مجله بیوتکنولوژی کشاورزی
علمی-پژوهشی و ISC

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

صفیه ابراهیمی[1]، فاطمه ذاکر تولایی[2]*، محمد زارع مهرجردی[2]، محمود قربانزاده نقاب[3]

[1]دانش اموخته کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، مجتمع آموزش عالی شیروان، خراسان شمالی، ایران.
[2]استادیار بیوتکنولوژی کشاورزی و عضو هیأت علمی مجتمع اموزش عالی شیروان، خراسان شمالی، ایران.
[3]دانشیار بیوتکنولوژی کشاورزی و عضو هیأت علمی مجتمع اموزش عالی شیروان، خراسان شمالی، ایران.

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

## چکیده

گون از گیاهان دارویی وصنعتی با ارزش در ایران است و گونه *Astragalus verus* از گونه‌های بومی مولد کتیرا می‌باشد. با توجه به اهمیت این گونه در تولید کتیرا و در معرض انقراض قرار داشتن آن این مطالعه با هدف دست یابی به روشی سریع برای تکثیر آن برمبنای 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 بالای‌لپه 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 بدست‌آمد. نتایج این پژوهش می‌تواند در ریزازدیادی، انتقال ژن و تولید درون‌شیشه‌ای کتیرا در آینده استفاده شود.

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

*نویسنده مسئول: فاطمه ذاکر تولایی  تلفن تماس: ۰۹۱۵۵۰۸۷۶۹۱  Email:f.zaker.t@um.ac.ir

**مقدمه**

جنس گون Astragalua 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 متناهبی 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 امولیسیون 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) واستفاده 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 جوانه-زنی 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 روش-های فیزیولوژیکی موثرتر بودند.

در مطالعه‌ای جهت شکست خواب بذر و جوانه‌زنی گون سفید ( Astragalus gossypinus) از تیمارهای نیترات 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*


Journal of Agricultural Biotechnology; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

*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 Moghaddam *et al*., 2014). در مطالعه Fateh *et al*. (2005) 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 1/2 MS 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 میلی‌گرم درلیتر زاتین بود.

در مطالعه القای کالوس و باززایی گیاه *Astragalus nezaketae* گون بومی ترکیه، بیشترین تعداد شاخه (۶ شاخه بر ریزنمونه) از کالوس برگ در محیط کشت MS با ۰/۵ میلی-گرم در لیترNAA و چهار میلی‌گرم BA بدست آمد (Erisen *et al*., 2010). در گزارش دیگری در گونه *Astragalus cariensis*، ریزنمونه‌ها روی محیط کشت MS غنی‌شده باTDZ 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 میلی‌گرم 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 مریستم 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 می‌باشد، شکستن

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 ریزنمونه‌های 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 کتیرا در آینده استفاده شود.

**مواد و روش ها**

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 کتیرا است. گیاهان گون از گردنه اسدلی در خراسان شمالی جمع آوری شدند. بذرهای 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 خراش‌دادن در محیط کشت MS دارای سه درصد ساکارز و ۰/۸ درصد آگار با pH=۵/۷ کشت شدند. بذرهای کشت‌شده به شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی(۲۵۰۰-۳۰۰۰ لوکس) و دمای ۱± ۲۵ 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 کاملا تصادفی بر پایه فاکتوریل(۳×۴)با ۱۰ تکرار انجام شد.

ریزنمونه‌های 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 کاملا تصادفی به صورت فاکتوریل(۲×۳) غلظت هورمون سیتوکنین (سه سطح) و غلظت اکسین (دو سطح) با پنج تکرار با دو ریزنمونه در هر ویال انجام شد.

در این آزمایش شاخه‌های بدست‌آمده ازمرحله قبل در محیط‌کشت جامد ۱/۲MS دارای IAA (۰/۵، ۱ و۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) و IBA (۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر)، کشت شدند.


Journal of Agricultural Biotechnology; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

پس از گذشت ۳۰ روز ریشه‌زایی ارزیابی شد. این آزمایش در قالب طرح پایه کاملا تصادفی با شش تیمار و پنج تکرار (هر تکرارحاوی دو ریزنمونه) انجام شد. در همه آزمایش‌ها آماده-سازی داده‌ها در برنامه Excel، تجزیه و تحلیل داده‌ها با نرم‌افزار JMP®-8، مقایسه میانگین تیمارها با آزمون LSD، رسم نمودارها با استفاده از برنامه Excel وتبدیل داده‌های درصدی با استفاده از فرمول (۱۸۰×[ArcSin/۳/۱۴]) انجام شد.

## نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که تاثیر تیمار خراش‌دهی سطح بذر بر درصد جوانه‌زنی در سطح یک درصد اختلاف معنی دار داشت(جدول ۱).

**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.**

| منبع تغییرات<br>Source of variation | درجه آزادی<br>df | میانگین مربعات(MS)<br>جوانه‌زنی بذر<br>Seed germination |
|---|---|---|
| تیمارtreatment | 1 | 114739.2** |
| خطاerror | 58 | 31 |

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

هیچ گونه جوانه‌زنی در بذرهای بدون خراش دیده نشد. درمقابل، در بذرهای خراش داده شده جوانه زنی به مقدار ۹۸ درصد مشاهده شد. در پژوهش Arbabian*et al.* (2009) نیز روی گونه (*Astragalus fridae*)، خراش‌دهی تاثیر زیادی روی شکستن خواب بذر داشت و بیشترین درصد جوانه‌زنی بذرها در تیمار خراش‌دهی با سمباده مشاهده شد. در مطالعه Khayyat Moghaddam and Sadrabadi (2015) برای شکستن خواب گونه *Astragalus parrowianus* بیشترین درصد جوانه‌زنی در تیمار خراش‌دهی به همراه سرمادهی بدست آمد. سرمادهی به تنهایی و کاربرد اسیدجیبرلیک در شکستن خواب بذر بی‌تاثیر بود( Khayyat Moghaddam and Sadrabadi, 2015). این در حالی است که در گونه *Astragalus gossypinus* استفاده از اسیدسولفوریک نسبت به خراش‌دهی در شکستن خواب بذر موثرتر بود (Tavili *et al*. 2012). در گونه *Astragalus cicer* L. هم خراش‌دهی تاثیر چندانی روی شکستن خواب بذر نداشت، بلکه سرمادهی و تیمار اسیدجیبرلیک موثرتر بود ( Khayyat Moghaddam *et al*., 2014). در مطالعه

Erison(2010) روی گونه *Astragalus nezaketaein* خواب بذرها فقط با خراش‌دهی شکسته شد. به نظر می‌رسد مکانیسم خواب بذر در گونه‌های مختلف گون متفاوت می‌باشد. در گونه*Astragalus verus* خراش‌دهی تاثیر زیادی در شکستن خواب بذر داشت. نتایج تجزیه واریانس داده‌های حاصل از تاثیر تیمارهای مورد مطالعه روی درصد جوانه‌زنی بذور خراش داده شده در سطوح مختلف محیط کشت و غلظت متفاوت ساکارز معنی‌دار 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 جوانه‌زنی 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 معنی‌داری بین سطوح مختلف محیط کشت و غلظت ساکارز بر وزن تر گیاهچه وجود 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 معنی‌دار 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 سانتی‌متر 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 MSکامل و ۱/۲MS با میزان ۳۰ گرم در لیتر ساکارز به ترتیب با میانگین ۲۵ و ۲۶/۱۶ سانتی‌متر 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 میلی‌گرم در لیتر ساکارز با میانگین ۰/۰۹۹ میلی‌گرم بدست آمد.

**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**.

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

* 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.



Journal of Agricultural Biotechnology; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

**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.**

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

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.

نتایج این پژوهش نشان داد که جوانه‌زنی بذرهای خراش داده شده در غلظت‌های مختلف محیط کشت MS(MS، ۱/۲MS، ۱/۴MS) و ساکارز تقریبا بطور مشابه اتفاق افتاد و اختلاف معنی‌داری بین انها مشاهده نشد. فقط اندکی افزایش جوانه‌زنی در غلظت ۱۰ گرم بر لیتر ساکارز نسبت به غلظت‌های دیگر ان 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.

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 معنی‌دار بود. اثر ساده غلظت IAA برطول شاخه در سطح پنج درصد معنی‌دار بود، اما بر تعداد شاخه معنی‌دار نبود. همچنین اثر متقابل BAP و IAA بر طول و تعداد شاخه معنی‌دار 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 معنی‌دار نبود. این در



Journal of Agricultural Biotechnology; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

حالی است که اثر ساده IAA بر وزن تر شاخه‌ها در سطح پنج درصد معنی‌دار بود (جدول۴). مقایسه میانگین تاثیر سطوح مختلف هورمونی بر درصد باززایی نشان داد که با افزایش BAP تعداد شاخه بیشتری حاصل شد.

**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.**

| منبع تغییرات Source of variation | درجه آزادی df | میانگین مربعات(MS) | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | تعداد شاخه Shoot number | طول شاخه Shoot length | وزن تر Fresh weight | وزن خشک Dry weight |
| BAP | 2 | 17.062** | 2.734** | 0.005 ns | 0.00005 ns |
| IAA | 1 | 0.0 ns | 5.88* | 0.284* | 0.000002 ns |
| IAA× BAP | 2 | ns2.437 | 1.285 ns | 0.0025 ns | 0.00002 ns |
| خطا error | 42 | 2.437 | 0.569 | 0.002 | 0.00006 |

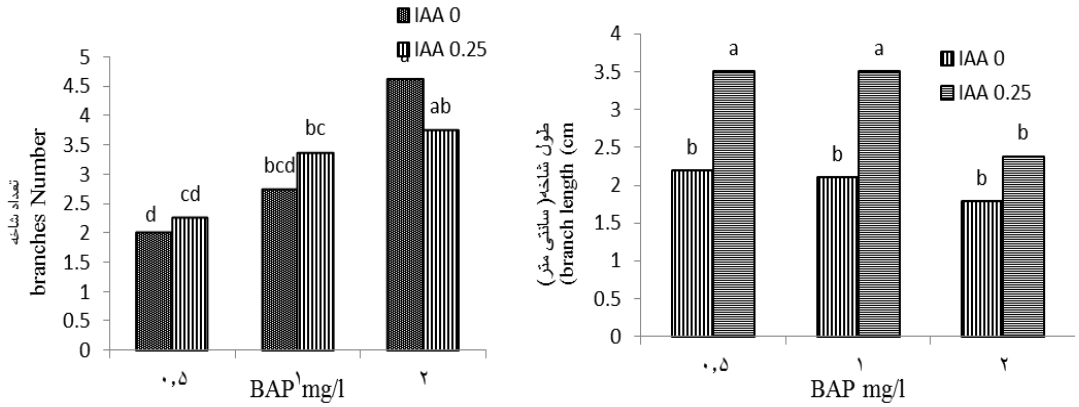
* و ** به ترتیب معنی داری در سطح احتمال ۰/۵ و ۱ درصد و ns بیانگر عدم اختلاف معنی دار است.

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

همچنین بیشترین درصد شاخه‌های تولیدی در تیمارهای غلظت بالای BAP بدون IAA مشاهده شد. به‌طوری که بیشترین درصد شاخه‌زایی در محیط کشت MS حاوی ۲ میلی-گرم در لیتر BAPبدون ترکیب با IAA با میانگین ۴/۶ عدد بدست آمد(شکل ۲).طبق مطالعه‌ای که توسط Moshtaghi *et al.*(2006) انجام شد، BAP می‌تواند سیتوکنین مناسبی برای تحریک شاخه‌زایی چندگانه در ژنوتیپ‌های نخود باشد. عموما استفاده از غلظت بالای این هورمون نظیر دو تا سه میلی‌گرم در لیتر سبب تولید کافی شاخه 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 میلی‌گرم در لیتر BAP در ترکیب با ۰/۲۵ میلی‌گرم 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

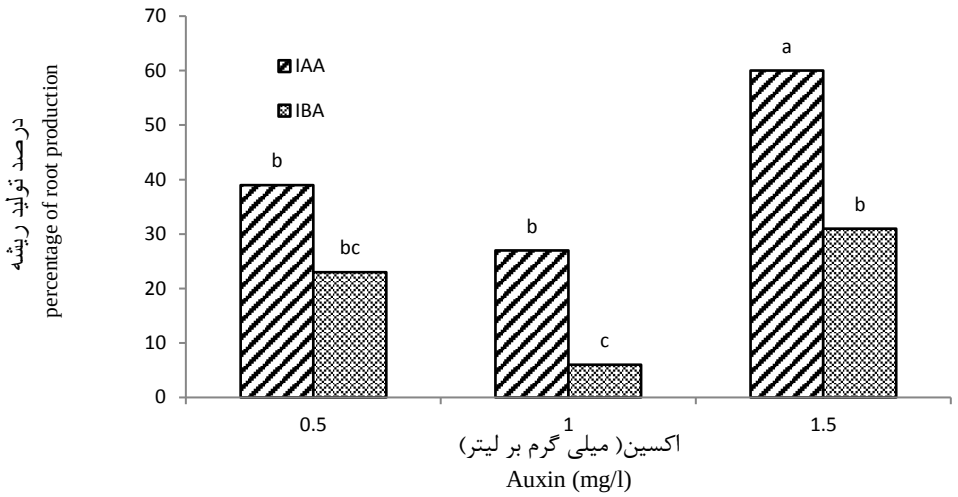
شد. بیشترین وزن تر در محیط کشت با ۲ میلی-گرم در لیتر BAP در ترکیب با ۰/۲۵ گرم در لیتر IAA با میانگین ۰/۲۰۶ گرم بدست آمد. پژوهشگران در مطالعات باززایی غیرمستقیم گونه‌های دیگر گون(*Astragalus cariensis* و *Astragalus schizopterus*) استفاده از TDZ و NAA را در تولید شاخه‌های چندگانه موثر دانسته‌اند ( Erisen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




**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 معنی دار ندارد

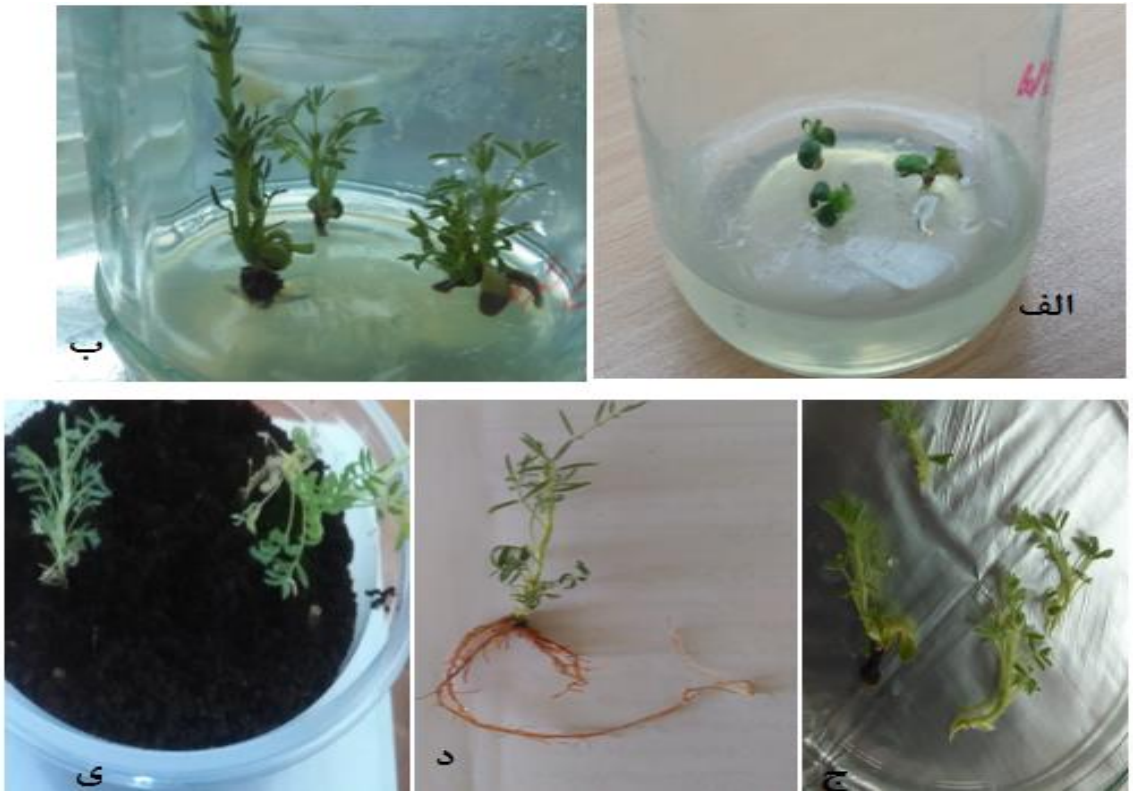
**Fig. 1** Effect of BAP and IAA on **A**: branch number and **B**: branch length. Similar letters based on LSD test at 5% .probability level have no significant difference

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 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).




**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 گیاهچه‌هادر 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.**

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 آن ها ۱۰۰ درصد بود. ریشه‌زایی شاخه‌ها در ریزازدیادی این گونه اهمیت دارد. همچنین کشت ریشه‌های مویین نیز می‌تواند در تولید متابولیت‌های ثانویه استفاده شود. گونه *Astragalus verus* از مهمترین گونه های 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.

## 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

Hasancbi 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 AgriculturalBiotechnology 6: 49-62.

Mozaffarian V, (1996). A Dictionary of Iranian Plant Names Latin, English, and Persian. Farhange Moaser Publisher 745p.




Journal of Agricultural Biotechnology; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

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.

Shamspur 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, Moaamari 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

**EbrahimiS.[1], ZakerTavallaieF.[2*], Zare MehrjerdiM.[2], Ghorbanzadeh Neghab M.[3]**

[1]MSc, 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 tragacant producer. Due to the importance of this species in the production of tragacant, 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 tragacant 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