

شود (۳ و ۱۸). همچنین از قسمت‌های هوایی گونه‌های بارهنگ معمولاً در درمان تعدادی از بیماری‌های مرتبط با پوست، دستگاه تنفس، گوارش، تولیدمثل و همچنین در برابر عفونت‌ها استفاده می‌گردد (۳۵).

فرار اشاره کرد (۱۰). ترکیبات فیتوشیمیایی موجود در برگ، ریشه و بذرهای بارهنگ باعث خواص درمانی قابل توجهی در این گیاه شده که شامل خواص ضد ویروس، ضد میکروب، ضد التهاب، ضد درد، ضد هیستامین، ضد روماتیسم، ضد سرطان، ضد زخم و کاهش فشار خون می‌-



شکل ۱- گیاه خودرو بارهنگ کبیر (*Plantago major*)

(۱۵). کالوس‌زایی متفاوت در ریزنمونه‌های گیاهی می‌تواند به دلیل فعالیت‌های متابولیکی متفاوت و میزان هورمون‌های درونزا باشد و ممکن است تیمار با اکسین به عنوان یک وضعیت تنش‌زا توسط بافت گیاه تلقی گردد و روند تقسیمات سلولی را به سوی جنین‌زایی تغییر دهد (۲۳). اکثر باززایی‌ها از ریزنمونه‌های گیاهی به صورت غیرمستقیم و از طریق القاء کالوس اتفاق می‌افتد که این روش گاهی باعث ایجاد تنوع سوماکلونی می‌شود. به همین منظور از روش باززایی مستقیم برای تکثیر استفاده می‌گردد که دارای مزیت‌های بیشماری است. از آن جمله می‌توان به سهولت تهیه ریزنمونه، قابلیت باززایی بالا و کاهش زمان اشاره کرد (۱۶). اخیراً این گیاه مورد توجه محققان زیادی بوده است (۴۲).

باتوجه به پیشینه بسیار طولانی در استفاده از بارهنگ کبیر به عنوان گیاه دارویی و همچنین به دلیل اهمیت ترکیبات فیتوشیمیایی و فعالیت‌های بیولوژیکی موجود در آن، لازم است که مطالعات بیشتری بر روی این گیاه دارویی انجام گیرد. تکنیک کشت بافت به عنوان ابزاری مهم شناخته شده است که منجر به توسعه ژنوتیپ‌های جدید گیاهی می‌شود (۱۹) همچنین متخصصان ژنتیک و پرورش دهندگان گیاهان، از این تکنیک به عنوان منبع تنوع استفاده می‌کنند (۱۴). کشت بافت این گیاه می‌تواند به تکثیر آن در شرایط درون شیشه‌ای کمک قابل توجهی بکند، زیرا اکثر بذرهای خریداری شده از کلکسیون‌ها، هرباریوم‌های خصوصی و بانک ژن دارای قوه نامیه پایین و درصد جوانه زنی اندکی هستند و اغلب تحقیقات خارج از فصل رشد گیاه صورت می‌گیرد. همچنین بررسی ویژگی‌های جوانه زنی در آزمایشگاه می‌تواند تعیین کننده میزان موفقیت تولید باشد

است، لذا انجام تحقیقات مکرر و بصورت جامع برای دستیابی به روشی کارآمد برای کشت بافت گیاه ضروری بنظر می‌رسد که بتوان از گیاهانی انبوه و عاری از هرگونه بیماری در روند تحقیقات دارویی از جمله تولید متابولیت‌های ثانویه با ارزش و از لحاظ تجاری نیز سودآور استفاده کرد که این موضوع برای کشورهایی همچون ایران که دارای گیاهان دارویی متنوعی هستند، بسیار باارزش می‌باشد. بارهنگ کبیر نیز حاوی متابولیت‌های ثانویه مهم از جمله ایریدوئیدهای اکوین و کاتالپل است که دارای خواص متعددی از جمله ضدالتهاب، ضد سرطان و ضد میکروب هستند، بنابراین کشت‌های درون شیشه‌ای می‌تواند برای تولید این ترکیبات مهم باشد.

بنابراین، هدف از این مطالعه افزایش جوانه زنی بذر و معرفی یک پروتکل ساده، و جامع برای تکثیر این گیاه دارویی با ارزش از طریق القاء کالوس، اندام زایی و باززایی در شرایط بهینه است.

مواد و روشها

تهیه مواد گیاهی و ضدعفونی کردن بذرها: در ابتدا بذر گیاه بارهنگ کبیر از بانک ژن موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع استان تهران در آبان ماه سال ۱۳۹۶ خریداری شد. در ابتدا بذرها سه دفعه با آب مقطر استریل شستشو شدند و در اتانول ۷۰ درصد به مدت ۳۰ ثانیه غوطه‌ور گشتند، سپس بذر با هیپوکلریت سدیم ۵ درصد همراه با یک قطره تئوین-۲۰ به مدت ۱۰ دقیقه و مجدداً با آب مقطر استریل سه دفعه شستشو شدند.

آزمایشات جوانه زنی: در آزمایش اول ۱۰ عدد بذر استریل روی کاغذ صافی و درون پتری دیش ۱۰ سانتی-متری قرارگرفتند و ۱۰ میلی‌لیتر از محلول‌های آزمایش ۱/۱ میلی‌مولار جیبرلین (GA_3) و ۱ میلی‌مولار نیترات پتاسیم (KNO_3) به مدت ۲۴ ساعت به پتری دیش‌ها اضافه گردید. بذرهای تیمار شده در محیط MS با ۸ گرم در لیتر آگار

القاء کالوس از ریزنمونه‌های محور زیر لپه گونه‌های *Plantago* و باززایی از کالوس حاصل از کشت‌های ریشه در محیط MS (۳۰) همراه با ۳-ایندول-۳-استیک اسید (IAA) قبلاً گزارش شده است (۴۱). تشکیل کالوس و باززایی از ریزنمونه‌های محور زیر لپه *P.ovata* نیز بررسی شده است. تولید شاخه‌های جانبی در محیط MS حاوی غلظت‌های مختلف IAA، اسید ایندول ۳- بوتیریک (IBA)، الفانفتالین اسید استیک (NAA)، ۲، ۴ دی کلرو فنوکسی استیک اسید (2,4-D)، ۶-بنزیل آمینو پورین BAP و کینتین (Kin) نیز بررسی شده است. در غلظت ۰/۵ میلی-گرم بر لیتر IBA رشد کالوس همراه با تشکیل ریشه مشاهده شد. 2,4-D کالوس‌زایی را با سرعت یکنواخت با غلظت از ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر تا ۲/۵ میلی‌گرم بر لیتر القاء کرد (۲۲). ریزازدیادی نوک ساقه *P.asiatica* در محیط MS با ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر IAA و ۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP انجام گردید (۲۵). بالاترین مقدار باززایی شاخه از ریزنمونه‌های لپه و محور زیر لپه *P.afra* در محیط MS، حاوی ۰/۲ میلی-گرم بر لیتر تیدیازورون (TDZ) و ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر IBA مشاهده شد. شاخه‌های موجود بهترین ریشه‌دهی را در محیط MS حاوی ۰/۶ میلی‌گرم بر لیتر NAA داشتند (۳۶). در مطالعه‌ای دیگر، کشت درون شیشه‌ای گیاه *P.major* با استفاده از محیط MS همراه با ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر IAA و ۱/۰ میلی‌گرم بر لیتر TDZ گزارش شده است (۲۱). در مطالعه اسماعیلی و همکارانش در ۲۰۱۴، القاء کالوس در ریزنمونه‌های برگ و ریشه گونه *P.major* با استفاده از غلظت‌های مختلف 2,4-D/Kin بهینه گردید. مقایسه الگوهای باندینگ مشتق شده از ۶ آغازگر ISSR نشان داد که کالوس‌ها تنوع سوموکلونال آشکاری را نشان می‌دهند که می‌تواند در نهایت برای سیستم‌های انتخاب آزمایشگاهی مورد بهره برداری قرارگیرند (۹).

بنابراین این گونه نیازمند پروتکل جامع و مناسبی برای بهبود جوانه‌زنی بذر و سپس تکثیر گیاه از طریق القاء کالوس، اندام زایی و باززایی در شرایط درون شیشه‌ای

سیتوکینین ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲ و ۳ میلی‌گرم برلیتر و برای اکسین‌ها صفر، ۰/۲، ۰/۵، ۱ میلی‌گرم برلیتر (NAA)، ۰/۱، ۰/۵، ۱، ۱/۵ میلی‌گرم برلیتر (IAA) و ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲ میلی‌گرم برلیتر (IBA) بودند. برای جلوگیری از قهوه‌ای شدن، القاء کالوس و شاخه‌زایی، هر دو هفته یکبار نمونه‌ها به محیط تازه MS منتقل شدند. ریزنمونه‌ها با باززایی مستقیم به محیط MS بدون هورمون و کالوس‌ها به محیط کشت MS همراه با ۰/۵ میلی‌گرم برلیتر سیتوکینین مربوطه برای القاء شاخه منتقل شدند. گیاهچه‌های باززا شده به محیط بدون هورمون و یا محیط ریشه‌زایی حاوی غلظت ۰/۵ میلی‌گرم برلیتر IBA منتقل شدند. سپس گیاهچه‌های رشدیافته با موفقیت به گلدان حاوی مخلوطی از ۸۰ درصد پیت ماس و ۲۰ درصد پرلیت استریل پس از دو هفته انتقال یافتند و در فواصل منظم، گیاهچه‌ها با محلول هوگلدن آبیاری شدند.

تحلیل آماری: آزمایش فاکتوریل با طرح پایه کاملاً تصادفی (CRD) با سه تکرار و ۱۰ ریزنمونه در هر تکرار استفاده شد. درصد کالوس‌زایی، باززایی و تعداد شاخه در هر ریزنمونه ثبت گردید. داده‌ها با استفاده از تجزیه واریانس مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند و میانگین‌ها با استفاده از آزمون توکی با استفاده از نرم افزار SPSS 21 مقایسه شدند و مقایسه میانگین‌ها از نظر آماری ۵ درصد معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

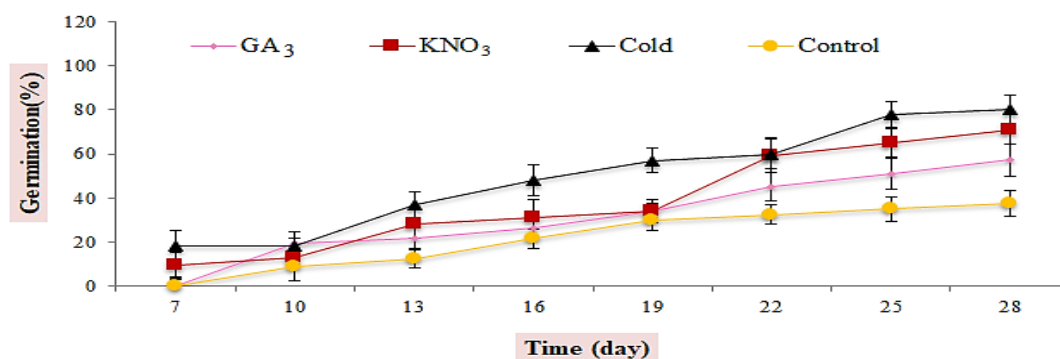
تأثیر عوامل مختلف بر جوانه‌زنی بذر بارهنگ کبیر: در ابتدا، بذره‌های بارهنگ کبیر ضدعفونی شدند و با تیمارهای مختلف GA_3 ، KNO_3 ، سرما و آب مقطر استریل به عنوان شاهد آزمایش شدند. یافته‌ها نشان داد که در هفته اول، اثر پیش تیمار سرما (۱۸ درصد جوانه زنی)، KNO_3 (۹/۴۵ درصد) و GA_3 (صفر درصد) بود و پس از گذشت ۲۸ روز، بترتیب ۸۰، ۶۵ و ۵۰ درصد جوانه‌زنی نسبت به شاهد (۳۵ درصد) مشاهده شد (شکل ۲).

کشت شدند. pH محیط برابر با ۵/۸ قبل از اضافه کردن آگار تنظیم گردید و سپس بوسیله اتوکلاو و در شرایط ۱۲۱ درجه سانتیگراد بمدت ۲۰ دقیقه استریل گردیدند. کشت‌ها در اتاقک رشد با تناوب نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در دمای 22 ± 2 درجه سانتیگراد و رطوبت نسبی 70 ± 5 نگهداری شدند. تیمار با آب مقطر استریل به عنوان تیمار شاهد در نظر گرفته شد. شرایط تیمار شاهد همانند سایر تیمارها بود. برای بررسی تأثیر سرما بر جوانه‌زنی، بذره‌های ضدعفونی شده در دمای ۴ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی قرار گرفتند و سپس در محیط MS کشت شدند (۳۷). در آزمایش دوم به منظور بررسی تأثیر نور روز بر جوانه‌زنی، بذرها مجدداً سرمادهی شده و در محیط MS جامد کشت شدند و در شرایط روشنایی روز (۱۶ ساعت روشنایی) و شرایط تاریکی کامل تقسیم گردیدند (۱۰). در آزمایش سوم، بذور سرمادهی شده در محیط MS با غلظت‌های مختلف نمک (کامل، $1/2$ ، $1/4$ و $1/8$) قرار گرفتند و تیمار با آب مقطر استریل به همراه آگار به عنوان تیمار شاهد در نظر گرفته شد. نمونه‌ها به مدت ۴ هفته در معرض نور روز (۱۶ ساعت) قرار گرفتند. نرخ جوانه‌زنی از هفته اول تا هفته چهارم ثبت گردید. برای محاسبه نرخ جوانه‌زنی از شاخص تیمسون (Timson Index) اصلاح شده استفاده گردید.

$$\text{Timson germination index (TGI)} = \Sigma G/T$$

(G) درصد جوانه‌زنی بذر در فواصل ۲ روزه در یک دوره ۲۸ روزه و (T) دوره جوانه‌زنی کل است (۸).

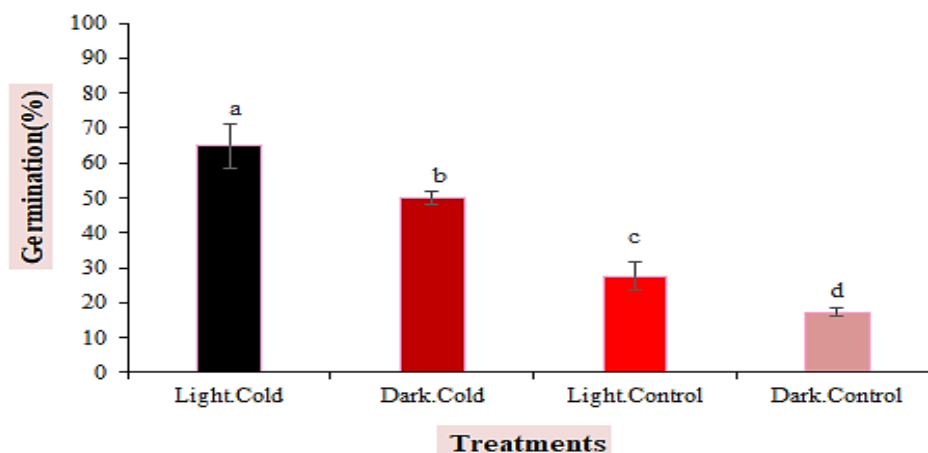
کشت بافت: براساس نتایج بهینه شده آزمایش جوانه‌زنی، بذره‌های سرما دیده در محیط کامل MS کشت شدند و به مدت ۴ تا ۸ هفته در ۱۶ ساعت روشنایی قرار گرفتند. ریزنمونه‌های برگ، ساقه و ریشه به اندازه یک سانتی‌متر از گیاهچه‌ها بریده شده و در محیط MS حاوی ترکیب سیتوکینین‌های BAP یا TDZ و اکسین‌های NAA، IAA یا IBA در غلظت‌های مختلف کشت گردیدند. غلظت هر دو



شکل ۲- تأثیر پیش‌تیمارهای مختلف Cold (۴ درجه سانتی‌گراد)، GA₃ (۱ میلی‌مولار)، KNO₃ (۱ میلی‌مولار) و آب مقطر استریل (کنترل) بر درصد جوانه‌زنی بذر گیاه بارهنگ کبیر، نتایج بصورت میانگین سه تکرار ± انحراف معیار ذکر گردید.

MS قرار گرفتند و درصد جوانه‌زنی به مدت دو هفته ثابت گردید.

باتوجه به تأثیر بهتر سرمادهی بر جوانه‌زنی بذر، برای آزمایش دوم، مجدداً بذرهای سرما دیدند و در معرض روشنایی نور روز (۱۶ ساعت) و تاریکی کامل در محیط

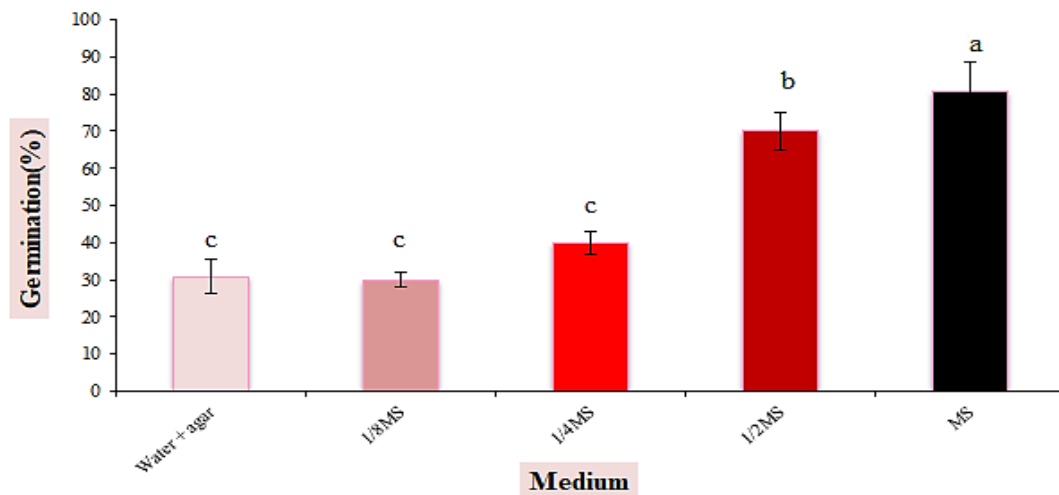


شکل ۳- تأثیر نور و تاریکی بر جوانه‌زنی بذر گیاه بارهنگ کبیر (*Plantago major*) Cold. بذرهای سرما دیده و Control: گیاهان شاهد، Light: شرایط طول روز (۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی) و Dark: شرایط تاریکی کامل، نتایج بصورت میانگین سه تکرار ± انحراف معیار و بر حسب آزمون توکی در سطح ۵ درصد محاسبه گردید. حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت آماری داده‌ها می‌باشد.

محیط MS کامل و MS $1/2$ بود و بعد از سه هفته، محیط MS کامل، جوانه‌زنی ۸۰ درصد را نشان داد. کشت بذر در آب مقطر استریل و آگار نیز به عنوان شاهد در نظر گرفته شد و در هفته اول ۱۱/۵۴ درصد جوانه‌زنی داشت که نسبت به محیط کامل MS کمتر بود و بعد از سه هفته جوانه‌زنی ۳۰/۷۶ درصد را نشان داد که مشابه با محیط MS $1/8$ بود (شکل ۴).

یافته‌ها به وضوح تأثیر بهتر روشنایی طول روز را بر جوانه‌زنی و سرعت جوانه‌زنی نشان می‌دهند (شکل ۳).

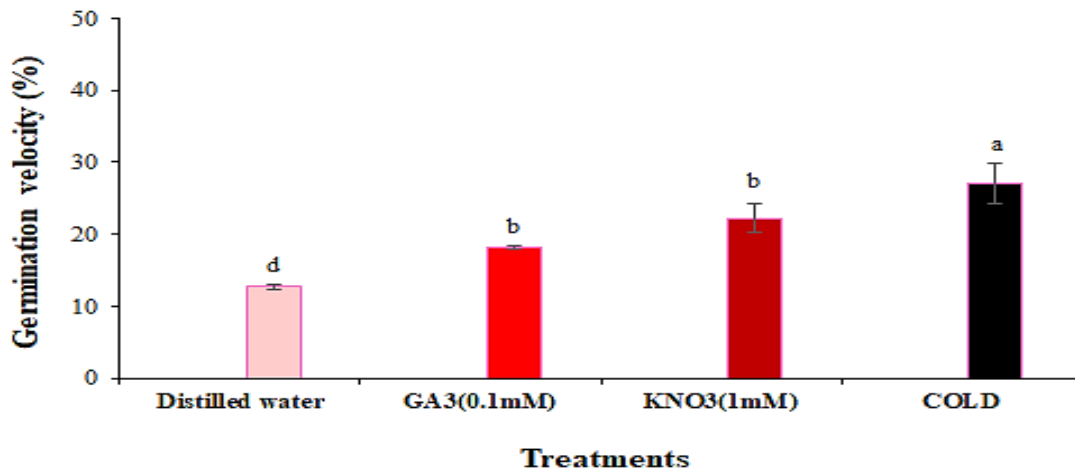
به منظور بهینه کردن روشی برای جوانه‌زدن سریع و خارج از فصل، در آزمایش سوم بذرهای ضدعفونی شده و با سرما تیمار شده و در محیط MS با غلظت‌های مختلف نمک (۱، $1/2$ ، $1/4$ و $1/8$) کشت شدند. یافته‌ها نشان داد که محیط با درصد نمک بیشتر، جوانه‌زنی و رشد سریعتری را نشان می‌دهد، زیرا در هفته اول ۵۰ درصد جوانه‌زنی مربوط به



شکل ۴- تأثیر غلظت‌های مختلف نمک محیط MS بر جوانه‌زنی بذر گیاه بارهنگ کبیر (*Plantago major*). نتایج بصورت میانگین سه تکرار \pm انحراف معیار و برحسب آزمون توکی در سطح ۵ درصد محاسبه گردید. حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت آماری تیمارها می‌باشند.

شرایط پیش تیمار سرما است از طرفی نیز آزمایشات تکمیلی نیازمند برقراری شرایط نور و تاریکی در بازه زمانی موردنظر هستند، لذا در صورت اندازه‌گیری‌های متناوب درصد جوانه‌زنی، این شرایط در تیمار تاریکی مختل می‌شدند، بنابراین شاخص نرخ جوانه‌زنی برای پیش تیمار سرما اندازه‌گیری گردید.

در نهایت شاخص نرخ جوانه‌زنی بذر بارهنگ کبیر برای پیش تیمارهای مختلف در آزمایش اول اندازه‌گیری گردید (شکل ۵). آزمایش اول در این مطالعه نشان‌دهنده بهترین پیش تیمار بوده است و آزمایشات بعدی، آزمایشات تکمیلی برای برقراری شرایط بهینه می‌باشند و هدف مطالعات بعدی نشان دادن سرعت جوانه‌زنی بهتر در



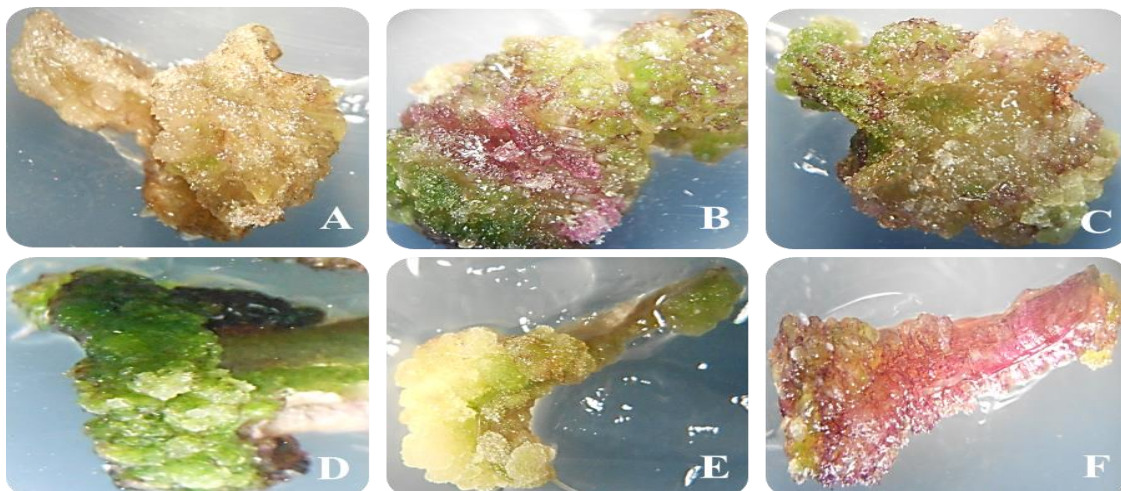
شکل ۵- نرخ جوانه‌زنی شاخص تیمسون اصلاح شده، نتایج بصورت میانگین سه تکرار \pm انحراف معیار و برحسب آزمون توکی در سطح ۵ درصد محاسبه گردید، حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت آماری تیمارها می‌باشند.

کالوس‌ها در اکثر ریزنمونه‌ها ظاهر شدند (شکل ۶ و ۷). بیشترین درصد کالوس‌زایی (۱۰۰ درصد) در اکثر ترکیبات هورمونی مشاهده شد. با این حال در ریز نمونه برگ با

یافته‌های کشت بافت گیاه بارهنگ کبیر در ترکیبات مختلف تنظیم کننده‌های رشدی: پس از ۲ یا ۳ زیرکشت،

مشخصات ظاهری کالوس‌ها نشان دهنده سن کالوس و قدرت باززایی آن‌ها در محیط کشت می‌باشد. کالوس‌های زرد رنگ معمولاً نیاز به چند دوره زیرکشت در محیط حاوی سیتوکینین دارند. کالوس‌هایی که در محیط حاوی اکسین به تنهایی و یا مقدار اکسین بیشتر شکل می‌گیرند، تمایل بیشتری به تشکیل ریشه نشان دادند. با این حال کالوس‌های سبزرنگ از ریزنمونه‌های مختلف معمولاً نیازی به زیرکشت نداشتند و پتانسیل تشکیل نوساقه در محیط کشت پایه MS حاوی غلظت‌های مختلف سیتوکینین/اکسین خوبی را نشان دادند. در این مطالعه اکثر کالوس‌های TDZ/IBA نیازی به زیرکشت نداشتند و کشت-های حاوی اکسین NAA معمولاً کالوس‌های بزرگتری را تشکیل دادند (شکل ۶). بدین ترتیب ریزنمونه‌های مختلف تحت تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشدی متفاوت، میزان متفاوتی از کالوس‌دهی را نشان دادند.

غلظت هورمون TDZ (۱/۵ میلی‌گرم برلیتر) در هر چهار سطح NAA مقدار کالوس ۱۰۰ درصد القاء شد. در ریزنمونه ساقه، القاء کالوس نمایان‌تر بود به این صورت که در هورمون TDZ (۳ میلی‌گرم برلیتر) در تمام سطوح NAA (۱/۵ و ۳ میلی‌گرم برلیتر) در سطوح IAA، کالوس‌زایی ۱۰۰ درصد مشاهده شد و در ریزنمونه ریشه، القاء کالوس در اکثر ترکیبات هورمونی رخ داد. چنانچه که در هورمون BAP (۱/۵ و ۲ میلی‌گرم برلیتر) در سطوح NAA و BAP (۲ میلی‌گرم برلیتر) و همچنین TDZ (۳ میلی‌گرم برلیتر) برای تمام سطوح IAA و (۲ و ۱/۵ میلی‌گرم برلیتر) در سطوح IBA کالوس تشکیل شد. هورمون TDZ (۱/۵ و ۳ میلی‌گرم برلیتر) و BAP (۱/۵ و ۲ میلی‌گرم برلیتر)، NAA (۱/۵ و ۱ میلی‌گرم برلیتر)، IAA (۱/۵ میلی‌گرم برلیتر) و IBA (۱/۵ میلی‌گرم برلیتر) در ترکیب با هم کالوس‌زایی بیشتری را القاء کرده‌اند.



شکل ۶- کالوس‌زایی ریزنمونه‌ها با ترکیبات هورمونی مختلف، (A) کالوس در ترکیب هورمونی BAP/NAA (B,C); BAP/IAA (D); BAP/IBA (E) کالوس چهار هفته‌ای BAP/IAA (F) BAP/NAA

جدول‌های ۱، ۲ و ۳ آورده شد. در هر جدول بالاترین باززایی به همراه درصد شکل‌گیری کالوس مرتبط با آن و نوع باززایی از نوع مستقیم و یا غیرمستقیم و تعداد شاخه از هر ریزنمونه نیز ذکر شده است.

باززایی از کالوس‌ها پس از ۲ هفته در هر سه ریزنمونه ظاهر شد و بیشترین درصد باززایی‌ها (باززایی که حروف a را در آزمون مقایسه میانگین دانکن به خود اختصاص داده‌اند) در هر ترکیب هورمونی سیتوکینین/اکسین در

بالاترین فراوانی باززایی در ریزنمونه برگ (۱۰۰ درصد) باززایی (۲ درصد) در ترکیب ۱: ۰/۵ میلی‌گرم برلیتر IAA: در محیط MS حاوی ۰/۵: ۱؛ ۱/۵؛ ۲: ۱ و ۲ میلی‌گرم برلیتر IBA: TDZ مشاهده گردید. میزان کمی از BAP مشاهده شد (شکل ۸).

جدول ۱- بیشترین مقادیر باززایی در ریزنمونه برگ در ترکیبات هورمونی مختلف به همراه درصد تشکیل کالوس و تعداد شاخه‌زایی مرتبط با هر

باززایی

تعداد جوانه در هر ریزنمونه (عدد)	باززایی غیرمستقیم (درصد)	باززایی مستقیم (درصد)	باززایی (درصد)	کالوس زایی (درصد)	سیتوکینین/اکسین (میلی‌گرم بر لیتر)	سیتوکینین	اکسین
۷/۶۰ ± ۶/۲	۵۳/۳۳ ± ۶/۳	۱۱/۲۰ ± ۳/۸	± ۱۹/۶۴/۶	۲/۵ ۵۰ ±	۱/۵:۰	BAP	none
۱۲/۳۳ ± ۳/۳	۴۵/۸۳ ± ۲/۶	۶/۶۷ ± ۳۳/۳	۵۲ ± ۴/۵	۸۵ ± ۴/۳	۱:۰/۵	BAP	NAA
۱۱ ± ۲/۱	۱۶/۶۷ ± ۲/۳	۴۶/۶۷ ± ۸/۳۳	± ۱۳/۳ ۶۳/۳۳	۴۶/۶۷ ± ۸/۲	۱:۰/۱	BAP	IAA
۱۵/۶ ± ۶/۲	۶۰ ± ۴/۴	۳۰ ± ۵/۵	۹۰ ± ۲/۰	۷۰ ± ۳/۵	۲:۱	BAP	IBA
۱۷/۵۰	۵۸ ± ۵/۵	۲۸ ± ۲/۱	۸۶ ± ۲/۲	۴/۸ ۶۶ ±	۲:۰/۵		
-	-	-	-	-	-	TDZ	none
۹ ± ۳/۰	۱۰۰ ± ۰/۰	۰/۰ ± ۰/۰	۵۰ ± ۱۴/۳	۱۰۰ ± ۰/۰	۱/۵:۱	TDZ	NAA
۵/۳ ± ۳/۳	۲۷/۱۴ ± ۲/۸	۵۰ ± ۵/۳	± ۲/۴ ۷۷/۱۴	۵۰ ± ۵/۱	۱:۰/۵	TDZ	IAA
۱۷/۲ ± ۸/۴	۱۰۰ ± ۰/۰	۰ ± ۰/۰	۱۰۰ ± ۰/۰	۱۰۰ ± ۰/۰	۲:۱		
۱۴/۲۵ ± ۸/۳	۷۳/۳۳ ± ۳/۳	۲۶/۶۶ ± ۶/۳	۱۰۰ ± ۰/۰	۷۳/۳۳ ± ۳/۳	۱/۵:۲		
۲۲/۰۵ ± ۳/۶	۷۰ ± ۲/۵	۳۰ ± ۲	۱۰۰ ± ۰/۰	۸۰ ± ۴	۱/۵:۱	TDZ	IBA
۱۸/۰۱ ± ۲/۶	۶۷/۵ ± ۱۲/۳	۳۲/۵ ± ۷/۵	۱۰۰ ± ۰/۰	۳۰/۹۵ ± ۵/۵	۱:۰/۵		

نتایج بصورت میانگین ± انحراف معیار بیان شدند

جدول ۲- بیشترین مقادیر باززایی در ریزنمونه ساقه در ترکیبات هورمونی مختلف به همراه درصد تشکیل کالوس‌زایی و تعداد شاخه‌زایی مرتبط با هر

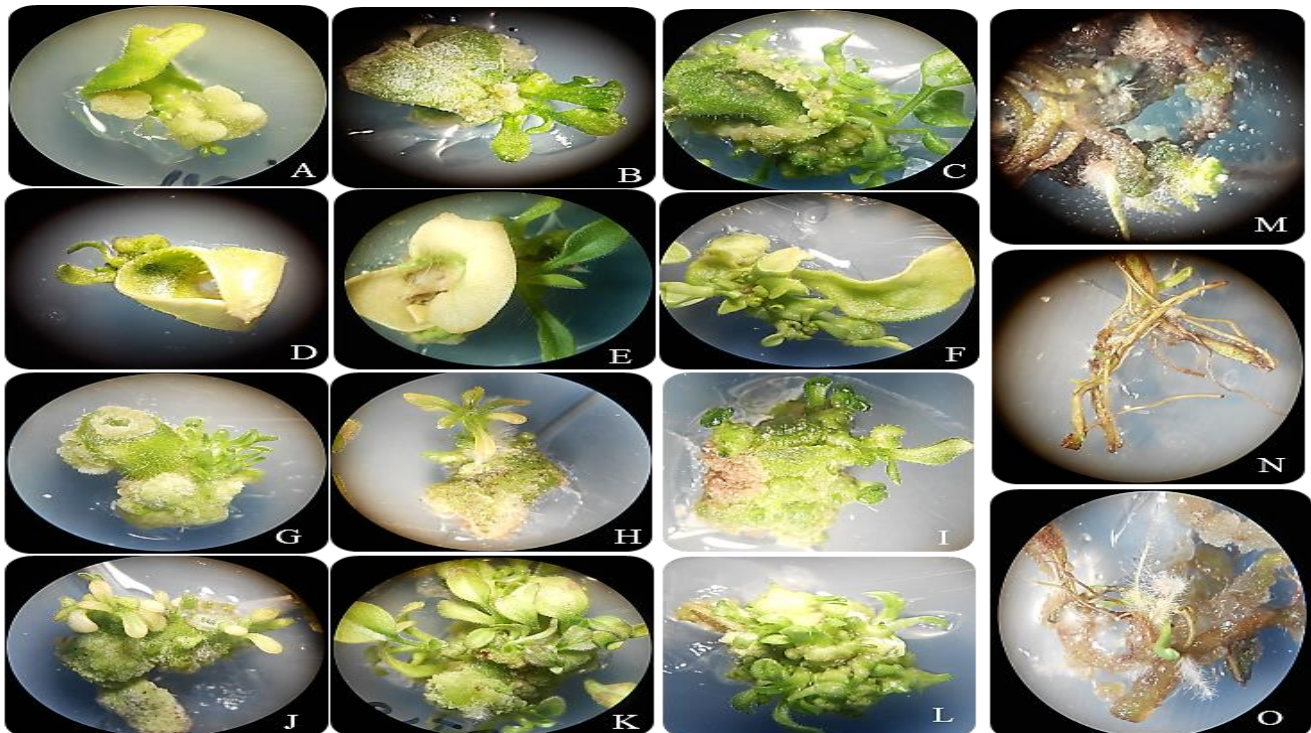
باززایی

تعداد جوانه در هر ریزنمونه (عدد)	باززایی غیرمستقیم (درصد)	باززایی مستقیم (درصد)	باززایی (درصد)	کالوس زایی (درصد)	سیتوکینین/اکسین (میلی‌گرم بر لیتر)	سیتوکینین	اکسین
-	-	-	-	-	-	BAP	none
۲۵ ± ۵/۱	۱۰۰ ± ۰/۰	۰/۰ ± ۰/۰	۱۰۰ ± ۰/۰	۱۰۰ ± ۰/۰	۲:۰/۵	BAP	NAA
۳۲ ± ۲/۲	۷۰ ± ۱۰	۰/۰ ± ۰/۰	۷۰ ± ۶/۴	۱۰۰ ± ۰/۰	۱/۵:۱/۵	BAP	IAA
۲۴ ± ۲/۴	۵۴ ± ۳/۸		۵۴ ± ۳/۸	۷۲ ± ۲	۲:۲		
۲۶/۵ ± ۲/۵	۵۲ ± ۱/۵	۰/۰ ± ۰/۰	۵۲ ± ۱/۵	۹۴ ± ۱/۱	۱/۵:۱	BA	IBA
۲۸ ± ۱/۶	۵۵ ± ۵/۰		۵۵ ± ۵/۰	۷۰ ± ۳/۳	۱/۵:۰/۵		
-	-	-	-	-	-	TDZ	none
۱۵ ± ۳/۱	۸۱/۲۵ ± ۷/۳	۰/۰ ± ۰/۰	۸۱/۲۵ ± ۱۰/۸	۱۰۰ ± ۰/۰	۱:۱	TDZ	NAA
۷/۵ ± ۲/۵	۳۲ ± ۳	۰/۰ ± ۰/۰	۳۲ ± ۴/۲	۱۰۰ ± ۰/۰	۳:۰/۱	TDZ	IAA
۲۷/۳۷ ± ۱/۳	۸۶/۶۶ ± ۱/۴	۰/۰ ± ۰/۰	۸۶/۶۶ ± ۳/۳	± ۲/۵ ۹۵	۱/۵:۱	TDZ	IBA

جدول ۳- بیشترین مقادیر باززایی در ریزنمونه ریشه در ترکیبات هورمونی مختلف به همراه درصد تشکیل کالوس‌زایی و تعداد شاخه‌زایی مرتبط با هر باززایی

تعداد جوانه در هر ریزنمونه (عدد)	باززایی غیرمستقیم (درصد)	باززایی مستقیم (درصد)	باززایی (درصد)	کالوس‌زایی (درصد)	سیتوکینین/اکسین (میلی گرم بر لیتر)	سیتوکینین	اکسین
۱۴±۶/۰	۱۰۰±۰/۰	۰/۰±۰/۰	۱۰۰±۰/۰	۱۰۰±۰/۰	۱/۵	BAP	none
۲۱±۵/۷	۱۰۰±۰/۰	۰/۰±۰/۰	۱۰۰±۰/۰	۱۰۰±۰/۰	۱/۵:۱	BAP	NAA
۸±۲/۴	۰/۰±۰/۰	۱۰۰±۰/۰	۱۰۰±۰/۰	۰/۰±۰/۰	۱/۵:۰/۱	BAP	IAA
۶±۲/۱	۱۰۰±۰/۰	۰/۰±۰/۰	۵۰±۰/۱۵	۱۰۰±۰/۰	۱/۵:۱	BAP	IBA
-	-	-	-	-	-	TDZ	none
۱۲±۴/۳	۱۰۰±۰/۰	۰/۰±۰/۰	۱۰۰±۰/۰	۱۰۰±۰/۰	۲:۰/۲	TDZ	NAA
۲۰±۴	۱۰۰±۰/۰	۰/۰±۰/۰	۱۰۰±۰/۰	۱۰۰±۰/۰	۱/۵:۰/۲	TDZ	NAA
۵/۵±۰/۵	۱۰۰±۰/۰	۰/۰±۰/۰	۱۰۰±۰/۰	۱۰۰±۰/۰	۳:۰/۲	TDZ	IAA
۱۰±۲	۱۰۰±۰/۰	۰/۰±۰/۰	۱۰۰±۰/۰	۱۰۰±۰/۰	۱/۵:۱	TDZ	IAA
۱۲±۳/۰	۱۰۰±۰/۰	۰/۰±۰/۰	۱۰۰±۰/۰	۱۰۰±۰/۰	۳:۲	TDZ	IBA
۱۰±۲/۵	۱۰۰±۰/۰	۰/۰±۰/۰	۱۰۰±۰/۰	۱۰۰±۰/۰	۳:۱	TDZ	IBA
۹±۱/۰	۱۰۰±۰/۰	۰/۰±۰/۰	۱۰۰±۰/۰	۱۰۰±۰/۰	۲:۲	TDZ	IBA
۱۵±۲/۳	۱۰۰±۰/۰	۰/۰±۰/۰	۱۰۰±۰/۰	۱۰۰±۰/۰	۲:۱	TDZ	IBA

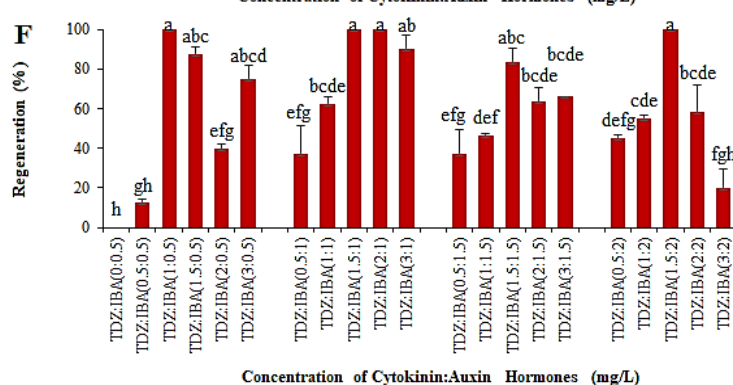
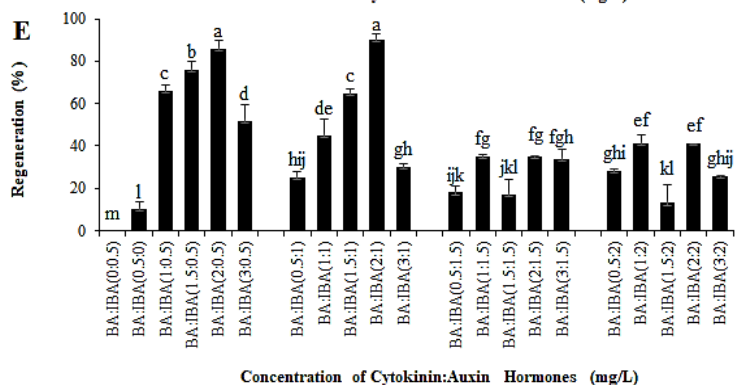
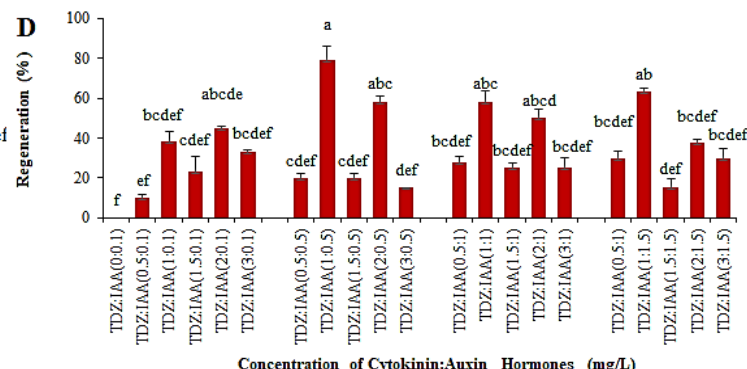
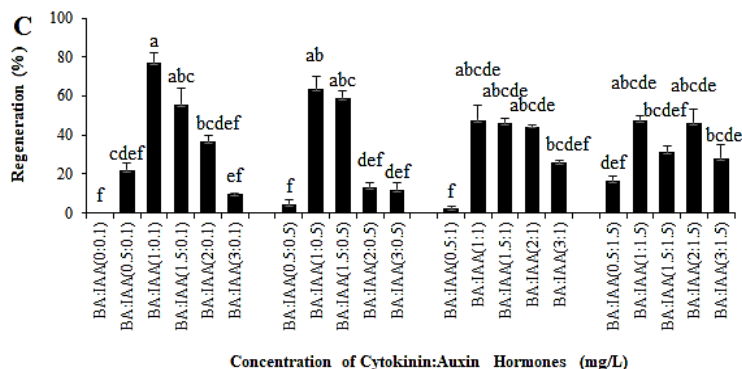
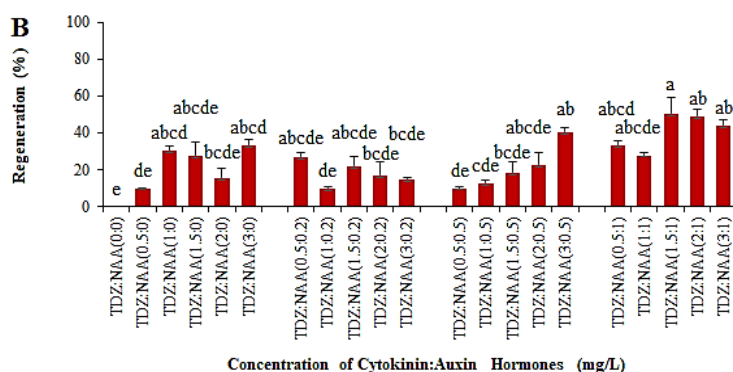
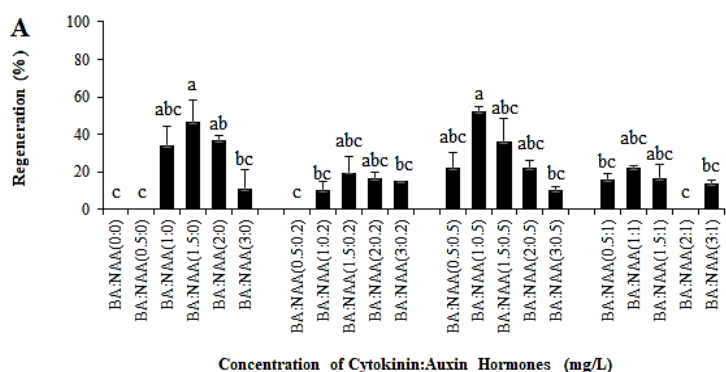
نتایج بصورت میانگین ± انحراف معیار بیان شدند



شکل ۷- کالوس‌زایی و باززایی از ریزنمونه‌های برگ، ساقه و ریشه بارهنگ کبیر (*Plantago major*). (A-C) القاء کالوس و باززایی از کالوس در ریزنمونه برگ (غیرمستقیم) در غلظت ۱:۰/۵ میلی گرم بر لیتر BAP:IAA و (D-E) باززایی مستقیم در غلظت ۱/۵ میلی گرم بر لیتر BAP، (F) باززایی مستقیم در غلظت ۱ میلی گرم بر لیتر BAP. (G-I) القاء کالوس از ریزنمونه ساقه و باززایی غیرمستقیم از کالوس در نمونه ساقه در غلظت ۱/۵:۰/۱ میلی گرم بر لیتر TDZ:IBA، (J-L) باززایی مستقیم از ساقه در غلظت ۱/۵:۱ TDZ:IBA، (M, N) باززایی مستقیم ریشه در غلظت ۱/۵:۰/۱ میلی گرم بر لیتر BAP:IAA و (O) تشکیل کالوس و باززایی از ریشه در غلظت ۱/۵:۱ میلی گرم بر لیتر TDZ:IBA

۲:۰/۵ میلی‌گرم برلیتر BAP: NAA و ۱:۰/۵ میلی‌گرم برلیتر TDZ: IBA مشاهده گردید (شکل ۱۰). فراوانی بالای تعداد شاخه‌های باززا شده ۴۱/۶۷ و ۲۲ در محیط حاوی ۱:۲ و ۱/۵:۱ میلی‌گرم برلیتر TDZ:IBA در ریزنمونه برگ و به ترتیب ۲۷ و ۲۰ تعداد شاخه در ترکیب ۱/۵:۱ میلی‌گرم برلیتر TDZ:IBA در ریزنمونه ساقه و ۲:۰/۲ میلی‌گرم برلیتر TDZ:NAA در ریزنمونه ریشه بدست آمد.

۲:۰/۵ میلی‌گرم برلیتر BAP: NAA و ۱:۰/۵ میلی‌گرم برلیتر TDZ: IBA به ترتیب بیشترین (۱۰۰ درصد) و کمترین باززایی (۳۳/۸ درصد) را در ریزنمونه ساقه نشان دادند (شکل ۹). در ریزنمونه ریشه (۱۰۰ درصد باززایی) در غلظت ۱/۵ میلی‌گرم برلیتر BAP: NAA، ۱:۰/۵ BAP: NAA، ۰/۱:۰/۱ TDZ: IAA، ۱/۵:۰/۲ BAP: IAA، ۲:۰/۲ و ۳:۰/۲ میلی‌گرم برلیتر TDZ: IAA، ۱:۰/۵ TDZ: NAA و ۳:۰/۲، ۲:۰/۲، ۱:۰/۳، ۳:۰/۲



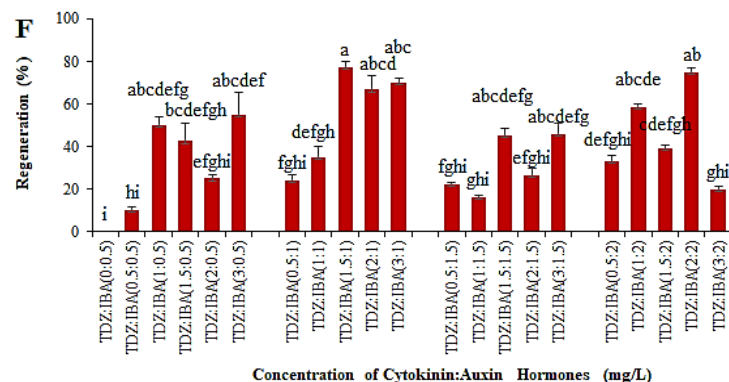
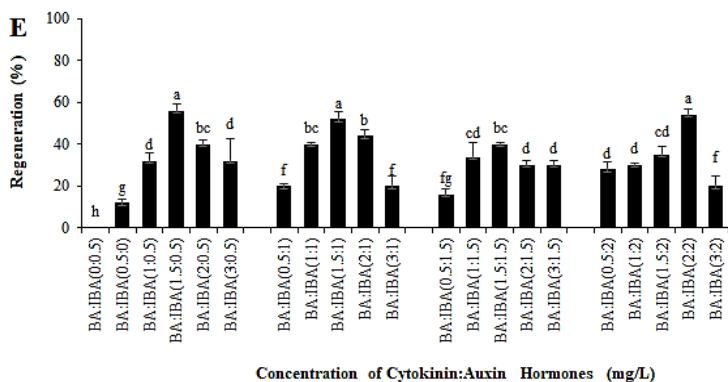
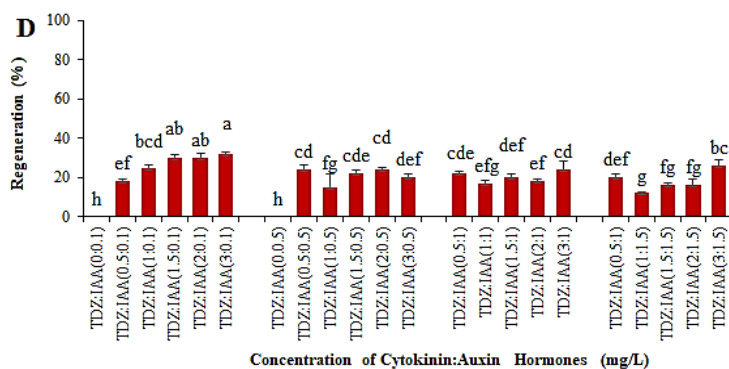
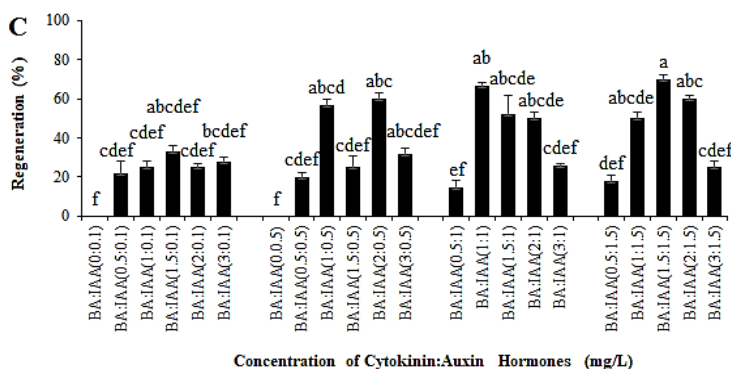
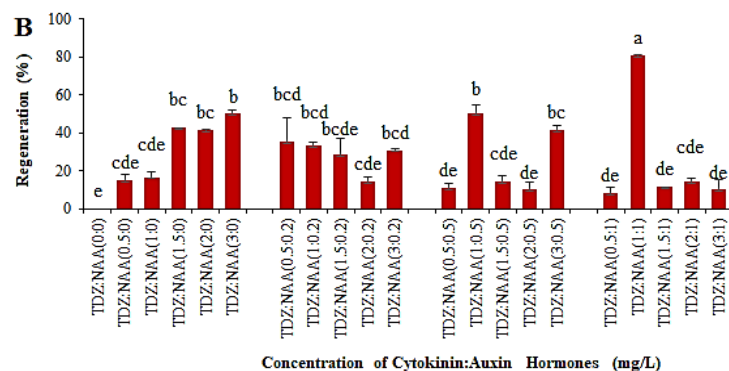
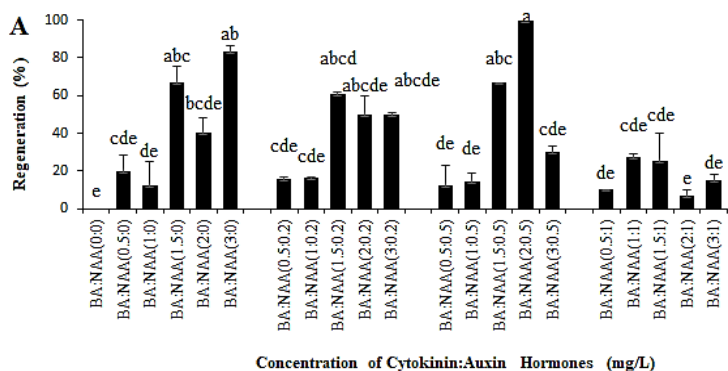
شکل ۸- درصد باززایی در ریزنمونه برگ‌های بارهنگ کبیر (*Plantago major*) (A. تیمارهای مختلف BAP:NAA (B. TDZ:NAA (C.

(E. TDZ:IAA (D. BAP:IAA (F. TDZ:IBA) در محیط MS. نتایج (باززایی مستقیم و غیرمستقیم) بصورت میانگین سه تکرار ±

انحراف معیار و بر حسب آزمون توکی در سطح ۵ درصد ذکر گردید.

ریشه‌زایی حاوی غلظت ۰/۵ میلی‌گرم برلیتر IBA منتقل شدند (شکل ۱۱).

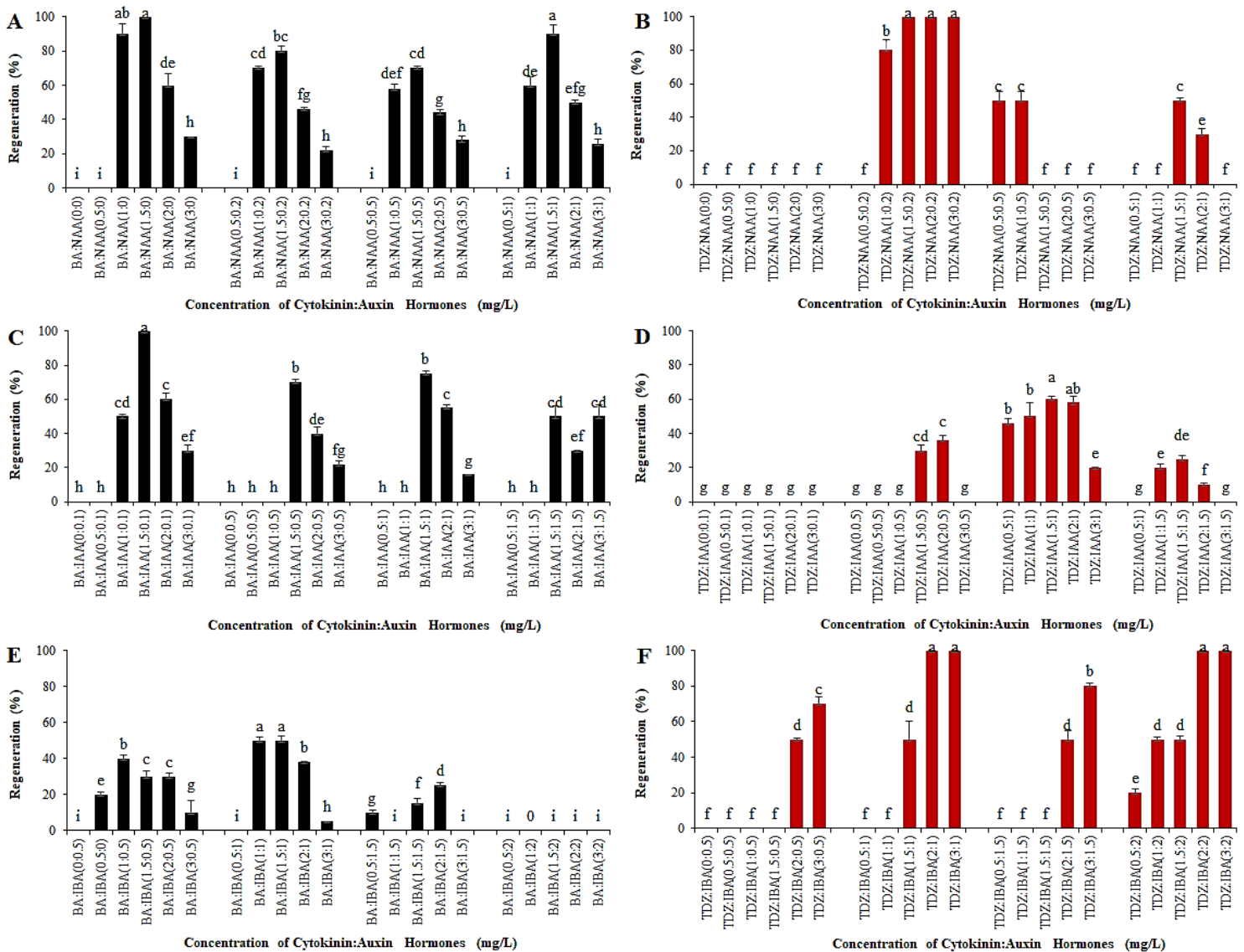
بعضی از گیاهچه‌های باززا شده در محیط بدون هورمون، ریشه‌دار شدند و نیازی به انتقال به محیط هورمون دار نداشتند با این حال گیاهچه‌های بدون ریشه به محیط



شکل ۹- درصد باززایی در ریزنومه ساقه بارهنگ کبیر (*Plantago major*). (A) تیمارهای مختلف (B .BAP:NAA (C .BAP:IAA (D .TDZ:IAA (E .BAP:IBA (F .TDZ:IBA در محیط MS. نتایج (باززایی مستقیم و غیرمستقیم) بصورت میانگین سه تکرار ± انحراف معیار و بر حسب آزمون توکی در سطح ۵ درصد ذکر گردید.

گرفتند و با نرخ بقای ۸۰ درصد در گلخانه سازگاری یافتند (شکل ۱۲).

یک هفته بعد، گیاهچه‌های ریشه‌دار شده برای رشد بیشتر به محیط MS بدون هورمون انتقال یافتند و سپس گیاهچه های رشدیافته با موفقیت در گلدان پس از دو هفته قرار



شکل ۱۰- درصد باززایی در ریزنمونه ریشه بارهنگ کبیر (*Plantago major*) (A، تیمارهای مختلف (B، TDZ:NAA (C، TDZ:IAA (D، BAP:IAA (E، BAP:IBA (F و TDZ:IBA در محیط MS. نتایج (باززایی مستقیم و غیرمستقیم) بصورت میانگین سه تکرار ± انحراف معیار و بر حسب آزمون توکی در سطح ۵ درصد ذکر گردید.

های جانبی بیشتری داشتند. گیاه وحشی دارای برگ‌های عریض‌تر و رگبرگ‌های برجسته‌تری است.

بررسی مورفولوژی گیاهچه سازگار شده در شرایط درون شیشه‌ای در مقایسه با گیاهان رشد یافته از بذور تیمار شده و گیاهان وحشی نشان داد که گیاهان بازایی شده جوانه-



شکل ۱۱- مقایسه ریشه‌زایی گیاه باززا شده در محیط ریشه‌زایی، (A) باززایی مستقیم از ریزنمونه برگ، (B) ریزنمونه رشد یافته در محیط MS عاری از تنظیم‌کننده رشدی (PGRs) و محیط حاوی ۰/۵ میلی‌گرم برلیتر IBA، (C) گیاهچه رشد یافته



شکل ۱۲- مرحله سازگاری و انتقال گیاهچه‌های باززاده از محیط ریشه‌زایی به گلدان A: گیاهان باززا شده رشد یافته در شرایط درون شیشه‌ای، B: گیاهچه منتقل شده به گلدان و سازگار شده در شرایط اتاقک رشد (یک هفته) و گلخانه، C: گیاه وحشی رشد یافته از بذر در گلخانه و D: گیاه رشد یافته از بذر و تحت شرایط اپتیمم در شرایط درون شیشه‌ای در اتاقک رشد.

را نشان داده است بطوری که در غلظت سیتوکینین ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم برلیتر BAP باززایی مستقیم قابل توجهی مشاهده گردید (شکل V D-F). تیمار ریزنمونه‌ها با هورمون سیتوکینین BAP باززایی مستقیم بیشتری را موجب می‌شود اما تیمار با سیتوکینین TDZ باززایی بیشتر از نوع غیرمستقیم را نشان دادند.

نتایج ما نشان داد که بیشترین و معنی‌دارترین (تفاوت در سطح ۵ درصد) باززایی در ترکیب IBA: TDZ برای هر سه ریزنمونه بدست آمد. به طور کلی، ریزنمونه ریشه نسبت به دو ریزنمونه برگ و ساقه باززایی کمتری را نشان می‌دهد و همچنین بیشترین باززایی‌ها از نوع غیرمستقیم بودند. ریزنمونه برگ بیشتر از دو ریزنمونه دیگر باززایی مستقیم

بحث

می‌زنند و بذره‌های بارهنگ کبیر در تاریکی جوانه نزده (۴) و یا جوانه‌زنی اندکی داشتند (۵ درصد) (۳۳). همچنین در مطالعات دیگری گزارش شده است که نور جوانه‌زنی بذرها را افزایش می‌دهد (۴). نتایج تحقیق فعلی، گزارش‌های قبلی محققان درباره گونه بارهنگ کبیر را تأیید می‌کند، زیرا مشاهده گردید که شرایط روشنایی طول روز (۱۶ ساعت) برای جوانه‌زنی گیاه مفیدتر بود و علاوه بر جوانه‌زنی، رشد بهتر گیاه را به همراه داشت. محققان بسیاری از محیط‌های مختلفی برای کشت‌های درون شیشه‌ای گونه‌های بارهنگ استفاده کردند از جمله این محیط‌ها NT (۳۱) و MS (۳۰) هستند (۵). با این وجود استفاده از محیط MS ارجح است (۲۴)، محیط MS معمولاً برای مراحل مختلف ریزازدیادی، از جمله القاء کالوس (۶)، تکثیر ساقه‌های جانبی (۲۷) و القاء ریشه (۱۰ و ۱۹) در مطالعات تغییر یافته است. در این پژوهش محیط MS برای کشت این گیاه انتخاب گردید و برای بهینه ساختن شرایط تکثیر و جوانه‌زدن بذرها، غلظت‌های مختلفی از آن تهیه شد. یافته‌ها بهتر بودن محیط کامل MS را نشان دادند. محققان تنظیم‌کننده‌های رشدی مختلفی را به منظور القاء کالوس و ریشه‌زایی در ریزنمونه‌های برگ بارهنگ کبیر آزمایش کردند. بهترین نتیجه از تکثیر کالوس با (۲ میلی‌گرم برلیتر 2,4-D، به همراه ۰/۵ میلی‌گرم برلیتر Kin)، ساقه‌زایی (۰/۵ میلی‌گرم برلیتر IAA به همراه ۱ میلی‌گرم برلیتر Kin و ریشه‌زایی (۲ میلی‌گرم برلیتر IBA به همراه ۱ میلی‌گرم برلیتر NAA) بدست آمده است (۳۴). محقق دیگری نیز از ریزنمونه‌های برگ برای القاء کالوس و سپس تکثیر جوانه و تشکیل ریشه استفاده کرد و یافته‌های بهینه با استفاده از ۰/۸ تا ۱/۲ میلی‌گرم برلیتر NAA برای القاء کالوس و به همراه ۳/۵ تا ۴/۵ میلی‌گرم برلیتر BAP بدست آمد (۲۰). در مطالعه دیگر کالوس‌های بارهنگ کبیر، برای تشکیل ریشه و ساقه‌زایی بر روی محیط MS به همراه ۱ میلی‌گرم برلیتر 2,4-D و ۰/۵ میلی‌گرم برلیتر BAP زیرکشت شدند و سپس به محیط حاوی ۰/۵ میلی‌گرم برلیتر BAP منتقل شدند (۲۶). ساقه-

بذر بارهنگ کبیر به دلیل اهمیت فراوان برای تحقیقات متعددی استفاده می‌گردد و اغلب از کلکسیون‌های خصوصی، باغ‌های گیاه‌شناسی و موسسات تحقیقاتی جمع‌آوری می‌گردد، همچنین از گیاهان وحشی و یا از پرورش دهندگان متخصص خریداری می‌شود (۱۰). بنابراین، این بذرها ممکن است از جوانه‌زنی پایینی برخوردار باشند که خود نیازمند روشی مناسب برای جوانه‌زنی بذر و تکثیر در شرایط آزمایشگاهی هستند.

برخی از محققین برای افزایش درصد جوانه‌زنی بذر و به منظور شکستن خواب بذر از GA₃ استفاده کرده‌اند (۱۳). Pons (1992) بیان کرد تأثیر پیش تیمار ۱۰ میلی‌مولار KNO₃ بر جوانه‌زنی بذره‌های بارهنگ کبیر در شرایط نور ناکافی، مفید بوده است (۳۲). همچنین اثر این دو پیش تیمار بر جوانه‌زنی بذرها آزمایش گردید و یافته‌های مطالعه حاضر نشان داد که پیش تیمار با KNO₃ باعث افزایش درصد جوانه‌زنی در مقایسه با پیش تیمار GA₃ شد. نتایج محققان نشان داده است که پیش تیمار بذرها در دمای ۵ درجه سانتیگراد به مدت ۷ تا ۱۴ روز جوانه‌زنی بارهنگ کبیر را افزایش می‌دهد (۲۹ و ۳۳) و همچنین سرمادهی بذره‌های بارهنگ کبیر، جوانه زنی آن را بهبود بخشید (۳۲). در مطالعه حاضر نیز، پیش تیمار سرما، میزان جوانه‌زنی در هفته اول را ۱۸ درصد افزایش داد، اما در شاهد هیچگونه درصد جوانه‌زنی مشاهده نشد و همچنین بذره‌های سرما دیده نسبت به سایر پیش تیمارها سرعت و درصد جوانه‌زنی بالاتری داشتند. محققان بیان کردند که پیش تیمار با دمای پایین علاوه بر بهبود جوانه‌زنی بذور، می‌تواند القای ساقه و ریشه را نیز بر روی کشت‌های کالوس افزایش دهد (۱۱). یافته‌های بسیاری از محققان نشان دادند که شرایط تاریکی برای جوانه‌زنی بذر گیاه بارهنگ مهم است (۳۸ و ۴۱) در حالی که در مطالعات دیگر، بیان شد که اکثر بذره‌های بارهنگ در شرایط روشنایی طول روز نیز جوانه

باززایی شده از ریزنمونه‌های سنبل الطیب، به راحتی در محیط فاقد هورمون قادر به ریشه زایی بودند (۱).

نتیجه گیری کلی

تحقیقات جامع به منظور بهبود جوانه‌زنی و روشی بهینه برای القاء کالوس، اندام‌زایی مستقیم و یا از طریق کالوس می‌تواند راه گشای انجام مراحل پیشرو در روند تحقیقات درون شیشه‌ای باشد. متابولیت‌های ثانویه با ارزشی در *P. major* وجود دارند که می‌توان با تولید انبوه از طریق ریزازدیادی، تولید و خالص‌سازی کردند. این گیاه پتانسیل خوبی برای پاسخ به هورمون‌های برون‌زا نشان داده است و برای تولید نوساقه‌های فراوان و بازده زمانی کوتاه‌تر میتوان از ترکیب TDZ/IBA نسبت به دیگر هورمون‌های مورد مطالعه استفاده نمود. بنابراین در مطالعات پیشرو قصد داریم بصورت پیوسته روشی بهینه جهت تکثیر ریشه‌های ترانسژن شده توسط آگروباکتریوم رایزوترنز و ازدیاد این متابولیت‌های با ارزش و ارزشی‌های فیتوشیمیایی و دارویی در شرایط درون شیشه‌ای و برون تنی ارائه نماییم.

سپاسگزاری

این مطالعه بخشی از پایان نامه دوره دکتری در دانشگاه زنجان است. همچنین نویسندگان مراتب قدردانی خود را از دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان اعلام می‌دارند.

زایی و ریشه‌زایی از کشت‌های نوک ساقه بارهنگ کبیر بر روی محیط MS تغییر یافته به همراه ۰/۱ میلی گرم برلیتر BAP و سپس ۰/۱۸ میلی گرم برلیتر NAA بدست آمد (۲۸). پس از مطالعه نتایج سایر محققان، نتایج ارزشمندی حاصل گردید، که نشان می‌دهد بارهنگ کبیر پتانسیل خوبی برای تکثیر در شرایط درون شیشه‌ای دارد و می‌تواند به طور مستقیم و غیرمستقیم اندام زایی کند. ریشه‌زایی خوب نیز می‌تواند به دلیل محتوای بالای تنظیم کننده‌های رشدی درون‌زا باشد (۷). نتایج سلیمانی و همکارانش (۱۳۹۸) نشان داد که القای اندام هوایی در *Narcissus tazetta* به مقادیر هورمون NAA وابسته نبوده ولی مقادیر هورمون BAP در القاء موثر بوده است (۲). در پژوهش حاضر نیز مشاهده گردید که هورمون BAP به تنهایی باعث ایجاد باززایی مستقیم در ریزنمونه‌های برگ‌گی شده است. بنابراین با مقایسه ترکیبات تنظیم کننده‌های رشدی آزمایش شده، بهترین و کارآمدترین ترکیب هورمونی مشخص گردید که باززایی سریع‌تر و بهتری در این گیاه ایجاد شود. بنابراین، بسیاری از گیاهان باززا شده در مطالعه حاضر در محیط عاری از هورمون ریشه‌دار شدند به جز در مورد تیمار با TDZ، همانطور که قبلاً بیان شده است که TDZ کاملاً از رشد ریشه جلوگیری می‌کند (۱۷). همچنین در مطالعه‌ای دیگر یافته‌های محققان نشان دادند که تمام گیاهچه‌های

منابع

۱. پشم فروش، ن.، و احمدآبادی، م.، ۱۳۹۹. بهینه سازی کشت بافت و باززایی گیاه سنبل الطیب (*Valeriana officinalis*)، مجله پژوهش‌های گیاهی (مجله زیست‌شناسی ایران)، جلد ۳۳، شماره ۱، صفحات ۱۶۶-۱۵۶.
۲. سلیمانی، ح.، برنارد، ف.، و فاضلی نژاد، س.، ۱۳۹۸. ریزازدیادی گیاه نرگس (*Narcissus tazetta L.*) تحت تیمارهای هورمونی متفاوت و انتقال به خاک گیاهچه‌ها، مجله پژوهش‌های گیاهی (مجله زیست‌شناسی ایران)، جلد ۳۲، شماره ۲، صفحات ۳۸۹-۳۷۹.
3. Basri, D.F., Tan, L.S., Shafiei, Z. and Zin, N.M., 2012. In vitro antibacterial activity of galls of *Quercus infectoria* Olivier against oral pathogens. Evidence-Based. Complementary. Altern. Med, 2012:632796, doi:10.1155/2012/632796.
4. Blom, C.W.P.M., 1992.- Ecology of *Plantago* populations. Germination and establishment. In: *Plantago: a multidisciplinary study.*, P.J.C., Kuiper & M. Bos (eds.), Ecological Studies, 89, Springer-Verlag, PP: 88-98.

5. Bräutigam, M., and Franz, G., 1985. Versuche zur Gewebekultur von schleimbildenden pflanzlichen Geweben. *Scientia Pharmaceutica*, 53, PP: 237-46.
6. Budzianowska, A., Skrzypczak, L., and Budzianowski, J., 2004. Phenylethanoid glucosides from in vitro propagated plants and callus cultures of *Plantago lanceolata*. *Planta medica*, 70(09), PP: 834-40. doi:10.1055/s-2004-827232.
7. Centeno, M., Rodríguez, A., Feito, I., and Fernández, B., 1996. Relationship between endogenous auxin and cytokinin levels and morphogenic responses in *Actinidia deliciosa* tissue cultures, *Plant, Cell, Rep.* 16(1-2), PP: 58-62. doi:10.1007/BF01275450.
8. Das Pal, M., and Raychaudhuri, S.S., 2001. Enhanced development of somatic embryos of *Plantago ovata* Forsk. by additives. *In Vitro. Cell. Dev. Bioly – Plant*, 37(5), PP: 568-571. doi:10.1007/s11627-001-0099-6.
9. Esmaceli, F., Shooshtari, L., Ghorbanpour, M., and Etmian, A., 2014. Assessment of somaclonal variation in *Plantago major* using molecular markers. *Journal of Biodiversity and Environmental Science*, 5(4), PP: 402-408.
10. Fons, F., Gargadennec, A., and Rapior, S., 2008. Culture of *Plantago* species as bioactive components resources: a 20-year review and recent applications, *Acta. bot. gallica*, 155(2), PP: 277-300. doi:10.1080/12538078.2008.10516109.
11. George, E.F., 1993. *Plant propagation by tissue culture*. Netherlands: Springer, Part 1: The technology, 2ed., Exegetics limited, 1., doi: 10.1007/978-1-4020-5005-3.
12. Haddadian, K., Haddadian, K., and Zahmatkash, M., 2014. A review of *Plantago* plant. *Indian. J., Tradit. Know.* 13(4), PP: 681- 685.
13. Horner, J., and Bell, J., 1995. Evolution of fluoride tolerance in *Plantago lanceolata*. *Sci. Total. Environt*, 159(2-3), PP: 163-168. doi:10.1016/0048-9697(95)04318-U.
14. Hossain, M.A., Konisho, K., Minami, M., and Nemoto, K., 2003. Somaclonal variation of regenerated plants in chili pepper (*Capsicum annum* L.). *Euphytica*. 130(2), PP: 233-239. doi.org/10.1023/A:1022856725794.
15. ISTA., 2010. *International rules for seed testing*. Basserdorf, Switzerland, (Handbook)
16. Khademi, M., and Nazarian Firouzabadi, F., 2013. The influence of two types of hormones on appearance of shoot base explants in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Biotechnology in Agriculture*, 12 p.
17. Khawar, K., Sarhin, E., Sevimay, C., Cocu, S., Parmaksiz, I., Uranbey, S., Ipek, A., Kaya, M., Sancak, C., and Ozcan, S., 2005. Adventitious shoot regeneration and micropropagation of *Plantago lanceolata* L., *Periodicum Biologorum*, 107(1), PP: 113-116.
18. Kobeasy, M.I., Abdel-Fatah, O.M., El-Salam, S.M.A., and Mohamed, Z.E.M., 2011. Biochemical studies on *Plantago major*, L., and *Cyamopsis tetragonoloba* L., *Int., J., Biodivers, Conserv*, 3(3), PP: 83-91.
19. Kuksova, V.B., Pieven, N.M., and Gleba, Y.Y., 1997. Somaclonal variation and in vitro induced mutagenesis in grapevine. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 49(1), PP: 17-27.
20. Li, P., Chen, H., and Li, Y.X., 2005. Establishment and optimization of in vitro regeneration system for *Plantago major* L. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*, 21(6), PP: 916-922.
21. Li, Y., and Li, P., 2005. In vivo culture method of *Plantago major*, Patent written in Chinese CN1701657, 9 p.
22. Mahato, S., and Mehta, A., 2015. Optimization Of in-Vitro Propagation Protocol for *Plantago Ovata* Forsk, *The Journal of Indian Botanical Society*, 94(3and4), PP: 245-251.
23. Majd, A., Poor Mohammad, F., and Mirzaei, M., 2010. Study effects of some plant growth regulators on somatic embryogenesis and its histological stages in tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) var, Y. J., *Plant Reasearches*, 20 (4), PP: 49-56.
24. Makowczyńska, J., and Andrzejewska-Golec, E., 2000. Somatic embryogenesis in in vitro culture of *Plantago asiatica* L., *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 69 (4), PP: 245-50.
25. Makowczynska, J., and Andrzejewska-Golec, E., 2003. Micropropagation of *Plantago asiatica* L., through culture of shoot-tips. *Acta SOC BOT POL*, 72(3), doi.org/10.5586/asbp.2003.025
26. Mathur, J., Mukunthakumar, S., Gupta, S.N., and Mathur, S.N., 1991. Growth and morphogenesis of plant tissue cultures under mineral-oil. *Plant Science*, 74(2), PP: 249- 254, doi.org/10.1016/0168-9452(91)90053-B.
27. Mederos, M.S., 1994. In vitro cultivation of stem apexes of *Plantago major* L. *Proceedings das II*

- Jornadas Ibericas de Plantas medicinais, Aromaticas e Oleos Essenciais, 1, PP: 107-10.
28. Mederos, S., Martin, C., Navarro, E., and Ayuso, M.J., 1997. Micropropagation of a medicinal plant, *Plantago major* L. *Biologia, Plantarum*, 40(3), PP: 465-468.
 29. Mook, J.H., Haeck, J., van der Toorn, J., van Tienderen, P.H., Blom, C.W.P.M., Woldendorp, J.W., Smit, A.J., Blacquière, T., and Troelstra, S.R., 1992. Ecology of *Plantago* Populations. In: Kuiper, P.J.C., Bos, M. (eds) *Plantago: A Multidisciplinary Study. Ecological Studies*, vol 89. Springer, Berlin, Heidelberg.
 30. Murashige, T., and Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, *Physiol Plant*, 15(3), PP: 473-497.
 31. Nagata, T., and Takebe, I., 1971. Plating of isolated tobacco mesophyll protoplasts on agar medium, *Planta*, 99(1), PP: 12-20.
 32. Pons, T., 1992. Seed germination of *Plantago major* ssp. *major* and *Plantago lanceolata*, Seed germination of *Plantago major* ssp. *major* and *Plantago lanceolata*, PP: 161-169.
 33. Sagar, G.R., and Harper, J.L., 1960. Factors affecting the germination and early establishment of plantains (*Plantago lanceolata*, *P. media* and *P. major*), In: *Biology of Weeds Symposium of the British Ecological Society*, PP: 236-245.
 34. Saker, M.M., and Kawashity, S.A., 1998. Tissue culture and flavonoid content of *Nepeta* and *Plantago* species endemic in Egypt, *Fitoterapia*, 69(4), PP: 358-64.
 35. Samuelsen, A., 2000. The traditional uses, chemical constituents and biological activities of *Plantago major* L. A., review., J., *Ethnopharmacol*, 71, PP: 1-21.
 36. Sarihan, E.O., Khawar, M.D., and Özcan, S., 2005. Prolific adventitious shoot regeneration from black psyllium (*Plantago afra* L.)., Gen., *Appl. Plant Physiol.*, 31(1-2), PP: 81-87.
 37. Sarihan, E.O., Ipek, A., Khawar, K.M. and Gurbuz, B., 2005. Role of GA3 and KNO3 in improving the frequency of seed germination in *Plantago lanceolata* L, *Pakistan Journal of Botany*, 37(4), PP: 883-887.
 38. Siegel, B.Z., and Siegel, S.M., 1975. A selective role for potassium in the phytotoxicity of thallium. *Bioinorg. Chem.* 4(2), PP: 93-97. doi:10.1016/S0006-3061(00)81017-0.
 39. Van der Aart, P.J., Vulto, J.C., Soekarjo, R., and Damme, J., 1992. General biology of *Plantago*: Biogeography and human effects:5-6. In: Kuiper, P.J.C., Bos, M., (Eds.), *Plantago: a multidisciplinary study*. Paris, Springer-Verlag Heidelberg, *Ecological Studies*, 1nd, 89p. doi: 10.1007/978-3-642-76392-2.
 40. Velasco-Lezama, R., Tapia-Aguilar, R., Román-Ramos, R., Vega-Avila, E., Pérez- and Gutiérrez, M.A.S., 2006. Effect of *Plantago major* on cell proliferation in vitro. J., *ethnopharmacol*, 103, PP: 36-42.
 41. Wakhlu, A.K., Barna, K.S. 1989. Callus initiation growth and plant regeneration in *Plantago ovata* Forsk cultivar GI-2, *Plant Cell Tiss Org Cult*, 17 (3), PP: 235-242. doi.org/10.1007/BF00046870.
 42. Zakaria, M. S., Golzardi, F., and Vazan, S., 2014. Environmental maternal effects on drought and salinity tolerance of common plantain (*Plantago major* L.) at germination and seedling growth stage., *Journal of Biodiversity and Enviromental Science*, 5(2), PP: 578-585.
 43. Zubair, M., 2012. Genetic variation, biochemical contents and wound healing activity of *Plantago major*. Diss. (sammanfattning/summary) Alnarp, Sweden: Sveriges lantbruksuniv., *Acta Universitatis agriculturae Sueciae*, 1652-6880, 20 p. [Doctoral thesis].

Improving seed germination, *in vitro* organogenesis and regeneration of *Plantago major* medicinal plant

Rahamooz-Haghighi S.¹, Bagheri Kh.¹ and Sharafi A.²

¹ Dept. of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, I.R. of Iran

² Dept. of Pharmaceutical Biotechnology, Faculty of Pharmacy, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, I.R. of Iran

³ Dept. of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, I.R. of Iran

Abstract

The seed germination of *Plantago major* requires pre-treatment in the off-season. Thus, the effect of gibberellic acid, potassium nitrate, cold, daylight and different Murashige and Skoog medium (MS) salt concentrations on the germination of seeds were studied. The modified Timson index was applied to calculate the germination rate. Effect of different concentrations of 6-Benzyl amino purine (BAP) or Thidiazuron (TDZ) in combination with α -Naphthalen acetic acid (NAA), indole-3-acetic acid (IAA) or indole-3-butyric acid (IBA) was studied for callus induction and regeneration of various explants. The results showed that cold, daylight and full salt MS medium are more suitable for high germination of *P. major*. The highest percentage of callus formation (100%) was observed in the most of the explants. The highest regeneration frequency (100%) was observed in leaf explant in MS medium containing 1:0.5; 1.5:1; 1.5:2 and 2: 1 mg.L⁻¹ TDZ: IBA, as well as, 2:0.5 mg.L⁻¹ BAP: NAA in stem explant and in root explant at concentration of 1.5 mg.L⁻¹ BAP, 1.5:0.2; 2:0.2 and 3:0.2 mg.L⁻¹ TDZ: NAA and 2:1; 2:2; 3:1; 3:2 mg.L⁻¹ TDZ: IBA. 41.67 shoot number obtained with 1: 2 mg.L⁻¹ TDZ: IBA in leaf explants, as well as, 27 shoot number in 1.5: 1 mg.L⁻¹ TDZ: IBA and 20 shoot number in 2:0.2 mg.L⁻¹ TDZ: NAA were obtained in shoot and root explants, respectively. For root induction, regenerated shoots were transferred into MS medium supplementation with 0.5 mg.L⁻¹ IBA. The survival rate of plantlets was 80% and they were acclimatized in the greenhouse.

Key words: Callogenesis, Germination *In vitro* Regeneration, *Plantain*, Shoot organogenesis