پس از آن قطعات جدا کشت ساقه و هیپوکوتیل به محیط کشت القا کالوس برده و کالوس تولید شد. برای باززایی گیاه یونجه ۱۴محیط کشت با ترکیب هورمونی مختلف از اکسین، سیتوکتین و اتینیل استرادیول ساخته شد و در ۲ مرحله، یکی کالوس‌های ۳ تا ۴ هفته‌ای و در مرحله دیگر جداکشت‌های هیپوکوتیل و ساقه یونجه به آنها منتقل گردید.

نتایج نشان داد کالوس‌هایی‌که به محیط کشت‌های حاوی اکسین و اتینیل استرادیول منتقل شده‌اند بعد از چند هفته ایجاد جنین سوماتیک، ریشه و ساقه نمودند. در قطعات جداکشت پس از ۱۰ روز ظهور ریشه دیده شد. بررسی‌ها نشان داد که ظهور ریشه و ساقه و تشکیل جنین سوماتیک به واسطه تعامل اکسین و اتینیل استرادیول القا شده است و حضور هریک از هورمون‌ها به تنهایی نمی‌تواند آثار ذکر شده را نشان دهد.

واژه‌های کلیدی: *استروژن، اتینیل استرادیول، باززایی، یونجه*

مقدمه

گیاه یونجه (*Medicago sativa*) در ایران دارای گونه‌های بسیاری است و از نظر غذای دام، پوشش گیاهی، نثبیت نیتروژن و از نظرداروییی بسیار حائز اهمیت است. این گیاه نسبت به شوری نسبتاً مقاوم بوده و بهبود رشد ونمو این گیاه از نظر زراعی با ارزش است(۳). بررسی‌های بسیاری در زمینه کشت بافت یونجه گزارش شده است. به عنوان مثال نولان (۱۵) درسال ۱۹۹۸ با استفاده از ,BAP NAA و ABA نسبت به تولید جنین سوماتیک از این گیاه اقدام کرده، هم‌چنین تولید کالوس از قطعات هیپوکوتیل این گیاه در محیط کشتB5 نیز با استفاده از

۱. به ترتیب دانشیار و کارشناس ارشد زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-04-23]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1384.9.1.8.1]

هورمون‌های 4-D ,2 و BA گزارش شده است (۱۸). براسیوستروئیدها در حال حاضر در کنار اکسین‌ها، سیتوکینین‌ها، جیبرلین‌ها، اتیلن و آبسیزیک اسید به عنوان ششمین گروه هورمون‌های گیاهی شناخته می‌شوند(۵، ۶ و۷). این هورمون‌ها در جوانه‌زنی، تحریک تقسیم سلولی و تمایز بافت چوبی مؤثر بوده و گاهی با سایر هورمون‌های گیاهی اثر متقابل و گاهی اثر تشدید کنندگی داشته و آثار رشد و نموی نیز نشان می‌دهند(۱۱ و ۱۷)، با این وجود تا کنون کاربرد این هومون‌ها در شرایط آزمایشگاهی کمتر مورد توجه قرار گرفته و به جز یک مورد که توسط حسامی (۱۲) در سال ۲۰۰۲ گزارش شده تحقیق علمی دیگری به ویژه روی اتینیل استرادیول صورت نگرفته است. اتینیل استرادیول، از نظر ساختمان شیمیایی از مشتقات هورمون‌های استروئیدی است که در سلول‌های جانوری داری نقش متابولیسمی مهمی هستند، اگر چه این هورمون بنیان مشترک با براسینواستروئیدها دارد ولی نقش و مکانیزم عمل آن در گیاهان تا کنون مورد بررسی قرار نگرفته است (۸ و ۱۳). از آنجایی که پاسخ‌های گیاه نسیت به شرایط کشت بافت بویژه محیط کشت غلظت و نوع هورمون‌هایی که جهت بازایی و یا تولید جینین سوماتیک به کار می‌رود، به شدت وابسته به ژنوتیپ است(۹)، بنابراین به دست آوردن شرایط بهینه برای کشت و تولید جنین سوماتیک برای ارقام و یا گونه‌های مختلف گیاه یونجه به عنوان یک گیاه با ارزش باید مورد بررسی قرار گیرد. به عنوان مثال تحقیقات انجام شده روی *Medicago truncatula* نشان داه که پاسخ این گیاه نسبت به سایر گونه‌های یونجه کاملاً متفاوت است(۱۵). تا کنون مطالعاتی مبنی بر استفاده از اتینیل استرادیول بر رشد و نمو و فیزیولوژی سلول‌های جانوری صورت گرفته است(۴) ولی تأثیر این هورمون بر چگونگی رشد ونمو و به ویژه باز زایی و تولید جنین سوماتیک در گیاهان منتشر نشده است. از آنجایی که دست یابی به یک سیستم تولید جنین سوماتیک با درصد نسبتاً بالا به عنوان ابزار بسیار با ارزشی برای ایجاد گیاهان تراریخت (Transgenic) می‌باشد (۱)، بنابراین هدف این تحقیق بررسی آثارینیل استرایول در ایجاد جینین سوماتیک درگیاه یونجه رقم رهنانی است. این سیستم در آینده می تواند به منظور بهبود کیفیت و یا افزایش میزان مقاومت یونجه نسبت به شرایط سخت طبیعت استفاده شود.

مواد و روش‌ها

بذر یونجه از مرکز تحقیقات امور دام و منابع طبیعی اصفهان تهیه گردید. بذرها برای ضدعفونی به مدت ۳۰ ثانیه در الکل ۷۰ در صد و۲۰دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۳۰ درصد قرار گرفتند بعد از آن بذرها در محیط کشتMS (۱۴) کشت گردیدند. پس از ۴-۳ هفته در هر شیشه کشت تعداد ۴-۵ قطعه جداکشت به اندازه تقریبی ۰/۵ سانتی‌متر از ساقه و هیپوکوتیل گیاهان رشد یافته در محیط کشت MS جدا شده و برای تولید کالوس به محیط کشت MS حاوی Kin, 2,4-d و NAA هر کدام با غلظت ۲ میلی گرم در لیتر به تعداد ۱۰ شیشه منتقل شدند. زمانی‌که قطعات کالوس به قطر ۰/۵ سانتی‌متر رسیدند(پس از حدود ۳ هفته) به محیط کشت جنین زایی منتقل شدند. کلیه مراحل کشت بذر و قطعات جداکشت تحت شرایط استریل انجام گرفته و در نهایت نمونه‌های کشت شده در شیشه در اتاق کشت با دمای ۲۵ در جه سانتی‌گراد و شدت نور ۱۵۰۰ لوکس و زمان نور دهی ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفتند.

طراحی محیط‌های کشت باززایی

برای ارزیابی اثر اتینیل استرادیول بر جنین زایی گیاه یونجه، در مجموع ۱۴ ترکیب هورمونی متفاوت درنظر گرفته شد که برای سهولت کار، این محیط کشت‌ها به اختصار از M1 تا M14 نام‌گذاری شدند(جدول ۱). این ترکیب‌های هورمونی به محیط کشت پایه MS اضافه شد. ۵ قطعه کالوس با قطر متوسط ۰/۵ سانتی‌متر به محیط کشت‌های باز زایی با ۱۰ تکرار منتقل گردیدند و مشاهدات درمورد چگونگی تغییرات آنها در تیمارهای مختلف هر ۱۰ روز یک بار ثبت شدند. گیاهان باززایی شده پس از اثبات وجود جنین سوماتیک به محیط

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-04-23]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1384.9.1.8.1]

جدول ۱. ترکیب هورمونی محیط‌های کشت جنین زایی سوماتیک

نام محیط کشت	تر کیب هورمونی که به محیط کشت پایه MS افزوده شده است
M1	(NAA (0.5 mg/L)+TDZ (1 mg/L) + ethinyl estradiol (0.5 mg/L)
M2	(NAA (0.5 mg/L) + TDZ (1 mg/L) + ethinyl estradiol (1 mg/L)
M3	NAA (0.5 mg/L) + TDZ (1 mg/L) + ethinyl estradiol (2 mg/L)
M4	NAA (0.5 mg/L) + TDZ (1 mg/L)
M5	NAA (0.5 mg/L) + ethinyl estradiol (0.5 mg/L)
M6	NAA (0.5 mg/L) + ethinyl estradiol (1 mg/L)
M7	NAA (0.5 mg/L) + ethinyl estradiol (2 mg/L)
M8	NAA (0.5 mg/L)
M9	Ethinyl estradiol (1 mg/L)
M10	IAA (0.1 mg/L) + BAP (1 mg/L)
M11	IAA (0.1 mg/L) + BAP (1 mg/L) + Ethinyl estradiol (1 mg/L)
M12	IAA (0.1 mg/L) + ethinyl estradiol (1 mg/L)
M13	NAA (0.5 mg/L) + BAP (1 mg/L)
M14	NAA (0.5 mg/L) +BAP (1 mg/L) + Ethinyl estradiol (1 mg/L)

کشت پایه MS ، فاقد هورمون منتقل گردیدند. پس از ریشه‌دار شدن ساقه‌ها، گیاهان به گلدان‌ها (شرایط *ex vitro*) منتقل گردیده و رطوبت آنها جهت سازگاری گیاه با شرایط جدید به آرامی کاهش داده شد(شکل۴). داده‌های به دست آمده علاوه بر ANOVA بر اساس فرض برابری نسبت‌ها با استفاده از آماره کای دوی پیرسین نیز مورد آزمون قرار گرفت(۲).

نتایج

نتایج به دست آمده از کشت کالوس در محیط‌های کشت جنین‌زا در جدول ۲ ارائه شده است.کالوس‌ها در سه محیط کشت M1 تا M3 به خوبی رشد کرده و سبز شدند، علاوه بر این ۲ درصد از کالوس‌ها تولید ساختارهای شبیه به جنین سوماتیک نمودند ولی اندام زایی مشاهده نگردید. در محیط کشت M4 کالوس‌ها رشد نداشته و اندام زایی نیز در آنها دیده نشد. پس از حدود ۴ هفته از واکشت کالوس‌ها در محیط کشت‌های M5 تا M7، جنین سوماتیک در روی آنها مشاهده گردید(شکل۱). ۴۰ درصد از کالوس‌ها جنین تولید نمودند که میانگین تعداد آنها در هر قطعه کالوس ۲ عدد بود. در محیط M6، ۵۰ درصد و در محیط M7 ۳۰ در صد از کالوس‌ها تولید جنین سوماتیک نمودند. با وجود این‌که جنین‌های سوماتیک تولید شده از لحاظ مورفولوژی کاملاً قابل تشخیص بودند ولی برای اطمینان بیشتر مطالعات میکروسکوپی روی آنها انجام گرفت. نتایج به دست آمده در شکل ۲ نشان داده شده است. در این تصویر میکروسکوپی سلول‌های مریستمی مولد ریشه و ساقه و بخش‌های مریستمی بینابینی آنها کاملا قابل رؤیت است.

جدا کشت‌های منتقل شده به محیط کشت‌های M5 تا M7 ۷ روز پس از واکشت شروع به ریشه‌دهی کردند. میانگین تعداد ریشه‌ها در هر جدا کشت ۲ عدد بود. برای پاسخ به این سؤال که آیا القای جنین سوماتیک و ریشه ناشی از عملکرد اتینیل استرادیول و یا اکسین می‌باشد، محیط کشت‌های M8 و M9 طراحی شدند. چنانچه اکسین (NAA) باعث القای جنین سوماتیک و ریشه باشد باید در محیط کشت M8 نیز این دو

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-04-23]

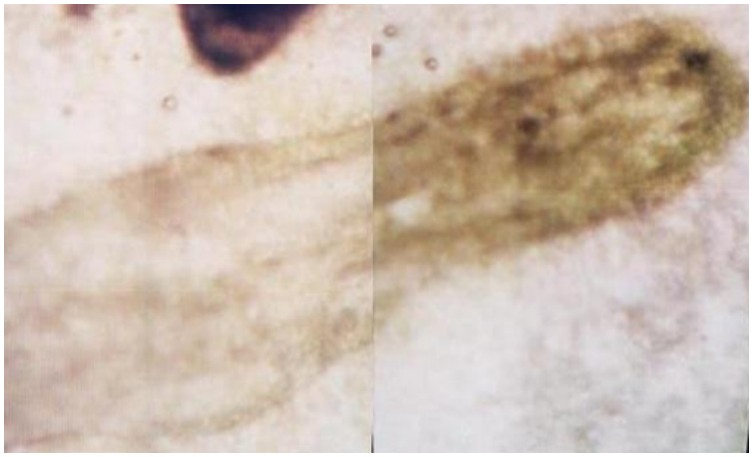
[DOR: 20.1001.1.22518517.1384.9.1.8.1]

جدول۲. نتایج حاصل از باززایی قطعات کالوس در محیط کشت‌های باززایی M!-M14

محیط کشت	درصد تولید جنین‌زایی سوماتیک و یا اندام‌زایی کالوس‌ها	توضیحات
M1	2	تولید ساختار شبیه جنین سوماتیک بدون اندام زایی
M2	2	تولید ساختار شبیه جنین سوماتیک بدون اندام زایی
M3	2	تولید ساختار شبیه جنین سوماتیک بدون اندام زایی
M4	0	رشد در کالوس ها کاملا متوقف شد.
M5	40	کالوس‌ها سبز شده و جنین سوماتیک همراه با ریشه و ساقه تولید کردند.
M6	50**	کالوس‌ها سبز شده و جنین سوماتیک همراه با ریشه و ساقه تولید کردند.
M7	30	کالوس‌ها سبز شده و جنین سوماتیک همراه با ریشه و ساقه تولید کردند.
M8	0	کالوس‌ها پس مدتی قهوه‌ای شده و از بین رفتند.
M9	0	کالوس‌ها پس مدتی قهوه‌ای شده و از بین رفتند.
M10	0	کالوس‌ها پس مدتی قهوه‌ای شده و از بین رفتند.
M11	0	کالوس‌ها پس مدتی قهوه‌ای شده و از بین رفتند.
M12	12	نوساقه و ریشه تولید کردند ولی جنین سوماتیک مشاهده نشد.
M13	0	کالوس‌ها بدن رشد ماندند.
M14	0	کالوس‌ها بدن رشد ماندند.

** : بیانگر معنی‌دار بودن اختلاف داده‌ها ($p<۰/۰۱$) بر اساس آنالیز واریانس(ANOVA) می‌باشد.

شکل ۱. ایجاد جنین سوماتیک در کالوس‌های یونجه در اکسین و اتینل استرادیول (محیط کشت M6)



شکل۲. تصویر میکروسکوپی از جنین سوماتیک محیط کشت حاوی در کالوس‌های یونجه در محیط کشتM6 (بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰)

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-04-23]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1384.9.1.8.1]

پدیده مشاهد گردد و چنانچه اتینیل استرادیول به تنهایی بتواند باعث القای ریشه و جنین گردد محیط M9 باید این پدیده را داشته باشد. نتایج به دست آمده نشان داد که کالوس‌ها و قطعات جدا کشت در هر دو محیط کشت بدون آنکه رشد کنند و یا اندام زایی و تولید جنین داشته باشند پس از حدود ۳ هفته تماماً قهوه‌ای شده و از بین رفتند. نتایج به دست آمده نشان داد که اکسین و اتینیل استرادیول به تنهایی نمی‌توانند با عث القای ریشه و یا جنین سوماتیک گردند. بلکه ترکیب (combination) این دو هورمون است که باعث ریشه زایی و تولید جنین سوماتیک می‌شود. کالوس‌ها در محیط کشت M11 رشد خوبی نداشتند و پس از ۳ هفته قهوه‌ای شده و بدون جنین‌زایی و اندام‌زایی از بین رفتند. این نتایج نشان می‌دهد ترکیب BAP با اتینیل استرادیول عملکرد مناسبی برای رشد یا اندام زایی ندارد. ۱۳ درصد از کالوس‌های منتقل شده به محیط محیط کشت M12، ده روز پس از واکشت تولید نوساقه کردند.۳۰ روز پس از واکشت تعداد کالوس‌هایی که ریشه تولید کردند به ۵۰ درصد رسید (شکل ۳).

بحث

با توجه به این‌که گزارش علمی منتشر شده‌ای در زمینه تأثیر اتینیل استرادیول بر باززایی گیاه یونجه در دست نیست، محیط کشت های پایه MS با ترکیب هورمونی یک اکسین (IAA)، یک سیتوکنین (TDZ) و اتینیل استرادیول در غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر مورد استفاده قرار گرفت و قطعات کالوس با قطر حدود ۰/۵ سانتی‌متر به این محیط کشت‌ها منتقل گردید. محیط کشت M4 نیز به عنوان شاهد برای این سه محیط کشت استفاده شد. نتایج نشان داد کالوس‌ها در محیط کشت M1 تا M3 به خوبی رشد کرده و سبز رنگ می‌شوند ولی اندام‌زایی در این محیط کشت‌ها دیده نمی‌شود. حدود ۲٪ از کالوس‌ها نیز اندام شبیه به جنین سوماتیک تولید می‌کنند. بررسی‌ها نشان داد این اندامک‌ها مرحله قلبی شکل از مراحل تکوین جنین هستند. با فرض این‌که در آزمایش‌های انجام گرفته اتینیل استرادیول نقش یک اکسین را ایفا می‌کند(۱۶). می‌توان گفت احتمالاً حضور سیتوکنین (TDZ) با غلظت استفاده شده در محیط کشت باعث شده است، زیرا مشخص شده که نسبت اکسین به سیتوکنین در محیط کشت عامل بسیار مهمی در اندام زایی کالوس‌ها است. محیط کشت M5 تا M7 با ترکیب هورمونی اکسین (NAA) و غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر اتینیل استرادیول طراحی گردید. نتایج ذکر شده نشان داد کالوس‌های منتقل شده به این سه محیط کشت ریشه و جنین سوماتیک تولید کرده‌اند. درصد جنین‌های سوماتیک تولید شده در این محیط کشت‌های M5 تا M7 به ترتیب ۴۰، ۵۰ و ۳۰ درصد است. این نتایج نشان می‌دهد اتینیل استرادیول (درمحدوده غلظت‌های استفاده شده) با غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر بیشترین اثر القایی در تولید جنین سوماتیک داشته است، بنابراین بهترین ترکیب هورمونی برای راندمان تولید جنین سوماتیک ترکیب استفاده شده در محیط کشت M6 است. ممکن است. ممکن است نتایج به دست آمده به این دلیل باشدکه حضور اتینیل استرادیول بدون حضور سیتوکنین باعث تقویت اثر هورمونی اکسین و بروز ریشه و تولید جنین سوماتیک شده است، ولی کالوس‌هایی که به محیط کشت M8 (NAA 0.5 mg/L) و M9 (ethinyl estradial 1 mg/L) منتقل شدند در هر دو محیط کشت رشد نکردند. در تفسیر این نتایج می‌توان پیشنهاد نمود که ممکن است واکنش متقابل بین اکسین (NAA) و اتینیل استرادیول موجب تحریک تمایز ریشه و جنین سوماتیک شده و یا این‌که اتینیل استرادیول نقش یک سیتوکنین را ایفا کرده و نسبت بین اکسین و اتینل استرادیول در القای تمایز نقش مهم‌تری داشته است. در محیط دیگر که تنها شامل یک اکسین و سیتوکنین هستند کالوس‌ها رشد کرده و سبز رنگ شدند. اما کالوس‌های در محیط کشت حاوی اکسین و اتینیل استرادیول (M12)، اندام‌زایی نمودند. اندام‌زایی در محیط کشتM12 نشان می‌دهد که هم‌آهنگی و حضور این دو هورمون باعث بروز پدیده باززایی می‌گردد ولی اثر کمتری در تولید جنین سوماتیک نشان می‌دهد.

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-04-23]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1384.9.1.8.1]

شکل ۳. ایجاد نوساقه در کالوس‌های یونجه در محیط کشت M12

۱

۲

۳

۴

۵

شکل ۴. مراحل مختلف باززایی گیاه یونجه از طریق ایجاد جین سوماتیک

۱. تهیه قطعات جداکشت از هیپوکتیل و ساقه

۲. تولید کالوس از قطعات جداکشت وانتقال آنها به محیط باززایی

۳. باززایی و تولید جنین سوماتیک

۴. انتقال گیاهان به گلدان و کاهش تدریجی رطوبت

۵. ایجاد گیاه کامل

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-04-23]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1384.9.1.8.1]

کالوس‌های منتقل شده به محیط کشت M8 تا M11 بدون آن‌که رشد کنند، تحلیل رفته و قهوه‌ای شدند. به نظر می‌رسد واکنش متقابل BAP و اتینیل استرادیول واکنش مفیدی نباشد. این مطلب نیز مجدداً گویای این است که ممکن است اتینیل استرادیول نقش اکسینی داشته و BAP می‌تواند اثر آن را خنثی کند. به هرحال با توجه به این‌که نقش دقیق هورمون‌های استروئیدی بر سلول‌های گیاهی کاملاً مشخص نشده است. این فرضیات نیاز به بررسی‌های دقیق‌تر علمی دارد.

با توجه به گزارش(۱۰) قطعات ساقه و هیپوکوتیل، بافت‌های فعالی برای باززایی هستند، بنابراین برای انجام باززایی مستقیم از این قطعات استفاده گردید. قطعات هیپوکوتیل و ساقه به اندازه تقریبی ۰/۵ سانتی‌متر به محیط‌های کشت M1 تا M14 منتقل گردید. نتایج نشان می‌دهد که قطعات جداکشت ساقه و هیپوکوتیل که به محیط کشت M5 تا M7 منتقل شدند، پس از یک هفته تولید ریشه نمودند. تعداد ریشه‌های تشکیل شده به طور میانگین ۲ ریشه در هر قطعه جداکشت بود. این نتایج نشان داد اتینیل استرادیول در القای ریشه بسیار مؤثر است.

براساس جمع بندی نتایج به دست آمده به نظر می‌رسد بهترین ترکیب هورمونی برای القای اندام زایی و تولید جنین سوماتیک در گیاه یونجه ترکیب یک اکسین و اتینیل استرادیول (مثل محیط کشت M5، M6 و M12) می‌باشد. با توجه به منابع موجود تولید ریشه و جنین سوماتیک از مهم‌ترین مشخصات حضور اکسین در محیط‌های کشت در شرایط آزمایشگاهی می‌باشد (۱). علاوه بر این بنا به گزارش Sara و همکاران (۱۶) براسینواستروئیدها عملکردی شبیه به اکسین دارند. بنابراین به نظر می‌رسد در ترکیب اکسین و اتینیل استرادیول احتمالاً، اتینیل استرادیول با اثر متقابل خود با اکسین و یا عملکرد سینرژیسم (Synergism) با آن باعث القای تمایز ریشه و جنین سوماتیک مؤثر بوده است، ولی چون ساختمان شیمیایی آن استروئیدی است و از نظر حلقه‌های استروئیدی مشابه با اسینوستروئیدهاست. بنابراین احتمالاً در گیاهان با مکانیزمی مشابه براسینواستروئیدها عمل می‌کنند.

منابع مورد استفاده

۱. احسانپور، ع. و ف. امینی. ۱۳۷۹. *کشت سلولی و بافت گیاهی*. انتشارات جهاد دانشگاهی اصفهان.

۲. خردمند نیا، م. و غ. قاسمی تودشکی. ۱۳۷۷. تحلیل آماری داده‌های طرح همه‌گیرشناسی اختلالات روانی اصفهان. مجله پژوهشی دانشگاه اصفهان۳: ۲۰۲-۲۰۶

۳. کریمی، ه. ۱۳۷۵. *گیاهان زراعی*. انتشارات دانشگاه تهران.

۴. صریریان، ر . ۱۳۸۱. آثار استروژن بر لیپیدها و لیپوپروتئین‌های سرم رات. پایان نامه کارشناسی ارشد علوم جانوری، دانشکده زیست شناسی، دانشگاه اصفهان.

5. Andrzej, B. and T. Andrzej. 2003. The chemical characteristic and distribution of brassinosteroids in plants. Phytochem. 62: 1027-1046.
6. Bvioy, V. and R. Seeta. 1998. Effect of brassinosteroids on growth, metabolite content and yield of *Arachis hypogaea*. Phytochem. 48: 927-930.
7. Camille, M. and M. Peter. 2001. A role of brassinosteroids in germination in *Arabidopsis*. Plant Physiol. 125: 763-769.
8. Carsten, M. and A. Thomas. 1999. Physiology and molecular mode of action of brassinosteroids. Plant Physiol. and Biochem. 37: 363-372.
9. Ehsanpour, A. A. and M. G. K. Jones. 2001. Plant regeneration from mesophyll protoplast of potato (*Solanum tuberosum*) cultivar Delaware using silver thisulfate. J. sci. 12: 103-110
10. Ehsanpour, A. A. and E. Saadat. 2002. Plant regeneration from hypocotyl culture of *Peganum harmala*. Pak. J. Bot. 34: 253-256

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-04-23]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1384.9.1.8.1]

11. Gerhard, J. and Y. Takayo. 2001. Plant steroid hormones, brassinosteroids current high lights of molecular aspects on their synthesis/metabolism, transport, perception and response. Plant and Cell Physiol. 42: 114-120.
12. Hisami, S. 2002. Brassinolide promotes adventitious shoot regeneration from cauliflower hypocotyl segments. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 71: 111-116.
13. Hooley, R. 1996. Plant steroid hormones emerge from the dark. TIG 12: 281-283.
14. Murashige, I. and F. Skooge. 1962. aravised for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Plant physiol. 159:437-497
15. Nolan, K. E. and R. J. rose. 1998. plant regeneration from cultured *Medicago truncatula* with particular refren to abscisic and light treatment. Aust. J. Bot 46: 151-160
16. Sara, V., S. Izabela, B. Peter, D. Julia and F. Lada. 2002. Developmental pathway of somatic embryogenesis. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 69: 233-249.
17. Taiz, L. and E. Zeiger. 1998. Plant Physiology. Sinauer Associates Pub., USA.
18. zafar, Y. 1995. Plant regeneration from explants and protoplast derived callus of *Medicago littoralis.* Plant Cell Tissue Organ Culture 41: 41-48

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-04-23]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1384.9.1.8.1]