مقاله پژوهشی

نشریه علمی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/ijrfpbgr.2019.122389.1309

جلد ۲۸، شماره ۱، صفحه ۱۱۴-۱۰۲ (۱۳۹۹) شناسه دیجیتال (DOR): 98.1000/1735-0891.1398.28.104.55.1.1576.41

بررسی تأثیر نوع ریزنمونه و ترکیب هورمونی بر کالوس‌زایی گون کتیرا (*Astragalus verus*)

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

۱*- نویسنده مسئول مکاتبات، استادیار، گروه تولیدات گیاهی، مجتمع آموزش عالی شیروان، خراسان شمالی

پست الکترونیک: zakertavallaie@cheshirvan.ac.ir

۲- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه تولیدات گیاهی، مجتمع آموزش عالی شیروان، خراسان شمالی

۳- استادیار، گروه تولیدات گیاهی، مجتمع آموزش عالی شیروان، خراسان شمالی

۴- دانشیار، گروه تولیدات گیاهی، مجتمع آموزش عالی شیروان، خراسان شمالی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۴/۱۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۵/۱۵

چکیده

جنس گون متعلق به خانواده لگومینوز یکی از بزرگترین جنس‌ها در میان گیاهان گلدار بوده و گونه *Astragalus verus* یکی از گونه‌های مناسب برای تولید کتیرا است. این پژوهش با هدف بررسی اثر ترکیبات هورمونی مختلف بر کالوس‌زایی ریزنمونه‌های مختلف *Astragalus verus* انجام شد. کالوس‌زایی از ریزنمونه‌های ریشه، هیپوکتیل و کوتیلدون در محیط کشت پایه MS دارای غلظت‌های مختلف از BAP، 2,4-D و NAA بررسی شد. بیشترین درصد کالوس‌زایی در تیمار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D با میانگین ۵۶ درصد و کمترین درصد کالوس‌زایی در تیمار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA با میانگین ۴ درصد حاصل شد. بیشترین درصد کالوس‌زایی از ریزنمونه ریشه با میانگین ۶۷ درصد بدست آمد. بیشترین و کمترین ابعاد کالوس به‌ترتیب در تیمار ۹ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۹ میلی-گرم در لیتر 2,4-D با میانگین‌های ۶۲ و ۰/۱۰ میلی‌متر مکعب بدست آمد. بیشترین وزن تر و خشک کالوس‌ها به‌ترتیب با میانگین ۰/۱۴۸ و ۰/۰۲۲ گرم از ریزنمونه ریشه در محیط کشت 2,4-D بدست آمد. تفکیک‌پذیری کالوس‌ها در محیط کشت حاوی2,4-D بهتر از NAA بود. نتایج این پژوهش می‌تواند در مطالعات باززایی غیرمستقیم، انتقال ژن و کشت سوسپانسیون سلولی به‌منظور تولید متابولیت‌های ثانویه از جمله کتیرا در محیط درون شیشه‌ای کاربرد داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: *Astragalus verus*، 2,4-D، NAA، ریزنمونه، کالوس‌زایی.

مقدمه

جنس گون Astragalus متعلق به قبیله Galegeae از تیره نخود است و گیاهانی یکساله یا چند ساله و دارای فرم‌های رویشی متنوع از علفی تا درختچه‌ای را شامل می‌شود. در میان گیاهان گلدار جهان، گون یکی از بزرگترین جنس‌ها بوده و شامل بیش از ۳۳۰۰ گونه با پراکنش وسیع در سراسر مناطق معتدله جهان می‌باشد. کشور ایران خاستگاه اصلی و یکی از مراکز تنوع گونه‌های گون در دنیای قدیم بوده که براساس آخرین اطلاعات ۸۰۴ گونه در ایران وجود دارد که از آن میان ۵۲۷ گونه بومی و ۲۷۷ گونه مشترک با کشور همسایه است که از این تعداد ۱۵۶ گونه مولد کتیراست (Maassoumi, 2000 و Maassoumi, 2005). حدود ۱۷ میلیون هکتار از اراضی ایران که تقریبا ۱۹ درصد از سطح مراتع را شامل می‌شود، زیر پوشش گونه‌های مختلف گون قرار دارد (Vahhabi, 2005). القای کالوس

و باززایی گیاه*Astragalus nezaketaein* بومی ترکیه توسط Erisen و همکاران (۲۰۱۰) انجام شد. بیشترین تعداد شاخه از کالوس برگ در محیط کشت MS با ($0.5mgl^{-1}NAA + 4\ mgl^{-1}BA$) بدست آمد. در تحقیق دیگری از همین محقق اثرهای TDZ روی شاخه‌زایی در شرایط درون‌شیشه‌ای بر روی گونه *Astragalus cariensis* بررسی شد. کالوس‌زایی ریزنمونه روی محیط‌کشت MS با ترکیب هورمونی (0.2, 0.4 and 0.6 $mgl^{-1}TDZ$ + 0.2 and 1 $mgl^{-1}NAA$) ۱۰۰ درصد بود و بالاترین تعداد شاخه در محیط‌کشت MS با (0.4 mgl^{-1} TDZ + 0.2 mgl^{-1} NAA) بدست آمد (Erisen *et al*., 2011). گونه*Astragalus adsurgens* یک گونه بومی در چین و هندوستان است که به‌عنوان علوفه مورد استفاده دام قرار می‌گیرد. در مطالعه باززایی این گیاه توسط Ping Luo و همکاران (۱۹۹۹) حداکثر کالوس‌زایی در محیط کشت MS دارای 2,4-D و BA در ریزنمونه لپه بدست آمد. پس از انتقال کالوس‌های جنین‌زا به محیط کشت MS دارای BA و NAA، ۸۰ درصد جنین‌های سوماتیکی به نهال تبدیل شدند. Ebrahimi و همکاران (۲۰۱۸) باززایی مستقیم گیاه *Astragalus verus* را با استفاده از ریزنمونه‌های محور زیرلپه و محور بالای لپه انجام دادند. در این مطالعه بیشترین درصد شاخه‌زایی را در محیط MS دارای $2mg^{-1}$ BAP و بیشترین درصد ریشه‌زایی را در محیط کشت 1/2MS دارای $1.5mg^{-1}$ IAA بدست آوردند. Amiri (2012) از غلظت‌های مختلف BA و 2,4-D برای کالوس‌زایی *Astragalus verus* استفاده و مشاهده کرد که تیمار دارای BA اثری مثبت روی کالوس‌زایی دارد.

این گونه کتیرا *(Astragalus verus)* بومی ایران بوده و از لحاظ تولید کتیرا اهمیت ویژه‌ای دارد. بهره‌برداری از آن با روش‌های اشتباه، این گیاه را در معرض خطر انقراض قرار داده است. در این مطالعه اثر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر کالوس‌زایی این گیاه بررسی شده است. نتایج این پژوهش می‌تواند در باززایی غیرمستقیم، انتقال ژن و به‌ویژه تولید سوسپانسیون سلولی گیاه برای تولید کتیرا در محیط درون شیشه‌ای مورد استفاده قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

گیاه مورد مطالعه در این پژوهش *Astragalus verus* می‌باشد که یک گونه تولید کننده کتیرا است. این گونه از گردنه اسدلی در خراسان شمالی جمع‌آوری شده و توسط کارشناسان پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد شناسایی شد. بذرهای سالم پس از شستشو با آب، برای ضدعفونی در الکل ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه گذاشته شد و بعد از ۳ مرتبه آبکشی با آب مقطر استریل، در هیپوکلریت سدیم یک درصد به مدت ۲۰ دقیقه قرار داده شد و دوباره ۳ بار آبکشی شدند. بذرها پس از خراش دادن سطح آنها با تیغ اسکالپل (از بین بردن خواب بذر) روی محیط کشت MS با سه درصد ساکارز و ۰/۸ درصد آگار با pH =۵/۷ کشت شده و ویال‌های حاوی آنها به شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی (۳۰۰۰-۲۵۰۰ لوکس) و دمای ۱± ۲۵ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند.

پس از جوانه زدن بذرها و تولید گیاهچه استریل، ریزنمونه‌های کوتیلدون، هیپوکوتیل و ریشه تهیه شده و به محیط کشت MS دارای ترکیبات هورمونی مختلف مطابق (جدول۱) منتقل شدند و در اتاق رشد در شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی (۳۰۰۰-۲۵۰۰ لوکس) در دمای ۱±۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردیدند. پس از یک ماه فاکتورهای درصد کالوس‌زایی، تفکیک‌پذیری، ابعاد کالوس، وزن‌تر و وزن خشک کالوس‌ها ارزیابی شد. آزمایش بصورت فاکتوریل با ۲۰ تیمار (جدول۱) با سه ریزنمونه کوتیلدون، هیپوکوتیل و ریشه در قالب طرح کاملا تصادفی با پنج تکرار اجرا شد.

تجزیه‌وتحلیل‌های آماری

در تحقیق حاضر اثر ۲۰ ترکیب هورمونی بر صفات مختلف سه نوع ریزنمونه بررسی گردید. هورمونBAP (در ۲ سطح) و 2,4-D (در ۵ سطح)، NAA (در ۵ سطح) و نوع

ریزنمونه (در ۳ سطح کوتیلدون، هیپوکوتیل و ریشه) با پنج تکرار انجام شد. به همین دلیل از ۱۲ تجزیه واریانس فاکتوریل جداگانه به‌شرح زیر استفاده شد.

- تجزیه واریانس اثر غلظت BAP در ۲ سطح، غلظت اکسین در ۱۰ سطح و ریزنمونه در ۳ سطح بر درصد کالوس‌زایی
- تجزیه واریانس اثر غلظت BAP در ۲ سطح، غلظت 2,4-D در ۵ سطح و ریزنمونه در ۳ سطح بر درصد کالوس‌زایی
- تجزیه واریانس اثر غلظت BAP در ۲ سطح، غلظت NAA در ۵ سطح و ریزنمونه ۳ سطح بر درصد کالوس‌زایی
- تجزیه واریانس اثر غلظت BAP در ۲ سطح و غلظت2,4-D در ۵ سطح و ریزنمونه در ۳ سطح بر درصد کالوس‌زایی
- تجزیه واریانس اثر غلظت BAP در ۲ سطح، غلظت NAA در ۵ سطح و ریزنمونه در ۳ سطح بر ابعاد کالوس
- تجزیه واریانس اثر غلظت BAP در ۲ سطح، غلظت اکسین در ۱۰ سطح و ریزنمونه در ۳ سطح بر ابعاد کالوس
- تجزیه واریانس اثر غلظت BAP در ۲ سطح و غلظت NAA در ۵ سطح بر تفکیک‌پذیری کالوس
- تجزیه واریانس اثر غلظت BAP در ۲ سطح و غلظت 2,4-D در ۵ سطح بر تفکیک‌پذیری کالوس
- تجزیه واریانس اثر غلظت BAP در ۲ سطح و غلظت اکسین در ۱۰ سطح بر تفکیک‌پذیری کالوس
- تجزیه واریانس اثر غلظت BAP در ۲ سطح و غلظت 2,4-D در ۵ سطح بر وزن تر و خشک کالوس
- تجزیه واریانس اثر غلظت BAP در ۲ سطح و غلظت NAA در ۵ سطح بر وزن تر و خشک کالوس
- تجزیه واریانس اثر غلظت BAP در ۲ سطح و غلظت اکسین در ۱۰ سطح بر وزن تر و خشک کالوس

داده‌ها در برنامه Excel ثبت و تجزیه وتحلیل داده‌ها در نرم‌افزار JMP-8 انجام شد. مقایسه میانگین تیمارها با آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد انجام گردید و نمودارها با استفاده از برنامه Excel رسم شده و تبدیل داده‌های درصدی با استفاده از فرمول (۱۸۰×[۳/۱۴/ArcSin]) انجام شد.

جدول ۱- ترکیب هورمونی به‌کاررفته برای کالوس‌زایی (میلی‌گرم بر لیتر)

تیمار	BAP	NAA	2,4-D	تیمار	BAP	NAA	2,4-D	تیمار	BAP	NAA	2,4-D
T۱	۰	۰/۵	۰	T۸	۰/۲۵	۳	۰	T۱۵	۰	۰	۹
T۲	۰	۱/۵	۰	T۹	۰/۲۵	۶	۰	T۱۶	۰/۲۵	۰	۰/۵
T۳	۰	۳	۰	T۱۰	۰/۲۵	۹	۰	T۱۷	۰/۲۵	۰	۱/۵
T۴	۰	۶	۰	T۱۱	۰	۰	۰/۵	T۱۸	۰/۲۵	۰	۳
T۵	۰	۹	۰	T۱۲	۰	۰	۱/۵	T۱۹	۰/۲۵	۰	۶
T۶	۰/۲۵	۰/۵	۰	T۱۳	۰	۰	۳	T۲۰	۰/۲۵	۰	۹
T۷	۰/۲۵	۱/۵	۰	T۱۴	۰	۰	۶				

نتایج

با توجه به تعداد زیاد جدول‌های تجزیه واریانس و متفاوت بودن منابع تغییرات و درجات آزادی، به همین دلیل نتایج جدول‌های تجزیه واریانس نشان داده نشده است، به‌نحوی‌که فقط مقایسه میانگین اثرهای اصلی و متقابل تیمارها در صورت معنی‌دار بودن در نمودارهای مختلف نشان داده شده است.

مقایسه اثر غلظت‌های اکسین (NAA و 2,4-D) بر درصد کالوس‌زایی در ریزنمونه‌های مختلف

اثر غلظت هر دو نوع اکسین بر درصد کالوس‌زایی در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. به‌طوری‌که با افزایش غلظت 2,4-D درصد کالوس‌زایی کاهش یافت. بیشترین و کمترین درصد کالوس در تیمارهای 0.5 و9 mgl^{-1} 2,4-D با میانگین ۵۶ و ۴۰ درصد حاصل شد (شکل ۱–الف).

در مقابل افزایش غلظت NAA سبب افزایش درصد کالوس‌زایی شد. بیشترین درصد کالوس‌زایی درتیمار mgl^{-1} NAA 9 با میانگین ۳۵ درصد بدست آمد.

در مقایسه بین ریزنمونه‌ها، کمترین درصد کالوس‌زایی در تیمار $0.5\ mgl^{-1}$NAA با میانگین ۴ درصد در کوتیلدون حاصل شد. بیشترین درصد کالوس‌زایی از ریزنمونه ریشه در محیط کشت دارای 2,4-D با میانگین ۶۸ درصد بدست آمد (شکل ۱–ب).

مقایسه اثر غلظت‌های اکسین (NAA و 2,4-D) با و بدون ترکیب با BAP بر درصد کالوس‌زایی ریزنمونه‌ها

اثر ساده BAP و 2,4-D در سطح احتمال پنج درصد و اثر ساده ریزنمونه در سطح احتمال یک درصد و اثر متقابل BAP و 2,4-D در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بودند. بیشترین درصد کالوس از ریزنمونه ریشه در تیمار $1.5\ mg^{-1}$ 2,4-D بدون ترکیب با BAP با میانگین ۹۸ درصد بدست آمد. به همین ترتیب محیط کشت 2,4-D بدون ترکیب با BAP اثر بهتری در تولید کالوس از ریزنمونه هیپوکوتیل داشته است. به‌طوری‌که در تیمار $3\ mgl^{-1}$2,4-D بدون ترکیب با BAP با میانگین ۸۶ درصد بیشترین درصد کالوس بدست آمد. در مقابل، تیمار 2,4-D در ترکیب با BAP اثر بهتری در تولید کالوس از ریزنمونه کوتیلدون داشت و افزایش غلظت 2,4-D باعث کاهش درصد کالوس‌زایی از ریزنمونه کوتیلدون گردید. بیشترین درصد کالوس‌زایی از کوتیلدون در تیمار $0.5\ mgl^{-1}$ 2,4-D در ترکیب با $0.25\ mgl^{-1}$BAP با میانگین ۴۴ درصد بدست آمد. در غلظت‌های دیگر 2,4-D بدون ترکیب با BAP هیچ کالوسی از ریزنمونه کوتیلدون تولید نشد (شکل ۲).

در تیمار NAA در ترکیب با BAP، اثر ساده غلظت NAA و اثر متقابل غلظت NAA در نوع ریزنمونه در سطح احتمال پنج درصد و اثر ساده نوع ریزنمونه بر درصد کالوس‌زایی در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بودند. با افزایش غلظت NAA مقدار کالوس بیشتری از ریزنمونه ریشه بدست آمد (شکل۲– ج). به‌طوری‌که در محیط کشت$0.25mgl^{-1}$BAP + $9mgl^{-1}$NAA با میانگین ۸۰ درصد بیشترین مقدار کالوس حاصل شد. کمترین مقدار کالوس در تیمار $0.5\ mgl^{-1}$NAA بدون BAP بدست آمد. در تیمار ۳ و ۶ میلی‌گرم در لیتر NAA بدون BAP با میانگین ۴۶ درصد بیشترین مقدار کالوس از ریزنمونه هیپوکوتیل بدست آمد (شکل ۲– ب). در ریزنمونه‌های کوتیلدون در هیچ‌یک از تیمارهای NAA و همچنین در تیمار شاهد بدون هورمون هیچ‌گونه کالوسی مشاهده نشد (شکل ۲–الف).

مقایسه اثر غلظت‌های اکسین (NAA و 2,4-D) با و بدون ترکیب با BAP بر ابعاد کالوس ریزنمونه‌ها

در تیمار 2,4-D، اثر ساده غلظت BAP و اثر ساده ریزنمونه و اثر متقابل BAP و ریزنمونه در سطح احتمال یک درصد و اثر ساده 2,4-D و اثر متقابل BAP و 2,4-D و اثر متقابل ریزنمونه و 2,4-D در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار بودند. در تیمار 2,4-D بدون BAP کالوس بیشتری حاصل شد. بیشترین ابعاد کالوس از ریزنمونه ریشه در تیمار $3\ mgl^{-1}$2,4-D بدون ترکیب با BAP با میانگین ۴۸/۴ میلی‌مترمربع بدست آمد. افزایش غلظت 2,4-D تا

سطح سه میلی‌گرم در لیتر باعث افزایش ابعاد کالوس تولید شده از هیپوکوتیل شد. غلظت‌های بالاتر 2,4-D باعث کاهش ابعاد کالوس شد. در تیمارهای ۱/۵ و ۳ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D بدون ترکیب با BAP به‌ترتیب با میانگین ۱۳/۷۲ و ۱۷/۲۱ میلی‌مترمربع بیشترین ابعاد کالوس از ریزنمونه هیپوکوتیل به‌دست‌آمد. کمترین ابعاد کالوس از تیمار mgl^{-1}2,4-D 9 در ترکیب با BAP با میانگین ۰/۲۹ میلی‌مترمربع حاصل شد. افزایش 2,4-D بدون BAP باعث کاهش ابعاد کالوس از ریزنمونه کوتیلدون شد. در تیمار 0.5 mgl^{-1}2,4-D بدون ترکیب با BAP با میانگین ۱۰/۳ میلی-مترمربع بیشترین ابعاد کالوس از ریزنمونه کوتیلدون حاصل شد. در تیمار 2,4-D با غلظت ۰/۵، ۳ و ۶ میلی‌گرم در لیتر در ترکیب با ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر BAP هیچ کالوسی از ریزنمونه کوتیلدون به‌دست نیامد (شکل۳).

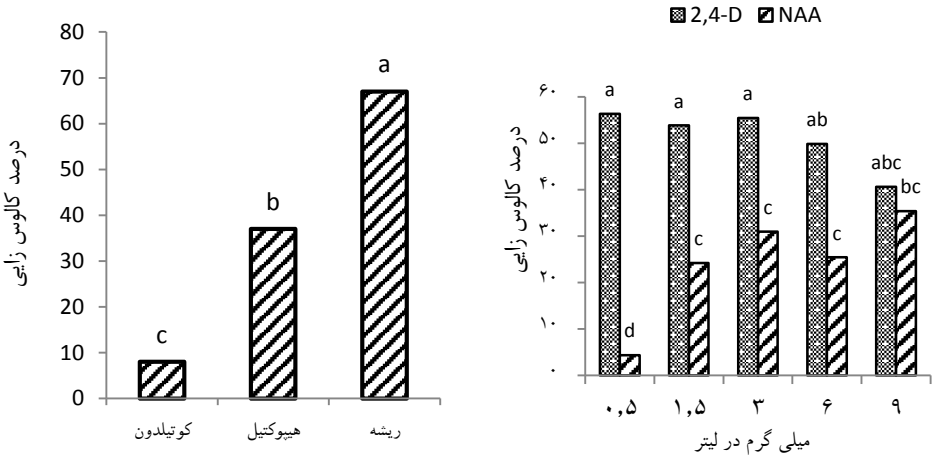
در تیمار NAA، اثر ساده غلظت BAP در سطح احتمال پنج درصد و اثر ساده غلظت NAA و ریزنمونه در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. مقایسه میانگین‌ها نشان داد که در تیمار NAA بدون ترکیب با BAP با افزایش غلظت NAA ابعاد کالوس حاصل از ریزنمونه ریشه افزایش پیدا کرد. این در حالی است که در تیمار 9 mg/l NAA بدون ترکیب با BAP با میانگین ۹۰ میلی‌متر مربع بیشترین ابعاد کالوس از ریزنمونه ریشه بدست آمد (شکل۳).

مقایسه اثر غلظت‌های اکسین (NAA و 2,4-D) بر ابعاد کالوس در ریزنمونه‌ها

اثر ساده غلظت BAP، اکسین و اثر ساده ریزنمونه و همه اثرهای متقابل در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بودند. ابعاد کالوس حاصل از ریزنمونه ریشه با افزایش غلظت NAA افزایش یافت و بیشترین ابعاد کالوس از ریزنمونه ریشه در تیمار mgl^{-1}NAA 9 با میانگین ۶۲ میلی‌مترمربع بدست آمد. در مقابل، ابعاد کالوس حاصل از ریزنمونه ریشه با افزایش غلظت2,4-D کاهش یافت. بیشترین ابعاد کالوس در تیمار mgl^{-} 0.5 ^{1}2,4-D با میانگین ۳۷/۳ میلی‌متر مربع حاصل شد. با افزایش غلظت NAA ابعاد کالوس در هیپوکوتیل افزایش یافت. بیشترین ابعاد کالوس در تیمار mgl^{-1}NAA 9 با میانگین ۱۲/۷ میلی‌مترمربع بدست آمد. اما افزایش غلظت 2,4-D تا سطح ۳ میلی‌گرم در لیتر باعث افزایش ابعاد کالوس ریزنمونه هیپوکوتیل شد. در غلظت‌های بالاتر 2,4-D ابعاد کالوس کاهش یافت و بیشترین ابعاد کالوس در تیمار mgl^{-1}2,4-D 3 با میانگین ۹/۸۶ میلی-مترمربع بدست‌آمد (شکل ۴). افزایش غلظت 2,4-D باعث کاهش ابعاد کالوس ریزنمونه کوتیلدون شد. در تیمار mgl^{-1}2,4-D 0.5 با میانگین ۵/۱۵ میلی‌مترمربع بیشترین ابعاد کالوس حاصل شد. کمترین ابعاد کالوس در تیمار mgl^{-1}2,4-D 9 با میانگین ۰/۱ میلی‌متر مکعب به‌دست آمد. ریزنمونه‌های کوتیلدون در محیط کشت NAA نکروزه شدند و از بین رفتند (شکل ۴).

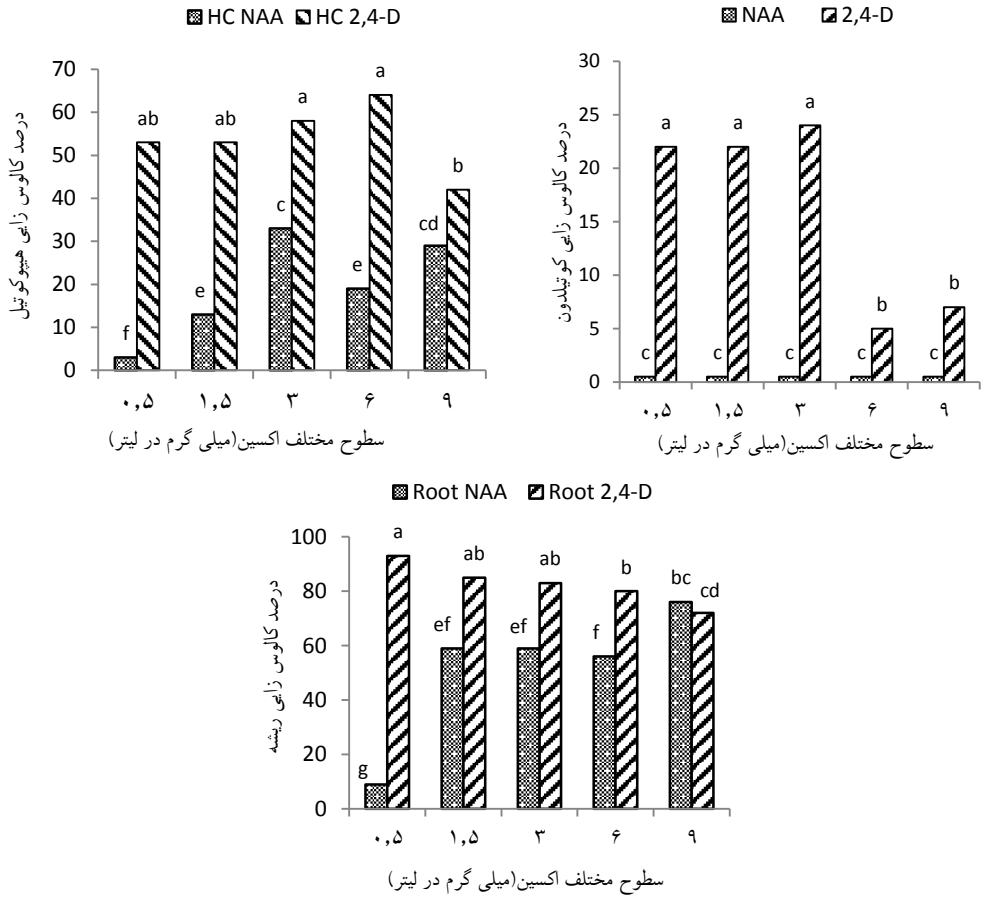
مقایسه اثر غلظت‌های اکسین (NAA و 2,4-D) در ترکیب با و بدون BAP بر تفکیک‌پذیری کالوس

اثر ساده BAP و NAA و اثر متقابل NAA و BAP در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بودند. تفکیک‌پذیری در تیمار NAA بدون BAP بهتر انجام شد. به‌طوری‌که با افزایش NAA تا سطح سه میلی‌گرم در لیتر تفکیک‌پذیری افزایش یافت ولی در غلظت‌های بالاتر کاهش یافت. در تیمار $^{-}$3mgl ^{1}NAA با میانگین ۴۲۸ سلول در یک میلی‌لیتر بیشترین تفکیک‌پذیری حاصل شد. کمترین تفکیک‌پذیری در محیط کشت mgl^{-1}NAA 0.5 با میانگین ۴۰ سلول در یک میلی‌لیتر بدست آمد (شکل ۵). اثر ساده 2,4-D در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار بود. ترکیب 2,4-D با و بدون BAP تأثیر زیادی در تفکیک‌پذیری کالوس نداشت. به‌نحوی‌که بیشترین تفکیک‌پذیری در تیمار mgl^{-1}2,4-D 3 بدون BAP و $^{-}$3 mgl ^{1}2,4-D با BAP به‌ترتیب با میانگین ۴۱۴ و ۴۲۸ سلول در میلی‌لیتر بدست آمد (شکل ۵). تأثیر نوع اکسین هم بر تفکیک‌پذیری کالوس مقایسه شد و در مجموع اکسین 2,4-D نتیجه بهتری داشت (شکل ۶).



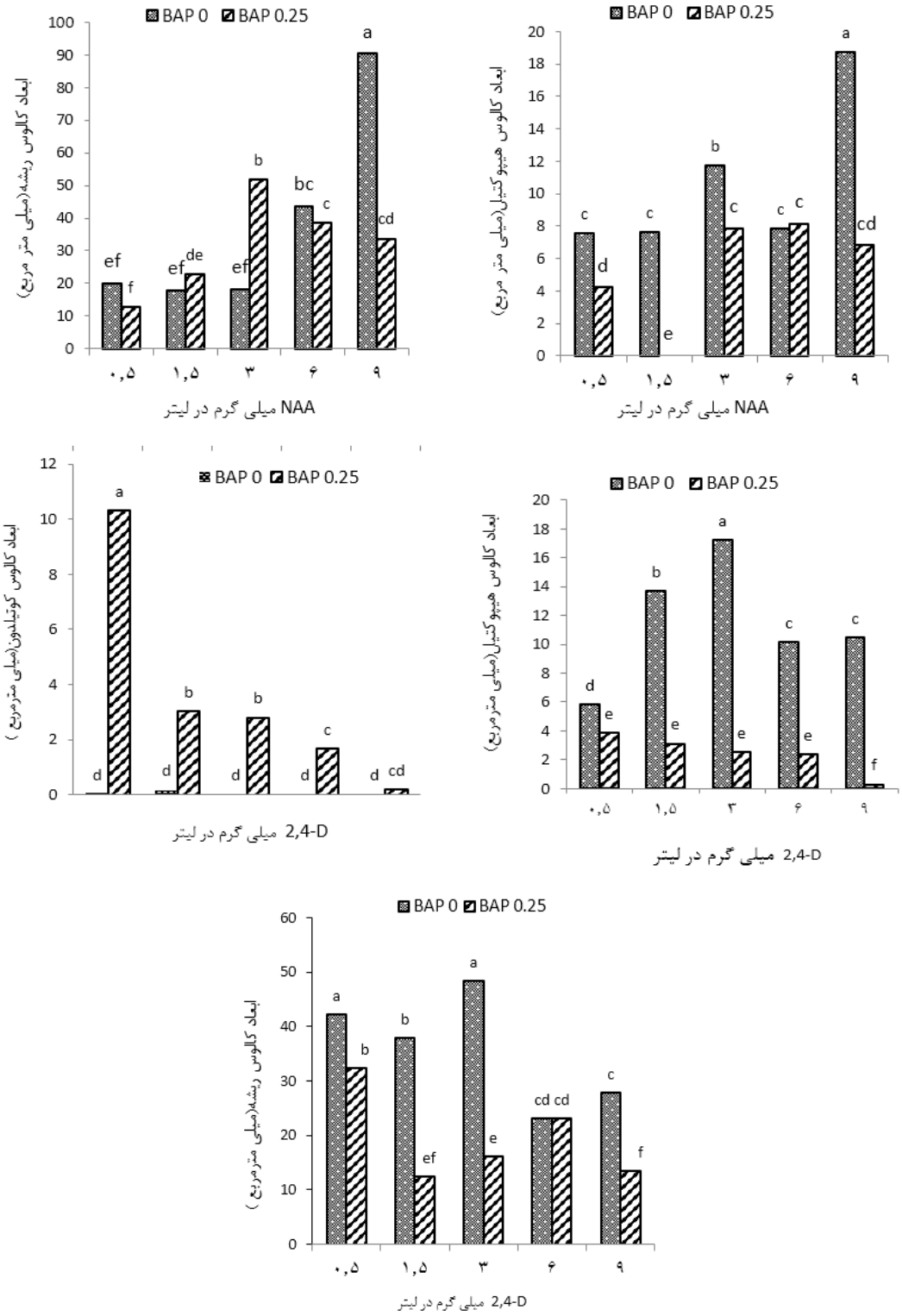
شکل ۱- الف) اثر NAA و 2,4-D بر کالوس‌زایی، ب) اثر نوع ریزنمونه بر کالوس‌زایی

حروف مشابه براساس آزمون **LSD** در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌داری با هم ندارند.



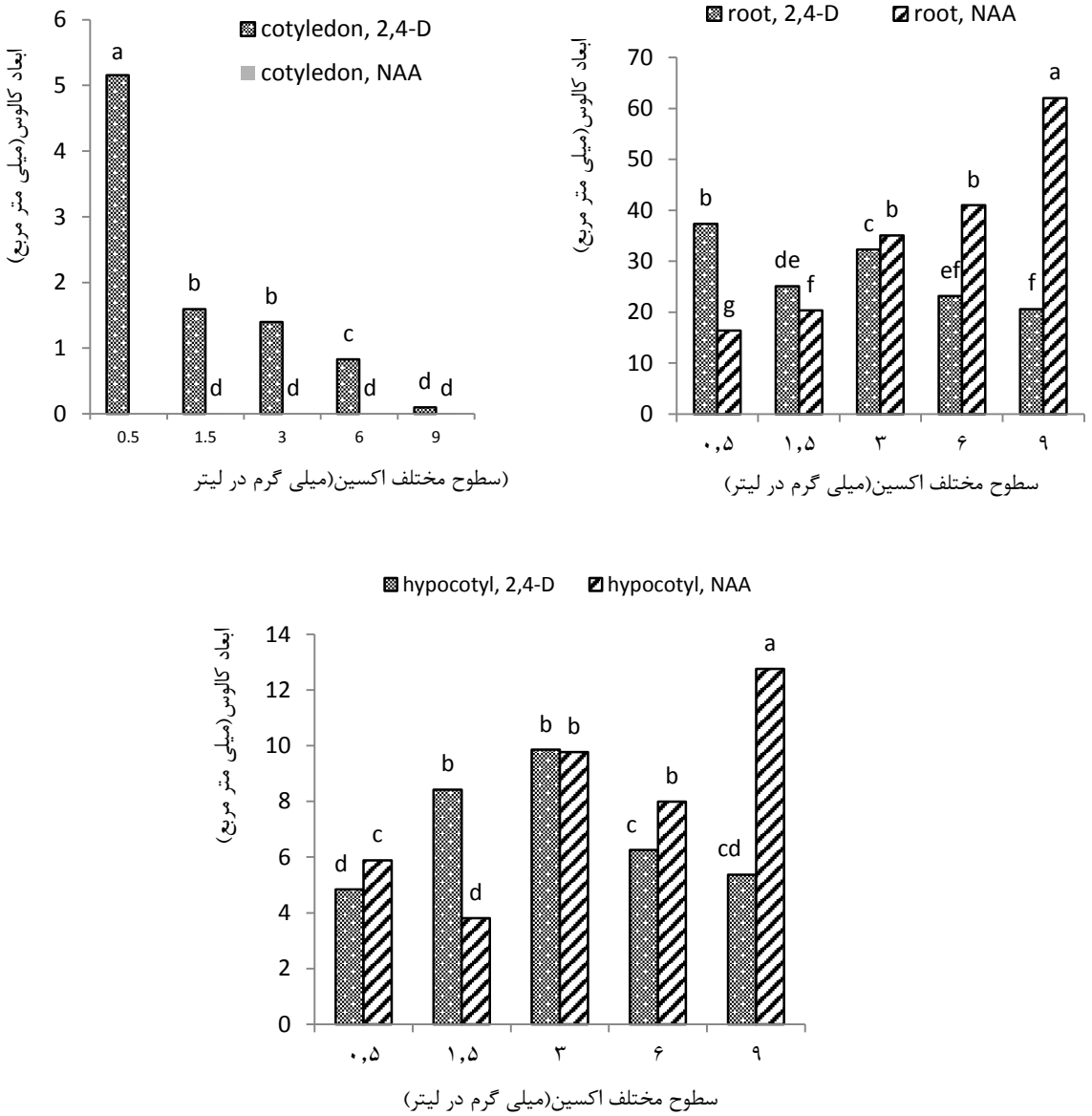
شکل ۲- اثر غلظت‌های NAA و 2,4-D بر درصد کالوس‌زایی ریزنمونه‌های الف) کوتیلدون، ب) هیپوکوتیل و ج) ریشه

حروف مشابه براساس آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌داری با هم ندارند.



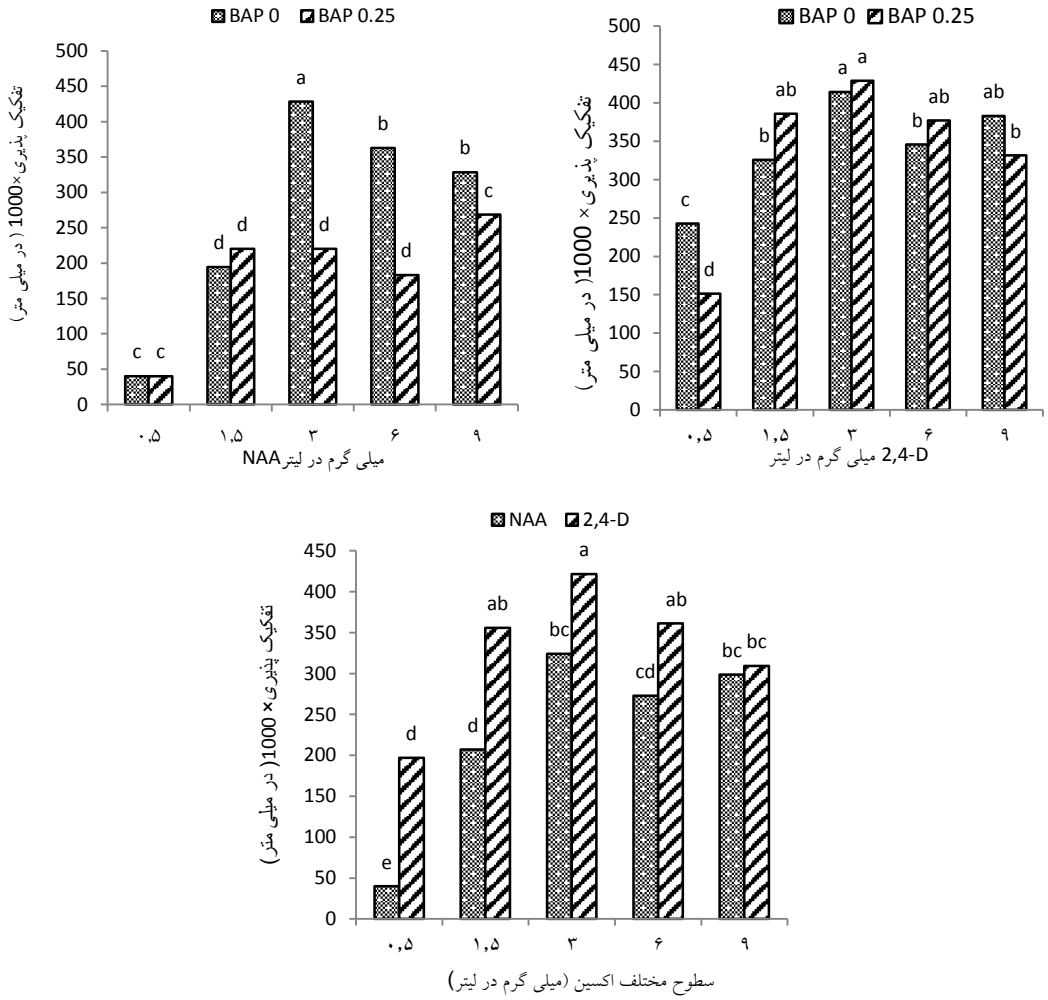
شکل ۳- اثر غلظت‌های مختلف NAA، BAP، 2,4-D و BAP بر ابعاد کالوس در ریزنمونه‌های مختلف

حروف مشابه براساس آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌داری با هم ندارند

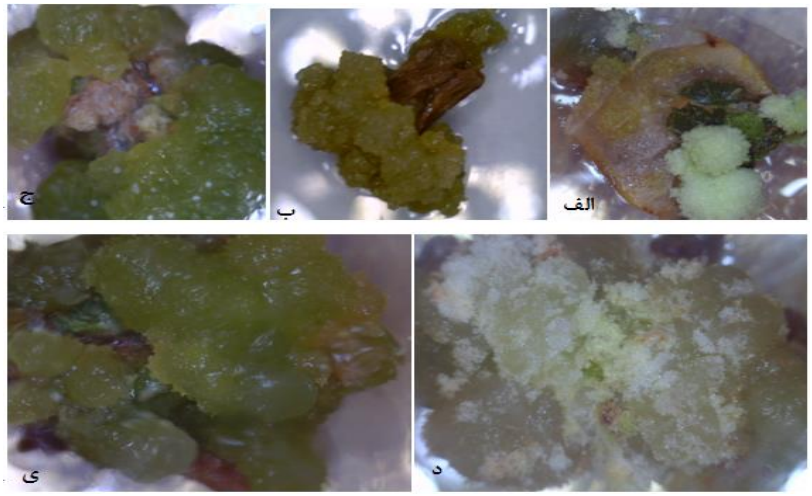


شکل ۴- اثر غلظت‌های مختلف 2,4-D و BAP بر ابعاد کالوس تولید شده از: الف) ریشه، ب) کوتیلدون و ج) هیپوکوتیل

حروف مشابه براساس آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌داری با هم ندارند.



شکل ۵- تفکیک‌پذیری سلول‌های کالوس بدست‌آمده از محیط کشت دارای: الف) 2,4-D، ب) NAA با و بدون ترکیب با BAP و تأثیر نوع اکسین بر روی تفکیک‌پذیری کالوس حروف مشابه براساس آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌داری با هم ندارند.



شکل ۶- الف) کالوس کوتیلدون در محیط کشت حاوی 2,4-D، ب) کالوس هیپوکوتیل در محیط کشت حاوی 2,4-D، ج) کالوس هیپوکوتیل در محیط کشت حاوی NAA، د) کالوس ریشه در محیط کشت حاوی 2,4-D و ی) کالوس ریشه در محیط کشت NAA

بررسی اثر غلظت‌های مختلف 2,4-D و NAA در ترکیب با و بدون BAP بر وزن خشک کالوس

اثر ساده غلظت 2,4-D در سطح احتمال پنج درصد و اثر ساده ریزنمونه در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بودند. در تیمار 2,4-D بدون ترکیب با BAP وزن خشک بیشتری از کالوس ریشه بدست آمد. افزایش غلظت 2,4-D بدون ترکیب با BAP تا سه میلی‌گرم در لیتر باعث افزایش وزن خشک کالوس ریشه شد و غلظت‌های بالاتر آن باعث کاهش وزن خشک شد. البته این روند در تیمار 2,4-D در ترکیب با BAP مطابقت نکرد. بیشترین وزن خشک کالوس ریشه در تیمار 2,4-D $0.5\ mgl^{-1}$ بدون BAP و $6\ mgl^{-1}$ 2,4-D در ترکیب با BAP به‌ترتیب با میانگین ۲۹ و ۲۷ میلی‌گرم به‌دست آمد. افزایش غلظت 2,4-D باعث کاهش وزن خشک کالوس هیپوکوتیل شد. بیشترین وزن خشک کالوس هیپوکوتیل در تیمار $1.5\ mgl^{-1}$ 2,4-D بدون ترکیب با BAP بدست آمد. بیشترین وزن خشک کالوس کوتیلدون از تیمار 2,4-D در ترکیب با BAP بدست آمد. افزایش NAA بدون BAP باعث افزایش وزن خشک کالوس ریزنمونه ریشه شد.

تیمار NAA بدون BAP اثر بهتری بر وزن خشک کالوس هیپوکوتیل داشت. در تیمار 9 mgl-1NAA بدون ترکیب با BAP به‌ترتیب با میانگین ۹/۸ و ۱۱/۵ میلی‌گرم بیشترین وزن خشک از کالوس هیپوکوتیل بدست آمد (جدول ۲).

جدول ۲- تأثیر ریزنمونه، BAP و اکسین بر میانگین وزن خشک کالوس (میلی‌گرم)

نوع هورمون	غلظت	BAP غلظت			BAP غلظت		
	mg/l	۰	۰	۰	(۰/۲۵mg/l)	(۰/۲۵mg/l)	(۰/۲۵mg/l)
		ریشه	هیپوکوتیل	کوتیلدون	ریشه	هیپوکوتیل	کوتیلدون
2,4-D	۰/۵	۲۹/۳a	۹/۹ f	۶/۹ g	۲۴/۸ b	۹/۵ f	۶/۳ g
	۱/۵	۲۸/۲ b	۱۰/۲ f	۴ g	۱۳/۳ e	۸/۱ f	۶/۵ g
	۳	۹/۱f	۸/۷f	۹/۹ g	۱۴/۹ c	۵ g	۴/۸ g
	۶	۱۳/۹ d	۴/۶ g	۲/۷ h	۲۷ b	۱/۳ h	۶ g
	۹	۱۵/۸ b	۶/۸ g	۳/۴ g	۱۱/۹ e	۵/۱ g	۳/۵ g
NAA	۰/۵	۷ g	۴/۱ g	۲/۸ g	۹/۸ f	۴/۴ g	۳/۳ g
	۱/۵	۱۰/۵ f	۵ g	۳ g	۱۱/۱ e	۳ g	۲/۴ h
	۳	۱۶/۵ b	۷/۳ g	۳/۵ g	۵۴ a	۸/۵ f	۳ h
	۶	۴۶/۷ a	۱۱/۵ e	۳/۶ g	۲۱/۴ b	۶/۵ g	۳ g
	۹	۱۵/۸ b	۹/۸ f	۳/۷ g	۲۸ b	۴/۲ g	۲/۴ g
ریزنمونه		۲۲/۴ A	۷/۸ B	۳/۲ C	۲۱/۷ A	۵/۳ B	۴/۱ B

حروف مشابه براساس آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌داری با هم ندارند.

بحث

گزارش‌های محدودی در رابطه با تأثیر تنظیم کننده‌های رشد گیاهی بر کالوس‌زایی گونه *Astragalus verus* منتشر شده است. Amiri (2012) از اثر غلظت‌های مختلف BA و 2,4-D بر کالوس‌زایی *Astragalus verus* استفاده کرد و گزارش نمود که BA اثر بیشتری روی کالوس‌زایی دارد. Ebrahimi و همکاران (2018) نیز با استفاده از BAP و IAA موفق به باززایی مستقیم *Astragalus verus* شدند. آنان در مطالعه دیگری با استفاده از ترکیب 2,4-D و Kin موفق به تولید سوسپانسیون سلولی گون گونه *Astragalus verus* از کالوس بدست‌آمده از ریزنمونه ریشه شدند (Ebrahimi et al., 2018)

Erisen و همکاران (۲۰۱۰) باززایی غیرمستقیم گونه *Astragalus nezaketaein* را با واسطه کالوس انجام دادند. در مطالعه این پژوهشگران NAA در ترکیب با BA باعث شاخه‌زایی از کالوس برگ در گونه *Astragalus nezaketaein* شد (Erisen *et al.*, 2010). استفاده از NAA در ترکیب با TDZ در مطالعه Erisen و همکاران (۲۰۱۱) نیز بیشترین کالوس‌زایی را در گونه *Astragalus cariensis* در پی داشت. بر خلاف پژوهش‌های قبلی Ping Luo و همکاران (1999) در مورد کالوس‌زایی گونه *Astragalus adsurgens* هورمون 2,4-D در ترکیب با BA حداکثر کالوس‌زایی را نشان داد. Arbabian و Moghanloo (2009) در مطالعه‌ای روی گون گچی گونه *Astragalus fridae* Rech. F. با استفاده از بافت مریستم و بکار بردن ترکیب هورمونی 2ip و NAA توانستند کالوس‌زایی خوبی را داشته باشند (Arbabian and Moghanloo, 2009). Hou و Jia (2004) روی گونه *Astragalus melilotoides* از طریق کالوس‌زایی با استفاده از ریزنمونه-های هیپوکوتیل و ساقه باززایی غیرمستقیم انجام دادند. این پژوهشگران هم از اکسین‌های NAA و 2,4-D در ترکیب با BA برای کالوس زایی استفاده کردند (Hou and Jia, 2004).

Hoseinpanahi و همکاران (2016)، از هورمون‌های مورد استفاده در این مطالعه برای کالوس‌زایی در سیاهدانه استفاده کردند. در این مطالعه بیشترین درصد کالوس‌زایی با تیمار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP بدست آمد. Hasancebi و همکاران (۲۰۱۰)، از گونه *Astragalus chrysochlorus* باززایی مستقیم و غیرمستقیم انجام دادند. در مطالعه آنان استفاده از ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر حداکثر کالوس‌زایی اتفاق افتاد (Hasancebi et al, 2010). Hosseini و Bighamat (2016) نیز بیشترین درصد القای کالوس را در گیاه مرزنجوش بخارایی (Origanum vulgar ssp gracile.) با استفاده از ترکیب 2,4-D و BAP از ریزنمونه برگ بدست آوردند(Hosseini and Bighamat, 2016).

با توجه به گزارش‌های منتشر شده و این تحقیق می‌توان نتیجه گرفت که نوع اکسین می‌تواند در گونه‌های مختلف تأثیر متفاوتی در کالوس‌زایی داشته باشد. بنابراین به نظر می‌رسد که اکسین‌های NAA و 2,4-D در ترکیب با سایتوکنین‌ها می‌توانند در کالوس‌زایی گون‌ها مؤثر باشند، اما این تأثیر به ژنوتیپ هم بستگی دارد، چون گونه‌های مختلف پاسخ‌های متفاوت به این هورمون‌ها می‌دهند.

با توجه به اهمیت زیاد گونه *Astragalus verus* از لحاظ تولید کتیرای مرغوب، تثبیت ازت و سایر ویژگی‌های آن و همچنین در معرض انقراض بودن آن به دلیل برداشت غیرصحیح و بی‌رویه، نتایج این پژوهش می‌تواند در مراحل بعدی برای باززایی غیرمستقیم گیاه و ریزازدیادی آن و همچنین تولید متابولیت‌های ثانویه با ارزش گیاه از طریق کشت سوسپانسیون سلولی در شرایط درون شیشه‌ای مورد استفاده قرار گیرد.

منابع مورد استفاده

– Amiri H, 2012. Production of tragacant in suspension culture of Astragalus verus using different concentration of BA and 2,4-D. MS Thesis. Bu Ali Sina University, Iran (In Persian).
– Arbabian S and Moghanloo M. 2009. Investigation of type and concentration of some hormonal treatments in tissue culture of *Astragalus fridae Rech. f.*. Journal of Developmental Biology. 1(2): 25-34. (In

Breeding and Genetic Research, 24(2): 264-276.
– Hoseinpanahi S, Majdi M, Mirzaghaderi Gh. 2016. Effects of growth regulators on *in vitro* callogenesis and regeneration of black cumin (*Nigella sativa*). Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 24(2): 232-242. (In Persian).
– Hou, SW., Jia, JF. 2004. High frequency plant regeneration from *Astragalus melilotoides* hypocotyl and stem explants via somatic embryogenesis and organogenesis. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC). 79: 95-100.
– Maassoumi, A. 2000. Astragalus in Iran. Publication of Research Institute Forests and Rangelands Tehran, Iran. (In Persian).
– Maassoumi, A. 2005. Astragalus in Iran. Publication of Research Institute Forests and Rangelands Tehran, Iran. (In Persian).
– 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.
– Vahhabi MR. 2005. Effective habit indices determination for harvesting gum tragacanth from *Astragalus gossypinus & A. verus* in Isfahan Province. University of Tehran. Ph.D. thesis.212p. In Farsi with English abstract. (In Persian).
Persian).
– Ebrahimi S, Zaker tavallaie F, Zare Mehrjerdi M, Ghorbanzadeh M 2018. Optimization of Direct Regeneration of *Astragalus verus* in in vitro condition. Journal of Agricultural Biotechnology. 10(3): 17-30. (In Persian).
– Ebrahimi S, Zaker tavallaie F, Zare Mehrjerdi M, Ghorbanzadeh M 2018. Optimization of Cell Suspension Induction in Tragacanth Astragalus (*Astragalus Verus*). Journal of Agricultural Biotechnology. 10(4): 1-18. (In Persian).
– 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-Biot, 35: 521-526.
– Erisen S, Atalay E, Yorgancilar M., Bubaoglu M, Duran A. 2010. Callus induction and plant regeneration of the endemic Astragalus nezaketaein Turkey. Electronic Journal of Biotechnology.13:1-7.
– Hasancebi S, Turgutkara N, Cakir O, Ari S. 2011. Micropropagation and root culture of Turkish endemic *Astragalus chrysochlorus* (Leguminosae). Turk Journal Botani. 35: 203-210.
– Hosseini B, Bighamat A. 2016. Effects of different concentrations of growth regulators and explants type on callus induction, embryogenesis and shoot regeneration of Origanum vulgare ssp. Gracile. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant

Investigating the effect of explant type and hormonal composition on *Astragalus verus* callogenesis

F. Zaker Tavallaie[*1], S. Ebrahimi[2], M. Zare Mehrjerdi[3] and M. Ghorbanzadeh Neghab[4]

1 *-Corresponding author,Assist. Prof., Plant Production, Higher Education Complex of Shirvan, North Khorasan, I.R. Iran. Email: zakertavallaie@cheshirvan.ac.ir
2- M.Sc. Graduated, Plant Production, Higher Education Complex of Shirvan, North Khorasan, I.R. Iran.
3- Assist. Prof., Plant Production, Higher Education Complex of Shirvan, North Khorasan, I.R. Iran.
4- Assoc. Prof., Plant Production, Higher Education Complex of Shirvan, North Khorasan, I.R. Iran.

Received: 5.07.2018 Accepted: 6.08.2019

Abstract

The genus *Astragalus* of the Leguminosae family is one of the largest genera among flowering plants. *Astragalus verus* is one of the suitable species for tragacanth production. The purpose of this study was to investigate the effect of different hormonal compounds on callus induction of *A. verus* different explants . Callogenesis from root, hypocotyl and cotyledon explants was studied in MS basal medium supplemented with different concentrations of BAP, 2,4-D and NAA. The highest percentage of callogenesis was obtained in 2,4-D (0.5 mgl^{-1}) treatment with a mean of 56% and the lowest percentage of callogenesis was in 0.5 mg $^{-1}$L NAA treatment with a mean of 4%. The highest callogenesis percentage was achieved from root explant with an average of 67%. The highest and lowest callus dimensions were obtained in treatment of 9 mgl^{-1}NAA and 9 mgl^{-1}2,4-D with average values of 62 and 0.1 mm^3 , respectively. The highest fresh and dry weights of calli were obtained with an average of 0.148 and 0.022 g of root explant in 2,4-D treatment, respectively. The separability of calli in medium containing 2,4-D was better than NAA. The results of this study can be used in indirect regeneration studies, gene transfer, and cell suspension culture to produce secondary metabolites such as tragacanth under *in vitro* conditions.

Keywords: *Astragalus verus*, 2,4-D, NAA, Explants, Callogenesis.