مقاله پژوهشی

نشریه علمی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران
شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/ijrfpbgr.2020.341849.1359

جلد ۲۸، شماره ۱، صفحه ۱۶۰-۱۴۹ (۱۳۹۹)
شناسه دیجیتال (DOR): 98.1000/1735-0891.1398.28.152.55.1.1603.41

کشت جنین بذر به‌منظور غلبه بر خفتگی بذر و تولید گیاهچه گیاه دارویی چویل (*Ferulago angulata* (Schlecht.) Boiss.)

سید مهران علوی مهریان[۱]، ناصر زارع[۲*]، اسد معصومی اصل[۳]، پریسا شیخ‌زاده مصدق[۴] و رسول اصغری زکریا[۵]

۱- دانش آموخته دکترای اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی

۲- نویسنده مسئول مکاتبات، دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی

پست الکترونیک: zarenasser@yahoo.com

۳- استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه یاسوج

۴- استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی

۵- استاد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۱/۱۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۴/۲۵

چکیده

گیاه دارویی چویل (*Ferulago angulata*) متعلق به خانواده چتریان می‌باشد که بوسیله بذر تکثیر می‌شود، ولی خفتگی بذر عامل محدود کننده‌ای در تکثیر این گیاه است. به‌منظور ارزیابی کارایی کشت درون‌شیشه‌ای و همچنین ترکیب محیط کشت و نوع ریزنمونه بر رفع خفتگی بذر در گیاه چویل، آزمایشی به‌صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی در پنج تکرار اجرا شد. تیمارها شامل چهار اکوتیپ (آبنهر، گایونه، وزگ و سی‌سخت) از استان کهگیلویه و بویراحمد و سه غلظت مختلف از محیط کشت پایه موراشیگ و اسکوگ (یک چهارم، یک دوم و کامل) بودند. بذرهای جمع‌آوری شده پس از ضدعفونی، به‌صورت بذر کامل و رویان‌های جدا شده در محیط‌های ذکرشده کشت شدند. در این آزمایش، رویان‌های جدا شده با توجه به نوع اکوتیپ بعد از ۶-۳ روز جوانه زدند. اما در بذرهای کامل در محیط‌های کشت مورد استفاده هیچ‌گونه جوانه‌زنی مشاهده نشد. نتایج کشت رویان نشان داد که اثر محیط کشت و نوع اکوتیپ به‌طور معنی‌داری همه صفات گیاهچه‌ای اندازه‌گیری شده را تحت تأثیر قرار داد. مقایسه میانگین تیمارها نشان داد که بین محیط‌کشت‌های مختلف اختلاف آماری معنی‌داری وجود داشت و محیط کشت ۱/۴MS نسبت به دو محیط کشت دیگر از نظر درصد جوانه‌زنی رویان و رشد گیاهچه برتری داشت. بین اکوتیپ‌های مختلف نیز از نظر آماری اختلاف معنی‌داری وجود داشت و اکوتیپ گایونه درصد جوانه‌زنی رویان و رشد گیاهچه بالاتری نسبت به بقیه اکوتیپ‌ها داشت. بنابراین، کشت درون‌شیشه‌ای رویان‌های بذری گیاه چویل روی محیط کشت ۱/۴MS روش مناسبی برای غلبه بر خفتگی بذر فراهم می‌کند. گیاهچه‌های حاصل از جوانه‌زنی و رشد جنین با موفقیت به گلدان و محیط طبیعی انتقال یافت. با توجه به نتایج این تحقیق، عوامل بازدارنده جوانه‌زنی در گیاه چویل، در پوشش اطراف رویان قرار داشته و تا زمانی که عوامل بازدارنده رفع نشود، رویان قادر به جوانه‌زنی نخواهد بود. بنابراین، جداسازی و کشت رویان در شرایط درون‌شیشه‌ای ابزار مناسبی را برای رفع خفتگی بذر این گیاه، به‌ویژه برای مطالعات آزمایشگاهی فراهم می‌کند.

واژه‌های کلیدی: خواب بذر، چویل، کشت بافت گیاهی، گیاهان دارویی

مقدمه

تغییر شرایط محیطی در دهه‌های گذشته و برداشت بیش از حد گیاهان خودرو از طبیعت به وسیله انسان و همچنین شرایط نامساعد اقلیمی (خشکسالی) باعث شده است تا جمعیت گیاهان خودرو به سرعت کاهش یابد. ازاین‌رو برای پیشگیری از خطر از بین رفتن گیاهان بومی در آینده، استفاده از روش‌های متفاوت و کارآمد برای تکثیر، کشت و نگهداری آنها ضروریست (Copeland & McDonald, 2001; Fu, *et al*., 2013). یکی از موانع عمده کشت گیاهان دارویی در خارج از رویشگاه طبیعی، محدودیت میزان جوانه‌زنی و طولانی بودن خفتگی بذر آنها می‌باشد (Gupta, 2003). طی دوره خفتگی حتی اگر شرایط محیطی مناسب فراهم باشد، جوانه‌زنی انجام نخواهد شد. این امر در شرایط نامساعد رویشی سودمند است، زیرا بذر غیرفعال می‌باشد و بسیاری از تنش‌های محیطی و شرایط نامناسب اقلیمی را بهتر تحمل کرده و تداوم نسل و بقای گونه گیاهی را تضمین می‌نماید (Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006). باوجوداین، گاهی خفتگی بذرها یک وضعیت نامطلوب در نظر گرفته می‌شود، به‌ویژه اگر هدف تولید انبوه یک گیاه با ارزش اقتصادی یا دارویی بالا باشد. بنابراین پژوهشگران تلاش می‌نمایند تا با بررسی علل خفتگی بذرها، روش‌هایی مناسب را برای شکست خفتگی و افزایش درصد و سرعت جوانه‌زنی بذرها فراهم کنند. به‌طور طبیعی روش کشت بافت نیز در این راستا می‌تواند کمک مؤثری نماید. کشت بافت ابزاری مهم در مطالعات پایه و کاربردی است و از این طریق می‌توان به تکثیر گیاهان مختلف یک‌دست از لحاظ ژنتیکی ازجمله گیاهان دارویی، زینتی و غیره به شکل عاری از آفت اقدام نمود (Ehsanpour & Amini, 2002).

اهمیت دارویی و اقتصادی گیاهان تیره چتریان باعث گردیده که بسیاری از گونه‌های متعلق به این تیره در معرض برداشت بی‌رویه، تخریب و انقراض قرار گیرند تا جایی که دیگر عرصه‌های منابع طبیعی به تنهایی نمی‌تواند جوابگوی این نیازها باشد، بنابراین احیاء، توسعه و به‌کارگیری اصولی گیاهان باقیمانده در طبیعت و همچنین کشت و اهلی نمودن این گیاهان ضرورت پیدا کرده است (Sharifi *et al*., 2015). گیاه چویل با نام علمی *Ferulago angulata (Schlecht.)* Boiss متعلق به خانواده چتریان (Apiaceae) می‌باشد. جنس Ferulago دارای حدود ۳۵ گونه در سراسر دنیا می‌باشد که هفت گونه آن در ایران رشد می‌کند (Mozafriyan, 2006). گیاه چویل، گونه انحصاری ایران و خاص منطقه غرب کشور است، گیاهی است پایا، بدون کرک، بلند به ارتفاع ۱۶۰–۵۰ سانتی‌متر با ساقه‌ای ضخیم، ایستاده، منفرد، دارای خطوط طولی یا شیاردار با شاخه‌های دارای گل‌آذین طویل با برگ‌های کمرنگ و متمایل به کبود و وسیع، بسیار بریده، گل‌آذین خوشه گرزن فشرده، میوه مریکارپ بیضی پهن، دارای نوارک ترشحی پشتی و موسم گل‌دهی آن خرداد تا تیرماه است (Ghahreman, 1986). چویل ارزش زیادی در صنایع دارویی، آرایشی و بهداشتی دارد. اسانس این گیاه دارای خواص ضدعفونی کننده، ضد میکروبی و تسکین‌دهنده بوده، همچنین دارای تأثیرات حفاظتی و نگهدارنده مواد غذایی می‌باشد. علاوه‌براین مصارف، در درمان بیماری‌های گوارشی و کرم‌های روده‌ای مورد استفاده قرار می‌گیرد (Taran *et al*., 2010). همچنین به علت عطر خوشایند، قابلیت استفاده در صنایع عطرسازی را داراست و از گل‌های باز شده و برگ‌های جوان آن برای خوش‌بو و خوش‌طعم کردن دوغ، ماست و کره استفاده می‌شود. به‌طوری‌که از دیرباز به‌صورت سنتی با افزودن به مواد لبنی به‌ویژه روغن، با ایجاد طعم بسیار مطبوع، از فاسد شدن آن جلوگیری کرده و با قرار دادن آن در لابه‌لای گوشت برای مدتی آنرا نگهداری می‌کرده‌اند. اما علوفه آن برای دام خوش‌خوراک نیست.

در حال حاضر، گیاه دارویی چویل به‌صورت خودرو در مناطق کوهستانی و مرتفع می‌روید و تکثیر این گیاه در طبیعت از طریق بذر انجام می‌شود. اما بذر این گیاه دارای دوره خفتگی طولانی است که عامل محدود کننده‌ای در تکثیر آن می‌باشد. به‌طورکلی بذر گیاهان تیره چتریان شکل‌های مختلفی از الگوی خفتگی فیزیولوژیکی را از خود نشان می‌دهند که در آن یک سازوکار فیزیولوژیکی بازدارنده رشد جنین بوده و از خروج ریشه‌چه جلوگیری می‌کند (Amooaghaie, 2005). روش‌های کلاسیک مختلفی برای برطرف کردن خفتگی بذر از قبیل

سرمادهی مرطوب (Stratification)، تیمار با هورمون‌ها و ترکیبات بهبوددهنده جوانه‌زنی مانند نیترات پتاسیم و پراکسید هیدروژن و خراش‌دهی (Scarification) مکانیکی و شیمیایی در گیاهان مختلف مورد استفاده قرار گرفته است. در گیاهان تیره چتریان سرمادهی مرطوب تا حد زیادی می‌تواند به رفع این نوع خفتگی‌ها کمک نماید. مدت زمان مورد نیاز برای شکستن خفتگی بذر با استفاده از این روش کلاسیک طولانی بوده و با توجه به گونه گیاهی و شدت یا عمق خواب بذر بین ۲ تا ۱۲ هفته متفاوت است. به‌عنوان مثال، برای شکستن خفتگی بذر و جوانه‌زنی گیاه چویل حداقل ۶ تا ۱۲هفته سرمادهی مرطوب نیاز می‌باشد (Movahedi, 2011; Sharifi *et al.*, 2015). در حالی‌که تیمارهای اسید جیبرلیک، نیترات پتاسیم و ترکیب سرمادهی و اسید جیبرلیک تأثیری در رفع خواب بذر این گیاه نداشت (Sharifi *et al.*, 2015). معمولاً دمای ۵ درجه سانتی‌گراد یا اندکی کمتر برای گیاهانی که در اقلیم‌های سرد رشد می‌کنند، بیشترین تأثیر را در رفع خفتگی بذر دارد (Copeland & McDonald, 2001). بااین‌حال جداسازی جنین از بذر و کشت آن در محیط کشت به‌عنوان یک روشی مؤثر برای غلبه بر خفتگی بذر و تولید گیاهچه در گونه‌های گیاهی، به‌ویژه گیاهانی که دارای خفتگی طولانی و عمیق هستند، پیشنهاد شده است (ISTA, 2017). به‌منظور به حداقل رساندن خفتگی بذر در باریجه (*Ferula gommosa*) کشت رویان در شرایط درون شیشه‌ای با هدف رفع خفتگی بذر با موفقیت انجام شده است (Montazeri *et al.*, 2009). با استفاده از کشت رویان در شرایط درون شیشه‌ای، تلاش شده زمان لازم برای شکستن خفتگی و جوانه‌زنی بذر یک اکوتیپ چویل جمع‌آوری شده از منطقه دنا را به حداقل رسانده و با ایجاد گیاهچه کامل، ریزنمونه‌های مناسب برای القای کالوس، با به‌کارگیری انواع محیط‌کشت‌ها و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی تولید شوند (Mortazavi *et al*, 2013). بااین‌حال گزارشی در مورد پاسخ اکوتیپ‌های مختلف گیاه چویل و کارایی این تکنیک در ژنوتیپ‌ها و اکوتیپ‌های مختلف وجود ندارد. بنابراین در این تحقیق کارایی کشت رویان در اکوتیپ‌های مختلف گیاه چویل مورد بررسی قرار گرفته تا بتوان تأثیر ژنوتیپ بر کارایی این روش را ارزیابی نمود. با توجه به خفتگی بذر در گیاهان تیره چتریان و طولانی بودن مدت زمان لازم برای رفع آن با استفاده از روش‌های کلاسیک، روش‌های مناسبی برای شکستن خفتگی بذر و جوانه‌زنی زودهنگام در هر شرایطی نیاز می‌باشد تا بتوان در هر زمان و مکانی از گیاهان مورد نظر و همچنین ترکیبات موجود در آنها در صورت نیاز استفاده نمود و از فشار بیش از حد بر جمعیت این گیاه با ارزش دارویی در اثر برداشت بی‌رویه از رویشگاه‌های طبیعی جلوگیری کرد. بنابراین، در این تحقیق کشت درون‌شیشه‌ای جنین به‌عنوان یک روش سریع و جایگزین برای رفع خفتگی بذر اکوتیپ‌های مختلف چویل و همچنین تأثیر محیط‌کشت‌های مختلف بر رشد جنین مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

بذرهای اکوتیپ‌های مختلف چویل در شهریور ماه سال ۱۳۹۴ از چهار رویشگاه مختلف در استان کهگیلویه و بویراحمد (آبنهر، گایونه، وزگ و سی‌سخت) جمع‌آوری شد (جدول ۱).

به‌منظور ضدعفونی، ابتدا بذرها با استفاده از آب و مایع ظرف‌شویی شسته شدند. سپس با استفاده از هیپوکلریت سدیم ۱٪ به مدت ۵ دقیقه ضدعفونی شدند. بذرهای ضدعفونی شده به مدت ۱ تا ۲ روز قبل از کشت، در درون آب مقطر سترون در محفظه سترون دارای جریان هوا قرار گرفتند تا پوسته بذر متورم و نرم شود. در زمان کشت، زیر هود لامینارایرفلو اقدام به ضدعفونی دوباره بذرها با اتانول ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه شد و شستشو به وسیله آب دو بار تقطیر و در نهایت به مدت ۱۵ دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۲٪ غوطه‌ور شدند، سپس سه مرتبه با آب مقطر شستشو گردیدند و آب اضافی آنها با کاغذ صافی سترون گرفته شد و برحسب نوع آزمایش اقدام به کشت بر روی محیط کشت با غلظت‌های مختلفی از مواد غذایی شد. ظروف کشت، شیشه‌های جار مخصوص کشت بافت با درب قابل اتوکلاو بودند که بعد از کشت به اتاقک رشد با دمای ۱±۲۴ درجه سانتی‌گراد با دوره ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی منتقل شدند.

جدول ۱- اطلاعات اکوتیپ‌های مختلف چویل مورد آزمایش با مختصات محل جمع‌آوری بذر آنها

ردیف	اکوتیپ	وزن هزاردانه (گرم)	ارتفاع از دریا (متر)	عرض جغرافیایی شمالی	طول جغرافیایی شرقی
۱	آب‌نهر	۲۲/۶	۲۸۴۳	۳۰°۴۰′۴۹″	۵۱°۴۱′۴۲″
۲	گایونه	۳۱/۴	۳۰۵۳	۳۰°۴۳′۵۶″	۵۱°۴۰′۱۸″
۳	وزگ	۲۲/۲	۲۶۷۷	۳۰°۳۰′۸″	۵۱°۴۱′۳۷″
۴	سی‌سخت	۱۹/۸	۲۸۶۱	۳۰°۵۰′۱″	۵۱°۳۳′۳۷″

به‌منظور بررسی رفع خفتگی بذر و مقایسه جوانه‌زنی اکوتیپ‌های مختلف، دو آزمایش مجزا به‌شرح زیر انجام شد.

الف) رویان از بذرهای ضدعفونی شده جداسازی شده و در محیط کشت MS با سه غلظت مختلف از مواد غذایی (MS، ۱/۲MS و ۱/۴MS) کشت شدند (شکل ۱ الف).

ب) بذرهای کامل و ضدعفونی شده در محیط کشت MS با سه غلظت مختلف از مواد غذایی (MS، ۱/۲MS و ۱/۴MS) کشت شدند (شکل ۱ ب).

شکل ۱- کشت درون شیشه‌ای گیاه چویل: رویان (الف) و بذر کامل (ب)

محیط کشت مورد استفاده، محیط کشت MS (Murashige & Skoog, 1962) بود که در غلظت‌های یک چهارم، یک دوم و کامل مورد استفاده قرار گرفت. pH محیط کشت قبل از اتوکلاو با استفاده از HCl و NaOH برابر با ۵/۷ تنظیم گردید (Bagheri & Safari, 2008) و از آگار به‌عنوان عامل جامد کننده استفاده شد. محیط کشت تهیه شده به همراه کلیه وسایل شیشه‌ای مورد نیاز درون اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار یک اتمسفر به مدت ۲۰ دقیقه ضدعفونی گردید.

درصد جوانه‌زنی حدود ۱۰ روز پس از کشت و طول ساقچه، طول ریشه‌چه و وزن تر ساقه‌چه حدود ۳۵ روز پس از کشت اندازه‌گیری شد. بدین‌منظور، ۱۵ عدد بذر یا رویان به‌صورت افقی در هر محیط کشت قرار گرفت و بعد جوانه‌ها شمارش شده و درصد جوانه زنی محاسبه شد (فرمول ۱). شاخص‌های طول ساقه‌چه و طول ریشه‌چه با استفاده از خط کش مندرج اندازه‌گیری و وزن تر ساقچه برحسب میلی‌گرم در پایه توزین شد.

$$PG = (Ni/N) \times 100$$ فرمول ۱

در این فرمول، PG درصد جوانه‌زنی، Ni تعداد جنین جوانه‌زده در روز آخر شمارش و N تعداد جنین‌هاست.

آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در پنج تکرار انجام گردید. تجزیه‌وتحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.1 انجام شد. مقایسه میانگین‌ها در سطح احتمال ۵ درصد با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام گردید.

نتایج

در آزمایش اول رویان‌های جدا شده بعد از ۳ تا ۶ روز، با توجه به نوع اکوتیپ شروع به رشد نمودند و بعد از ۱۰ تا ۱۵ روز نیز ساقه‌چه و ریشه‌چه نمایان شد. از بین ۴ اکوتیپ مورد ارزیابی، اولین اکوتیپ که شروع به جوانه‌زنی نمود مربوط به اکوتیپ آبنهر بود. براساس نتایج حاصل از تجزیه واریانس اثر اکوتیپ، محیط کشت و اثر متقابل اکوتیپ در محیط کشت بر درصد جوانه‌زنی (رشد) رویان، چویل در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار بود (جدول ۲). مقایسه میانگین‌ها نشان داد که به‌طورکلی بیشترین درصد جوانه‌زنی مربوط به اکوتیپ گایونه (۵۶ درصد) بود که به‌طور معنی‌داری بیشتر از سایر اکوتیپ‌ها افزایش نشان داد. درصد جوانه‌زنی اکوتیپ آبنهر (۴۳/۱۱ درصد) نیز به‌طور معنی‌داری بیشتر از اکوتیپ سی‌سخت (۲۴/۴۴ درصد) و وزگ (۲۸/۴۴ درصد) بود، ولی بین اکوتیپ‌های وزگ و سی‌سخت از نظر درصد جوانه‌زنی اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (جدول ۳). با توجه به معنی‌دار بودن اثر متقابل، همان‌طوری‌که در شکل ۲الف مشاهده می‌شود واکنش اکوتیپ‌ها نسبت به محیط‌های کشت یکسان نبود. مقایسه میانگین ترکیب تیماری اکوتیپ و محیط کشت نشان داد که بیشترین درصد جوانه‌زنی رویان (۸۵/۳۳٪) مربوط به اکوتیپ گایونه و با محیط کشت ۱/۴MS و کمترین آن (۲۲/۶۷٪) مربوط به اکوتیپ وزگ در محیط کشت MS کامل بود (شکل ۲الف). به‌طوری‌که در اکوتیپ‌های گایونه و آبنهر بین محیط‌کشت‌های مختلف از نظر درصد جوانه‌زنی رویان اختلاف معنی‌داری وجود داشته و درصد جوانه‌زنی در محیط‌کشت ۱/۴MS به‌طور معنی‌داری بیشتر از ۱/۲MS و MS بود. ولی در اکوتیپ‌های وزگ و سی‌سخت بین محیط‌کشت‌های مختلف اختلاف معنی‌داری از نظر درصد جوانه‌زنی رویان وجود نداشت (شکل ۲الف).

اثرهای اصلی اکوتیپ و محیط کشت بر طول ساقه‌چه در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود، ولی اثر متقابل اکوتیپ در محیط کشت بر این صفت در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار نبود (جدول ۲). مقایسه میانگین‌ها نشان داد بیشترین طول ساقه‌چه (۴/۲۳cm) مربوط به اکوتیپ گایونه بود که به‌طور معنی‌داری بیشتر از سایر اکوتیپ‌ها بود ولی بین اکوتیپ‌های دیگر از نظر طول ساقه‌چه تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (جدول ۳). همان‌طوری‌که در شکل ۲ب مشاهده می‌شود واکنش اکوتیپ‌ها نسبت به محیط‌های کشت یکسان بوده و در همه اکوتیپ‌ها بیشترین طول ساقه‌چه در محیط کشت ۱/۴MS بدست آمد. اثر اکوتیپ و اثر متقابل اکوتیپ در محیط کشت بر وزن تر ساقه‌چه در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار نبود ولی اثر محیط کشت بر این صفت در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود (جدول ۲). مقایسه میانگین نشان داد که وزن تر ساقه‌چه در محیط کشت ۱/۴MS (۱۲۷/۹۰ میلی‌گرم) به‌طور معنی‌داری بیشتر از ۱/۲MS (۸۲/۱۰ میلی‌گرم) و آن هم بیشتر از محیط کشت MS (۴۶/۵۰ میلی‌گرم) بوده (جدول ۳) و این روند پاسخ در همه اکوتیپ‌های مورد استفاده صادق بود (شکل ۲ج). به‌عبارت دیگر، در هر چهار اکوتیپ مورد مطالعه، بیشترین وزن تر ساقه‌چه در محیط کشت ۱/۴MS و کمترین آن در محیط کشت MS مشاهده شد. به‌طوری‌که در بین ترکیب‌های تیماری مختلف بیشترین میانگین وزن تر ساقه‌چه (۱۳۲ میلی‌گرم) مربوط به اکوتیپ گایونه با محیط کشت ۱/۴MS و کمترین آن (۴۴/۶ میلی‌گرم) مربوط به اکوتیپ آبنهر با محیط کشت MS بود (شکل ۲ج).

اثر اکوتیپ بر طول ریشه‌چه در سطح احتمال ۵ درصد و اثر محیط کشت بر این صفت در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود. ولی اثر متقابل این دو عامل برای این صفت معنی‌دار نبود (جدول ۲). مقایسه میانگین‌ها نشان داد بیشترین طول ریشه‌چه (۳/۲۹cm) مربوط به اکوتیپ گایونه بود که به‌طور معنی‌داری بیشتر از سایر اکوتیپ‌ها بود ولی بین اکوتیپ‌های دیگر از نظر این صفت تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (جدول ۳). در بین محیط کشت‌های مختلف نیز همانند سایر صفات، بیشترین طول ریشه (۳/۲۵ cm) در محیط کشت ۱/۴MS و کمترین آن (۲/۰۵ cm) در محیط کشت MS بود (جدول ۳). در بین ترکیب‌های تیماری نیز بیشترین میانگین طول ریشه‌چه مربوط به اکوتیپ گایونه (۴/۰۶ cm) در محیط کشت ۱/۴MS و کمترین آن (۱/۸۶ cm) مربوط به اکوتیپ

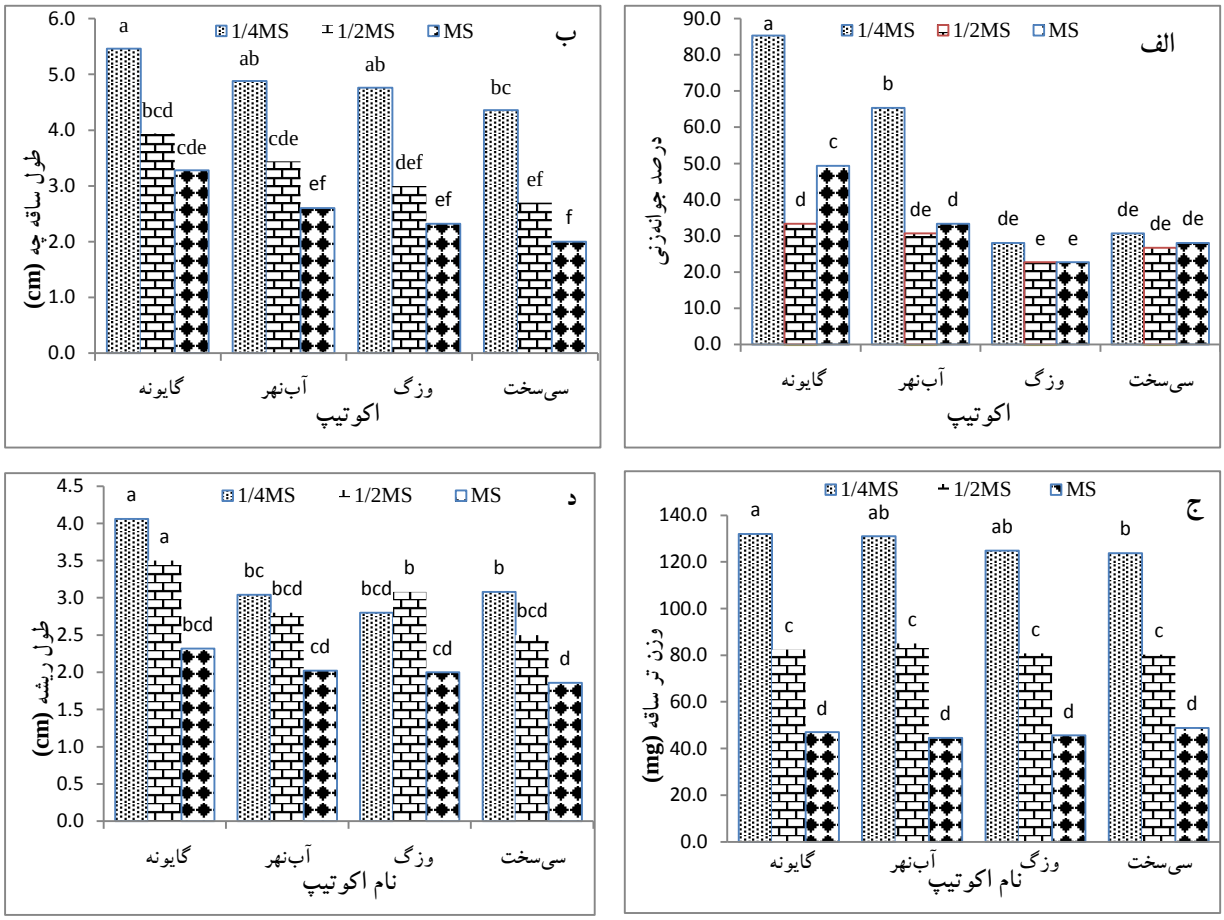
سی‌سخت در محیط کشت MS بود (شکل ۳د).

مراحل مختلف رشد چویل در محیط کشت ۱/۴MS برای اکوتیپ گایونه در شکل ۳ آورده شده است. انتقال گیاهچه‌های حاصل از کشت رویان از شرایط درون‌شیشه‌ای به خاک انتقال و پس از یک دوره سازگاردهی به شرایط محیط طبیعی انتقال داده شد (شکل ۴).

جدول ۲- تجزیه واریانس صفات گیاهچه‌های حاصل از کشت رویان اکوتیپ‌های مختلف گیاه چویل در محیط کشت‌های مختلف

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات			
		درصد جوانه‌زنی	طول ساقه‌چه	وزن تر ساقه	طول ریشه‌چه
اکوتیپ (A)	۳	۳۱۲۵/۹۳**	۳/۶۷**	۴۵/۸۹ns	۱/۹۵*
محیط کشت (B)	۳	۳۲۰۶/۶۷**	۲۸/۷۲**	۳۳۳۰۳/۲۰**	۷/۸۳**
A×B	۶	۷۵۶/۳۰**	۰/۱۵ns	۴۰/۸۹ns	۰/۳۵ns
خطا	۴۸	۴۹/۲۶	۰/۶۰	۳۳/۰۳	۰/۵۱

ns، * و **: به‌ترتیب بیانگر عدم معنی‌داری و معنی‌دار بودن در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد می‌باشد.

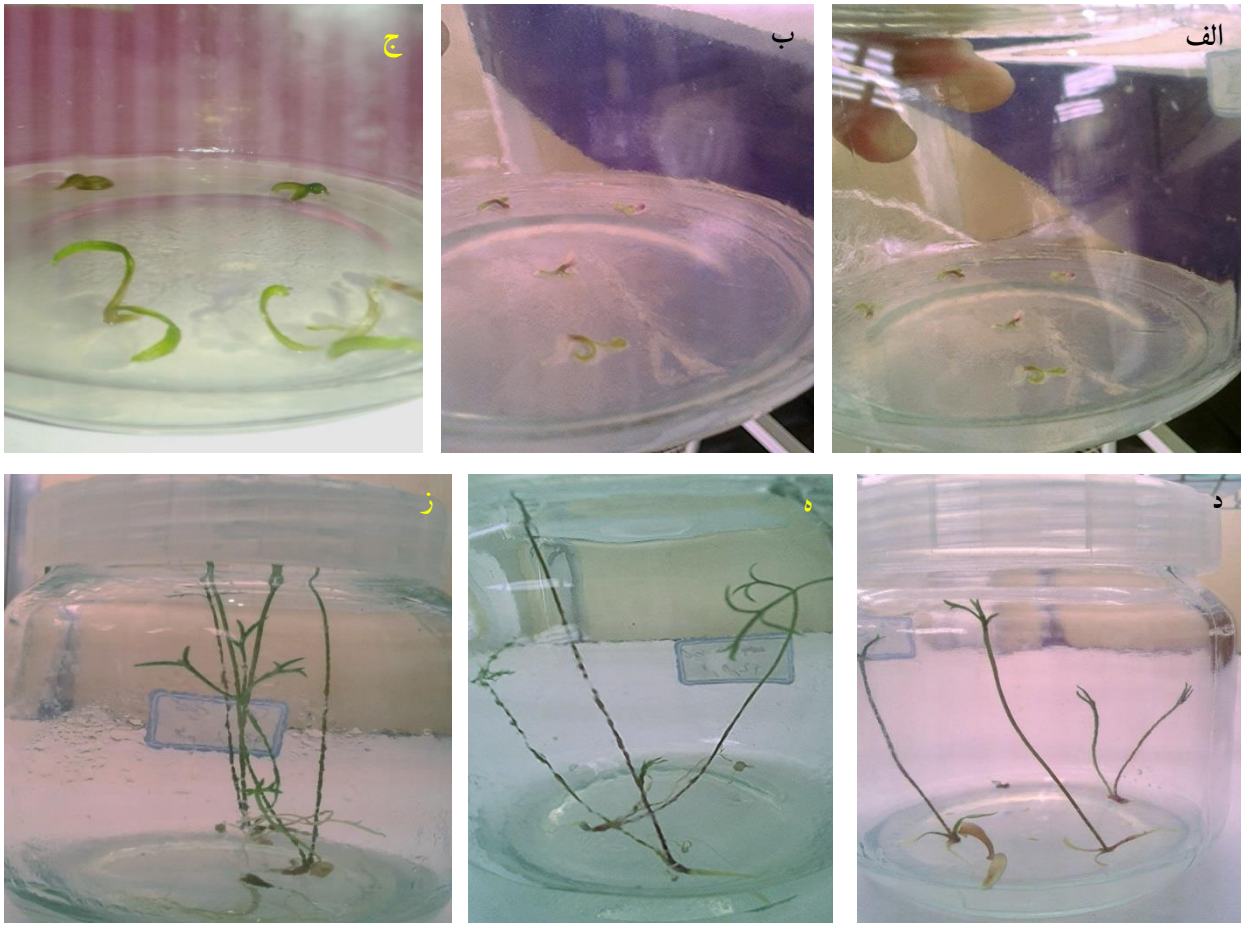


شکل ۲- تأثیر اکوتیپ و محیط کشت بر میانگین درصد جوانه‌زنی رویان (الف)، طول ساقه (ب)، وزن تر ساقه‌چه (ج) و طول ریشه (د) در کشت درون‌شیشه‌ای رویان چویل (میانگین ستون‌هایی که دارای حرف مشابه هستند، بر اساس آزمون دانکن در سطح ۵ درصد تفاوت معنی‌داری با هم ندارند)

جدول ۳- درصد جوانه‌زنی رویان و رشد گیاهچه اکوتیپ‌های مختلف چویل در شرایط درون‌شیشه

فاکتور A (اکوتیپ)	درصد جوانه‌زنی	طول ساقچه (cm)	وزن تر ساقه (mg)	طول ریشه (cm)
گایونه	۵۶ ^{a}	۴/۲۳^{a}	۸۷/۱۳^{a}	۳/۲۹^{a}
آب‌نهر	۴۳/۱۱^{b}	۳/۶۴^{b}	۸۶/۸۷^{a}	۲/۶۱^{b}
وزگ	۲۸/۴۴^{c}	۳/۲۶^{b}	۸۴/۲۷^{a}	۲/۵۸^{b}
سی‌سخت	۲۴/۴۴^{c}	۳/۱۲^{b}	۸۳/۷۳^{a}	۲/۳۵^{b}
فاکتور B (محیط کشت)	درصد جوانه‌زنی	طول ساقچه (cm)	وزن تر ساقه (mg)	طول ریشه (cm)
1/4MS	۵۲/۳۳^{a}	۴/۸۷^{a}	۱۲۷/۹۰^{a}	۳/۲۵^{a}
1/2MS	۳۳/۳۳^{b}	۳/۲۷^{b}	۸۲/۱۰^{b}	۲/۹۷^{b}
MS	۲۸/۳۳^{c}	۲/۵۵^{c}	۴۶/۵۰^{c}	۲/۰۵^{c}

در هر صفت میانگین‌هایی که دارای حرف مشابه هستند بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌داری با هم ندارند.



شکل ۳- مراحل مختلف رشد رویان اکوتیپ گایونه در محیط کشت ۱/۴MS: الف و ب) ۵ روز پس از کاشت، ج) ۱۵ روز پس از کاشت، د) ۲۸ روز پس از کاشت، ه) ۴۰ روز پس از کاشت و ز) ۴۰ روز پس از کاشت رویان چویل در شرایط درون‌شیشه‌ای

شکل ۴- انتقال گیاهچه‌های حاصل از کشت رویان در محیط کشت به گلدان و شرایط طبیعی

بحث

در آزمایش دوم که مربوط به بذر کامل ضدعفونی شده (شاهد) بود هیچ‌گونه جوانه‌زنی مشادهده نشد، با وجود اینکه بذرها در مرحله ضدعفونی چندین بار بوسیله اتانول، هیپوکلریت سدیم و آب‌مقطر تیمار شده بودند، ولی ضدعفونی و شستشوی بذر نتوانست منجر به جوانه‌زنی بذر گردد. با توجه به جوانه‌زنی رویان در کشت‌های درون‌شیشه‌ای (جدول ۳ و شکل ۳) می‌توان نتیجه گرفت که احتمالاً عوامل بازدارنده در اندوسپرم و اطراف رویان می‌باشد که مانع از جوانه‌زنی بذرهای این گیاه شده است. این امر در طبیعت برای مقابله با شرایط نامساعد محیطی و فرار از تنش‌ها، مفید واقع شده و بذرها بعد از سپری شدن شرایط نامساعد محیطی شروع به جوانه‌زنی و بقا می‌نمایند (Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006). علاوه‌براین، نتایج حاصل نشان داد که بهترین غلظت محیط کشت برای کشت رویان چویل محیط ۱/۴MS می‌باشد (جدول ۲) که این نتیجه با کار مرتضوی و همکاران بر روی چویل به‌منظور تعیین مناسب‌ترین محیط کشت برای ریزازدیادی همخوانی دارد (Mortazavi *et al.*, 2013).

همچنین طی تحقیقاتی که روی گیاه باریجه انجام شده محیط کشت ۱/۴MS بهترین محیط برای رشد گزارش شده است (Sarabadani *et al.*, 2008). این روند در گیاه وشاء (*Dorma ammoniacum*) نیز گزارش شده است (Ghasemian *et al.*, 2011). گیاهچه‌های باریجه در محیط کشت ۱/۴MS نسبت به محیط B5 ظاهری عادی و مطلوب‌تر داشتند. در واقع نتایج نشان‌دهنده واکنش بهتر جنین‌های کشت شده با غلظت کاهش یافته عناصر غذایی ماکرو و میکرو در محیط کشت است. کشت باریجه در محیط کشت ۱/۴MS جامد حاوی ۰/۵ گرم در لیتر زغال فعال به‌طوری‌که برگ‌های رویان به سمت بالا قرار گرفته باشند، به‌عنوان بهترین گزینه برای تولید گیاهان سترون با بنیه مناسب معرفی گردید (Montazeri *et al.*, 2009). در این مطالعه نیز جوانه‌زنی و صفات اندازه‌گیری شده تحت تأثیر غلظت محیط کشت قرار گرفت، به‌طوری‌که مقایسه میانگین‌ها برای کلیه صفات اندازه‌گیری شده نشان داد که محیط کشت ۱/۴MS، ۱/۲MS و MS کامل اختلاف معنی‌داری با هم دارند (جدول ۳). به‌عبارت دیگر، با کاهش غلظت محیط کشت و بالطبع کاهش عناصر میکرو و ماکرو

در محیط کشت، جوانه‌زنی و رشد رویان چویل نیز بهبود یافت (جدول ۳ و شکل ۲). خفتگی فیزیولوژیک متداول‌ترین نوع خفتگی در تیره چتریان می‌باشد (Sharifi et al., 2015). در این نوع خفتگی، یک عامل فیزیولوژیک با ممانعت از رشد رویان مانع از خروج ریشه‌چه می‌شود (Phillips *et al*., 2003). خفتگی فیزیولوژیک براساس پاسخ به سرما و جیبرلین، به‌صورت سطحی، متوسط و یا عمیق گروه‌بندی می‌شود. اگر جیبرلین بتواند جایگزین سرما شود نوع خفتگی غیرعمیق بوده ولی اگر نتواند جایگزین سرما شود نوع خفتگی فیزیولوژیک عمیق می‌باشد (Finch-Savage & Leubne-Metzeger, 2006). خفتگی فیزیولوژیک غیرعمیق با دوره سرمای کوتاه‌مدت رفع می‌شود و خفتگی عمیق نیازمند دوره طولانی سرما می‌باشد. (Baskin & Baskin, 2004). نشان داده شده که برای رفع خفتگی در بذر گیاه چویل، جیبرلین نمی‌تواند جایگزین سرما شود، بنابراین گیاه چویل دارای دوره خفتگی فیزیولوژیک عمیق می‌باشد که برای شکست خفتگی در بذر این گیاه نیاز به ۱۲ هفته سرما می‌باشد (Sharifi et al., 2015). یکی از عواملی که باعث ایجاد خفتگی در بذر می‌شود وجود عوامل بازدارنده در پوشش و اندوسپرم اطراف رویان می‌باشد و با برداشتن پوسته و اندوسپرم اطراف رویان می‌توان بر خفتگی موجود غلبه نمود (Taghinezad *et al*., 2016). جداسازی رویان و کشت آن به‌عنوان یک راهکاری برای غلبه بر خفتگی فیزیولوژیکی به‌ویژه خفتگی فیزیولوژیکی ناشی از وجود بازدارنده‌ها در اندوسپرم پیشنهاد شده است (Copeland & McDonald, 2001; Fu, *et al*., 2013). به‌عنوان مثال در گیاه *Cynara cardunculus* که دارای خفتگی بذر طولانی مدت است، از کشت رویان در محیط کشت MS۱/۲ برای تولید سریع‌تر گیاهچه استفاده شده است. به‌طوری‌که ۳۰ تا ۴۵ روز پس از کشت رویان گیاهچه‌های کامل بوجود می‌آیند که این مدت ۶ ماه زودتر از کشت بذر کامل است (Craverol & Cointry, 2007). کشت رویان علاوه بر شکست خفتگی بذر، در آزمون قابلیت حیات بذر و همچنین به‌عنوان ریزنمونه‌ای برای تولید کالوس و تکثیر درون‌شیشه‌ای نیز کاربرد دارد (Bridgen, 1994).

همان‌طوری‌که در شکل۲ مشاهده می‌شود بین اکوتیپ‌های مختلف چویل اختلاف معنی‌داری از نظر جوانه‌زنی رویان و خصوصیات رشدی آن وجود دارد. به‌طوری‌که در بین چهار اکوتیپ مورد بررسی، بیشترین درصد جوانه‌زنی رویان و رشد درون‌شیشه‌ای گیاهچه حاصل از آن در اکوتیپ گایونه مشاهده گردید (شکل ۲). این تفاوت‌ها ممکن است ناشی از اختلاف ژنتیکی بین اکوتیپ‌ها یا شرایط محیطی رویشگاه باشد که می‌تواند جوانه‌زنی و رشد رویان را هم در شرایط درون‌شیشه‌ای (روی محیط کشت) و هم در رویشگاه طبیعی تحت تأثیر قرار دهد. به‌عنوان مثال همان‌طوری‌که در جدول ۱ مشاهده می‌شود وزن هزار دانه بذرهای جمع‌آوری شده و همچنین ارتفاع از سطح دریا محل جمع‌آوری اکوتیپ گایونه نسبت به بقیه اکوتیپ‌ها بیشتر بوده است و این عوامل ممکن است در پاسخ رشدی مناسب رویان این اکوتیپ در شرایط درون‌شیشه‌ای تأثیرگذار باشد. رویان‌های تمایز نیافته در شرایط درون شیشه‌ای رشد نمی‌کنند، رویان‌هایی که در شرایط مزرعه‌ای تکامل بیشتری یافته‌اند راحت‌تر در شرایط درون شیشه‌ای کشت می‌شوند. در بعضی از گونه‌های گیاهی، رشد رویان سریع ولی در برخی دیگر مشکل می‌باشد، حتی در بین ارقام یک گونه نیز تفاوت‌هایی وجود دارد (Bagheri & Safari, 2008). در توجیه نحوه اثر ژنوتیپ می‌توان چنین بیان کرد که هریک از این پاسخ‌ها ممکن است توسط ژن یا گروه‌های ژنی خاصی کنترل شوند که در ژنوتیپ‌ها یا توده‌های بومی متفاوت تظاهر یکسانی ندارند (Sanatombi & Sharma, 2008). نتایج پژوهش‌های گذشته اثر ژنوتیپ بر نوع و میزان پاسخ‌دهی ریزنمونه‌ها به ترکیبات محیط کشت و همچنین متفاوت بودن این پاسخ‌ها را حتی در ژنوتیپ‌های مختلف یک رقم گزارش نموده‌اند (Zare *et al*. 2009; Koohi, *et al*. 2014). طبق گزارش‌ها کشت رویان ابزار مفیدی برای تکثیر گیاهانی است که با محدودیت در جوانه‌زنی مواجه هستند (Modares *et al*., 2007). تکثیر

گیاه از طریق کشت رویان، روش مفیدی برای غلبه بر خفتگی بذرها و کوتاه کردن زمان تکثیر و اصلاح گیاه است. به‌منظور بررسی رشد و نمو گیاه بلوط (*Quercus castaneifolia*) در شرایط درون‌شیشه‌ای، قسمت‌های مختلف گیاه ازجمله رویان، رویان همراه آندوسپرم و آندوسپرم را به‌طور جداگانه در محیط کشت MS کشت شده و بهترین نتیجه از کشت رویان بدست آمد (Ehsanpour & Zahedi, 2006). به‌طوری‌که با برداشتن پوشش رویان در باریجه، عوامل بازدارنده برطرف شده و جوانه‌زنی سریع‌تر انجام می‌شود (Sarabadani *et al.*, 2008). به‌منظور غلبه بر خفتگی بذر و افزایش جوانه‌زنی بذر و تولید نهال در راش (Jafari Mofidabadi and Amani, 2004) نیز از کشت درون شیشه‌ای رویان استفاده شده است. با ارزیابی تأثیر دو محیط کشت MS و ۱/۲MS بر جوانه‌زنی رویان این گیاه، گزارش شده که جوانه‌زنی رویان‌ها در محیط کشت ۱/۲MS به‌طور معنی‌داری بیشتر از MS بود (Jafari Mofidabadi and Amani, 2004). بهترین محیط کشت به‌منظور جوانه‌زنی بذر در گل جعفری (*Tagetes erecta* L.) مربوط به محیط کشت MS کامل در شرایط روشنایی گزارش شده است (Jafari & Daneshvar, 2016). بنابراین، با توجه به نتایج این تحقیق و با توجه به طولانی بودن دوره سرمادهی موردنیاز برای رفع خفتگی بذر گیاه چویل (Movahedi, 2011; Sharifi *et al.*, 2015)، به‌منظور رفع سریع این خفتگی و تولید گیاهچه می‌توان از کشت رویان به‌عنوان ابزار مناسبی بهره برد. این امکان به‌ویژه برای تولید گیاهچه‌های کاملا سترون در مطالعات آزمایشگاهی و مولکولی این گیاه بسیار مفید و سودمند خواهدبود.

به‌طورکلی، نتایج این تحقیق نشان داد با توجه به وجود خفتگی در بذر گیاه چویل، کشت رویان در شرایط آزمایشگاهی ابزار مناسبی را برای رفع سریع و مؤثر خفتگی بذر این گیاه به‌ویژه در مطالعات آزمایشگاهی و مولکولی فراهم می‌کند. به‌نحوی‌که بهترین محیط کشت برای کشت رویان چویل، محیط ۱/۴MSمی‌باشد. علاوه‌براین، با توجه به هدف، بهتر است از اکوتیپ‌هایی استفاده شود که قابلیت بالایی را در کشت بافت نشان داده است که در این تحقیق رویان جداسازی شده از اکوتیپ گایونه بیشترین درصد جوانه‌زنی و رشد گیاهچه را روی محیط ۱/۴MS نشان داد.

منابع مورد استفاده

-Amooaghaie, R., 2005. The effect of soaking, temperature and duration of pre-chilling on seed dormancy breaking of *Ferula ovina*. Iranian Journal of Biology, 18(4): 350-359. (In Persian).
-Bagheri, A. and Safari, M., 2008. Basics of Plant Tissue Culture. Publication of Ferdowsi University of Mashhad, 424p. Mashhad, Iran. (In Persian).
-Baskin, J.M. and Baskin, C.C., 2004. Classification system for seed dormancy. Seed Science Research, 1: 14–16.
-Bridgen, M.P., 1994. A review of plant embryo culture. Hortscience, 29(11): 1243-1246.
-Craverol, V. and Cointry, E. 2007. Shortening the seed to seed cycle in artichoke breeding by embryo culture. Plant Breeding, 126: 222-224.
-Copeland, L.O. and McDonald, M., 2001. Principles of Seed Science and Technology. Kluwer Academic Publisher, Norwell, 488p.
-Ehsanpour, A.A. and Zahedi, S, 2006. Induction of somatic embryogenesis from cotyledon of oak (*Quercus castaneifolia*). Journal of Science (University of Tehran), 32(1): 47-50.
-Finch-Savage, W.E. and Leubner-Metzger, G., 2006. Seed dormancy and the control of germination. New Phytologist, 171: 501–523.
-Fu, X.X., Liu, H.N., Zhou, X.D. and Shang, X.L., 2013. Seed dormancy mechanism and dormancy breaking techniques for *Cornus kousa* var. Chinensis. Seed Science and Technology, 41: 458-463.
-Ghahreman, A., 1986. Flora of Iran. Research Institute of Forest and Rangelands publication, Tehran, Iran, No, 17 (2048). (In Persian).
-Ghasemian, K.h., Nazeri, S., Chehregani-Rad, A. and Mirzaie-Asl, A. 2012. The stages of somatic embryogenesis derived from zygotic embryo of *Dorema ammoniacum* D. Journal of Cell and Tissue (JCT), 3(1): 21-27. (In Persian).
-Gupta, V., 2003. Seed germination and dormancy breaking techniques for indigenous medicinal and aromatic plants. Journal of Medicinal and Aromatic Plants Science, 25: 402-407.
-Jafari, M. and Daneshvar, M.H., 2016. Indirect organogenesis of *Tagetes erecta* L. via hypocotyl explant. Scientific Journal of Ornamental Flowers and Ornamental Plants, 1(2): 34-43. (In Persian).

Names (1). Tehran, Farhang Mooser Publishing, Volume I, 594p. (In Persian).
-Murashige, T. and Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiolagia Plantarum, 15: 473-497.
-Phillips, N., Drost, D. and Varga, V., 2003. Chemical treatments enhanced seed germination in *Perideridia gairdneri*. International Society for Horticultural Science, 618: 477-482.
-Sanatombi, K. and Sharma, G.J., 2008. In vitro plant regeneration in six cultivars of *Capsicum* spp. using different explants. Biologica Plantrum, 52: 141-145.
-Sarabadani-tafreshi, R., Omidi, M., Bihamta, M.R. and Davazdahemami, S., 2008. Study of in vitro embryo culture and Effect of explants, different hormonal levels on callus induction and shooting of *Ferula gummosa*. Journal of Medicinal Plants, 27: 71-81. (In Persian).
-Sharifi, H., Khajeh-hosseini, M. and Rashed-mohassel, M.H., 2015. Study of seed dormancy in seven medicinal species from Apiaceae. Iranian Journal of Seed Research, 2(1): 25-36. (In Persian).
-Taghinezad, Z., Dehdari, M., Mirshkari, A. and Zaynali, H., 2016. Effect of gibberllic acid, temperature and embryo culture on seed germination of four native species of *Barberry* (*Berberis* spp.). Iranian Journal of Seed Research, 3(1): 27-37. (In Persian).
-Taran, M., Ghasempour, H.R. and Shirinpour, E., 2010. Antimicrobial activity of essential oils of *Ferulago angulata*. Jundishapur Journal of Microbiology, 3(1): 10-14.
-Zare, N., Valizadeh, M., Tohidfar, M., Mohammadi, S.A., Malboobi, M.A. and Habashi, A.A., 2009. Selection of regenerative genotypes from Iranian alfalfa cultivars. Journal of food, agriculture and environment, 7: 567-572.
-Jafari-Mofidabadi, A. and Amani, M., 2004. Seed dormancy breakage of *Fagus orientalis* Lipsky using embryo culture. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 12(3): 257-274. (In Persian).
-Koohi, L., Zare, N., Asghari-Zakaria, R. and SheikhZadeh-Mosaddegh, P., 2014. The effect of plant growth regulators and different explants on the response of tissue culture and cell suspension cultures of german chamomile (*Matricaria chamomilla* L.). Journal of Crop Ecophysiology, 8: 203-214. (In Persian).
-Modares, M., Abrishamchi, P., Ejtehadi, H. and Ramezani, A. 2007. Propagation of *Salvia leriifolia* Benth. by embryo culture. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 15(2): 129-41. (In Persian).
-Montazeri, F., Omidi, M. and Imani, N., 2009. Comparing various methods of seed and embryo culture and charcoal effect in optimizing *in vitro* culture of *Galbanum* (*Ferula gummosa*). Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 26(4): 583-595. (In Persian).
-Mortazavi, R., Dehdari, A., Masumiasl, A. and Fayyaz, P., 2013. Seed dormancy of *Ferulago angulata (Schlecht*). Boiss by using embryo culture in various media cultures. 8th National Biotechnology Congress of Islamic Rpublic of Iran and 4th National Conference on Biosecurity. University of Tehran, Tehran, Iran. 6-8 July. 2013: 1-4. (In Persian).
-Movahedi-dehnavi, M., 2011. Effect of seed drop breeding treatments on germination and plant growth of *Ferulago angulata*, Celery, Iranian Cumin, Halibut, Saree and Cumin. Final Report of the Research and Technology Project, Yasouj University, Iran. (In Persian).
-Mozafriyan, V., 2006. Glossary of Iranian Plants

Embryo culture to overcome seed dormancy and produce seedling in *Ferulago angulata (Schlecht.) Boiss.*

S.M. Alavi Mehryan[1], N. Zare[*2], A. Masumiasl[3], P. Shiakhzade Mosadegh[4] and R. Asghari Zakaria[5]

1- Ph.D. Graduated, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, I.R. Iran.
2- Corresponding author, Assoc. Prof., Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, I.R. Iran. zarenasser@yahoo.com
3- Assist. Prof., Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Yasouj, Yasouj, I.R. Iran.
4- Assist. Prof., Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, I.R. Iran.
5- Prof., Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, I.R. Iran

Received: 05.02.2020 Accepted: 15.07.2020

Abstract

Ferulago angulata as a medicinal plant belongs to the Apiaceae family, and propagated by seed. But, seed dormancy is a main limiting factor in its propagation. To evaluate the efficiency of *in vitro* culture as well as the combination of culture medium and explant type on breaking seeds dormancy of *Ferulago angulata*, a factorial experiment was conducted based on a completely randomized design with five replications. The treatments consisted of four ecotypes (Abenahr, Gauonhe, Vezg, Sisakht) from Kohgiluyeh and Boyer-Ahmad province, Iran and three concentrations of Murashige and Skoog basal medium (1/4, 1/2 and 1MS) and explant type (seed or embryo). Collected seeds were surface sterilized and then were planted as intact seeds, and isolated embryos in the above mentioned media. In this experiment, isolated embryos germinated after 3 to 6 days, depending on the ecotype. However, no germination was observed in the intact seeds in the used media. The results of embryo culture showed that culture medium and ecotype significantly affected all measured seedling traits. Mean comparison indicated that there were significant differences between different media and 1/4MS medium was superior to the other two culture media in terms of embryo germination percentage and seedling growth. There also were significant differences between different ecotypes, and Gauonhe ecotype showed higher embryo germination percentage and seedling growth than other ecotypes. So, *in vitro* culture of *Ferulago angulata* seed embryos on 1/4MS medium provides an effective method to overcome seed dormancy. Seedlings resulting from germination and embryo growth were successfully transferred to pots and placed in natural environment. According to the results of this study, germination inhibitors in *F. angulata* are located in the tissues surrounding the embryo and the embryo would not be able to germinate until the inhibitory factors are removed. Therefore, isolation and *in vitro* culture of the embryo provides a suitable approach to overcome seed dormancy in this plant, especially for laboratory studies.

Keywords: Dormancy, *Ferulago angulate,* Plant tissue culture, Medicinal plants.