

بهینه‌سازی باززایی مستقیم گون (*Astragalus verus*) در شرایط درون شیشه‌ای

صفیه ابراهیمی^۱، فاطمه ذاکر تولایی^{۲*}، محمد زارع مهرجردی^۳، محمود قربانزاده نقاب^۳

^۱دانش اموخته کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، مجتمع آموزش عالی شیروان، خراسان شمالی، ایران.

^۲استادیار بیوتکنولوژی کشاورزی و عضو هیأت علمی مجتمع آموزش عالی شیروان، خراسان شمالی، ایران.

^۳دانشیار بیوتکنولوژی کشاورزی و عضو هیأت علمی مجتمع آموزش عالی شیروان، خراسان شمالی، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۳/۲۳، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۷/۲۲

چکیده

گون از گیاهان دارویی و صنعتی با ارزش در ایران است و گونه *Astragalus verus* از گونه‌های بومی مولد کثیرا می‌باشد. با توجه به اهمیت این گونه در تولید کثیرا و در معرض انقراض قرار داشتن آن این مطالعه با هدف دست یابی به روشی سریع برای تکثیر آن بر مبنای شکستن خواب بذرو جوانه‌زنی و باززایی مستقیم گیاه در شرایط این ویترو انجام شد. ابتدا تاثیر خراش دادن سطحی در شکستن خواب بذرها بررسی شد. سپس تاثیر نوع محیط کشت و غلظت ساکارز در جوانه‌زنی بذرها و تولید گیاهچه استریل در قالب طرح کاملا تصادفی به صورت فاکتوریل بررسی گردید. ریزنمونه‌های محور زیرلپه و بالای لپه جهت شاخه‌زایی چندگانه در محیط کشت MS غنی شده با ویتامین B5 حاوی ترکیب هورمونی BAP در سه سطح و IAA در دو سطح کشت شدند. ریشه‌زایی شاخه‌های چندگانه در محیط کشت ۱/۲MS با ترکیب هورمونی IAA در دو سطح و IBA در سه سطح در قالب طرح پایه کاملا تصادفی با شش تیمار و پنج تکرار بررسی شد. خراش‌دهی باعث افزایش میزان جوانه‌زنی با میانگین ۹۸ درصد شد. غلظت‌های مختلف محیط کشت و ساکارز تاثیری روی درصد جوانه‌زنی نداشت. با افزایش ساکارز طول ساقه و ریشه، وزن تر و وزن خشک گیاهچه افزایش یافت. بیشترین درصد شاخه‌زایی در محیط کشت MS حاوی دو میلی‌گرم در لیتر BAP بدون IAA با میانگین ۴/۶ عدد و بیشترین درصد ریشه‌زایی در محیط کشت ۱/۲MS با ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر IAA با میانگین ۶۰ درصد بدست آمد. نتایج این پژوهش می‌تواند در ریزازدیادی، انتقال ژن و تولید درون‌شیشه‌ای کثیرا در آینده استفاده شود.

واژه های کلیدی: *Astragalus verus*، جوانه‌زنی، خواب بذر، ریشه‌زایی، شاخه‌زایی چندگانه.

مقدمه

جنس گون *Astragalus* متعلق به قبیله *Galegeae* از تیره نخود است که شامل بیش از ۳۳۰۰ گونه با پراکنش وسیع در سراسر مناطق معتدله جهان می‌باشند. ۸۰۴ گونه گون در ایران وجود دارد که ۵۲۷ گونه آن بومی و ۲۷۷ گونه مشترک با کشور همسایه است (Massoomi, 2005). گون‌ها علاوه بر فواید شناخته شده ای مانند پوشش بسیار مناسب برای حفاظت خاک و جلوگیری از فرسایش، تولید صمغ کتیرا از گون مولد آن، زنبورداری، تلطیف هوا، تنوع زیستی، ذخایر توارثی و سایر اثرات اجتماعی، اقتصادی، بر مناطق رویش از جنبه‌های زیست‌محیطی مهم نظیر ترسیب مقادیر متناهی از کربن اتمسفر حایز اهمیت فراوان می‌باشد (Scherson et al., 2005). وجود باکتری تثبیت کننده ازت در انشعابات ریشه گون، از عوامل موثر در توسعه و رقابت این گیاه نسبت به سایر گیاهان محیط می‌شود (Massoomi 2005; Mozaffarian, 1996). کتیرا ماده صمغی است که بصورت خود به خودی یا در اثر شکاف از بافت ساقه گون کتیرا خارج می‌شود (Massoomi 2005). این صمغ جزو مهم‌ترین منابع صمغ تجاری دنیا به شمار می‌رود، که کاربرد عمده آن در صنایع داروسازی، به عنوان عامل تعلیق کننده در امولسیون روغن درآب، ژل‌ها، خمیر دندان‌ها، کرم‌ها، عامل پوشش دهنده در تولید قرص‌ها (Verbeken, 2003)،

تاخیردهنده برای سیستم‌های رهش آهسته دارو (Kaffashi, 2006 و Kiani & Asempour, 2012) و استفاده به عنوان غشاء برای سیستم‌های داروسازی (Tavakol, 2014) می‌باشد (Shamspur & Motasadizadeh, 2015). بهره‌برداران از روش‌های غلط تیغ‌زنی برای استحصال کتیرا استفاده می‌کنند که این امر باعث در معرض انقراض قرار گرفتن گون‌های مولد کتیرا شده است.

یکی از گونه‌های بومی تولید کننده کتیرا، *Astragalus verus* است. به نظر می‌رسد که جوانه‌زنی بذر در اکثر گونه‌های گون با مشکل مواجه است و شکستن خواب بذر برای جوانه‌زنی الزامی است. در زمینه شکستن خواب بذر گون در گونه‌های دیگری غیر از گونه مورد مطالعه پژوهش‌هایی انجام شده است. در بعضی مطالعات روش‌های مکانیکی و در برخی روش‌های فیزیولوژیکی موثرتر بودند.

در مطالعه‌ای جهت شکست خواب بذر و جوانه‌زنی گون سفید (*Astragalus gossypinus*) از تیمارهای نیترا پتاسیم، اسید سولفوریک، آب داغ ۹۰ درجه سانتیگراد و خراش‌دهی پوسته بذر با کاغذ سمباده استفاده شد. استفاده از اسیدسولفوریک ۹۸ درصد بیشترین تأثیر را در جوانه‌زنی بذرها داشت (Tavili et al., 2012). بررسی شکست خواب بذر و جوانه‌زنی آن در گونه گون *Astragalus*

کالوس برگ در محیط کشت MS با ۰/۵ میلی-گرم در لیتر NAA و چهار میلی گرم BA بدست آمد (Erisen et al., 2010). در گزارش دیگری در گونه *Astragalus cariensis* ریزنمونه‌ها روی محیط کشت MS غنی شده با TDZ و NAA صد در صد کالوس تولید کردند. شاخه‌های باززا شده مربوط به TDZ با غلظت زیاد و NAA با غلظت کمتر بود و بالاترین تعداد شاخه (۱۵ شاخه بر ریزنمونه) در محیط کشت MS غنی شده با ۰/۴ میلی گرم در لیتر TDZ و ۰/۲ میلی-گرم در لیتر NAA بدست آمد (Erisen et al., 2011). اثرات TDZ در باززایی شاخساره *Astragalus schizopterus* گون بومی ترکیه در سال ۲۰۱۱ بررسی شد و از ریزنمونه‌های مرستم جانبی در محیط کشت MS غنی شده با TDZ و NAA بیشترین تعداد شاخه (۱۵/۸ شاخه بر ریزنمونه) تولید شد (Yorgancilar and Erisen, 2011).

باززایی غیرمستقیم گونه *Astragalus adsurgens* نیز با استفاده از 2,4-D و BA توسط Ping Luo et al. انجام شد (1999). اگر چه در مورد جوانه‌زنی بذر و باززایی درون شیشه‌ای بعضی از گونه‌های گون مطالعاتی انجام شده است، ولی در مورد گونه *Astragalus verus* که یکی از مهمترین گونه‌های مهم تولید کننده کتیرا و بومی ایران می باشد گزارشی مشاهده نشده است. با توجه به اهمیت زیاد این گونه در تولید کتیرا، در معرض انقراض قرار داشتن آن و اینکه بذر عامل تکثیر و پراکنش گیاه می باشد، شکستن

cicer L. با استفاده از تیمارهای سرمادهی مرطوب و غلظت‌های متفاوت اسید جیبرلیک و خراش‌دهی با سمباده نشان داد که درصد جوانه‌زنی در تیمار خراش‌دهی با سمباده در ترکیب با سرمادهی و جیبرلیک اسید بهترین گزینه برای شکستن بذر گون بود (Khayyat Fateh et al., 2014). در مطالعه (Moghaddam et al., 2014) در گون گونه *Astragalus tribuloides* خراش دادن موثرترین راه شکستن بذر بیان شد. با توجه به در معرض انقراض بودن گونه‌های مهم تولید کننده تیرا در گون و امکان استفاده از کشت بافت در تکثیر و اصلاح این گیاه مطالعاتی روی کشت بافت و باززایی بعضی از گونه‌های گون انجام شده است. القای کالوس و باززایی گیاه *Astragalus nezaketaein* گون بومی ترکیه توسط Erison (2010) انجام شد. در این مطالعه بذرها بدون خراش روی محیط کشت MS 1/2 هیچ گونه جوانه‌زنی نداشتند ولی پس از خراش با تیغ اسکالپل جوانه‌زنی خوبی نشان دادند (Erisen, 2010). در مطالعه دیگری شاخه-زایی و ریشه‌زایی یک گونه گون دیگر بومی ترکیه (*Astragalus chrysochorus*) که توسط Hasancbi (2010) انجام شد، بالاترین شاخه‌زایی به مربوط به محیط کشت MS با ۰/۵ میلی گرم در لیتر زاتین بود.

در مطالعه القای کالوس و باززایی گیاه *Astragalus nezaketae* گون بومی ترکیه، بیشترین تعداد شاخه (۶ شاخه بر ریزنمونه) از

دمای 25 ± 1 درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. پس از گذشت ۲۱ روز درصد جوانه‌زنی ارزیابی شد. در این آزمایش به منظور بررسی اثر غلظت‌های مختلف محیط کشت MS و ساکارز روی جوانه‌زنی بذر گون، بذور پس از ضدعفونی و دادن خراش در سطح آنها روی محیط کشت MS با سه سطح (MS، ۱/۲MS، ۱/۴MS) دارای ساکارز با غلظت (۰، ۱۰، ۲۰، ۳۰) گرم بر لیتر و آگار ۰/۸ درصد کشت شدند. پس از گذشت ۲۱ روز پارامترهای درصد جوانه‌زنی، طول ریشه، طول ساقه، وزن تر و خشک گیاهچه ارزیابی شد. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی بر پایه فاکتوریل (۳×۳) با ۱۰ تکرار انجام شد.

ریزمنونه‌های محور زیر لپه و محور بالای لپه در محیط کشت MS با ویتامین B5 حاوی ترکیب هورمونی BAP در سه سطح (۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر) و IAA در دو سطح (صفر و ۰/۲۵ میلی‌گرم بر لیتر) کشت شدند. پس از گذشت ۳۰ روز پارامترهای تعداد شاخه، طول شاخه، وزن تر و وزن خشک ارزیابی شدند. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی به صورت فاکتوریل (۳×۲) غلظت هورمون سیتوکینین (سه سطح) و غلظت اکسین (دو سطح) با پنج تکرار با دو ریزمنونه در هر ویال انجام شد.

در این آزمایش شاخه‌های بدست‌آمده از مرحله قبل در محیط کشت جامد ۱/۲MS دارای IAA (۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) و IBA (۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر)، کشت شدند.

خواب بذر و بهینه‌سازی باززایی آن می‌تواند در ریزازدیادی گیاه استفاده شود. این مطالعه جهت بررسی جوانه‌زنی و تولید گیاهچه استریل و باززایی گیاه از ریزمنونه‌های مختلف شامل شاخه‌زایی چندگانه و ریشه‌زایی انجام شد. نتایج این پژوهش می‌تواند در تکثیر و ریزازدیادی، مهندسی ژنتیک و انتقال ژن به گیاه و تولید درون شیشه‌ای کثیرا در آینده استفاده شود.

مواد و روش‌ها

این مطالعه در سال ۱۳۹۴ و ۱۳۹۵ در مجتمع آموزش عالی شیروان در خراسان شمالی انجام شد. گیاه مورد مطالعه در این پژوهش *Astragalus verus* می‌باشد که یک گونه تولید کننده کثیرا است. گیاهان گون از گردنه اسدلی در خراسان شمالی جمع‌آوری شدند. بذرها سالم جمع‌آوری شده از درون بوته گیاه پس از شستشو با آب جاری و یک دقیقه قرار گرفتن در الکل ۷۰ درصد با هیپوکلریت سدیم یک درصد به مدت ۲۰ دقیقه ضدعفونی شدند.

در این مرحله جهت بررسی شکستن خواب در بذر گون، پس از ضدعفونی بذرها در دو تیمار باخراش دادن سطح با تیغ اسکالپل و بدون خراش دادن در محیط کشت MS دارای سه درصد ساکارز و ۰/۸ درصد آگار با $pH=5/7$ کشت شدند. بذرها کشت شده به شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی (۲۵۰۰-۳۰۰۰ لوکس) و

استفاده از فرمول ($[\text{ArcSin}/\sqrt{14}] \times 180$) انجام شد.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که تاثیر تیمار خراش دهی سطح بذر بر درصد جوانه زنی در سطح یک درصد اختلاف معنی دار داشت (جدول ۱).

پس از گذشت ۳۰ روز ریشه زایی ارزیابی شد. این آزمایش در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با شش تیمار و پنج تکرار (هر تکرار حاوی دو ریزنمونه) انجام شد. در همه آزمایشها آماده سازی داده ها در برنامه Excel، تجزیه و تحلیل داده ها با نرم افزار JMP®-8، مقایسه میانگین تیمارها با آزمون LSD، رسم نمودارها با استفاده از برنامه Excel و تبدیل داده های درصدی با

جدول ۱- تجزیه واریانس تاثیر خراش دادن سطح بذر بر جوانه زنی.

Table 1- Analysis of variance for effect of seed surface scratching on its germination.

میانگین مربعات (MS)	درجه آزادی	منبع تغییرات
جوانه زنی بذر	df	Source of variation
Seed germination		
114739.2**	1	تیمار treatment
31	58	خطا error

** بیانگر معنی داری در سطح احتمال یک درصد است. ** indicate significant difference at the 1% level of probability.

سرما دهی به تنهایی و کاربرد اسیدجیبرلیک در شکستن خواب بذر بی تاثیر بود (Khayyat Moghaddam and Sadrabadi, 2015). این در حالی است که در گونه *Astragalus gossypinus* استفاده از اسیدسولفوریک نسبت به خراش دهی در شکستن خواب بذر موثرتر بود (Tavili et al. 2012). در گونه *Astragalus cicer* L. هم خراش دهی تاثیر چندانی روی شکستن خواب بذر نداشت، بلکه سرما دهی و تیمار اسیدجیبرلیک موثرتر بود (Khayyat Moghaddam et al., 2014). در مطالعه

هیچ گونه جوانه زنی در بذرهای بدون خراش دیده نشد. در مقابل، در بذرهای خراش داده شده جوانه زنی به مقدار ۹۸ درصد مشاهده شد. در پژوهش Arbabian et al. (2009) نیز روی گونه (*Astragalus fridae*)، خراش دهی تاثیر زیادی روی شکستن خواب بذر داشت و بیشترین درصد جوانه زنی بذرها در تیمار خراش دهی با سمباده مشاهده شد. در مطالعه Khayyat Moghaddam and Sadrabadi (2015) برای شکستن خواب گونه *Astragalus parrowianus* بیشترین درصد جوانه زنی در تیمار خراش دهی به همراه سرما دهی بدست آمد.

ندارد. در مقابل اثر سطوح مختلف نمک در محیط کشت و غلظت مختلف ساکارز در سطح یک درصد و اثر متقابل سطوح مختلف محیط کشت و غلظت ساکارز در سطح پنج درصد بر وزن خشک گیاهچه معنی دار بود (جدول ۲). مقایسه میانگین نشان داد که افزایش میزان ساکارز باعث افزایش طول ساقه شد. بیشترین طول ساقه در محیط کشت MS کامل با میزان ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و میانگین ۸/۶ سانتی متر بدست آمد (شکل ۱). همچنین مقایسه میانگین نشان داد که در محیط کشت MS کامل و ۱/۲MS افزایش میزان ساکارز باعث افزایش طول ریشه شد. بیشترین طول ریشه در محیط کشت MS کامل و ۱/۲MS با میزان ۳۰ گرم در لیتر ساکارز به ترتیب با میانگین ۲۵ و ۲۶/۱۶ سانتی متر بدست آمد (جدول ۲).

مقایسه میانگین نشان داد که افزایش غلظت ساکارز در افزایش وزن خشک گیاهچه موثر بوده است به نحوی که بیشترین وزن خشک در غلظت ۳۰ میلی گرم در لیتر ساکارز با میانگین ۰/۰۹۹ میلی گرم بدست آمد.

Erison (2010) روی گونه *Astragalus nezaketaein* خواب بذرها فقط با خراش دهی شکسته شد. به نظر می رسد مکانیسم خواب بذر در گونه های مختلف گون متفاوت می باشد. در گونه *Astragalus verus* خراش دهی تاثیر زیادی در شکستن خواب بذر داشت. نتایج تجزیه واریانس داده های حاصل از تاثیر تیمارهای مورد مطالعه روی درصد جوانه زنی بذور خراش داده شده در سطوح مختلف محیط کشت و غلظت متفاوت ساکارز معنی دار نشد. مقایسه میانگین نشان داد که در هر سه سطح محیط کشت با غلظت ۱۰ گرم در لیتر ساکارز با میانگین صد درصد بیشترین درصد جوانه زنی حاصل شد.

نتایج تجزیه واریانس تاثیر تیمارهای مورد مطالعه بر طول ریشه و طول ساقه گیاهچه رشد یافته نشان داد که اثر ساده سطوح مختلف محیط کشت و غلظت ساکارز و اثر متقابل آنها در سطح یک درصد معنی دار بود (جدول ۲). همچنین نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اختلاف معنی داری بین سطوح مختلف محیط کشت و غلظت ساکارز بر وزن تر گیاهچه وجود

جدول ۲- تجزیه واریانس اثر سطوح مختلف محیط کشت و غلظت‌های مختلف ساکارز بر طول ریشه و ساقه و وزن تر و خشک گیاهچه‌ها.

Table2- Analysis of variance for effect of different medium strengths and different concentration of sucrose on root and stem length and fresh and dry weight of seedling.

میانگین مربعات (MS)				درجه آزادی	منبع تغییرات
وزن خشک گیاهچه‌ها Dry weight of seedling (mg)	وزن تر گیاهچه‌ها Fresh weight of seedling (mg)	طول ساقه Stem length (cm)	طول ریشه Root length (cm)	df	Source of variation
0.00037 ^{ns}	0.0309 ^{ns}	28.9323 ^{**}	166.788 ^{**}	2	سطح محیط کشت Medium level
0.00482 ^{**}	0.054 ^{ns}	5.4265 ^{**}	135.415 ^{**}	3	غلظت ساکارز Sucrose concentration
0.00176 [*]	0.0302 ^{ns}	9.1632 ^{**}	132.88 ^{**}	6	سطح محیط کشت × غلظت ساکارز Medium level × Sucrose concentration
0.0007	0.024	7.5803	0.437	24	خطا error

* و ** به ترتیب معنی داری در سطح احتمال ۰/۵ و ۱ درصد و ns بیانگر عدم اختلاف معنی دار است.

* and ** indicate significant difference at the 5% and 1% level of probability and ns indicate no significant difference.

جدول ۳- اثر سطوح مختلف محیط کشت و غلظت‌های مختلف ساکارز بر طول ساقه، طول ریشه و وزن خشک گیاهچه‌ها.

Table3- Effect of different medium strengths and different concentration of sucrose on stem length, root length and dry weight of seedlings.

وزن خشک گیاهچه (میلی گرم)	طول ریشه (سانتی متر)	طول ساقه (سانتی متر)	غلظت ساکارز (گرم بر لیتر)	سطح محیط کشت
Dry weight of seedling (mg)	Root length (cm)	Stem length (cm)	Sucrose concentration (g/l)	Medium level
0.018 d	8.8 d	4.5 cd	0	MS
0.035 cd	7.67 e	3.67 d	10	
0.029 cd	6 f	4.8 c	20	
0.099 a	25 b	8.67 a	30	
0.014 d	4.5 g	4 cd	0	1/2MS
0.031cd	1.8 h	4 cd	10	
0.064abc	11.67 c	6.8 b	20	
0.054 bcd	26.1 a	4.9 c	30	
0.022 cd	11.3 c	3.8 d	0	1/4MS
0.042 cd	2.3 h	2.67 e	10	
0.094 ab	1.3 h	1.17 f	20	
0.049 cd	5.16 fg	2.4 e	30	

حروف مشابه براساس آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی دار ندارد.

Similar letters based on LSD test at 5% probability level have no significant difference.

تاثیر تنظیم کننده‌های رشد گیاهی بر شاخه‌زایی چندگانه در گون نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر ساده غلظت BAP بر طول شاخه و تعداد شاخه در سطح یک درصد معنی دار بود. اثر ساده غلظت IAA بر طول شاخه در سطح پنج درصد معنی دار بود، اما بر تعداد شاخه معنی دار نبود. همچنین اثر متقابل BAP و IAA بر طول و تعداد شاخه معنی دار نبود (جدول ۳). همچنین نتایج تجزیه واریانس نشان داد، که اثر ساده غلظت BAP و IAA و اثر متقابل آنها بر وزن خشک و اثر ساده BAP و اثر متقابل BAP و IAA بر وزن تر شاخه‌های ایجاد شده معنی دار نبود. این در

نتایج این پژوهش نشان داد که جوانه‌زنی بذرهای خراش داده شده در غلظت‌های مختلف محیط کشت (MS، 1/2MS، 1/4MS) و ساکارز تقریباً بطور مشابه اتفاق افتاد و اختلاف معنی داری بین آنها مشاهده نشد. فقط اندکی افزایش جوانه‌زنی در غلظت ۱۰ گرم بر لیتر ساکارز نسبت به غلظت‌های دیگران مشاهده شد که قابل توجه نبود. در این مطالعه افزایش مقدار ساکارز، افزایش طول ریشه، ساقه، وزن تر و وزن خشک گیاهچه حاصل را در پی داشت که استفاده از مقدار بیشتر ساکارز را توجیه می کند.

درصد باززایی نشان داد که با افزایش BAP تعداد شاخه بیشتری حاصل شد.

حالی است که اثر ساده IAA بر وزن تر شاخه‌ها در سطح پنج درصد معنی‌دار بود (جدول ۴). مقایسه میانگین تاثیر سطوح مختلف هورمونی بر

جدول ۴- تجزیه واریانس اثر ترکیب هورمونی باززایی بر تعداد، طول، وزن تر و وزن خشک شاخه‌های تولید شده.

Table 4-Analysis of variance for effect of regeneration hormonal treatment on number, length, fresh weight and dry weight of produced shoots.

میانگین مربعات (MS)				درجه آزادی	منبع تغییرات
وزن خشک	وزن تر	طول شاخه	تعداد شاخه	df	Source of variation
Dry weight	Fresh weight	Shoot length	Shoot number		
0.00005 ^{ns}	0.005 ^{ns}	2.734 ^{**}	17.062 ^{**}	2	BAP
0.000002 ^{ns}	0.284 [*]	5.88 [*]	0.0 ^{ns}	1	IAA
0.00002 ^{ns}	0.0025 ^{ns}	1.285 ^{ns}	^{ns} 2.437	2	IAA× BAP
0.00006	0.002	0.569	2.437	42	خطا
					error

* و ** به ترتیب معنی داری در سطح احتمال ۰/۵ و ۱ درصد و ns بیانگر عدم اختلاف معنی دار است.

* and ** indicate significant difference at the 5% and 1% level of probability and ns indicate no significant difference.

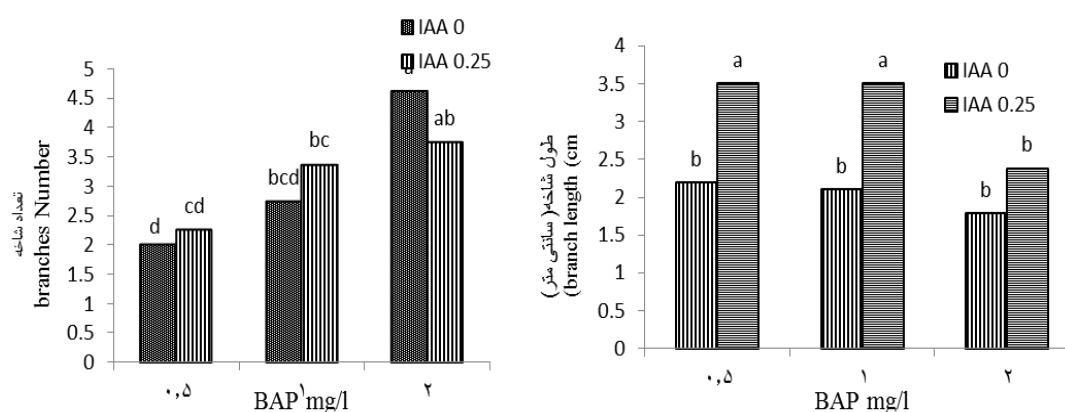
در هر ریزنمونه شد. در مطالعه حاضر BAP در ترکیب با IAA در افزایش طول ساقه تاثیر مثبت داشت. به طوری که بیشترین طول شاخه در محیط کشت ۰/۵ میلی گرم در لیتر BAP در ترکیب با ۰/۲۵ میلی گرم در لیتر IAA با میانگین ۳/۵ سانتیمتر حاصل شد (شکل ۱).

مقایسه میانگین نشان داد که شاخه‌های ایجاد شده در محیط کشت BAP در ترکیب با IAA دارای وزن تر بیشتری بود. IAA باعث افزایش طول شاخه و افزایش وزن تر شاخه‌ها

همچنین بیشترین درصد شاخه‌های تولیدی در تیمارهای غلظت بالای BAP بدون IAA مشاهده شد. به طوری که بیشترین درصد شاخه‌زایی در محیط کشت MS حاوی ۲ میلی گرم در لیتر BAP بدون ترکیب با IAA با میانگین ۴/۶ عدد بدست آمد (شکل ۲). طبق مطالعه‌ای که توسط Moshtaghi et al. (2006) انجام شد، BAP می‌تواند سیتوکینین مناسبی برای تحریک شاخه‌زایی چندگانه در ژنوتیپ‌های نخود باشد. عموماً استفاده از غلظت بالای این هورمون نظیر دو تا سه میلی گرم در لیتر سبب تولید کافی شاخه

NAA را در تولید شاخه‌های چندگانه موثر دانسته‌اند (Erisen *et al.*, 2011; Yorgancilar and Erisen, 2011). نتایج تجزیه واریانس اثر ترکیب هورمونی بر ریشه‌زایی نشان داد که اثر نوع اکسین بر تولید ریشه و کالوس‌زایی انتهای ساقه در سطح پنج درصد معنی‌دار بود.

شد. بیشترین وزن تر در محیط کشت با ۲ میلی-گرم در لیتر BAP در ترکیب با ۰/۲۵ گرم در لیتر IAA با میانگین ۰/۲۰۶ گرم بدست آمد. پژوهشگران در مطالعات باززایی غیرمستقیم گونه‌های دیگر گون (*Astragalus cariensis* و *Astragalus schizopterus*) استفاده از TDZ و

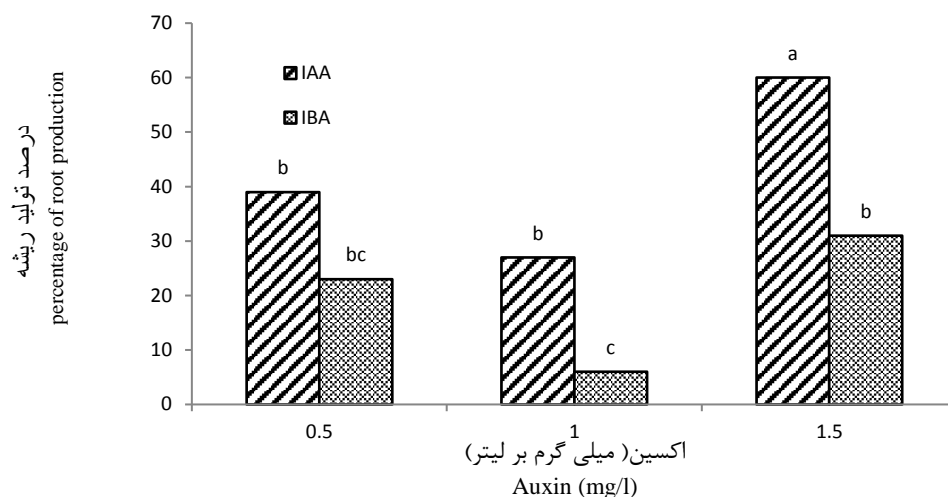


شکل ۱. مقایسه اثر ترکیب هورمون باززایی بر (الف) تعداد شاخه و (ب) طول شاخه. میانگین دارای حروف مشابه براساس آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌دار ندارد

Fig. 1 Effect of BAP and IAA on A: branch number and B: branch length. Similar letters based on LSD test at 5% probability level have no significant difference

در لیتر IAA با میانگین ۶۰ درصد حاصل شد. کمترین درصد ریشه‌زایی در محیط کشت دارای یک میلی‌گرم در لیتر IBA با میانگین شش درصد بدست آمد (شکل ۲).

مقایسه میانگین نشان داد که بیشترین درصد ریشه‌زایی در محیط کشت‌های دارای IAA بدست آمد. به طوری که بیشترین درصد ریشه‌زایی در محیط کشت دارای ۱/۵ میلی‌گرم



شکل ۲- اثر IAA و IBA بر درصد ریشه‌زایی شاخه‌های تولید شده در شرایط کشت بافت.

Figure2- Effect of IAA and IBA on rooting Percentage of produced shoots at tissue culture condition.



شکل ۳- مراحل باززایی گون (الف). کشت ریزنمونه (محورزیرلپه) در محیط شاخه‌زایی (ب). شاخه‌های تولید شده

(ج). شاخه‌های جدا شده (د). تولید ریشه از شاخه‌های باززا شده (ی). سازگاری گیاهچه‌ها در گلخانه.

Figure3- Direct regeneration process of *Astragalus verus* (A). Cultivation of explants (Hypocotyl) on multiplication medium, (B) Regenerated shoots (C). Separated branches, (D). Root production of regenerated branches, (E). Hardening of seedling in glasshouse.

متابولیت‌های ثانویه استفاده شود. گونه *Astragalus verus* از مهمترین گونه‌های تولید کننده کتیرا در ایران است که کتیرای بسیار مرغوب تولید می‌کند. نتایج حاصل از این پژوهش می‌تواند زمینه را برای انجام ریزازدیادی و تکثیر گیاه و همچنین در مطالعات اصلاح گیاه از طریق روش‌های نوین مهندسی ژنتیک و تولید متابولیت‌های ثانویه از جمله کتیرا در محیط درون شیشه‌ای استفاده شود.

در گزارشی که توسط Yorgancilar and Erisen (2011) روی گون بومی ترکیه *Astragalus schizopter* انجام شد شاخه‌های باززا شده به محیط کشت ریشه زایی شامل MS با ۰/۵ میلی گرم در لیتر NAA و ۰/۵ میلی گرم در لیتر IBA منتقل شدند، ریشه زایی در آن‌ها ۱۰۰ درصد بود. ریشه‌زایی شاخه‌ها در ریزازدیادی این گونه اهمیت دارد. همچنین کشت ریشه‌های مویین نیز می‌تواند در تولید

منابع

- Arbabian S, Moghanloo M, Majd A (2009). Seed dormancy breakage methods in the endangered species *Astragalus fridae* Rech. The Quarterly Journal of Biological Sciences 2: 45-50.
- Erisen S, Yorgancilar M, Atalay E, Bubaoglu M, Duran A (2010). Callus induction and plant regeneration of the endemic *Astragalus nezaketaein* Turkey. Electronic Journal of Biotechnology 13: doi: 10.2225/vol13-issue6-fulltext-3
- Erisen S, Atalay E, Yorgancilar M (2011). The effect of thidiazuron on the in vitro shoot development of endemic *Astragalus cariensis* in turkey. Turk Journal-Biotechnology 35: 521-526.
- Fateh E, Majnoonhosseini N, Arefi HM, Sharif-Zadeh F (2006). Seed dormancy methods breakage in *Astragalus tribuloides*. Iranian Journal Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research 13(4): 345-360 (In Persian).
- Genty HS (1957). Gum tragacanth in Iran. Economic Botany 11:40-63
- Hasançbi S, Turgutkara N, Art S (2010). Micropropagation and root culture of Turkish endemic *Astragalus chysochlorus*(leguminosae). Turk Botany 35:203-210.
- Khayat Moghaddam M, Agah F, Sadrabadi Haghighi R (2014). Effective methods in dormancy breakage and enhancement of seed germination in *Astragalus cicer* L. Journal of Seed Research 4: 21-27 (In Persian).
- Khayat Moghadam M, Sadrabadi Haghighi R (2015). Evaluation of seed dormancy breaking methods in *Astragalus parrowianus*. International Journal of Farming and Allied Sciences 4: 473-476.
- Maassoumi AA (2005) The genus *Astragalus* in Iran, vol 5. Research Institute of Forests and Rangelands, Technical Publication No. 362, Tehran (In Persian).
- Moshtaghi N, Bagheri A, Jalali M, Ghareyazi B (2006). In vitro direct multiple shoot induction of 5 genotype of *Cicer arietinum*. Journal of Agricultural Biotechnology 6: 49-62.
- Mozaffarian V, (1996). A Dictionary of Iranian Plant Names Latin, English, and Persian. Farhange Moaser Publisher 745p.

- Ping Luo J, Fen Jia J, Hua Gu Y, Liu J (1999). High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration in callus cultures of *Astragalus adsurgens* pall. *Plant Science* 143: 93-99.
- Scherson AR, Cook DR, Sanderson MG (2005). Phylogenetics of new world *Astragalus*: Screening of novel nuclear loci for the reconstruction of phylogenies at low taxonomic levels. *Brittonia* 57:354-366.
- Shampur T, Motasadizadeh H (2015). Extraction chemical composition in the gum tragacanth of *Astragalus calliphysa* bge by soxhelt and identification composition using GC/MS. *Journal of Separation Science and Engineering* 7: 55-62.
- Tavili A, Abbasi Khalaki M, Moamari M (2012). Effect of different of dormancy breaking methods on Seed Germination and Some Specificities of *Astragalus gossypinus* Seedling. *Iranian Journal of Seed Science and Technology* 1: 64-72 (In Persian).
- Yorgancilar M, Erisen S (2011). The effect of TDZ on shoot regeneration of *Astragalus schizopterus*. *Journal of Animal and Plant Sciences* 21:519-524.

Optimization of Direct Regeneration of *Astragalus verus* in in vitro condition

Ebrahimi S.¹, Zaker Tavallaie F.^{2*}, Zare Mehrjerdi M.², Ghorbanzadeh Neghab M.³

¹MSc, Plant Biotechnology, Complex Higher Education of Shirvan, North Khorasan, Iran.

² Assistant Professor, Plant Biotechnology, Complex Higher Education of Shirvan, North Khorasan, Iran.

³ Associate Professor, Plant Biotechnology, Complex Higher Education of Shirvan, North Khorasan, Iran.

Abstract

Astragalus is one of the most valuable medicinal plants in Iran. The species of *Astragalus verus* is a native species of tragacanth producer. Due to the importance of this species in the production of tragacanth, exposed to extinction, the role of seed in its reproduction, as well as the possibility of its reproduction using micropropagation, this study was conducted with the aim of breaking seed dormancy, seed germination and direct regeneration of this plant. First, the effect of surface scratching on breaking of seed dormancy was investigated. Then, the effect of culture medium and sucrose concentration on seed germination and sterile seedling production was studied as factorial based on completely randomized design. The explants of hypocotyle and epicotyle were cultured on MS medium supplied by B5 vitamin containing BAP in 3 levels and IAA in 2 levels due to multiple shoot production. Rooting of multiple shoots was carried out on 1/2MS medium containing IAA in 2 levels and IBA in 3 levels based on completely randomized design with 6 treatments and 5 repeat. Scraping increased the germination rate by an average of 98%. Different media and sucrose concentration had no effect on germination percentage. With increasing sucrose, were increased the stem and root length, fresh weight and seedling dry weight. The highest percentage of shoots was obtained in MS medium containing 2 mg /L BAP without IAA with an average of 4.6 pcs. The highest percentage of rooting was obtained with 1.5 mg/l IAA with an average of 60%. The results of this study can be used in micropropagation, gene transformation and in vitro tragacanth production.

Keywords: *Astragalus verus*, germination, multiple shoot induction, rooting, seed dormancy.

*Corresponding Author: Zaker Tavallaie F.

Tel: 09155087691

Email: f.zaker.t@um.ac.ir