

اثر هورمون گیاهی و ریز نمونه بر کالزایی و باززایی اسپرس زراعی (*Onobrychis sativa* L.)
Effect of phytohormone and explant on callusgenesis and regeneration of sainfoin
(*Onobrychis sativa* L.)

حمید گرشاسبی^۱، منصور امیدی^۲، سپیده ترابی^۳ و داریوش داودی^۴

چکیده

گرشاسبی، ح.، م. امیدی، س. ترابی و د. داودی. ۱۳۸۸. اثر هورمون گیاهی و ریز نمونه بر کالزایی و باززایی اسپرس زراعی (*Onobrychis sativa* L.). مجله علوم زراعی ایران: ۱۱ (۲): ۱۰۸-۱۰۱.

در این آزمایش که در بهار و تابستان ۱۳۸۵ در آزمایشگاه دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران انجام شد، یک روش برای تکثیر درون شیشه ای اسپرس زراعی واریته چادگان (*Onobrychis sativa* Var. Chadegan) ابداع شد. هدف این تحقیق تعیین بهترین ریز نمونه و تیمار هورمونی برای تولید بیشترین کالوس و باززایی از اسپرس زراعی بود. در این آزمایش دو نوع هورمون [2,4-D و بنزیل آمینوپورین (BAP)] و ۴ نوع ریز نمونه (برگ کوتیلدونی، مریستم انتهایی ساقه، ساقه و ریشه) مورد استفاده قرار گرفتند. نتایج نشان داد که بیشترین کالوس زایی در محیط موراشیک و اسکوک (Ms) حاوی ۱/۵ میلی گرم در لیتر BAP + ۴ میلی گرم در لیتر 2,4-D + مریستم انتهایی ساقه و یک میلی گرم در لیتر BAP + ۲ میلی گرم در لیتر 2,4-D + مریستم انتهایی ساقه به ترتیب با میانگین های ۱/۷۷ و ۱/۷۶ عدد کالوس و بیشترین باززایی در محیط Ms حاوی ۴ میلی گرم در لیتر BAP با میانگین ۱/۶ گیاه باززا شده در ظرف پتری بدست آمد. گیاهچه ها ریشه دار شده قابلیت رشد و نمو در گلخانه را دارا بودند.

واژه های کلیدی: اسپرس زراعی، باززایی، ریز نمونه، کالوس زایی و هورمون.

تاریخ دریافت: ۱۳۸۷/۴/۱۶

۱- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران (مکاتبه کننده)
پست الکترونیک: englab2005@yahoo.com

۲- دانشیار گروه بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه تهران

۳- عضو هیات علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران

۴- عضو هیات علمی موسسه تحقیقات بیوتکنولوژی کشاورزی کرج

اسپرس از تیمارهای هورمونی ۲ میلی گرم در لیتر BAP + ۰/۰۱ میلی گرم در لیتر IBA یا ۲ میلی گرم در لیتر BAP + ۰/۰۱ میلی گرم در لیتر NAA و یا ۸ میلی گرم در لیتر BAP + ۰/۰۵ میلی گرم در لیتر NAA بدست آمد (Sancak, 1998). هدف از اجرای این آزمایش بررسی اثر ریزنمونه ها و تیمارهای هورمونی در کشت درون شیشه ای اسپرس بر کالوس زایی و باززایی گیاهان کامل بود.

مواد و روش ها

این آزمایش در بهار و تابستان سال ۱۳۸۵ در مجتمع آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران انجام شد. بذراسپرس مورد استفاده در آزمایش که از توده های بومی منطقه چادگان اصفهان بود از دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران تهیه شد. بذرهای اسپرس بعد از ضدعفونی کردن سطحی با الکل ۷۰ درصد و محلول هیپوکلریت سدیم ۲۵ درصد (Bagheri and Safari, 2004) بمدت یک دقیقه، روی محیط محلول آگار (حاوی ۷ گرم در لیتر آگار و ۳۰ گرم در لیتر ساکارز) در ظروف پتری کشت داده شدند. ظروف پتری بعد از پیچیدن پارافیلیم، به مدت ۱۰ روز در ژرمیناتور با دمای ۲۰-۲۲ درجه سانتیگراد با ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار داده شدند. در ۷ تا ۱۰ روز بعد از کشت، گیاهچه ها ۶ تا ۱۰ سانتی متر رشد کردند. با استفاده از تیغ جراحی ضدعفونی شده و در زیر هود استریل، گیاهچه ها به ۴ قطعه ۵ میلی لیتری تقسیم شدند. ریزنمونه ها شامل برگ های کوتیلدون، مریستم نوک ساقه، ساقه و ریشه بودند. ۱۰ عدد از هر نوع ریزنمونه در داخل ظروف پتری ۹ سانتی متری شیشه ای حاوی محیط کشت MS و یک نوع تیمار هورمونی قرار داده شدند. ظروف پتری ابتدا به مدت یک هفته در تاریکی مطلق در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد برای تولید کالوس و سپس یک ماه در دوره نوری متناوب ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی

اسپرس یکی از گیاهان علوفه ای از خانواده بقولات با ۲۸ کروموزوم ($2n = 4x = 28$) و اتوتتراپلوئید است. ارزش غذایی اسپرس در تغذیه دام در درجه دوم اهمیت پس از یونجه قرار دارد. اسپرس گیاهی بسیار مقاوم به عوامل نامساعد طبیعی نظیر سرما و خشکی و همچنین مقاوم به آفات و بیماریهایی است که یونجه در برابر آنها حساس است و در صنعت زنبورداری به علت گلهای فراوان آن مورد توجه زیادی قرار دارد. روش های جدید اصلاحی و بیوتکنولوژی امکان تولید وارسته های جدید و پر محصولی که بخشی از نیاز علوفه ای کشور را تامین کند، فراهم آورده است (Garshasbi, 2006).

امیدی و همکاران (Omidi et al., 1992) با آزمایشی درباره کشت مریستم در اسپرس گزارش کردند که محیط کشت مایع حاوی ۰/۴ میلی گرم در لیتر اسید جیبرلیک (GA)، ۰/۵ میلی گرم در لیتر بنزیل آمینو پورین (BAP) و ۰/۰۱ میلی گرم در لیتر نفتالین استیک اسید (NAA) بیشترین تاثیر را بر رشد قسمت های هوایی گیاه داشت. برای تولید بیشتر کالوس، حذف دو هورمون GA و NAA و افزودن هورمون اندول بوتیریک اسید (IBA) به میزان ۰/۰۵ میلی گرم در لیتر اثر مثبت بیشتری داشت.

در یک آزمایش توانایی باززایی قسمت های مختلف گیاه اسپرس در حضور NAA و BAP آزمایش شد. ریز نمونه هایی از قسمت های مختلف گیاه شامل برگچه، ساقه و دمبرگ ها در معرض غلظت های مختلف هورمونی قرار داده شدند و مشاهده شد که ریزنمونه ساقه در حضور هورمون BAP توانایی بهتری در تولید قسمت های هوایی داشت (Ozcan et al., 1996). در یک آزمایش تعداد زیادی گیاه جدید اسپرس از باززایی جنین های محوری در محیط موراشیک و اسکوگ (MS) با هورمون های مختلف در طول ۸ هفته بدست آمد. مصرف غلظت های مختلف BAP، IBA و NAA نشان داد که بهترین باززایی

در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد در انکوباتور قرار داده شدند تا کالوس ها به قدر کافی رشد کنند. آزمایش کالوس زایی به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک های کامل تصادفی در ۳ تکرار، ۴ نوع ریزنمونه، ۴ غلظت هورمون BAP (صفر، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی گرم در لیتر) و ۴ غلظت هورمون 2,4-D (صفر ۰، ۲، ۴ و ۶ میلی گرم در لیتر) به اجرا گذاشته شد. رشد کالوس های تولید شده بر اساس مقیاس برز (Garshasbi, 2006) یادداشت برداری شد. در مرحله بعد آزمایش، باززایی کالوس های تولید شده در معرض غلظت های مختلف دو هورمون BAP و 2,4-D مورد ارزیابی قرار گرفت. در این آزمایش سطوح هورمونی BAP شامل (صفر، ۱/۵ و ۴ میلی گرم در لیتر) و سطوح هورمونی 2,4-D شامل (صفر، ۱/۰ و ۰/۳ میلی گرم در لیتر) استفاده شدند. کالوس ها در ظروف پتری به مدت یک ماه در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سانتیگراد با طول روز ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار داده شدند و سپس تعداد کالوس های باززایی شده شمارش شد. آزمایش به صورت فاکتوریل با دوفاکتور 2,4-D و BAP در ۳ تکرار در قالب طرح بلوک های کامل تصادفی اجرا شد. هدف از آزمایش باززایی، بررسی اثر غلظت های بیشتر BAP نسبت به 2,4-D در باززایی بود. در مرحله بعد گیاهان باززا شده در معرض تیمارهای هورمونی و سرما ریشه دار شده و در گلدان های حاوی پرلیت یا پیت ماس در گلخانه سازگار شده و سپس به محیط خاک انتقال داده شدند. (Bagheri and Safari, 2004). تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از نرم افزار Mstat-C و رسم نمودار با استفاده از نرم افزار Excel انجام شد.

نتایج و بحث

۱- بررسی اثر هورمون ها و ریزنمونه بر میزان کالوس زایی تجزیه واریانس داده ها نشان داد که به استثنای اثر ریزنمونه $BAP \times$ ، سایر تیمارهای آزمایشی بر تعداد

کالوس های تولید شده اثر معنی دار داشتند (جدول ۱). بررسی اثر متقابل ریزنمونه $2,4-D \times$ بر تعداد کالوس ها نشان داد که بیشترین کالوس زایی را ریزنمونه ریشه + ۲ میلی گرم در لیتر 2,4-D با میانگین ۱/۴۹۴ عدد کالوس در هر ظرف پتری دارا بود (جدول ۲). کمترین کالوس زایی مربوط به ریزنمونه برگ کوتیلدونی و بدون 2,4-D با میانگین ۰/۲۲۳ عدد کالوس در هر ظرف پتری بود. این نتایج با نظرسایر محققان مطابقت داشت (Lanas et al., 2006). به طور کلی با افزایش 2,4-D در محیط کشت در هر نوع ریزنمونه، افزایش کالوس مشاهده شد ولی در ریزنمونه هایی مانند برگ های کوتیلدونی تا غلظت ۶ میلی گرم در لیتر 2,4-D، تعداد کالوس ها افزایش و در بقیه ریزنمونه ها، تا غلظت دوم در کالوس زایی افزایش حاصل شد و بعد از آن با افزایش غلظت هورمون، میزان کالوس زایی کاهش یافت که به نظر می رسد به دلیل اثر متقابل ریزنمونه و غلظت 2,4-D بود.

بررسی اثر متقابل $BAP \times 2,4-D$ بر کالوس زایی گیاه اسپرس نشان داد که بیشترین تعداد کالوس در هر ظرف پتری مربوط به تیمار هورمونی ۱/۵ میلی گرم در لیتر $BAP + 2,4-D$ با میانگین ۱/۴۹۴ کالوس و کمترین تعداد کالوس در تیمار بدون هورمون با میانگین ۰/۰۸۰ بود (جدول ۳). اثر متقابل هورمون ها همراه با برتری نسبی 2,4-D به BAP باعث حداکثر کالوس زایی شد و در شرایط عدم حضور 2,4-D یا BAP یا هر دو هورمون یا افزایش نسبت BAP به 2,4-D، میزان کالوس زایی کاهش یافت. ایمانی (Eemani, 1374) بهترین محیط کشت برای کالوس زایی سورگوم را در محیط MS حاوی ۵ میلی گرم در لیتر 2,4-D و یک میلی گرم در لیتر BAP معرفی نمود، که با نتایج آزمایش حاضر مطابقت داشت.

بررسی اثر متقابل ریزنمونه $BAP \times 2,4-D$ بر کالوس زایی گیاه اسپرس نشان داد که بیشترین تعداد کالوس در ریزنمونه مرستم انتهایی ساقه + ۱/۵ میلی گرم

در لیتر BAP + ۴ میلی گرم در لیتر 2,4-D با متوسط ۱/۷۷، کالوس زایی از ریزنمونه های بالای شاخساره و مریستم انتهایی ساقه + یک میلی گرم در لیتر BAP + ۲ میلی گرم در لیتر 2,4-D و مریستم انتهایی ساقه + یک میلی گرم در لیتر BAP + ۶ میلی گرم در لیتر 2,4-D، هر دو با میانگین ۱/۷۶۳ و کمترین تعداد کالوس در ریزنمونه ریشه + ۶ میلی گرم در لیتر 2,4-D یا ریزنمونه ساقه + ۶ میلی گرم در لیتر 2,4-D مشاهده شد. در مجموع بیشترین کالوس زایی از ریزنمونه های پایین تر و غیر مریستمی و نسبت بیشتر BAP به 2,4-D و یا عدم حضور یکی یا هر دو هورمون بدست آمد.

جدول ۱- تجزیه واریانس تعداد کالوس هادر انواع هورمون و ریزنمونه های اسپرس

Table 1. Analysis of variance for callus number in hormone type and explant in sainfoin

S.O.V	منابع تغییر	درجه آزادی df	میانگین مربعات MS
Explant	ریزنمونه	3	0.855 ^{ns}
BAP	بنزیل آمینو پورین	3	4.514**
explant×BAP	بنزیل آمینو پورین × ریزنمونه	9	0.408 ^{ns}
2-4-D	توفوردی	3	6.477**
explant × 2-4-D	توفوردی × ریزنمونه	9	0.645*
2-4-D +BAP	توفوردی × بنزیل آمینو پورین	9	1.081**
2-4-D × BAP×Explant	ریزنمونه × بنزیل آمینو پورین × توفوردی	27	0.568**
Error	خطای آزمایش	126	0.310
(%)C.V	ضریب تغییرات (درصد)		54.22

ns: Non- Significant.

ns: غیر معنی دار

*and**: Significant at 5% and 1% probability levels, respectively

*و**: به ترتیب معنی دار در سطوح احتمال پنج و یک درصد

جدول ۲- مقایسه میانگین تعداد کالوس ها در تیمارهای اثرات متقابل ریزنمونه 2,4-D × در گیاه اسپرس

Table 2- Mean comparison of callus number in explant × 2, 4-D interaction in sainfoin

شماره Number	(ریزنمونه 2,4-D ×) (Explant×2,4-D) (mg.l ⁻¹)	تعداد کالوس ها Number of Callus
1	0 × (Cotyledon leaf)	0.223g
2	2 × (Cotyledon leaf)	0.149abcde
3	4 × (Cotyledon leaf)	1.202abcd
4	6 × (Cotyledon leaf)	1.416abc
5	0 × (Apical meristem)	0.326fg
6	2 × (Apical meristem)	1.457ab
7	4 × (Apical meristem)	1.366abc
8	6 × (Apical meristem)	1.318abc
9	0 × (Stem)	0.653efg
10	2 × (Stem)	1.159abcde
11	4 × (Stem)	0.982abcde
12	6 × (Stem)	0.954bcde
13	0 × (Root)	0.763def
14	2 × (Root)	1.494a
15	4 × (Root)	1.045abcde
16	6 × (Root)	0.918cde

در هر ستون و برای هر تیمار میانگین هایی که دارای حروف مشابه هستند براساس آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح پنج درصد تفاوت معنی داری ندارند Means in each column and for each treatment followed by similar letter(s) are not significantly different at 5% probability level - using Duncan's Multiple Range Test

جدول ۳- مقایسه میانگین تعداد کالوس ها در تیمارهای اثرات متقابل هورمون های 2,4-D×BAP در گیاه اسپرس

Table3- Mean comparison of callus number in BAP× 2,4-D interaction in sainfoin

شماره Number	2,4-D×BAP(mg.l ⁻¹)	تعداد کالوس ها Number of callus
1	0×0	0.080 g
2	2×0	1.147 abcde
3	4×0	1.205 abcd
4	6×0	1.416 abc
5	0×0.5	0.326 fg
6	2×0.5	1.457 ab
7	4×0.5	1.365abc
8	6×0.5	1.316 abc
9	0×1	0.653ef
10	2×1	1.159 abcde
11	4×1	0.982 abcde
12	6×1	0.945bcd
13	0×1.5	0.763def
14	2×1.5	1.494a
15	4×1.5	1.047abcde
16	6×1.5	0.918 cde

در هر ستون و برای هر تیمار میانگین هایی که دارای حروف مشابه هستند بر اساس آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح پنج درصد تفاوت معنی داری ندارند Means in each column and for each treatment followed by similar letter(s) are not significantly different at 5% probability level- using Duncan's Multiple Range Test

جدول ۴ - تجزیه واریانس کالوس های باززایی شده در تیمارهای هورمونی در گیاه اسپرس

Table 4-Analysis of variance for regenerated callus in hormonal treatment in sainfoin

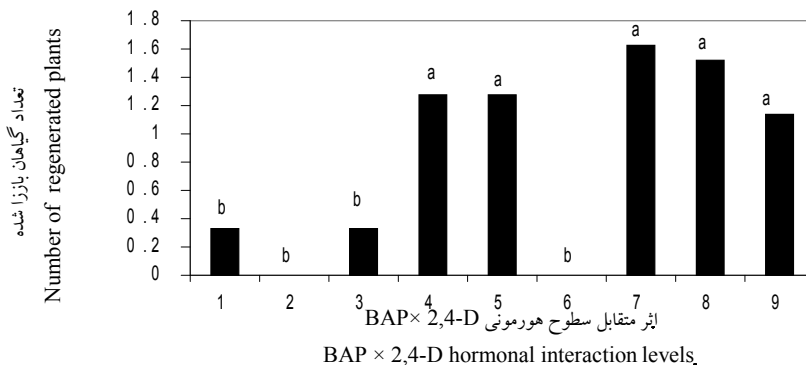
S. O. V	منابع تغییر	درجه آزادی df	میانگین مربعات MS
BAP	بنزیل آمینو پورین	3	3.274**
2,4-D	توفوردی	3	0.843**
BAP × 2,4-D	توفوردی × بنزیل آمینو پورین	9	0.547**
Error	خطای آزمایش	16	0.108
C.V (%)	ضریب تغییرات (درصد)		16.43

ns: Non- Significant

ns: غیر معنی دار

**و*: به ترتیب معنی دار در سطوح احتمال پنج و یک درصد

and: Significant at 5% and 1% probability levels, respectively



شکل ۱- اثر متقابل دو نوع هورمون BAP و 2,4-D بر میزان باززایی اسپرس

Fig 1. Effect of BAP × 2,4-D interaction of sainfoin

۲- بررسی اثر تیمارهای هورمونی بر باززایی گیاه اسپرس

تجزیه واریانس داده ها نشان داد که هر سه منبع هورمونی تاثیر معنی داری بر باززایی گیاه اسپرس داشتند (جدول ۴). مقایسه میانگین های اثر متقابل دو نوع هورمون $2,4-D \times BAP$ بر باززایی اسپرس در شکل یک نشان داده شده است. تیمارهای هورمونی $0/1$ میلی گرم در لیتر BAP و $0/1$ میلی گرم در لیتر BAP + $0/3$ میلی گرم در لیتر $2,4-D$ به ترتیب با میانگین $1/6$ و $1/5$ عدد گیاه باززا شده در هر ظرف پتری، بیشترین باززایی را نشان دادند و در تیمارهای هورمونی $0/1$ میلی گرم در لیتر $2,4-D$ و $1/5$ میلی گرم در لیتر BAP + $0/3$ میلی گرم در لیتر $2,4-D$ هیچگونه باززایی مشاهده نشد. بیشتر بودن نسبت BAP به $2,4-D$ باعث بیشترین باززایی شد. همانند کالوس زایی، بین هورمون ها اثر متقابل افزایشی وجود نداشت. هورمون BAP نقش اصلی را در باززایی داشت و $2,4-D$ در حضور و عدم حضور BAP یک بازدارنده باززایی بود که این موضوع با نتایج سایر محققان مطابقت داشت (Tamas and Savatti, 2006 و Neves et al., 2001).

در مجموع به نظر می رسد که بیشتر بودن نسبت اکسین ($2,4-D$) به سیتوکینین (BAP) باعث افزایش کالوس زایی تا حد مشخصی شده و بعد از آن کالوس زایی کاهش یافت. هورمون های BAP و $2,4-D$ تاثیر مثبتی بر کالوس زایی داشتند، بین اثرات متقابل هورمون های BAP و $2,4-D$ در کالوس زایی اثر متقابل افزایشی وجود داشت و ریزنمونه های قسمت هوایی و

مریستمی، تعداد کالوس بیشتری تولید کردند. بیشترین تولید کالوس مربوط به ریزنمونه مریستم انتهایی ساقه و تیمار هورمونی 4 میلی گرم در لیتر $2,4-D + 1/5$ میلی گرم در لیتر BAP بود. در آزمایش باززایی، افزایش BAP به تنهایی تا غلظت 4 میلی گرم در لیتر نسبت به $2,4-D$ ، باعث افزایش باززایی در اسپرس شد. به نظر می رسد که هورمون BAP تاثیر مثبت و هورمون $2,4-D$ اثر منفی بر باززایی داشتند و بین دو هورمون در باززایی اثر متقابل وجود نداشت. در مجموع به نظر می رسد که ریزنمونه های مریستم نوک ساقه و برگ کوتیلدونی اسپرس در نسبت بالاتر هورمون $2,4-D$ به BAP، بیشترین کالوس زایی و کالوس هایی که تحت تاثیر غلظت های بالای BAP به تنهایی بودند، بیشترین باززایی را نشان دادند. دوهورمون گیاهی $2,4-D$ و BAP در حضور هم در کالوس زایی اثر متقابل افزایشی ولی در باززایی، اثر متقابل نداشتند. به طور کلی پیشنهاد می شود که با توجه به اهمیت گیاه اسپرس، اثرات هورمون ها و غلظت های هورمونی دیگر نیز در کشت بافت این گیاه مورد ارزیابی قرار داده شود.

سپاسگزاری

از ریاست محترم مجتمع آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران دکتر آبرومند و مسئول آزمایشگاه مهندس حاج منصور کمال تشکر و قدردانی را داریم.

References

- Bagheri, A. and M. Safari. 2004.** In vitro culture of higher plants, Ferdowsi Mashhad University Publications. PP 495 (In Persian).
- Eemani, M. 1996.** The use of tissue culture for producing double haploide lines in sorghum. M.Sc. Thesis. Tarbiat Modarress University. Tehran. Iran (In Persian).
- Garshasbi, H. 2006.** The study of effect of hormon and explant on calloungencis and regeneration of sainfoin (*Onobrychis sativa*) and study of cytogenetics of sainfoin. MSc. Thesis. Islamic Azad University. Sciences

منابع مورد استفاده

and Research Unit. Thran, Iran (In Persian).

Lanas, I., P. Gallego, L. Martin, J. Fernandez., A. Alonso, J. Elena-Rosello, A. Blazquez, N. Villalobos and H. Guerra. 2006. In vitro culture of *Medicago arborea* L. anthers: Initial response. *Plant Growth Reg.* 49(1): 49-60.

Neves, L. O., L. Tomaz and M.P.S. Feveireiro. 2001. Micropropagation of *Medicago truncatula* Gaertn. Cv. Jemalong and *Medicago truncatula* ssp. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 67(1): 81-84.

Omidi, M., B. Gerami and A. Moshari. 1992. Meristem culture in sainfoin. *Iranian J. of Agric. Sci.* 3. 4(23): 49-57 (In Persian with English abstract).

Ozcan, S. C., S. Sevimay, M. Yddlz, C. Sancak and M. Ozgen. 1996. Prolific shoot regeneration from immature embryo explants of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*). *Plant Cell Reports.* 16: 200-203.

Sancak, C. 1998. In vitro micropropagation of sainfoin (*O.vicifolia*). *Tubitak.* 23: 133-136.

Tamas, E. and M. Savatti. 2006. In vitro micropropagation of sainfoin (*Onobrychis vicifolia* Scop.) *Agricultura.* 1 -2 : 57- 58.

Effect of phytohormone and explant on callusgenesis and regeneration of sainfoin (*Onobrychis sativa* L.)

Garshasbi¹, H., M. Omid², S. Torabi³ and D. Davoudi⁴

ABSTRACT

Garshasbi, H., M. Omid, S. Torabi and D. Davoudi. 2009. Effect of phytohormone and explant on callusgenesis and regeneration of sainfoin (*Onobrychis sativa* L.). **Iranian Journal of Crop Sciences. 12 (1): 101-108 (In Persian).**

To study the effects of phytohormone and explant on the callusgenesis and regeneration of Sainfoin (*Onobrychis sativa* L. var. Chadegan) an experiment was conducted in the biotechnology laboratory of Sciences and Research Unit, Islamic Azad University, Tehran, Iran in summer and spring of 2006. In this experiment, two phytohormones (2,4-D and BAP) and 4 explants (cotyledon leaf, apical meristem, stem, and root) were used. The highest number of callus was obtained on the MS medium containing 2,4-D (4 mg.l^{-1}) + BAP (1.5 mg.l^{-1}) + apical meristem explant and 2,4-D (2 mg.l^{-1}) + BAP (1 mg.l^{-1}) + apical meristem explant with means of 1.77 and 1.76 callus, respectively. The highest regeneration was obtained in MS medium containing BAP (4 mg.l^{-1}) with mean of 1.6 regenerated plants. A new method for *in vitro* micropropagation of Sainfoin (*Onobrychis sativa* Var Chadegan) was developed. Seedlings with root were transferred to greenhouse and continued growing.

Key words: Callusgenesis, Explant, Phytohormone, Regeneration and sainfoin.

Received: July, 2008

1- Former M.Sc. student, Sciences and Research Unit, Islamic Azad University, Tehran, Iran. (Corresponding author)

E-mail: engelab2005@yahoo.com

2- Associate Prof., The University of Tehran, Karaj, Iran

3- Faculty member, Sciences and Research Unit, Islamic Azad University, Tehran, Iran

4- Assistant Prof., Agricultura Biotechnology Research Institute, Karaj, Iran