فصلنامه

زیست شناسی تکوینی

سال اول، شماره ۲، بهار ۱۳۸۸

بررسی نوع و غلظت برخی تیمارهای هورمونی در کشت بافت گونه در معرض خطرانقراض گون گچی (*Astragalus fridae Rech. f.*)

صدیقه اربابیان*[۱]، مریم مغانلو[۲]

۱- استادیار گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال * (عهده دار مکاتبات)، arbabias@yahoo.com

۲- دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال

چکیده

Astragalus fridae Rech. f. از جنس گون و بومی ایران است که رویشگاه آن دارای اقلیمی بیابانی با خاکی غنی از گچ می باشد که این امر سبب گردیده کارخانجات گچ به منظور بهره برداری، به رویشگاه این گونه در حال پیشروی باشند و این گونه را در لیست گیاهان در معرض خطر انقراض کشور ایران قرار دهند. بررسی ها نمایانگر آن است که کشت در شیشه برخی از گونه های گون که دارای ارزش دارویی، اقتصادی و اکولوژیکی خاص می باشند به منظور ریزازدیادی ،رویان زایی پیکری و استخراج متابولیت های ثانویه صورت گرفته است و هدف ما نیز از این مطالعه بررسی تأثیر نوع و غلظت برخی از تنظیم کننده های رشد بر اندام زایی گیاه گون گچی در شیشه است برای این منظور تـأثیر چهار نوع هورمون شامل، نفتالین استیک اسید (NAA)،۲و۴ – دی کلروفنوکسی استیک اسید (2,4-D)، N^6 (۲- ایزوپنتیل) آدنین(2IP) و ۶بنزیل آمینوپورین (BAP)، در محیط کشت MS بر روی کشت قسمت های مختلفی از گیاه گون گچی مورد مطالعه قرار گرفت. جداکشتها از قسمت های مریستم رأسی، ساقه، برگ و ریشه از دانه رستهای سترون تهیه شدند. هورمون های مورد استفاده BAP/2,4-D و 2IP/NAA بود که برای هر ترکیب ۱۶نوع تیمار با نسبت‌های مختلف بکار گرفته شد. در محیط کشت با غلظت های متفاوت از هورمون BAP/2,4-D جداکشت های ریشه تولید کالوس هایی در تعداد و حجم کمتر و بدون اندام زایی و تمایز را داشتند و سایر جدا کشت ها به ترتیب مریستم رأسی،ساقه و برگ در هر دو محیط کشت MS با ترکیبات و غلظت های مختلف هورمونی منجر به تولید اندام های هوایی و ریشه با درصد های متفاوت گردیدند و با توجه به آزمایش ها و آنالیز داده های حاصل مشخص شد که جداکشت های مریستمی بهترین جداکشت در باززایی به گیاه کامل در شرایط in vitro بوده و ترکیب هورمونی 2IP/NAA با غلظت های مختلف درصد کال زایی و اندام زایی بهتری را نشان داده است. در مرحله نهایی گیاهان حاصل از کشت به گلدان های حاوی خاک مساوی پیت و پرلیت استریل شده منتقل و با محلول هوگلند تغذیه شدند. و پس از یک هفته این گیاهان به خاک جمع آوری شده از زیستگاه اصلی خود انتقال یافتند.

واژه های کلیدی: *Astragalus fridae*، کشت بافت، کالوس و در معرض خطر انقراض.

مقدمه

گون ها با داشتن ۳۳۰۰ گونه در جهان و انتشار در مناطق معتدله یکی از مهمترین جنس های خانواده پروانه آساها به شمار می روند واز این میان ایران خاستگاه اصلی و یکی از مراکز تنوع گونه های گون در دنیای قدیم می‌باشد که بر اساس آخرین اطلاعات ۸۰۴ گونه در ایران

Archive of SID

www.SID.ir

وجود دارد که از آن میان ۵۲۷ گونه انحصاری و ۲۷۷ گونه مشترک با کشورهای همسایه می باشد (۱،۲). اگرچه مصرف عمده گون به عنوان علوفه برای دامها و حیوانات وحشی می باشد، ولی از ۳۲گونه آن برای مصارف غذایی، دارویی، آرایشی وجانشینی برای چای و قهوه یا به عنوان منبع صمغ های گیاهی استفاده می شود (۱،۳). در جنس گون ترکیبهای دارویی نظیر پلی ساکارید ها و ساپونین ها و ترکیبهای سمی مانند آلکالوئید های ایندوزولیدین و ترکیبهای نیتروآلیفاتیک و سلنیوم وجود دارند. از گون ها مواد دارویی مختلفی از جمله آنتی اکسیدان، محرکهای سیستم ایمنی، حفاظت کننده‌های کبدی، مواد ضد ویروس و باکتری و مواد موثر بر رگهای قلبی استخراج شده است (۳). ترکیبهای آنتی‌اکسیدان بدست آمده از ریشه از کاهش محتوی‌گلیکوژن کبدی جلوگیری کرده، پروتئین و آلبومین کل سرم را افزایش می دهد. جدیدترین خواص دارویی شناخته شده گون ها در زمینه اثرات ضد ایدزی و ضد سرطانی آنها است که در این راستا ترکیب های کاستانوسپرمین و آستراگالوزوئید نیز در دست مطالعه اند (۴، ۵).

بنابراین باتوجه به اهمیت ویژه گون ها از نظر دارویی، علوفه ای و اقتصادی و گسترش وسیع آنها در کشور انجام مطالعات مختلف در زمینه های کشت بافت و تکثیر بر روی گونه های مهم این جنس به خصوص گونه های در حال انقراض حائز اهمیت می باشد .

گیاه گون گچی *Astragalus fridae* گیاهی است به ارتفاع ۳۰ تا ۳۵ سانتی متر، ساقه آن غالباً پوشیده از کرک های دو شاخه ای متقارن راست یا مجعد و نیمه خوابیده است، برگ ها به طول ۶ تا ۱۰ سانتی متر؛ دمبرگ ۱/۵ تا ۶ سانتی متر، شیاردار و به قطر۳ میلی متر؛ برگچه‌ها یک عدد ودارای گل آذین خوشه، با ۵ تا ۲۰ گل می‌باشد، تخمدان پایک دار، خطی و کرکداروخامه بدون کرک است. میوه آن دو حجره ای، واژگون، خطی، بدون پایک و بطرف بالا خمیده است (۱) گونه ای بومی وانحصاری ایران و از جنس گون می باشد که براساس طبقه بندی اتحادیه جهانی حفاظت از طبیعت (IUCN) و با استفاده از منابع موجود در کشور جز گیاهان در معرض خطر انقراض (Endangered) کشورمان است (۶).

بدین منظور تحقیق حاضر به بررسی نوع و غلظت برخی تیمارهای هورمونی در کشت بافت گونه بومی و در معرض خطر انقراض *Astragalus fridae* پرداخته است.

مواد و روشها

این آزمایش در آزمایشگاه ژنتیک سازمان حفاظت محیط زیست انجام شد. بذرهای مورد آزمایش از منطقه افتر واقع دراستان سمنان که تنها محل رویش این گیاه بومی است در سال ۱۳۸۷ جمع آوری گردید .

پس از شکست خواب بذرها بوسیله قرارگیری آنها به مدت ۱۰ روز در دمای ۵ درجه سانتیگراد درون یخچال و سپس خراش دهی پوسته بذر بوسیله سمباده، بذرها را به مدت یک دقیقه درون اتانل ۷۰ درصد قرار داده وسپس با آب مقطر استریل بذرها را شستشو می‌دهیم و بعد به مدت ۲۰ دقیقه در هیپوکلریت سدیم قرارداده و سپس دوباره با آب مقطر استریل شده شستشو می دهیم و پس از این مرحله بذرها به ظروف سترونی که دارای کاغذ صافی سترون بودند منتقل شدند تا آب آنها گرفته شود و سپس بذرهای سترون شده به محیط کشت MS فاقد هورمون های تنظیم کننده رشد که یک روز قبل سترون شده بودند منتقل شدند .تمامی بذرهای سترون شده بعد از چهار روز جوانه زدند و در شرایط دمای ۲۴ درجه سانتیگراد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند.

به منظور بررسی تأثیر چهار نوع هورمون بر کشت قسمت های مختلف گیاه شامل مریستم رأسی ساقه، برگ، ریشه ابتدا محیط های دارای هورمون هایی به صورت BAP/2,4-D و 2IP/NAA و هر یک در غلظت های ۰,۲/۰,۲–۰,۵/۰,۲– ۱/۰,۲– ۲/۰,۲– ۰,۲/۰,۵–۰,۵/۰,۵–

Archive of SID

www.SID.ir

۰,۵/۱۰– ۲/۰,۵ –۰,۲/۱– ۰,۵/۱–۱/۱–۲/۱– ۲/۲,۲–۰,۵/۲–۱/۲–۲/۲ میلی گرم بر لیتر تهیه شدند که به منظور تسهیل آنالیز داده ها به ترتیب با شماره های ۱ تا ۱۶مشخص گردیدند. برای هر غلظت از هر ترکیب هورمونی جهت هر قسمت از گیاه سه محیط کشت در نظر گرفته و در هر محیط کشت چهار قطعه کشت گردید. تأثیر هورمون بر قطعات جداکشت تقریباً بعد از ۱۰ روز از جهت تعداد و فراوانی کال زایی و توان اندام زایی بعد از ۳۰ روز مورد محاسبه قرار گرفت .در محیط هایی که کشت بافت سبب ایجاد گیاه کامل گردید، انتقال گیاه به گلدانی که مخلوطی برابر از پیت و پرلیت بود صورت گرفت و با محلول هوگلند تغذیه گردید.

تجزیه و تحلیل داده های این آزمایش با استفاده از نرم افزار SPSS و مقایسه میانگین ها به روش دانکن انجام گرفت و نمودارها با برنامه Excel رسم گردید.

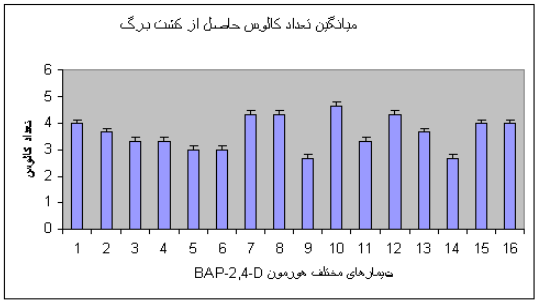
نتایج

با توجه به تیمارهای هورمونی ذکر شده نتایج حاصل از کشت جداکشت های قطعات گیاه *Astragalus fridae* بدین شرح می باشد:

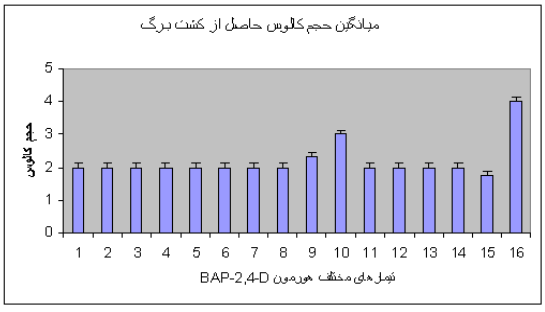
الف – نتایج حاصل از کشت جداکشت های بدست آمده در محیط کشت MS دارای غلظت های مختلفی از هورمون AP/2,4-D :

۱- برگ: قطعات برگ در طی ۳۰ روز ابتدایی کشت اکثر کال ها دارای رنگ سبز روشنی بوده ودر غلظت های ۱/۰,۲ و۲/۰,۲ از لحاظ رنگ حاصل از کال ها با یکدیگر اختلاف معناداری ندارند ولیکن با سایر غلظت های هـورمونی اختلاف مـعناداری را نشان می دهـند و غلظت هورمونی ۱/۲ کمترین حجم کال ها را شامل گشته و اکثر کال ها نیز قطری برابر با یک سانتی متر مکعب داشتند، بیشترین میانگین حجم مشاهده شده در کال ها در غلظت ۲/۲ می باشد (نمودار ۱–۲) و همچنین بیشترین میانگین تعداد کال حاصل شده در غلظت ۱/۰,۵ می باشد (نمودار۱–۱).

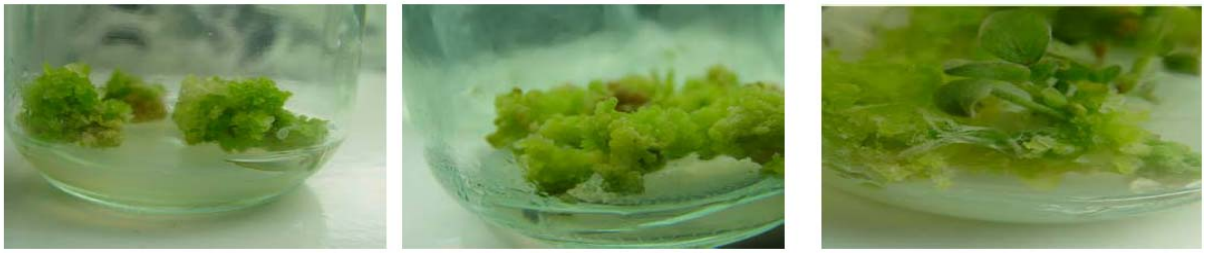
۱. در طی واکشت های صورت گرفته اکثریت کال ها رنگ سبز تیره ای به خود گرفتند و قطری تقریباً برابر با دو سانتی متر مکعب بدست آوردند که در نهایت منجر به اندام زایی ۵۳ درصد از کال های ایجاد شده بود که بیشترین درصد اندام زایی کامل را در غلظت هورمونی ۰,۲/۲ مشاهده کردیم. (شکل۱)



۱-۱- نمودار میانگین تعداد کالوس های حاصل از برگ در غلظت های مختلف BAP/2,4-D



۱-۲- نمودار میانگین حجم کالوس های حاصل از برگ غلظت های مختلف BAP/2,4-D

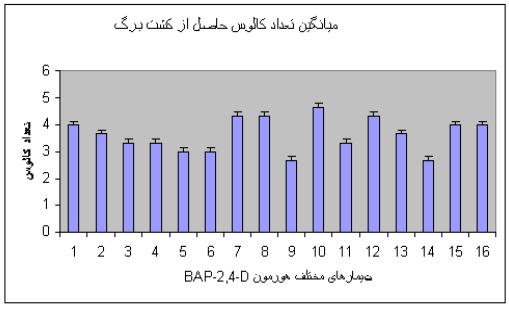


شکل ۱- نمایی از اندام زایی و کال زایی جدا کشت های برگ تحت تأثیر ترکیب هورمونی BAP/2,4-D

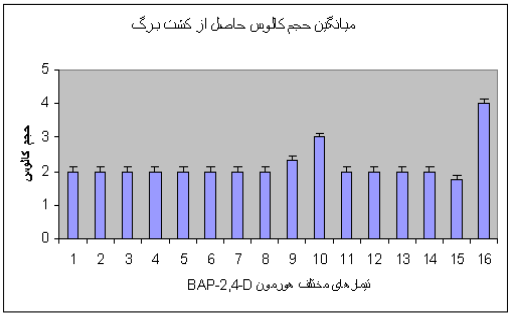
Archive of SID

www.SID.ir

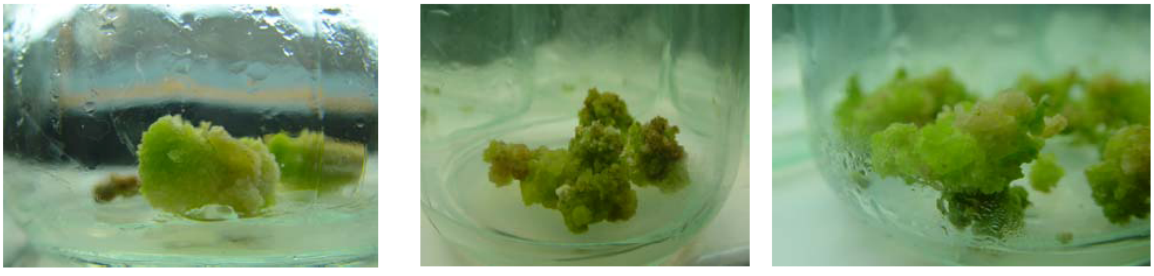
۲. ریشه : کشت اکثر قطعات ریشه منجر به ایجاد کال هایی با رنگ سبز روشن گردید به جز در غلظت های ۱/۱ و۲/۱ که بطور میانگین در تکرار های مختلف رنگ کال ها کرم مایل به زرد بود و همچنین بیشترین میانگین حجم کال تولید شده درغلظت های ۰,۲/۰,۲و ۰,۵/۱ می باشد (نمودار ۲-۲) بیشترین میانگین تعداد کال تولید شده در غلظت ۰,۲/۰,۲ می باشد وکمترین هم در غلظت های هورمونی ۱/۰,۲ و ۰,۲/۱ مشاهده گردید (نمودار ۲-۱). همچنین تقریباً ۵ درصد از قطعات نیز هیچگونه کالی تشکیل ندادند و در طی واکشت های صورت گرفته از سایر کال ها اندام زایی مشاهده نگردیده است. (شکل۲)



۲-۱- نمودار میانگین تعداد کالوس های حاصل از ریشه در غلظت های مختلفBAP/2,4-D

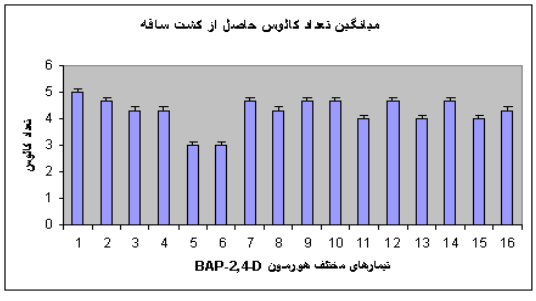


۲-۲- نمودار میانگین حجم کالوس های حاصل از ریشه در غلظت های مختلفBAP/2,4-D

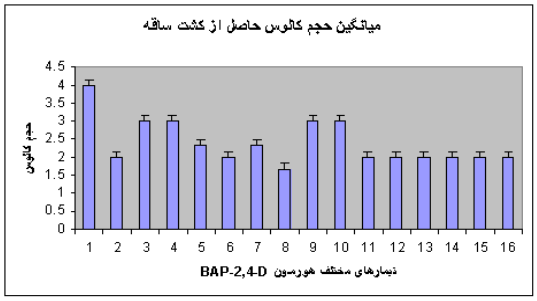


شکل ۲- نمایی از اندام زایی و کال زایی جدا کشت های ریشه تحت تأثیر ترکیب هورمونی BAP/2,4-D

۳- ساقه: قطعات ساقه در تمامی غلظت های ترکیب هورمونی تشکیل کال هایی به رنگ سبزتیره دادند و بیشترین میانگین حجم و تعداد کال در غلظت ۰,۲/۰,۲ می باشد و کمترین میانگین حجم کال در غلظت ۲/۰,۵ می باشد (نمودار ۳-۲)، همچنین کمترین میانگین تعداد کال حاصل را در غلظت هورمونی ۰,۲/۰,۵ و ۰,۵/۰,۵ مشاهده کردیم (نمودار ۳-۱) و در طی واکشت های صورت گرفته بیش از ۶۰ درصد از کال های ایجاد شده اندام زایی نمودند بطوریکه اندامهای هوایی با برگ های سبز پر رنگ بر روی کال ها تشکیل شدند که از این میان غلظت هورمونی ۱/۰,۲ بیشترین درصد اندام زایی کامل را داشت (شکل۳).



۳-۱- نمودار میانگین تعداد کالوس های حاصل از ساقه در غلظت های مختلفBAP/2,4-D

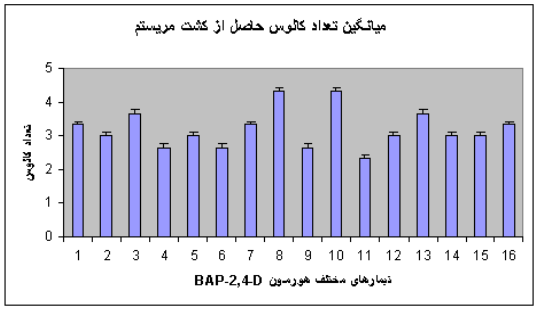


۳-۲- نمودار میانگین حجم کالوس های حاصل از ساقه در غلظت های مختلفBAP/2,4-D

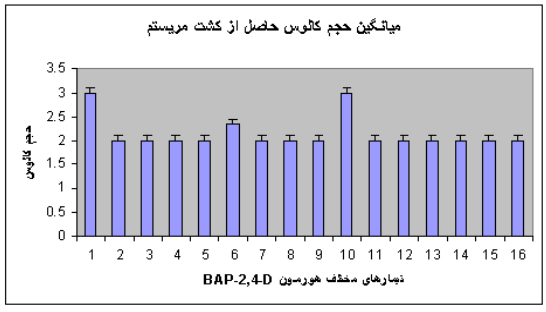
Archive of SID
www.SID.ir

شکل ۳- نمایی از اندام زایی و کال زایی جدا کشت های ساقه تحت تأثیر ترکیب هورمونی BAP/2,4-D

۴- مریستم رأسی: این قطعات در تمامی غلظت های این ترکیب هورمونی تشکیل کال دادند بیشترین میانگین حجم کالوس در غلظت ۰,۲/۰,۲ و ۰,۵/۱ می باشد (نمودار ۴-۲) همچنین بیشترین میانگین تعداد کالوس حاصل در غلظت های هورمونی ۰,۵/۱ و ۲/۰,۵ می باشد (نمودار ۴-۱) و در طی واکشت های صورت گرفته اکثریت کال ها رنگ سبز تیره داشته و حدود ۷۰ درصد از کال ها اندام زایی داشتند که از این میان غلظت هورمونی ۲/۰,۲ و ۰,۲/۰,۲ بیشترین درصد اندام زایی کامل را داشتند. (شکل ۴)



۴-۱- نمودار میانگین تعداد کالوس های حاصل از مریستم در غلظت های مختلف BAP/2,4-D



۴-۲- نمودار میانگین حجم کالوس های حاصل از مریستم در غلظت های مختلفBAP/2,4-D

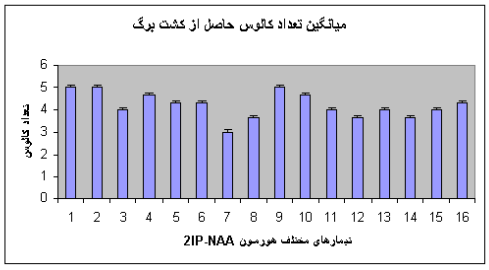
شکل ۴- نمایی از اندام زایی و کال زایی جدا کشت های مریستم رأسی تحت تأثیر ترکیب هورمونی BAP/2,4-D

ب- نتایج حاصل از کشت جداکشت های بدست آمده در محیط کشت MS دارای غلظت های مختلفی از هورمون 2IP/NAA :

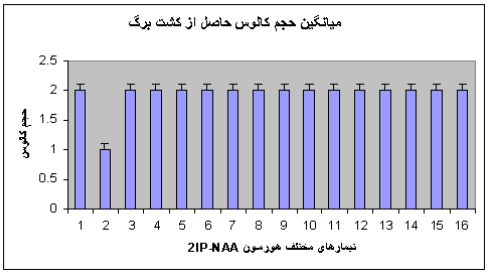
۱- برگ: قطعات برگ درتمامی غلظت های هورمونی رنگ سبز روشنی داشتند به جز درغلظت ۰,۲/ ۲ که کال های حاصل به رنگ زرد مایل به سبز بودند و همچنین رنگ کال های حاصل در غلظت ۲/۰,۲ اختلاف معناداری را با غلظت های هورمونی ۱/۰,۲ و ۱/۰,۵ و سایر غلظت های هورمونی دیگر دارد و به جز غلظت هورمونی ۰,۵/۰,۲ که کمترین میانگین حجم کال های تولید شده را داشت (نمودار۵-۲)، در تمامی غلظت ها کال ها ی تولید شده دارای رشد حجمی در تمامی جهات

www.SID.ir

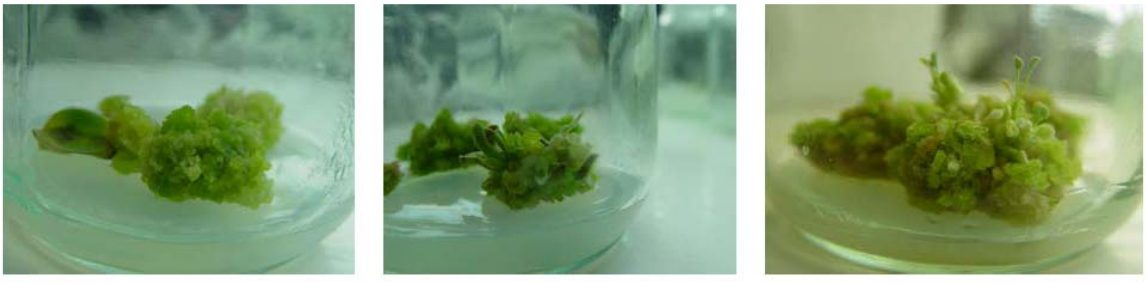
و بصورت توده ای بودند و بیشترین میانگین تعداد کال های حاصل در غلظت ۰,۵/۱ مشاهده گردید (نمودار ۵-۱) و در غلظت هورمونی ۱/۰,۵ کمترین میانگین تعداد کالوس حاصل را نشان می دهد که اختلاف معناداری را با سایر غلظت های هورمونی دیگر نشان می دهد و در طی واکشت های صورت گرفته تنها ۱۷ درصد از کال ها به سمت اندام زایی رفتند (شکل۵).



۵-۱- نمودار میانگین تعداد کالوس های حاصل از برگ در غلظت های مختلف2IP/NAA

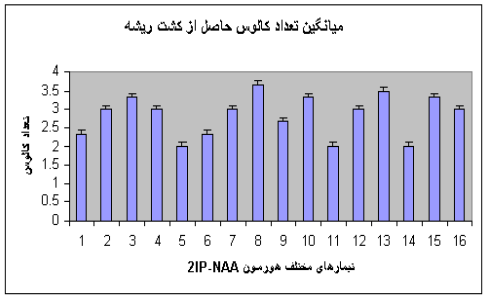


۵-۲- نمودار میانگین حجم کالوس های حاصل از برگ در غلظت های مختلف2IP/NAA

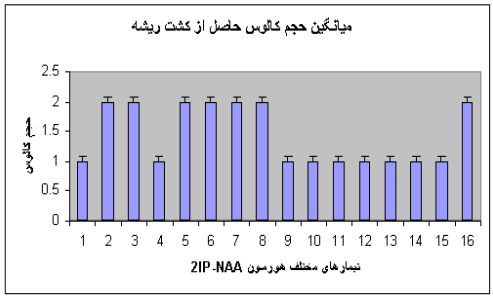


شکل ۵- نمایی از اندام زایی و کال زایی جدا کشت های برگ تحت تأثیر ترکیب هورمونی 2IP/NAA

۲- ریشه : قطعات ریشه بجز در غلظت های ۲/۰,۲ و ۰,۲/۲ و ۲/۲ درمابقی غلظت ها دارای رنگ سبز روشنی می باشند ودر این سه غلظت اختلاف معناداری دیده نمی شود و همچنین از نظر تعداد کالوس حاصل در غلظت های ۲/۰,۵ و ۱/۱ و ۰,۵/۲ اختلاف معناداری نداریم و بیشترین میانگین تعداد کالوس حاصل را نیز در غلظت هورمونی ۲/۰,۵ داریم (نمودار ۶-۱). از کل قطعات کشت شده حدود ۲ درصد به کال زایی نرفتند (نمودار۶ -۲) و از مابقی کال های حاصل در طی واکشت های صورت پذیرفته تنها ۲۰ درصد اندام زایی که از این میان غلظت های هورمونی ۲/۰,۲ و۱/۰,۵ و ۲/۰,۵ اندام زایی کامل داشتند و در غلظت هورمونی ۰,۵/۰,۲ تنها ریشه زایی مشاهده گردید (شکل ۶).



۶-۱- نمودار میانگین تعداد کالوس های حاصل از ریشه در غلظت های مختلف2IP/NAA

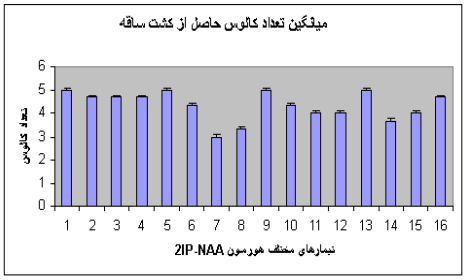


۶-۲- نمودار میانگین حجم کالوس های حاصل از ریشه در غلظت های مختلف2IP/NAA

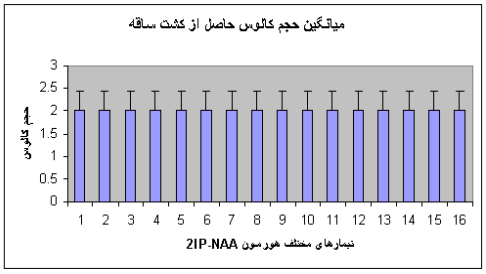
Archive
www.SID.ir

شکل ۶- نمایی از اندام زایی و کال زایی جدا کشت های ریشه تحت تأثیر ترکیب هورمونی 2IP/NAA

۳- ساقه: در غلظت ۱/۰,۵ رنگ کال های حاصل زرد مایل به سبز و در غلظت های هورمونی ۰,۲/۰,۵ و ۰,۵/۰,۵ میانگین رنگ کال های حاصل سبز تیره می باشد و مابقی کال ها نیز رنگ سبز روشن داشتند و میانگین حجم کال های تولید شده در تمام غلظت ها یکسان می باشد (نمودار۷-۲) ولی کمترین میانگین تعداد کال حاصل را در غلظت هورمونی ۱/۰,۵ مشاهده کردیم (نمودار ۷-۱) و هچنین در طی واکشت های صورت گرفته ۸۵ درصد کال ها اندام زایی کردند که از این میان غلظت هورمونی ۰,۵/۰,۲ بیشترین درصد اندام زایی کامل را داشت (شکل ۷) .



۷-۱- نمودار میانگین تعداد کالوس های حاصل از ساقه در غلظت های مختلف 2IP/NAA



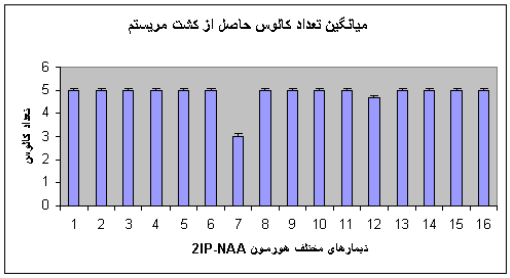
۷-۲- نمودار میانگین حجم کالوس های حاصل از ساقه در غلظت های مختلف 2IP/NAA

شکل ۷- نمایی از اندام زایی و کال زایی جدا کشت های ساقه تحت تأثیر ترکیب هورمونی 2IP/NAA

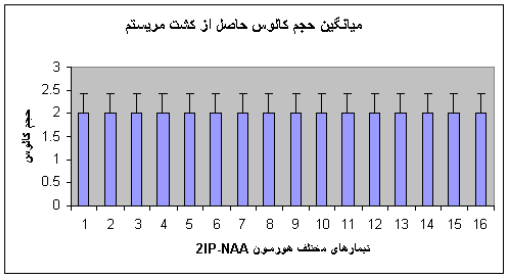
۴- مریستم رأسی: از قطعات کشت شده تنها در غلظت ۰,۵/۰,۵ رنگ حاصل از کال ها سبز تیره می باشد ودر این غلظت با سایر غلظت های هورمونی اختلاف معناداری دارد و مابقی کال ها دارای رنگ سبز روشن می باشند همچنین تنها در غلظت هورمونی ۱/۰,۵ کمترین میانگین تعداد کالوس حاصل مشاهده گردیده و در غلظت های ۰,۲/۰,۲ و ۱/۲ و۲/۲ بیشترین میانگین تعداد کال حاصل مشاهده گردیده است (نمودار ۸-۱) و میانگین حجم کال های حاصل در تمامی غلظت ها یکسان می باشد (نمودار۸-۲) و همچنین در طی واکشت های صورت گرفته تمام کال ها اندام زایی کردند (شکل ۸).

Archive of SID

www.SID.ir



۸-۱- نمودار میانگین تعداد کالوس های حاصل از مریستم در غلظت های مختلف 2IP/NAA



۸-۱- نمودار میانگین حجم کالوس های حاصل از مریستم در غلظت های مختلف 2IP/NAA

شکل ۸- نمایی از اندام زایی و کال زایی جدا کشت های مریستم رأسی تحت تأثیر ترکیب هورمونی 2IP/NAA

در محیط های کشت که فاقد هورمون های تنظیم کننده رشد بودند و قطعات مریستم رأسی، برگ، ریشه و ساقه به عنوان شاهد کشت داده شده بودند هیچ گونه کال زایی مشاهده نگردیده است .

بحث

طبق نتایج بدست آمده از بررسی کشت بافت گیاه گون گچی در محیط کشت MS با استفاده از هورمونهای اکسین و سیتوکنین با غلظت های متفاوت به منظور ایجاد شرایط بهینه برای ایجاد کالوس و اندام زایی کالوس ها با استفاده از جداکشت های برگ، ریشه، ساقه و مریستم رأسی نشان داد که جداکشت مریستم رأسی بهترین جداکشت در هر دو ترکیب هورمونی و بیشترین درصد تشکیل کال و اندام زایی را داشته است بطوری که در ترکیب هورمونی BAP/2,4-D در غلظت های ۰,۲/۰,۲ ، ۰,۵/۱، ۰,۵/۲ و۲/۰,۲ بیشترین تعداد و حجم کالوس ایجاد شده که منجر به اندام زایی کامل نیز گشته است. مطالعات و بررسی های صورت گرفته نشان می دهد که شانس بقا و موفقیت کالوس های جدا کشت مریستم نسبت به سایر اجزای دیگر بالاتر است زیرا مریستم ها معمولاً فاقد ویروس و یا دارای حداقل ویروس می باشند (۷) همچنین در بافت مریستم اکسین ها و سیتوکنین ها با غلظت بالا وجود دارند و بنابراین می توان از تنظیم کننده های رشد گیاهی با غلظت کمتری استفاده نمود که این خود دلیلی برای برتری کشت این بافت می باشد (۸) که منجر به ایجاد درصد بالاتری از کالوس ودر نتیجه اندام زایی می گردد و نتایج حاضر نیز همسو با مطالعات و بررسی های دیگر محققین در این زمینه می باشد .

با مقایسه مطالعات حاصل در این پژوهش و نیز نتایج بدست آمده ازکشت بافت دیگر گونه های جنس گون نشان می دهد (۹و۱۰) که ترکیب هورمونی اکسین و سیتوکینین در محیط کشت بر روی کال زایی و رسیدن به گیاه کامل موثر می باشد، بطوریکه حضور توأم اکسین و سیتوکینین در القاء تقسیمات سلولی و تمایزات سلولی ضروری بوده و تقسیمات سلولی موجب تشکیل کال و تمایزسلولی موجب اندام زایی می گردد .(۱۱)

کشت ریشه بدلیل حساس بودن این بافت خیلی سریع به محیط کشت واکنش داده و بنابراین از این خاصیت برای تعیین نیازهای غذایی ریشه در

Archive of SID

www.SID.ir

محیط های کشت استفاده می شود (۱۲)، همچنین در برخی موارد کشت ریشه از جهت مطالعه اثرات متقابل ریشه با سایرارگانیزم ها از جمله ریزوبیوم، قارچهای میکوریز و نماتدها صورت می پذیرد (۱۳). در این تحقیق جدا کشت های ریشه درترکیب هورمونی BAP/2,4-D فقط ایجاد کال کردند ولی اندام زایی در آنها مشاهده نگردید وبیشترین تعداد کالوس حاصل را نیز در غلظت ۰,۲/۰,۲ داشتیم و در ترکیب هورمونی 2IP/NAA از میان ۱۶ غلظت هورمونی تنها غلظت های ۲/۰,۲ و۱/۰,۵ و ۲/۰,۵ اندام زایی کامل داشتند . همچنین در این تحقیق جدا کشت های ساقه ای کال زایی و اندام زایی خوبی را نشان دادند بطوریکه در ترکیب هورمونی BAP/2,4-D بیشترین میانگین حجم و تعداد کال در غلظت ۰,۲/۰,۲ بوده است و غلظت هورمونی ۱/۰,۲ بیشترین درصد اندام زایی کامل را داشت و در ترکیب هورمونی 2IP/NAA در غلظت های مختلف اکثر کالوس های حاصل دارای تعداد و حجم یکسان و بالایی بوده و درغلظت هورمونی۰,۵/۰,۲ بیشترین درصد اندام زایی کامل را داشت که با بررسیهای صورت گرفته تا حدودی همسو با نتایج حاصل از کشت بافت گونهA.maximus می باشد (۱۴) و در بررسی صورت گرفته از جداکشت های برگ مشخص گردید که در ترکیب هورمونی BAP/2,4-D بیشترین میانگین حجم و تعداد مشاهده شده در کال ها به ترتیب در غلظت های ۲/۲و ۱/۰,۵ می باشد و بیشترین درصد اندام زایی کامل را در غلظت هورمونی ۰,۲/۲ مشاهده کردیم و در ترکیب هورمونی 2IP/NAA نیز بیشترین میانگین تعداد کال حاصل را در غلظت ۰,۵/۱ داشتیم و در تمام غلظت ها حجم یکسان و توده ای مشاهده ای گردید که نتایج اخیر با نتایج دیگر محققان بر روی گونه های

دیگری از این جنس تقریباً مطابقت دارد (۷و۱۴و۱۵) و امید است که در آینده نزدیک بتوانیم بررسی های دیگری نیز بر روی این گونه مهم و در معرض تهدید کشورمان انجام دهیم.

سپاسگزاری

از همکاران بخش تنوع زیستی گیاهی وبانک ژن سازمان حفاظت محیط زیست به خاطر همکاری صمیمانه شان در پیشبرد این تحقیق سپاسگزاری می گردد .

منابع

۱. معصومی علی اصغر.(۱۳۸۴) گون های ایران (جلد پایانی). انتشارات موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع.

۲. معصومی علی اصغر.(۱۳۷۹) گون های ایران (جلد چهارم). انتشارات موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع .

۳. عیسوند حمیدرضا، مداح عارفی حسن و توکل افشاری رضا.(۱۳۸۴) بررسی شکستن خواب و جوانه زنی بذر در گون *Siligosus*. فصلنامه پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران ۱۳(۱):۸۴-۶۷.

4. Rios JL and Waterman PG. (1997) A review of the pharmacology and Toxicology of *Astragalus*. Phytotherapy Research.11:411-418.
5. Du M, Wu XJ, Ding J, Hu ZB, White KN, Branford CJ. (2003) Astragaloside IV and polysaccharide production by hairy roots of *Astragalus membranaceus* in bioreactors.Biotechnology letters 25:1853-1856.
6. Jalili A and Jamzad Z .(1999) Red data book of Iran .Research Institue of Forests &Rangelands ,Publiscation .No.1999-215.
7. Hou S and Jia J .(2004) High frequency plant regeneration *Astragalus meliiotides* hypocotyle and stem explant via somatic embryogenesis and organogenesis. Plant Cell,Tissue and Organ Culture 79:95-100.
8. Luo J ,Zha X and Shi W .(2005) Selection of ethionine –resistant variants with increased accumulation of methionine from embroygenic protoplasts of the forage legume

Archive of SID

www.SID.ir

Astragalus adsurgens. Plant Cell,Tissue and Organ Culture 82:75-81.

9. Tian YJ and Xi T .(1989) The tissue culture and plant regeneration of *Astragalus melilotoides* (in chinese).Plant Physiol.Commun.25:44.
10. Luo J , Jing S and Pan L.(2003) Cold-enhanced embryogenesis in cell suspension cultures of *Astragalus adsurgens Pall.* Relationship with exogenous calcium during cold pretreatment .Plant Growth Regulation 40:171-177.

۱۱. حسندخت محمدرضا و ابراهیمی راهله .(۱۳۸۵) مبانی کشت بافت گیاهی .انتشارات مرز دانش.

12. Luo J and Jia J .(1998) Callus induction and plant regeneration from hypocotyls explants of the forage legume *Astragalus adsurgens*. Plant Cell Rep.17: 567-570.
13. Cho H and Widholm J.(2002) *Agrobacterium tumefaciens*- mediated transformation of the legume *Astragalus sinicus* using kanamycin resistance selection and green fluorescent protein expression. Plant Cell,Tissue and Organ Culture 69:251-258.
14. Turgut N , Ari S. (2006) Micropropagation of *Astragalus maximus Willd.* Biotechnol & Biotechnol. Eq. 20-22.
15. Hou S and Jia J .(2004) Plant regeneration from protoplasts isolated from embryogenic calli of forage legume *Astragalus melilotoides*. Plant Cell Rep.22: 741-746.

Archive of SID

www.SID.ir