علوم باغبانی ایران
دورۀ ۴۷، شمارۀ ۲، تابستان ۱۳۹۵ (ص ۲۵۵-۲۴۵)
DOI: 10.22059/ijhs.2016.58524

تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر ریزازدیادی گیاه گزانگبین (*Astragalus adscendens* Boiss and Haussk) با جوانۀ انتهایی

قاسم اسماعیلی[1]، مجید عزیزی[2*]، حسین آروئی[3] و لیلا سمیعی[4]
۱، ۲ و ۳. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، دانشیار و استادیار، دانشکدۀ کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
٤. استادیار پژوهشکدۀ علوم گیاهی، دانشگاه فردوسی مشهد
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۱/۱۹ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۳/۱۰/۷)

چکیده

گزانگبین (*Astragalus adscendens*) متعلق به جنس گون‌ها و یکی از گونه‌های پراهمیت ایران از نظر ارزش دارویی، جنبه‌های اقتصادی و اجتماعی است. به دلیل قدرت افزایش کم این گیاه با بذر و قلمه، امکان کشت درون شیشه‌ای این گیاه ارزیابی شد. اثر سه نوع سیتوکینین مختلف (BAP[1]، KIN[2] و Ze[3]) با غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۲ و ٤ mg/l در ترکیب با ۰ و ۰/۵ mg/l NAA[4] بر پرآوری جوانۀ انتهایی بررسی شد. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کامل تصادفی انجام شد. شاخساره‌ها به محیط کشت ریشه‌زایی حاوی IBA[5] و NAA با غلظت‌های ۰، ۰/۳، ۰/٦ و ۰/۹ mg/l از هر کدام منتقل شدند. نتایج نشان داد تأثیر کاربرد سیتوکینین‌های مختلف و غلظت‌های استفاده‌شده از هر کدام و همچنین کاربرد NAA در میزان شاخسارۀ تولیدشده، شمار برگ و طول شاخساره‌ها معنی‌دار بود. بیشترین شاخه‌زایی (۸/۵ شاخساره در هر ریزنمونه) به همراه شمار برگ مناسب (۲۲/٤ برگ در هر شاخساره) در محیط کشت MS[6] حاوی BAP ٤ mg/l به دست آمد. همچنین بیشترین مقدار ریشه‌زایی در محیط کشت MS حاوی ۰/۳ mg/l از هورمون NAA به دست آمد (۱۰۰ درصد). بیش از ٤۰ درصد گیاهچه‌های تولیدشده در گلدان حاوی مخلوط خاک، پیت و پرلیت (۱:۱:۱) سازگار شدند.

واژه‌های کلیدی: پرآوری، ریشه‌زایی، صمغ، کشت بافت، گون‌گزی.

مقدمه

مراتع یکی از ارزشمندترین منابع ملی و تأمین‌کنندۀ بخش اساسی از نیازهای پروتئینی و دارویی هر کشوری هستند. لذا بهره‌برداری همراه با اصلاح و احیای آن‌ها نقش بارزی در حفظ آب‌وخاک و تأمین نیازمندی‌های کشور دارد (Kardovani, 2005). کشور ایران به دلیل برخورداری از تنوع آب و هوایی خاستگاه گونه‌های پرشمار گیاهی است که برخی از آن‌ها تنها در مراتع آن رویش دارند (Mohamadi & Deni, 2001). گون گزانگبین با نام علمی (*Astragalus adscendens* (Boiss and Haussk متعلق به خانوادۀ پراوانه‌آسا[7] و زیرتیرۀ *Pailionaceae* یکی از این

* تلفن: ۰۹۱۵۵۲۲۲۴۷۸
E-mail: azizi@um.ac.ir

1. 6-Benzylaminopurine
2. Kinetin
3. Zeatin
4. α-Naphthaleneacetic acid
5. Indole-3-butyric acid
6. Murashige and Skoog (1962) medium
7. Fabaceae

گونه‌های ارزشمند است. این گونه اغلب در استان‌های اصفهان و چهارمحال و بختیاری در مرکز ایران یافت می‌شود (Masomi, 1994). این گیاه تنها میزبان حشرهٔ مولد صمغ (مان) گزانگبین است که ارزش زیادی از نظر اجتماعی و اقتصادی و دارویی دارد. صمغ تولیدشده از این گیاه تسکین‌دهندهٔ التهاب سینه، تنگی نفس و سرفه بوده و به دلیل داشتن درصد بالای فروکتوز که بدون حضور انسولین قابل‌تجزیه است برای مبتلایان به دیابت اهمیت دارد (Samsam Shariat & Moatar, 2003). گزارش‌ها گویای این است که پلی‌ساکاریدهای موجود در گیاهان این جنس فعالیت پاداکسندگی (آنتی‌اکسیدانی)، پاد-دیابتی و ایمنی درمانی دارند (Li *et al.*, 2007). جدیدترین خواص دارویی شناخته‌شدهٔ گون‌ها درزمینهٔ تأثیر ضد ایدزی و ضد سرطانی آن‌ها است که در این راستا ترکیب‌های کاستانوسپرمین[1] و آستراگالوزوئید[2] نیز بررسی شده‌اند (Rios & Waterman, 1997). همچنین این گیاه از نظر تولید کتیرا که امروزه کاربرد فراوانی در صنایع آرایشی و بهداشتی دارد با اهمیت است (Masomi, 1994). فرآورده‌های مربوط به این گیاه از نظر اجتماعی اهمیت فراوانی دارد، چراکه سبب ایجاد اشتغال و درآمدزایی برای کشاورزان و اهالی آن مناطق می‌شوند. همچنین این گونه قادر به تعدیل بوم‌سازگان (اکوسیستم)، کنترل فرسایش، تثبیت شن‌های روان و تحمل تنش‌های غیرزنده مانند شوری، سرما، خشکی نیز است (Azimi, 2005).

در سال‌های اخیر بررسی‌های زیادی روی صمغ این گیاه و علل کاهش تولید این صمغ انجام گرفته است (Seifallahi & Ebadi, 2002; Mohamadi & Deni, 2001; Azimi *et al.*, 2005; Farahnaky *et al.*, 2009). ولی بررسی روی گیاه مولد این صمغ با ارزش که تنها تولیدکنندهٔ آن است، بسیار محدود است. بی-شک برای درک و حل مشکل تولید این صمغ ارزشمند و دیگر جنبه‌های کاربردی و ارزشمند این گیاه نیاز به بررسی همه جانبهٔ آن است. در سال‌های اخیر به دلیل کاهش جمعیت حشرهٔ مولد گزانگبین، روستاییان، عشایر و دامداران به حذف گزانگبین به‌عنوان یک گیاه مزاحم و علف هرز در مراتع اقدام کرده‌اند. همچنین به دلایلی مانند قطع شاخه‌های گون به‌صورت بی‌رویه، آتش‌سوزی‌های در سطح گسترده، طرح‌های حذف لکه‌ای این گونه از مراتع و کشت گیاهان علوفه‌ای به‌صورت کپه‌کاری، چرای بی‌رویه، خشک‌سالی‌های پی‌درپی منجر به کاهش جمعیت این گونه از مراتع و جایگزین شدن آن با دیگر گیاهان شده است (Seifollahi & Shafezade, 2002). نکتهٔ دیگر اینکه با امکان افزایش و تولید این گیاه می توان تأثیر عامل‌های مختلف روی تولید صمغ و حشرهٔ مولد را در شرایط کنترل‌شده بررسی کرد. بنابراین تلاش برای حفظ این گیاه بسیار ضرورت دارد.

افزایش این گیاه و دیگر گیاهان این جنس با بذر با مشکلاتی مانند درصد جوانه‌زنی پایین به دلیل داشتن پوسته سخت (Rolston, 1978) و خواب موجود در بذرها، سختی گردآوری بذرهای این گیاه و تولید بذرهایی که اغلب آفت‌زده‌اند همراه است (Luo & Jia, 1998). افزون بر این محققان تاکنون موفق به افزایش این گیاه و دیگر گیاهان این جنس با قلمه نشده‌اند (Esmaili & Azizi, 2013). بررسی کنونی به‌منظور ارزیابی امکان افزایش این گیاه در شرایط درون شیشه‌ای با استفاده از جوانهٔ انتهایی و تحت تأثیر تنظیم‌کننده‌های مختلف گیاهی صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

به‌منظور ریزازدیادی گیاه گون گزانگبین با نام علمی *Astragalus adscendens* (Boiss and Haussk). ریزنمونه از گیاهچه‌های تولیدشده در شرایط سترون (استریل) تهیه شد. برای این کار بذر این گیاه از شهرستان بویین میاندشت واقع در غرب استان اصفهان (عرض جغرافیایی ۳۳ درجه و ۱۰ دقیقهٔ شمالی و ۵۰ درجه و ۱۷ دقیقهٔ شرقی) گردآوری شد. ازآنجایی‌که بذرهای این گیاه در شرایط عادی به دلیل داشتن خواب فیزیکی و مکانیکی جوانه‌زنی پایینی دارند، لذا پیش از کشت، بذرها با اسیدسولفوریک ۹۸ درصد به مدت ۱۵ دقیقه تیمار داده و آن‌گاه با آب مقطر سترون آبشویی شدند. برای ضدعفونی بذرها از

1. Castanospermine
2. Astragalosides

اتانول ۷۰ درصد به مدت ۱ دقیقه و سپس از هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد به مدت ۱۵ دقیقه استفاده شد و در پایان سه بار با آب مقطر سترون در زیر هود شستشو داده شدند. سپس بذرهای ضدعفونی شده در شیشه‌های با حجم۵۰ میلی‌لیتر حاوی ۱۵ میلی‌لیتر محیط کشت MS نصف غلظت کشت داده شدند (شکل ۴-آ). ریزنمونهٔ جوانهٔ انتهایی (مریستم) به‌اندازهٔ ۰/۵ سانتی‌متر از گیاهچه‌های پانزده روزه تهیه شد. ریزنمونه‌ها در محیط کشت MS حاوی ۳ درصد ساکارز و ۰/۸ درصد آگار به همراه تنظیم‌کننده‌های رشد کشت شدند. لازم به یادآوری است محیط‌های کشت پس از تهیه در فشار ۱/۵ اتمسفر و دمای ۱۲۱ درجهٔ سلسیوس به مدت ۲۱ دقیقه اتوکلاو شدند.

در این پژوهش برای پرآوری ریزنمونه‌ها آزمایشی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کامل تصادفی انجام شد. تیمارهای به‌کاررفته شامل سه نوع سیتوکینین BAP، KIN و Ze با غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۲ و ۴ میلی‌گرم در لیتر در ترکیب با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و بدون NAA استفاده شد. در مجموع ۲۴ تیمار و هر تیمار شامل چهار تکرار و هر تکرار شامل دو ریزنمونه بود. ظرف‌های کشت حاوی ریزنمونه‌ها به اتاق رشد با دمای ۲۵ درجهٔ سلسیوس در روز و ۲۰ درجه در شب و فتوپریود شانزده ساعت روز و هشت ساعت شب با شدت نور ۴۰ میکرومول فوتون بر مترمربع در ثانیه منتقل شدند. پس از چهار هفته یک دورهٔ واکشت در محیط‌های همسان انجام شد. در ادامه پس از چهار هفته شمار شاخساره حاصل، طول شاخساره، شمار برگ در هر شاخساره و همچنین درصد تولید کالوس (Vidoze, 2006) در هر یک از تیمارها ثبت شد.

$$\text{درصد تولید پینه} = \frac{\text{شمار ریزنمونه‌هایی که تولید پینه (کالوس) کرده‌اند}}{\text{کل ریزنمونه‌ها}} \times ۱۰۰$$

برای ریشه‌زایی شاخساره‌های تولیدشده، از IBA و NAA با غلظت‌های ۰، ۰/۳، ۰/۶ و ۰/۹ میلی‌گرم در لیتر از هر کدام در محیط کشت MS و ۱/۲MS استفاده شد. در مجموع شانزده تیمار و هر تیمار شامل شش تکرار و هر تکرار شامل دو ریزنمونه بود. پس از شش هفته درصد ریشه‌زایی، شمار ریشه‌های اصلی و فرعی و طول ریشه ثبت شد. در پایان برای سازگاری با شرایط محیط بیرون گیاهچه‌های دارای شاخساره و ریشهٔ سالم و قوی به گلدان‌های حاوی خاک، پیت و پرلیت منتقل شدند و پس از انجام مراحل سازگاری در گلخانه به خاک منتقل شدند.

تجزیهٔ آماری با نرم‌افزار JMP و مقایسهٔ میانگین‌ها با آزمون LSD انجام شد.

نتایج و بحث

نخستین نشانه‌های رشد در ریزنمونه‌ها یک هفته پس از کشت و آن‌گاه رشد سریع ریزنمونه‌ها مشاهده شد. نتایج حاصل از تجزیهٔ واریانس داده‌ها نشان داد صفات موردبررسی تحت تأثیر تیمارهای اعمال‌شده قرار گرفته و در اغلب صفات تفاوت معنی‌داری مشاهده شد (جدول ۱).

پرآوری

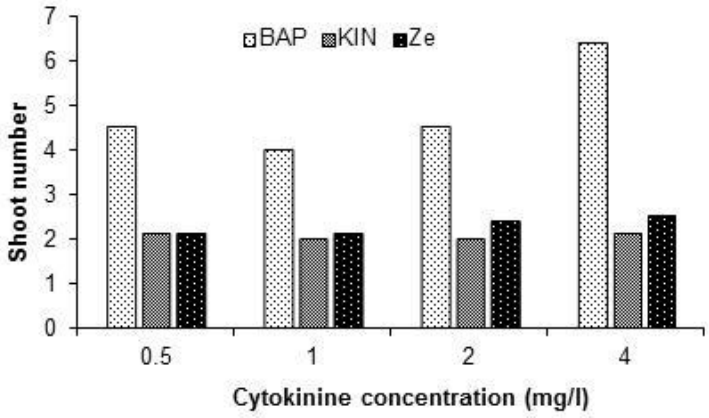
شاخه‌زایی

پس از گذشت یک هفته از آغاز آزمایش همهٔ ریزنمونه‌ها شروع به رشد کردند. بنابر نتایج به‌دست‌آمده بیشترین شمار شاخساره به میزان ۴/۸ شاخساره در هر ریزنمونه از تیمار حاوی ۴ میلی‌گرم در لیتر BAP به دست آمد و بین تیمارهای حاوی KIN و Ze اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (شکل-۱). کاربرد NAA به همراه سیتوکینین‌های مختلف منجر به کاهش تولید شاخساره شد (جدول-۳). بنابراین بهترین تیمار برای تولید بیشترین شاخساره در هر ریزنمونه تیمار ۴ میلی‌گرم BAP است (شکل-۵-ب). BAP یک سیتوکینین رایج در بررسی‌های کشت بافتی گونه‌های مختلف گون‌ها است (Luo & Jia, 1998) *A. adsurgens*، (Hou & Jia, 2004) *A. melilotoides* و *A. cariensis* (Erisen *et al.*, 2010). به‌طورکلی BAP مؤثرترین سیتوکینین مورداستفاده در تولید ساقه‌های جانبی است (Farsi & Zolala, 2011).

طول شاخساره

بنابر نتایج تجزیهٔ واریانس نوع سیتوکینین مورد

استفاده تأثیر معنی‌داری در طول شاخساره داشت (p<۰/۰۱). بیشترین طول شاخساره (۲/۳۸ سانتی‌متر) در تیمارهای حاوی KIN به دست آمد (جدول ۲). استفاده از ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر KIN به همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA سبب بیشترین رشد شاخساره‌ها شد (جدول -۳). کاربرد ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر از سیتوکینین‌ها به همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر از NAA سبب افزایش طول شاخساره‌ها شد (شکل- ۲). سیتوکینین‌ها به‌ویژه در غلظت بالا با غلبه بر چیرگی انتهایی از رشد طولی شاخساره‌ها جلوگیری می‌کنند و منجر به تولید شاخساره‌های فشرده و کاهش طول میانگره‌ها می‌شوند. این حالت توسط Vidoze (2006) نیز گزارش شده است. افزودن اکسین تا حدودی سبب خنثی شدن تأثیر سیتوکینین‌ها در رشد شاخساره شده و از این راه رشد شاخساره‌ها تحریک می‌شود (Farsi & Zolala, 2011).



شکل ۱. مقایسهٔ میانگین تأثیر متقابل غلظت و نوع سیتوکینین بر شمار شاخساره

Figure 1. Mean comparison of cytokinins type and concentration effects on shoot number

جدول ۱. تجزیهٔ واریانس صفات اندازه‌گیری‌شده برای ریزازدیادی گون گزانگبین

Table 1. Variance analysis of measured traits for micropropagation of Gavane-gaz-angubin

SOV	df	Mean of Squares			
		Shoot number	Shoot length	Leaf number	Callus production
Cytokinine	2	74.7**	3.01**	360.57**	28619.7**
Cytokinine concentration	3	4.3*	0.80*	36.80**	2673.3**
Auxin concentration	1	27.1**	0.13^{ns}	84.38**	1500**
Cyto × Cyto-con	6	2.5*	0.24^{ns}	22.61*	251.7^{ns}
Cyto × Aux-con	2	17.2**	2.29**	9.99^{ns}	2890.6*
Cyto-con × Aux-con	3	1.1*	1.65**	8.56^{ns}	902.7^{ns}
Cyto × Cyto-con × Aux-con	6	0.6^{ns}	0.50*	6.48^{ns}	1189.2^{ns}
Error	72	1.1	0.26	9.02	625
CV (%)		28	25	25	22

** و * معنی‌داری بر پایهٔ آزمون LSD به ترتیب در سطوح p<۰/۰۱ و p<۰/۰۵.

ns: بدون اختلاف معنی‌دار

- **p<0.01, *p<0.05 (According to LSD test).
- ns: non significance

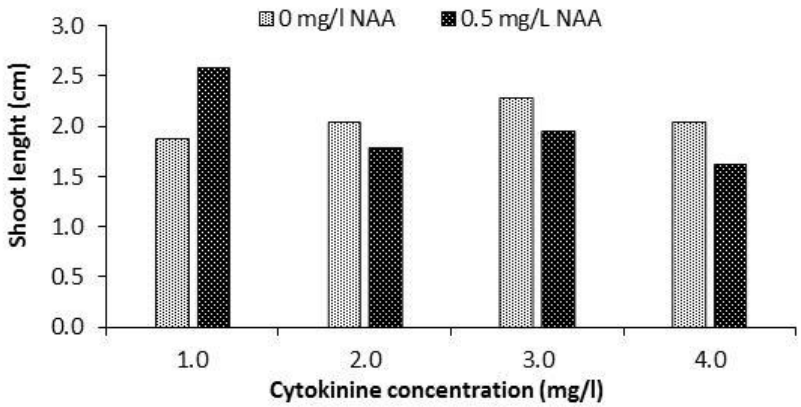
جدول ۲. مقایسهٔ میانگین تأثیر سیتوکینین های مختلف بر پرآوری گون گزانگبین

Table 2. Mean comparison of different cytokinins effects on proliferation of Gavane-gaz-angubin

Ctyokinine types	Shoot number	Shoot length (cm)	Leaf number	Callus production (%)
BAP	4.8^{a}	1.8^{b}	15.5^{a}	79.7^{a}
KIN	2.1^{b}	2.4^{a}	9.6^{b}	21.9^{c}
Ze	2.3^{b}	1.9^{b}	9.8^{b}	64.1^{b}

حروف مشترک در هر صفت بیانگر نبود اختلاف معنی‌دار میانگین‌ها بر پایهٔ آزمون LSD (p<۰/۰۵) است.

Mean within a column followed by the same latter are not significantly different at p<0.05 according to the LSD test.



شکل ۲. مقایسهٔ میانگین تأثیر متقابل غلظت اکسین و سیتوکینین بر طول شاخساره

Figure 2. Mean comparison of auxin and cytokinine concentration effects on shoot length

جدول ۳. مقایسهٔ میانگین تأثیر متقابل نوع سیتوکینین و غلظت اکسین بر پرآوری گون گزانگبین

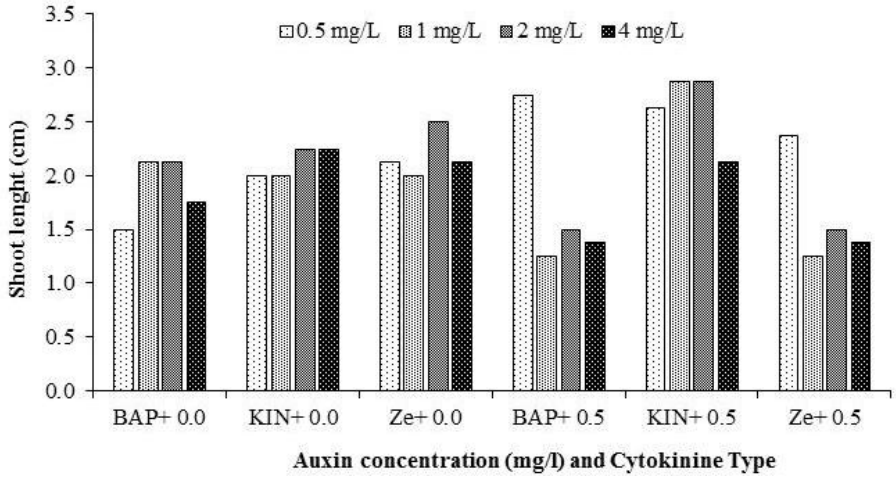
Table 3. Mean comparison interaction of different cytokinins and Auxin effects on proliferation of Gavane-gaz-angubin

Cytokinin types	Auxin concentration (mg/l)	Shoot number	Shoot length (cm)	Leaf number	Callus production (%)
BAP		6.2^{a}	1.9^{bc}	17.0^{a}	71.9^{a}
KIN	non-NAA	2.1^{c}	2.1^{b}	10.6^{c}	15.6^{c}
Ze		2.5^{c}	2.2^{b}	10.7^{c}	40.6^{b}
BAP		3.5^{b}	1.7^{b}	14.0^{b}	87.5^{a}
KIN	0.5 mg/l NAA	2.1^{c}	2.6^{a}	9.20^{c}	28.1^{bc}
Ze		2.0^{c}	1.6^{c}	9.0^{c}	87.5^{a}

حروف مشترک در هر صفت بیانگر نبود اختلاف معنی‌دار میانگین‌ها بر پایهٔ آزمون LSD (p<۰/۰۵) است.

Mean within a column followed by the same latter are not significantly different at p<0.05 according to the LSD test.

طول شاخساره در تیمارهای بدون اکسین تا حدودی ثابت بوده و کمتر تحت تأثیر غلظت سیتوکینین قرار گرفته‌اند اما هنگامی‌که همراه با سیتوکینین از NAA نیز استفاده می‌شود طول ساقه بسیار متغیر است و بهترین حالت زمانی است که از نسبت برابر از سیتوکینین و اکسین استفاده شود. به‌طورکلی می‌توان نتیجه گرفت کاربرد ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA به همراه غلظت‌های ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون KIN بهترین نتیجه را به همراه دارد و سبب بیشترین رشد در شاخساره‌ها می‌شود (شکل ۳).



شکل ۳. مقایسهٔ میانگین اثرهای متقابل نوع سیتوکینین، غلظت سیتوکینین و غلظت NAA بر طول شاخساره

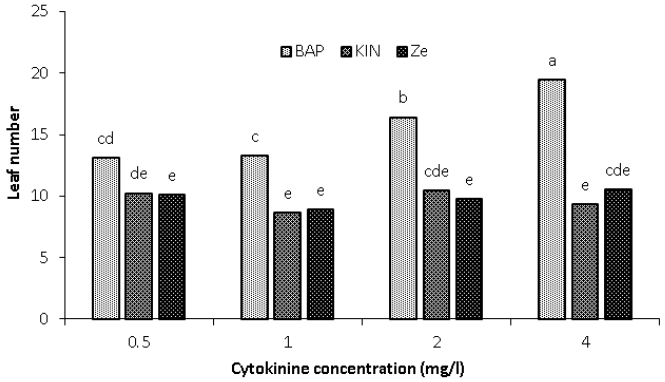
Figure 3. Mean comparison interaction of cytokinine type, cytokinine concentration and NAA concentration effects on shoot length

شمار برگ

بنابر نتایج تجزیهٔ واریانس کاربرد سیتوکینین‌های مختلف سبب اختلاف معنی‌داری در تولید برگ شد (p<۰/۰۱). بیشترین شمار برگ در تیمار BAP (۱۵/۵ برگ در هر ریزنمونه) بوده که اختلاف معنی‌داری با تیمار KIN و Ze دارد (جدول -۲). با افزایش غلظت سیتوکینین شمار برگ تولیدشده افزایش یافت. به‌طور میانگین کاربرد مقدار ۴ میلی‌گرم در لیتر سیتوکینین سبب بالاترین میزان تولید برگ (سیزده برگ در هر ریزنمونه) شد (جدول ۴).

استفاده از غلظت‌های مختلف سیتوکینین‌ها و اوکسین نشان می‌دهد بهترین تیمار برای تولید بیشترین برگ تیمار ۴ میلی‌گرم در لیتر BAP است (شکل۴). کاربرد NAA در همهٔ تیمارهای سیتوکینین‌ها منجر به کاهش شمار برگ شد.

از بین سیتوکینین‌های مورداستفاده BAP در بیشینه غلظت مورداستفاده (۴ mg/l) نتایج بهتری نشان داد و سبب بیشترین شمار شاخساره و برگ از هر ریزنمونه شد همچنین در نبود اکسین (NAA) شاخساره و برگ بیشتری تولید شد. افزایش غلظت سیتوکینین منجر به افزایش شمار شاخساره و شمار برگ و کاهش طول شاخساره شد که با نتایج برخی از پژوهشگران مانند، Jalili Marandi *et al.* (2011) و Steephen *et al.* (2010) همخوانی دارد.



شکل ۴. مقایسهٔ میانگین تأثیر متقابل نوع و غلظت سیتوکینین بر شمار برگ

Figure 4. Mean comparison interaction of cytokinins type and concentration effects on leaf number

جدول ۴. مقایسهٔ میانگین تأثیر غلظت‌های مختلف سیتوکینین بر پرآوری گیاه گون گزانگبین

Table 4. Mean comparison of different cytokinin concentrations effect on proliferation of Gavane-gaz-angubin

Cytokonin concentration (mg/l)	Shoot number	Shoot length (cm)	Leaf number	Callus production (%)
0.5	2.9[b]	2.2[a]	11.1[bc]	52.0[b]
1	2.7[b]	1.9[b]	10.2[c]	47.9[b]
2	3.0[b]	1.2[ab]	12.2[ab]	50.0[b]
4	3.7[a]	1.8[b]	13[a]	70.8[a]

حروف مشترک در هر صفت بیانگر نبود اختلاف معنی‌دار میانگین‌ها بر پایهٔ آزمون LSD (p<۰/۰۵) است.

Mean within a column followed by the same letter are not significantly different at p<0.05 according to the LSD test.

درصد تولید پینه

نتایج تجزیهٔ واریانس داده‌های مربوط به تولید پینه در جدول۱ آورده شده است. بر این پایه بیشترین مقدار پینه از تیمار حاوی BAP به دست آمده و با KIN و Ze اختلاف معنی‌دار دارد (p<۰/۰۱). تولید پینه در تیمار Ze بیشتر از تیمار KIN است (جدول ۲). در این آزمایش هدف پرآوری و تولید گیاهچه‌های همسان والدین بوده بنابراین مبنای مقایسهٔ صفات بر پایهٔ شاخساره‌هایی است که به‌طور مستقیم از ریزنمونه تولید شده‌اند. بنابراین تولید پینه یک عامل منفی در این آزمایش است چراکه باززایی گیاهچه‌های جدید از پینه منجر به تنوع ژنتیکی می‌شود. بنابراین بهترین تیمار با هدف تولید گیاهچه‌های همسان والدین کاربرد Ze است.

جدول ۴ تأثیر غلظت‌های مختلف سیتوکینین‌های بکار برده شده بر تولید پینه را نشان می‌دهد همان‌طور که مشخص است افزایش غلظت سیتوکینین منجر به

افزایش تولید پینه شده است. کاربرد NAA منجر به افزایش تولید پینه در ۶۸ درصد ریزنمونه‌ها شد (شکل۵- د).

بررسی نمونه‌ها پس از دو بار واکشت متوالی نشان داد که شمار زیادی شاخساره از پینه‌های تولیدی به وجود آمد و مشخص شد بین تیمارهایی که بیشترین مقدار پینه در آن‌ها تولیدشده با تیمارهایی که بیشترین شمار شاخساره تولیدشده رابطهٔ مثبت وجود دارد و تولید پینه سبب تولید شاخساره‌هایی شد که اغلب از پینه به وجود آمده بودند (باززایی غیرمستقیم) (شکل ۵- د، ی).

افزایش غلظت سیتوکینین منجر به تولید پینه در انتهای شاخساره‌ها می‌شود که با نتایج دیگر پژوهشگران همخوانی دارد (Rout, 2005; Jalili Marandi *et al*., 2011; Steephen *et al*., 2010; Puspashree & Shiba, 2012). انجام واکشت و سپری شدن زمان منجر به باززایی شاخساره‌های جدید از پینه می‌شود که با نتایج دیگر پژوهشگران همخوانی دارد (Mercier *et al*., 1992; Sudha & Seeni, 1994; Sahoo & Chand, 1998).

ریشه‌زایی شاخساره

درصد ریشه‌زایی

استفاده از غلظت‌های مختلف اکسین (۰، ۰/۳، ۰/۶ و ۰/۹ میلی‌گرم در لیتر) نشان داد، بیشترین میزان ریشه‌زایی در غلظت ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر از اکسین‌ها و کمترین درصد ریشه‌زایی در غلظت ۰/۹ میلی‌گرم در لیتر مشاهده شد (جدول ۶). برابر جدول ۵ بیشترین و کمترین درصد ریشه‌زایی به ترتیب مربوط به محیط MS حاوی ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر NAA (۱۰۰ درصد) و محیط MS ۱/۲ حاوی ۰/۹ میلی‌گرم در لیتر NAA (۰) است (شکل۵-ج).

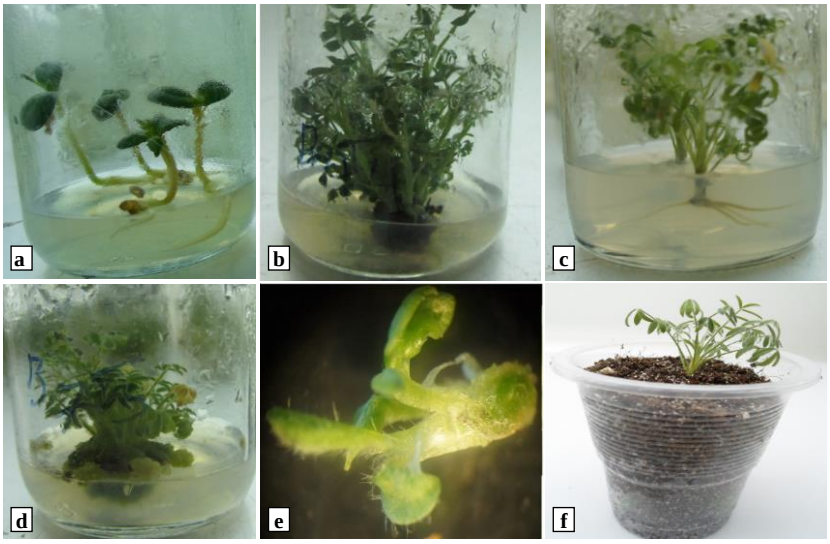
جدول ۵. مقایسهٔ میانگین تأثیر متقابل نوع و غلظت اکسین در نوع محیط کشت بر درصد ریشهٔ گون گزانگبین

Table 5. Mean comparison interaction of kind and concentrations cytokinins effect on proliferation of Gavane-gaz-angubin

Medium culture	Auxin	Auxin concentration (mg/l)			
		0	0.3	0.6	0.9
MS	IBA	30^{bcd}	15^{cd}	30^{bcd}	30^{bcd}
	NAA	30^{bcd}	100^{a}	45^{bc}	15^{cd}
1/2MS	IBA	15^{cd}	60^{ab}	30^{bcd}	30^{bcd}
	NAA	15^{cd}	15^{cd}	30^{bcd}	0^{cd}

حروف مشترک در هر صفت بیانگر نبود اختلاف معنی‌دار میانگین‌ها بر پایهٔ آزمون LSD (p<۰/۰۵) است.

Mean within a column followed by the same latter are not significantly different at p<0.05 according to the LSD test.



شکل ۵. a)گیاهچه‌های تولیدشده از بذر، b) پرآواری ریزنمونهٔ کشت‌شده، c) گیاهچهٔ ریشه‌دارشده، d) تولید پینه در غلظت‌های بالای سیتوکینین، e) باززایی گیاه کامل از پینه، f) گیاهچهٔ سازگارشده

Figure 5. a) Seedling from seed, b) proliferation of cultured explant, c) Rooted seedling, d) Callus production in high concentration of cytokinine, e) Plant regeneration from callus, f) Adapted plant

میزان ریشه‌زایی در برخی از گونه‌ها همانند این آزمایش در حدود ۵۰ درصد بود (Hung & Xie, 2008). استفاده از غلظت‌های بالای اکسین منجر به تشکیل تودهٔ پینه در انتهای شاخساره‌ها شد که با نتایج Steephen *et al.* (2010) و Hung & Xie (2008) هماهنگ است. افزون بر آن حضور همیشگی اکسین در محیط ریشه‌زایی و غلظت بالای آن منجر به کاهش شمار و طول ریشه‌ها می‌شود چراکه حضور اکسین برای القاء ریشه لازم است و برای طویل شدن ریشه‌ها نیازی به حضور اکسین نیست (Behroznam *et al*., 2008).

طول ریشه

نتایج تجزیهٔ واریانس داده‌ها اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای مختلف نشان نداد (p<۰/۰۵). مقایسهٔ میانگین‌ها نشان داد استفاده از محیط کشت MS سبب رشد بیشتر ریشه شد. همچنین IBA نسبت به NAA در رشد طولی ریشه‌ها مؤثرتر بود (جدول ۶). افزایش غلظت اکسین سبب افزایش طول ریشه‌ها شد و این افزایش طول در بیشتر مواقع با کاهش شمار ریشه‌های جانبی همراه بود. افزایش غلظت اکسین افزون بر کاهش درصد ریشه‌زایی منجر به تولید ریشه‌های بلند و بدون انشعاب‌های فرعی می‌شود (Vidoz, 2006). در برخی از تیمارها تشکیل تودهٔ پینه در انتهای شاخساره‌ها و در برخی موارد در اطراف ریشه‌ها مشاهده شد.

شمار ریشه‌های اصلی

نتایج تجزیهٔ واریانس داده‌ها اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای مختلف نشان نداد (جدول ۶). مقایسهٔ میانگین‌ها نشان داد محیط کشت ۱/۲MS سبب تولید ریشهٔ اصلی بیشتری نسبت به محیط کشت MS شد. همچنین از نظر تأثیر اکسین IBA در تولید ریشه‌های اصلی مؤثرتر از NAA بود. بیشترین و کمترین شمار ریشهٔ اصلی به ترتیب در محیط ۱/۲MS حاوی ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر IBA (شش عدد) و محیط ۱/۲MS حاوی ۰/۹ میلی‌گرم در لیتر NAA (یک عدد) مشاهده شد. افزایش غلظت NAA منجر به کاهش شمار ریشه‌های اصلی می‌شود و از سوی دیگر منجر به تولید ریشه‌های ضخیم و بدون ریشهٔ جانبی می‌شود (Puspashree & Shiba, 2012). به‌طورکلی از نظر شمار ریشهٔ اصلی محیط ۱/۲MS حاوی ۰/۳ تا ۰/۶ میلی‌گرم در لیتر IBA بهترین تیمار است.

شمار ریشه‌های فرعی

نتایج تجزیهٔ واریانس داده‌ها اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای مختلف نشان نداد. مقایسهٔ میانگین‌ها نشان داد که شمار ریشهٔ جانبی در محیط کشت ۱/۲MS بیشتر از MS و در محیط‌های حاوی IBA بیشتر از NAA بود (جدول ۶). همچنین افزایش غلظت اکسین منجر به کاهش شمار ریشه‌های جانبی شد. بیشترین شمار ریشه‌های جانبی در محیط کشت ۱/۲MS حاوی ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر IBA و کمترین شمار در محیط کشت ۱/۲MS حاوی ۰/۹ میلی‌گرم در لیتر NAA به دست آمد، هرچند در هیچ‌کدام از موارد بالا اختلاف معنی‌دار نبود.

گیاهچه‌های تولیدشده در آغاز در اتاق رشد و در لیوان‌های حاوی مخلوط خاک، پیت و پرلیت (۱:۱:۱) به نسبت حجمی برابر سازگار شدند (شکل۵- چ). ازآنجایی‌که اغلب شمار ریشه‌های جانبی در این گیاه کم است به‌سختی به شرایط بیرون سازگار می‌شوند.

جدول ۶. مقایسهٔ میانگین تأثیر محیط کشت، اکسین و غلظت اکسین بر ریشه‌زایی گون گزانگبین

Table 6. Mean comparison medium culture, auxin and auxin concentrations effect on rooting of Gavane-gaz-angubin

Simple effects		Rooting (%)	Main root number	Lateral root number	Root length (cm)
Medium culture	MS	40^{a}	1.5^{a}	1.6^{a}	3.6^{a}
	1/2MS	25^{b}	2^{a}	1.5^{a}	3.4^{a}
Auxin	IBA	33.5^{a}	2.2^{a}	1.9^{a}	3.7^{a}
	NAA	31.3^{a}	1.3^{b}	1.2^{a}	3.3^{a}
Auxin concentration (mg/l)	0	25^{b}	1.5^{a}	1.8^{a}	3.7^{a}
	0.3	50^{a}	2^{a}	1.5^{a}	3.8^{a}
	0.6	33.5^{ab}	2.3^{a}	2.2^{a}	2.3^{a}
	0.9	20.1^{b}	1.2^{a}	0.8^{a}	4.2^{a}

حروف مشترک در هر صفت بیانگر نبود اختلاف معنی‌دار میانگین‌ها بر پایهٔ آزمون LSD (p<۰/۰۵) است.

Mean within a column followed by the same latter are not significantly different at p<0.05 according to the LSD test.

نتیجه‌گیری

نتایج به‌دست‌آمده از این پژوهش نشان داد تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشدی مختلف در ریزازدیادی گیاه گزانگبین معنی‌دار است. بنا بر این نتایج می‌توان گفت بین غلظت سیتوکینین مورداستفاده و شمار شاخساره یک رابطهٔ خطی وجود دارد؛ با افزایش غلظت سیتوکینین تا حد بهینه شمار شاخساره‌ها افزایش می‌یابد. البته باید یادآور شد که بیان رابطهٔ دقیق بین غلظت سیتوکینین و شمار شاخساره نیازمند استفاده از غلظت‌های بالاتر از ۴ میلی‌گرم در لیتر نیز است و در آن صورت می‌توان به میزان همبستگی آن‌ها پی برد (Ahmad & Anis, 2007).

انجام واکشت و سپری شدن زمان منجر به باززایی شاخساره‌های جدید از پینه می‌شود که با نتایج دیگر پژوهشگران همخوانی دارد (Mercier *et al.*, 1992; Sudha & Seeni, 1994; Sahoo & Chand, 1998). اما ازآنجایی‌که هدف از این آزمایش پرآوری و تولید گیاهچه‌های همسان والدین بود بنابراین تولید پینه یک عامل منفی است. بررسی نتایج نشان می‌دهد کاربرد NAA تأثیری در پرآوری گیاهچه‌ها نداشت و استفاده از آن به‌ویژه همراه با غلظت‌های بالا از سیتوکینین‌ها در درازمدت سبب تحریک تولید پینه می‌شود. از این پینه‌ها شاخساره‌های زیادی باززایی می‌شود ولی ازآنجایی‌که منشأ این شاخساره‌ها بافت تمایزنیافتهٔ پینه است بنابراین امکان ایجاد تنوع در گیاهچه‌های تولیدی وجود دارد. ایجاد تنوع در کشت بافت و به‌ویژه در باغبانی در افزایش گیاهان با هدف تولید نتاج همانند هم یک عامل منفی به‌شمار می‌آید. از سوی دیگر استفاده از NAA در این آزمایش همراه با غلظت ۴ میلی‌گرم از BAP منجر به رشد طولی بیشتر شاخساره‌ها شد و از تولید گیاهچه‌های با میانگره‌های کوتاه جلوگیری کرد. کاربرد تلفیقی BAP و NAA برای افزایش پرآوری و طویل شدن شاخساره‌ها در پژوهش‌های گذشته نیز گزارش شده است (Mercier *et al.*, 1992; Ahmad & Anis, 2007).

نتایج پژوهش‌های گذشته روی دیگر گونه‌های این جنس نشان می‌دهد طیف گسترده‌ای از انواع محیط‌های کشت و تنظیم‌کننده‌های رشد با غلظت‌های مختلف برای ریشه‌زایی این گونه‌ها استفاده شده است (Hou & Jia, 2004; Uranbey, 2005; Luo *et al.*, 1999). در برخی از گونه‌ها محیط کشت ۱/۲MS همراه و یا بدون کاربرد تنظیم‌کننده‌های رشد نتایج بهتری را به همره داشته است (Başalma *et al.*, 2008; Turgut Kara & Arı, 2006).

در این پژوهش از ترکیب IBA و NAA در غلظت‌های مختلف و همچنین از IBA در غلظت‌های بیش از ۲ میلی‌گرم در لیتر نیز استفاده شد. به‌طورکلی بهترین ترکیب برای پرآوری این گیاه محیط کشت MS حاوی ۴ میلی‌گرم در لیتر BAP است و با افزودن اکسین به محیط شمار شاخساره‌ها به‌شدت افزایش می‌یابد. همچنین ترکیب محیط کشت MS حاوی ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر NAA بهترین محیط برای ریشه‌زایی در این گونه است. این پژوهش گام کوچکی در راه تولید و کشت این گیاه ارزشمند است. برای ارائهٔ دستورکار جامع افزایش این گیاه نیاز به پژوهش‌های بیشتری به‌ویژه درزمینهٔ ریشه‌زایی شاخساره‌ها و سازگار کردن گیاهچه‌های تولیدشده است.

سپاسگزاری

از ریاست محترم پژوهشکدهٔ علوم گیاهی جناب آقای دکتر فارسی و مسئول محترم آزمایشگاه کشت بافت و بیوتکنولوژی سرکار خانم مهندس میرشاهی، تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

1. Ahmad, N. & Anis, M. (2007). Rapid Clonal Multiplication of a Woody Tree, *Vitex negundo* L. Through Axillary shoots Proliferation. *Agroforestry Systems*, 71 (3), 195-200.
2. Azimi, M., Mesdaghi, M. & Farohpor, M. (2005). Study of the relationships of cyamophila dicora loginova population and vegetation parameters of *Astragalus adscendens in feridounshahr. Isfahan. Journal of Science and Technology of Agriculture and Natural* Research, 9 (3), 243-252. (in Farsi)
3. Azimi, M. (2005). *Ecology and habitat management of Astragalus adscendens in Isfahan province (case study of feridoun shahr city).* M.Sc. Thesis. Agriculture Science and Naturel Research, Sari University, Iran.

4. Başalma, D., Uranbey, S., Gürlek, D. & Özcan, S. (2008). TDZ-induced plant regeneration in *Astragalus cicer* L. *African Journal of Biotechnology*, 7(8), 955-959.
5. Behroznam, B., Khoshkhoei, M., Tafazoli, A. & Khalighi, A. (2008). Comparison effect of medium culture and plant growth regulations of proliferation and rooting of Jasminum grandiflorum in vitro culture condition. Journal of Research in Agricultural Science, 4(1), 83-92. (in Farsi)
6. Esmaili, GH. & Azizi, M. (2013). Effect of different concentration of IBA on three types of gaz-e-angubin (*Astragalus adscendens*). In: *2nd National Congress on Medicinal Plant*, 15-16 may. University of Shahid Beheshti, Tehran, Iran, pp, 610.
7. Erisen, S., Yorgancilar, M., Atalay, E., Babaoglu, M. & Duran, A. (2010). Callus induction and plant regeneration of the endemic *Astragalus nezaketae* in Turkey. *Electronic Journal of Biotechnology, ISSN*, 0717-3458.
8. Farahnaky, A., Shojaei, Z.A., Sadeghi. Khomami, A. & Majzoobi, M. (2009). Physicochemical Properties and Rheological Behaviour of Gaz-Angubin. *International Journal of Food Properties*, 12, 347-357.
9. Farsi, M. & Zolala, J. (2011). *Introduction to plant biotechnology* (5th ed.). Ferdowsi University of Mashhad Publication.
10. Hou, S.W. & Jia, J.F. (2004). High Frequency Plant Regeneration from *Astragalus melilotoides* Hypocotyl and Stem Explants via Somatic Embryogenesis and Organogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 79 (1), 95-100.
11. Hung, C.Y. & Xie, J. (2008). Development of an Efficient Plant Regeneration System for the Selenium-Hyperaccumulator *Astragalus racemosus* and the Nonaccumulator *Astragalus Canadensis*. *Horticultural Science*, 43(7), 2138-2142.
12. Jalili Marandi, R., Naseri, L., Mohseniazer, M., Hajitagiloo, R. & Marhamati, M. (2011). Investigation on interaction effect of banzyladenine and chitosan on in vitro proliferation of strawberry (fragaria × ananassa cv. Selva). Agricultural biotechnology, 10 (1), 27-34. (in Farsi)
13. Kardovani, P. (2005). Pastures in Iran problems and solutions (4th ed.). University of Tehran publication.
14. Li, R.J., Qiu, S-D., Chen, H.X., Tian, H. & Wang, H.X. (2007). The Immunotherapeutic Effects of *Astragalus* Polysaccharide in Type 1 Diabetic Mice. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 30(3), 470-476.
15. Luo, J.P. & Jia, J.F. (1998). Plant Regeneration from Callus Protoplasts of the Forage Legume *Astragalus adsurgens* Pall. *Plant Cell Reports*, 17(6-7), 313-317.
16. Luo, J.P., Jia, J-F., Gu, Y.H. & Liu, J. (1999). High Frequency Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration in Callus Cultures of *Astragalus adsurgens* Pall. *Plant Science*, 143, 93–99.
17. Masomi, A. (1994). *Astragalus of Iran*. Research Institute of Forest and Rangeland Publication, Tehran.
18. Mercier, H., Vieira, C.C.J. & Figueredo-Ribeiro, R.C.L. (1992). Tissue Culture and Plant Propagation of *Gomphrena officinalis*, a Brazilian Medicinal Plant. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 28 (3), 249-254.
19. Mohamadi, M. & Deni, M. (2001). Identification of producing factors, how to produce and operation of manna in Iran. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 17, 79-118. (In Farsi)
20. Puspashree, P. & Shiba, P.R. (2012). In Vitro Micropropagation of *Desmodium Gangeticum* (L.) DC (Fam- *Fabaceae*): A Medicinal Legume through Axillary Bud Multiplication. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 15(10), 477-483.
21. Rout, G.R. (2005). Micropropagation of *Clitoria Ternatea* Linn. (Fabaceae) An Important Medicinal Plant. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 41(4), 516-519.
22. Rolston, M.P. (1978). Water Impermeable Seed Dormancy. *The Botanical Review*, 44(3), 365-960.
23. Rios, JL. & Waterman, P.G. (1997). A review of the Pharmacology and Toxicology of *Astragalus*. *Phytotherapy Research*, 11 (6), 411-418.
24. Samsam Shariat, H. & Moatar, F. (2003). *Plants and natural drugs* (4th ed.). Rozbahan-Tehran publication.
25. Seifallahi, A. & Ebadi, R. (2002). Gaz psyllids species, their distribution and population densities in Isfahan province. *Iranian* Journal of Agricultural Science, 33 (2), 187-196. (in Farsi)
26. Seifollahi, A. & Shafezade, SH. (2002). Rang managements and the need to protect from *Astragalus adscendens* Boiss as hast of Gaz psyllids. *Iranian* Journal of Range and Desert Research, 7(1), 231-240. (in Farsi)
27. Steephen, M., Nagarajan, S. & Ganesh, D. (2010). Phloroglucinol and Silver Nitrate Enhances Axillary Shoot Proliferation in Nodal Explants of *Vitex negundo* L. –an Aromatic Medicinal Plant. *Iranian Journal of Biotechnology*, 8(2), 82-89.
28. Sudha, G.C. & Seeni, S. (1994). In Vitro Multiplication and Field Establishment of *Adhatoda beddomei* CB Clarke, A Rare Medicinal Plant. *Plant Cell Reports*, 13, 203-207.

29. Sahoo, Y. & Chand, K. (1998). Micropropagation of *Vitex negundo* L. a woody aromatic medicinal shrub through high-frequency axillary shoot proliferation. *Plant Cell Reports*, 18(3-4), 301-307.
30. Turgut-Kara, N. & Ar, S. (2006). Micropropagation of *Astragalus maximus* willd. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 20(1), 20-23.
31. Uranbey, S. (2005). Thidiazuron Induced Adventitious Shoot Regeneration in *Hyoscyamus niger*. *Biologia Plantarum*, 49(3), 427-430.
32. Vidoz, M. L. (2006). *Tissue Culture of Trifolium polymorphum, T. carolinianum, Adesmia latifolia, A. bicolor and Lotononis bainesii.* Abstract of Thesis Presented to the Graduate School of the University of Florida in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science.

Iranian Journal of Horticultural Science, Vol. 47, No. 2, Summer 2016

Study on the effect of plant growth regulations (PGRs) on micropropagation of gavane-gaz-angubin (*Astragalus adscendens* Boiss & Haussk) via apical meristem

Ghasem Esmaeili[1], Majid Azizi[2*], Hossein Aroei[3] and Leila Samiei[4]
1, 2, 3. Former M.Sc. Student, Professor and Assistant Professor, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
4. Assistant Professor, Research Center for Plant Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
(Received: Feb. 8, 2014 - Accepted: Dec. 28, 2014)

ABSTRACT

Gavane-gaz-angubin (Persian Manna) belongs to *Astragalus* genus (*Leguminosae*). This plant is one of the most important species in Iran for its medicinal value. Considering the low propagation rate of this plant from seed and cutting, the feasibility of *in-vitro* propagation of this plant was investigated. Effect of different types and concentrations of cytokinins such as BAP, KIN, and Ze (0.5, 1, 2 and 4 mg/l) in combination with NAA (0, 0.5 mg/l) were evaluated for production of apical bud in MS medium. Experiments were conducted in a factorial based on completely randomized design. Shoots were transferred to rooting medium and this medium contained different concentrations (0, 0.3, 0.6, 0.9 mg/l) of IBA or NAA. Results showed that not only the significant effect of different types and concentrations of cytokinins, but also confirmed effect of various concentrations of NAA on shoots number, leaf number and shoots length. Results indicated that MS medium containing 4 mg/l BAP lead to production of highest shoot number (8.5 shoots per explants) as well as the highest leaf number. The highest rooting production (100%) obtained in MS medium with 0.3 mg/l NAA, Likewise. More than 40 % of plants were adapted in pots with the mixture of soil, peat and perlite (1:1:1, v/v).

Keywords: Gavane gazi, manna, proliferation, rooting, tissue culture.

* Corresponding author E-mail: azizi@um.ac.ir Tel: +98 915 5222478