DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.1.12.6

بهبود جوانه‌زنی بذر، اندام‌زایی و باززایی گیاه داروئی بارهنگ کبیر *Plantago major* در شرایط درون شیشه‌ای

سمانه راه آموز حقیقی[۱]، خدیجه باقری[۱*]، علی شرفی[۲]، حسین دانافر[۳]

[۱] ایران، زنجان، دانشگاه زنجان، دانشکده کشاورزی، گروه تولید و ژنتیک گیاهی

[۲] ایران، زنجان، دانشگاه علوم پزشکی، دانشکده داروسازی، گروه زیست فناوری داروئی

[۳] ایران، زنجان، دانشگاه علوم پزشکی، دانشکده داروسازی، گروه شیمی دارویی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۸/۰۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۰/۲۵

چکیده

جوانه‌زنی بذر بارهنگ کبیر(*Plantago major*) در شرایط خارج از فصل نیاز به پیش تیمارهای خاص دارد. تأثیر پیش تیمارهای اسیدجیبرلیک، پتاسیم نیترات، سرما، نور و غلظت نمک محیط Murashige and Skoog medium (MS) بر جوانه‌زنی بذر این گیاه بررسی شدند. از شاخص تیمسون (Timson Index) برای تعیین نرخ جوانه‌زنی استفاده گردید. تأثیر غلظت‌های مختلف سیتوکینین‌های ۶-آمینو پورین (BAP) و تیدیازورون (TDZ) در ترکیب با اکسین‌های آلفا-نفتالین اسید استیک (NAA)، ۳-ایندول-۳- استیک اسید (IAA) و اسید ایندول ۳- بوتیریک (IBA) برای القاء کالوس و باززایی ریزنمونه‌های برگ، ساقه و ریشه مطالعه شد. یافته‌ها نشان داد که پیش تیمار سرما، نور روز و محیط MS کامل برای جوانه‌زنی بذور بارهنگ کبیر مناسب‌تر هستند. بیشترین درصد کالوس‌زایی (۱۰۰ درصد) در اکثر ریز نمونه‌ها پدیدار گردید. بالاترین فراوانی باززایی(۱۰۰ درصد) در ریزنمونه برگ در محیط MS حاوی ۰/۵: ۱: ۱/۵؛ ۲: ۱/۵ و ۱: ۲ میلی‌گرم بر لیتر TDZ: IBA، در ریزنمونه ساقه ۰/۵: ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP: NAA و در ریزنمونه ریشه در غلظت ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP، ۰/۲: ۱/۵ ؛۰/۲: ۲ و ۰/۲ : ۳ میلی‌گرم برلیتر TDZ: NAA و ۲:۱؛ ۲:۲؛ ۱: ۳؛ ۲: ۳ TDZ: IBA مشاهده گردید. ۴۱/۶۷، ۲۷ و ۲۰ تعداد شاخه به ترتیب در محیط حاوی ۱:۲ و ۱/۱:۵ میلی‌گرم برلیتر TDZ:IBA و ۲:۰/۲ میلی‌گرم برلیتر TDZ:NAA در ریزنمونه‌های برگ، ساقه و ریشه بدست آمد. گیاهچه‌های باززایی شده به محیط ریشه‌زایی حاوی غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر IBA منتقل و با نرخ بقای ۸۰ درصد در گلخانه سازگاری یافتند.

واژه های کلیدی: اندام‌زایی شاخه، بارهنگ کبیر، باززایی درون شیشه‌ای، جوانه‌زنی، کالوس‌زایی

* نویسنده مسئول، تلفن: خدیجه باقری تلفن : ۹۸۲۴۳۳۰۵۴۵۲۳+ ، پست الکترونیکی: bagheri.khadijeh@znu.ac.ir

مقدمه

Plantago بزرگترین جنس از خانواده *Plantaginaceae* است که حدود ۴۸۳ گونه از این جنس در مقالات گزارش شده است (۳۹، ۴۳). بارهنگ کبیر (*Plantago major*) یکی از قدیمی‌ترین گیاهان دارویی است که در طب سنتی بسیار مورد استفاده قرارگرفته و یکی از گسترده‌ترین گونه‌های گزارش شده در مقالات می‌باشد (شکل۱). این گیاه در سراسر جهان و در چمنزارهای معتدل اروپا، آسیا، جنوب استرالیا و همچنین شمال آفریقا و آمریکا توزیع شده است (۱۲و ۴۰). ترکیبات فعال بیولوژیکی مختلفی در گونه‌های بارهنگ وجود دارد از جمله آن‌ها می‌توان به آلکالوئیدها، مشتقات اسید کافئیک، کومارین‌ها، چربی‌ها، فلاونوئیدها، ایریدوئیدها، موسیلاژها، پلی ساکاریدها، استرول‌ها و مواد

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.1.12.6

فرار اشاره کرد (۱۰). ترکیبات فیتوشیمیایی موجود در برگ، ریشه و بذرهای بارهنگ باعث خواص درمانی قابل توجهی دراین 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-شود (۳و 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).

شکل۱- گیاه خودرو بارهنگ کبیر (*Plantago major*)

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 (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 واز طریق القاء کالوس اتفاق می افتد 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).

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.1.12.6

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) ، الفا-نفتالین اسید استیک (NAA) ، ۲، ۴ دی کلرو فنوکسی استیک اسید (2,4-D)، ۶-بنزیل آمینو پورین BAP و کینیتین(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 ۰/۱میلی‌گرم برلیترIAA و ۱ میلی‌گرم برلیترBAP انجام گردید (۲۵). بالاترین مقدار باززایی شاخه از ریزنمونه‌های لپه و محور زیر لپه *P.afra* در محیط MS، حاوی ۰/۲ میلی-گرم برلیتر تیدیازورون (TDZ) و ۰/۲ میلی‌گرم برلیتر IBA مشاهده شد. شاخه‌های موجود بهترین ریشه‌دهی را در محیط MS حاوی ۰/۶ میلی‌گرم برلیتر NAA داشتند (۳۶). در مطالعه‌ای دیگر، کشت درون شیشه‌ای گیاه *P.major* با استفاده از محیط MS همراه با ۰/۲ میلی‌گرم برلیتر IAA و۱/۰ میلی‌گرم برلیتر TDZ گزارش شده است (۲۱). در مطالعه اسماعیلی و همکارانش در۲۰۱۴، 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 پروتوکل جامع و مناسبی برای بهبود جوانه‌زنی بذر و سپس تکثیر گیاه از طریق القاء کالوس، اندام زایی و باززایی در شرایط درون شیشه‌ای است، لذا انجام تحقیقات مکرر و بصورت جامع برای دستیابی به روشی کارامد برای کشت بافت گیاه ضروری بنظر می‌رسد که بتوان از گیاهانی انبوه و عاری از هرگونه بیماری در روند تحقیقات دارویی از جمله تولید متابولیت-های ثانویه با ارزش و از لحاظ تجاری نیز سوداور استفاده کرد که این موضوع برای کشورهایی همچون ایران که دارای گیاهان دارویی متنوعی هستند، بسیار باارزش می-باشد. بارهنگ کبیر نیز حاوی متابولیت‌های ثانویه مهم از جمله ایریدوئیدهای اکوبین و کاتالپل است که دارای خواص متعددی از جمله ضدالتهاب، ضد سرطان و ضد میکروب هستند، بنابراین کشت‌های درون شیشه‌ای می-تواند 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 بذور با هیپوکلریت سدیم ۵ درصد همراه با یک قطره توئین-۲۰ به مدت ۱۰ دقیقه و مجددا 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 ۰/۱ 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

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.1.12.6

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 ۲±۲۲ درجه سانتیگراد و رطوبت نسبی ۵±۷۰ 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، بذرهای 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 مجددا 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 $^1/_8$) قرارگرفتند 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) قرارگرفتند. 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).

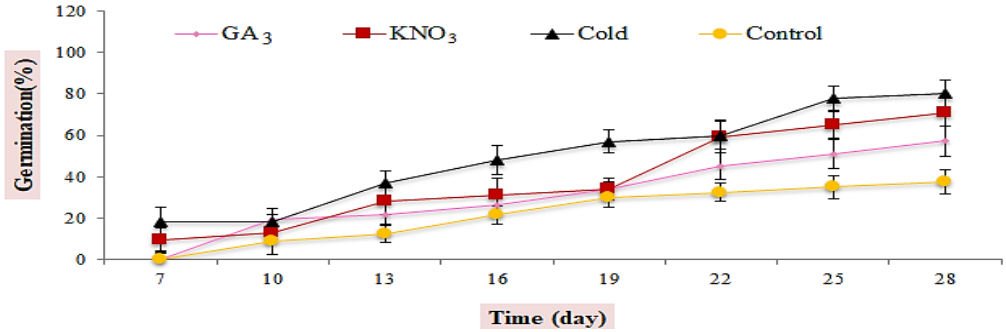
کشت بافت: براساس نتایج بهینه شده آزمایش جوانه‌زنی، بذرهای سرما دیده در محیط کامل MS کشت شدند و به مدت ۴ تا ۸ هفته در ۱۶ ساعت روشنایی قرارگرفتند. ریزنمونه‌های برگی، ساقه و ریشه به اندازه یک سانتی‌متر از گیاهچه‌ها بریده شده و در محیط MS حاوی ترکیب سیتوکینین‌های BAP یا TDZ و اکسین‌های NAA، IAA یا IBA در غلظت‌های مختلف کشت گردیدند. غلظت هر دو 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 هوگلند 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. داده ها با استفاده از تجزیه واریانس مورد تجزیه و تحلیل قرارگرفتند 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

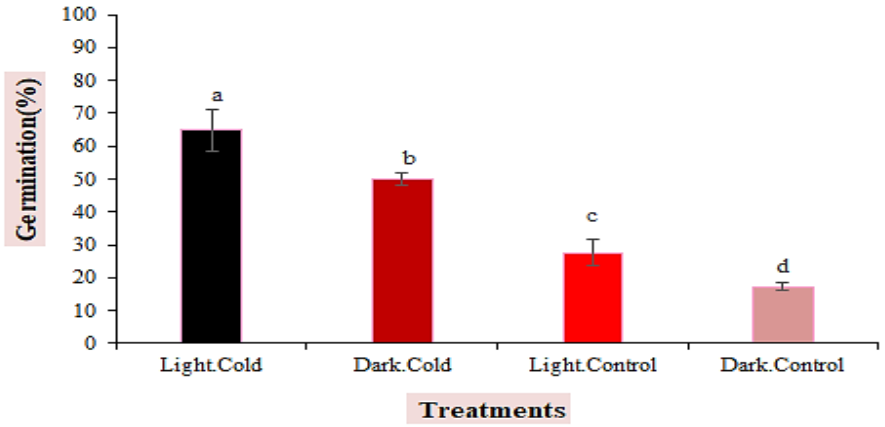
تأثیر عوامل مختلف بر جوانه‌زنی بذر بارهنگ کبیر: در ابتدا، بذرهای بارهنگ کبیر ضدعفونی شدند و با تیمارهای مختلف GA_3 ، KNO_3، سرما و آب مقطر استریل به عنوان شاهد آزمایش شدند. یافته‌ها نشان داد که در هفته اول، اثر پیش تیمار سرما (۱۸ درصد جوانه زنی)، KNO_3 (۹/۴۵ درصد) و GA_3 (صفر درصد) بود و پس از گذشت ۲۸روز،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

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.1.12.6



شکل۲- تأثیر پیش‌تیمارهای مختلف Cold (۴ درجه سانتی‌گراد)، GA_3 (۰/۱میلی مولار)، KNO_3 (۱ میلی مولار) و آب مقطر استریل (کنترل) بر درصد جوانه‌زنی بذر گیاه بارهنگ کبیر، نتایج بصورت میانگین سه تکرار ± انحراف معیار ذکر گردید.

باتوجه به تأثیر بهتر سرمادهی بر جوانه‌زنی بذرها، برای آزمایش دوم، مجددا بذرها سرما دیدند و در معرض روشنایی نور روز (۱۶ ساعت) و تاریکی کامل در محیط MS قرارگرفتند و درصد جوانه‌زنی به مدت دو هفته ثبت گردید.

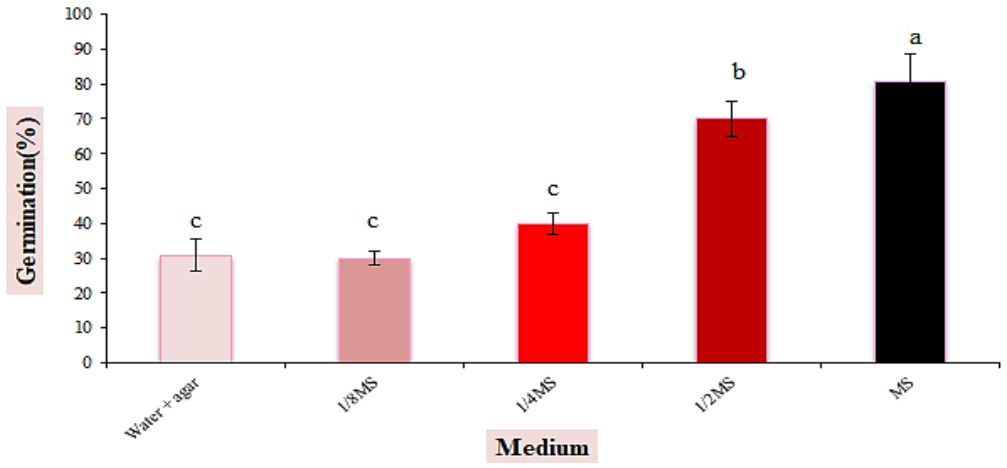


شکل۳- تأثیر نور و تاریکی بر جوانه‌زنی بذر گیاه بارهنگ کبیر (*Plantago major*) Cold. بذرهای سرما دیده و Control: گیاهان شاهد، Light: شرایط طول روز (۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی) و Dark: شرایط تاریکی کامل، نتایج بصورت میانگین سه تکرار ± انحراف معیار و بر حسب آزمون توکی در سطح ۵ درصد محاسبه گردید. حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت آماری داده‌ها می‌باشد

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

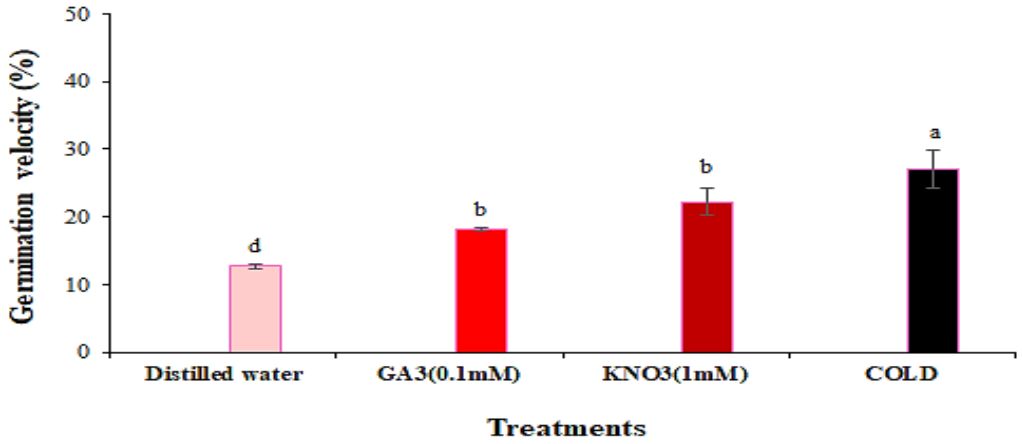
به منظور بهینه کردن روشی برای جوانه‌زدن سریع و خارج از فصل، در آزمایش سوم بذرها ضدعفونی شده و با سرما تیمار شده و در محیط MS با غلظت‌های مختلف نمک (۱، $1/2$، $1/4$ و $1/8$) کشت شدند. یافته‌ها نشان داد که محیط با درصد نمک بیشتر، جوانه‌زنی و رشد سریعتری را نشان می‌دهد، زیرا در هفته اول ۵۰ درصد جوانه‌زنی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

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.1.12.6



شکل۴- تأثیر غلظت‌های مختلف نمک محیط MS بر جوانه‌زنی بذر گیاه بارهنگ کبیر (*Plantago major*). نتایج بصورت میانگین سه تکرار ± انحراف معیار و برحسب آزمون توکی در سطح ۵ درصد محاسبه گردید. حروف متفاوت نشاندهنده تفاوت آماری تیمارها می‌باشند.

در نهایت شاخص نرخ جوانه زنی بذر بارهنگ کبیر برای پیش تیمارهای مختلف در آزمایش اول اندازه‌گیری گردید (شکل۵). 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 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.



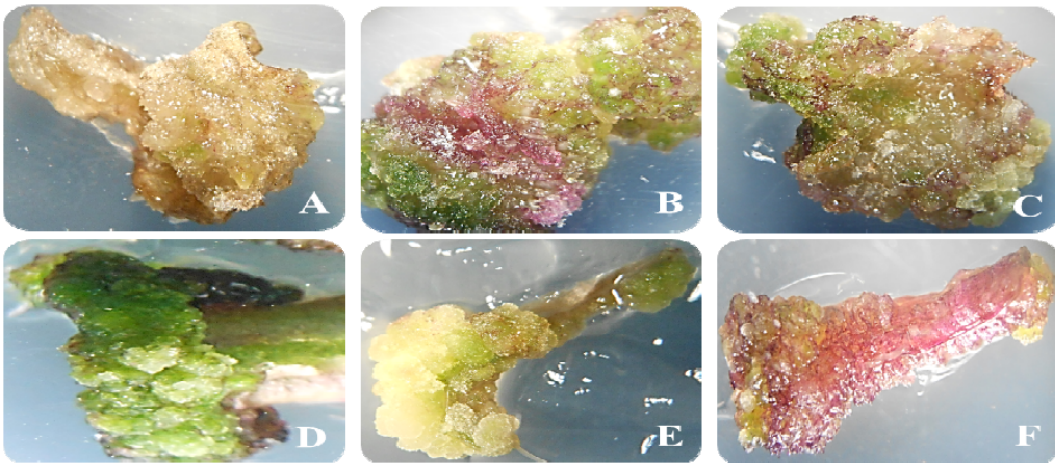
شکل۵- نرخ جوانه زنی شاخص تیمسون اصلاح شده، نتایج بصورت میانگین سه تکرار ± انحراف معیار و برحسب آزمون توکی در سطح ۵ درصد محاسبه گردید، حروف متفاوت نشاندهنده تفاوت آماری تیمارها می‌باشند.

یافته‌های کشت بافت گیاه بارهنگ کبیر در ترکیبات مختلف تنظیم کننده‌های رشدی: پس از ۲ یا ۳ زیرکشت، کالوس‌ها در اکثر ریزنمونه‌ها ظاهر شدند (شکل ۶ و۷). بیشترین درصد کالوس‌زایی (۱۰۰ درصد) در اکثر ترکیبات هورمونی مشاهده شد. با این حال در ریز نمونه برگی با

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.1.12.6

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 و (۱/۵و 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 (۰/۵ و ۱ میلی‌گرم برلیتر) ، IAA (۱و ۱/۵میلی‌گرم برلیتر) و IBA (۱/۵ میلی‌گرم برلیتر) در ترکیب با هم کالوس‌زایی بیشتری را القاء کرده‌اند.

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. بااین 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). بدین‌ترتیب ریزنمونه‌های مختلف تحت تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشدی متفاوت، میزان متفاوتی از کالوس‌دهی را نشان دادند.



شکل۶- کالوس‌زایی ریزنمونه‌ها با ترکیبات هورمونی مختلف، (A) کالوس درترکیب هورمونی BAP/NAA; (B,C) BAP/IAA; (D) BAP/IBA; (E) کالوس چهارهفته‌ایBAP/IAA (F) BAP/NAA

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

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.1.12.6

بالاترین فراوانی باززایی در ریزنمونه برگ (۱۰۰ درصد) در محیط MS حاوی ۰/۵: ۱؛ ۱: ۱/۵؛ ۲: ۱/۵ و ۱: ۲ میلی گرم برلیتر TDZ: IBA مشاهده گردید. میزان کمی از باززایی (۲ درصد) در ترکیب ۱: ۰/۵ میلی‌گرم برلیتر IAA : BAP مشاهده شد (شکل۸).

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

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

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

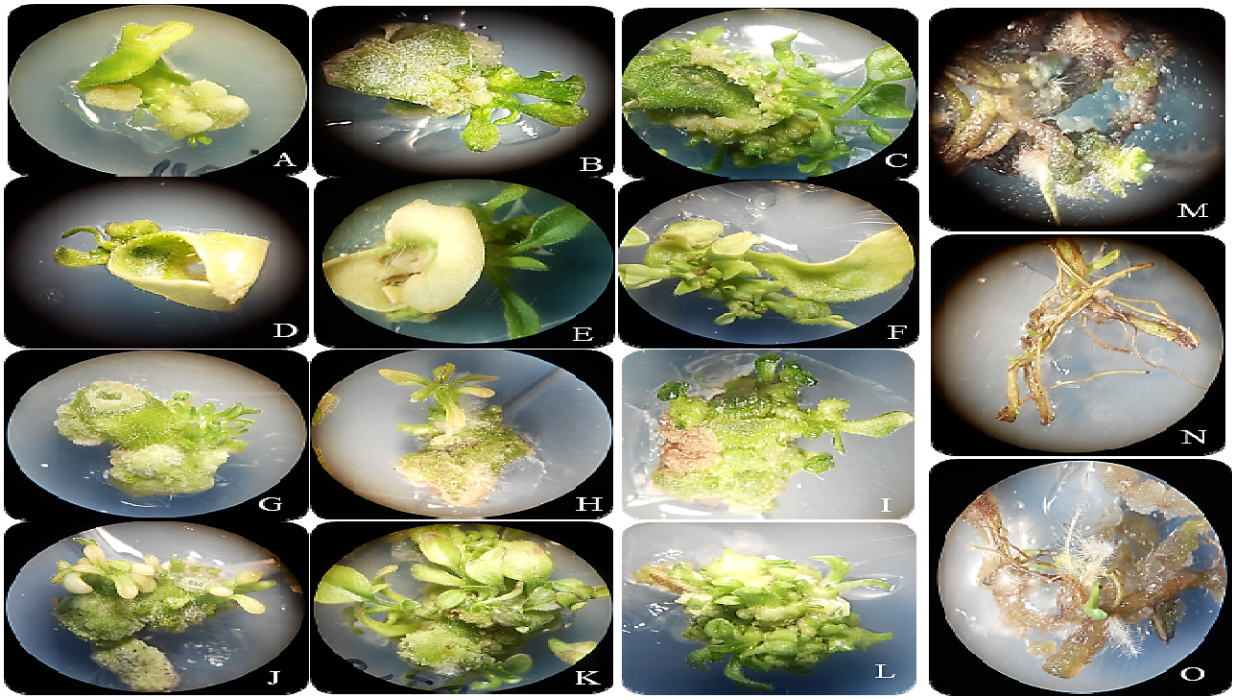
اکسین	سیتوکینین	سیتوکینین/اکسین (میلی گرم بر لیتر)	کالوس زایی (درصد)	باززایی (درصد)	باززایی مستقیم (درصد)	باززایی غیرمستقیم (درصد)	تعداد جوانه در هر ریزنمونه (عدد)
none	BAP	-	-	-	-	-	-
NAA	BAP	۲:۰/۵	۰/۰±۱۰۰	۰/۰±۱۰۰	۰/۰±۰/۰	۰/۰±۱۰۰	۲۵ ±۵/۱
IAA	BAP	۱/۵:۱/۵	۰/۰±۱۰۰	۴/۶±۷۰	۰/۰±۰/۰	۱۰±۷۰	۲/۲±۳۲
IBA	BA	۲:۲ ۱/۵:۱ ۱/۵:۰/۵	۲±۷۲ ۹۴ ±۱/۱ ۳,۳±۷۰	۸/۳±۵۴ ۵۲±۱/۵ ۰/۵±۵۵	۰/۰±۰/۰	۸/۳±۵۴ ۵۲±۱/۵ ۰/۵±۵۵	۲۴ ±۲/۴ ۲۶/۵ ±۲/۵ ۲۸ ±۱/۶
none	TDZ	-	-	-	-	-	-
NAA	TDZ	۱:۱	۰/۰±۱۰۰	۸۱/۲۵± ۱۰/۸	۰/۰±۰/۰	۸۱/۲۵ ±۷/۳	±۱۵ ۳/۱
IAA	TDZ	۳:۰/۱	۰/۰±۱۰۰	۲/۴±۳۲	۰/۰±۰/۰	۳±۳۲	۷/۵ ±۲/۵
IBA	TDZ	۱/۵:۱	۵/۲± ۹۵	۸۶/۶۶ ± ۳/۳	۰/۰±۰/۰	۸۶/۶۶ ±۱۴	۲۷/۳۷ ±۱/۳

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.1.12.6

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

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

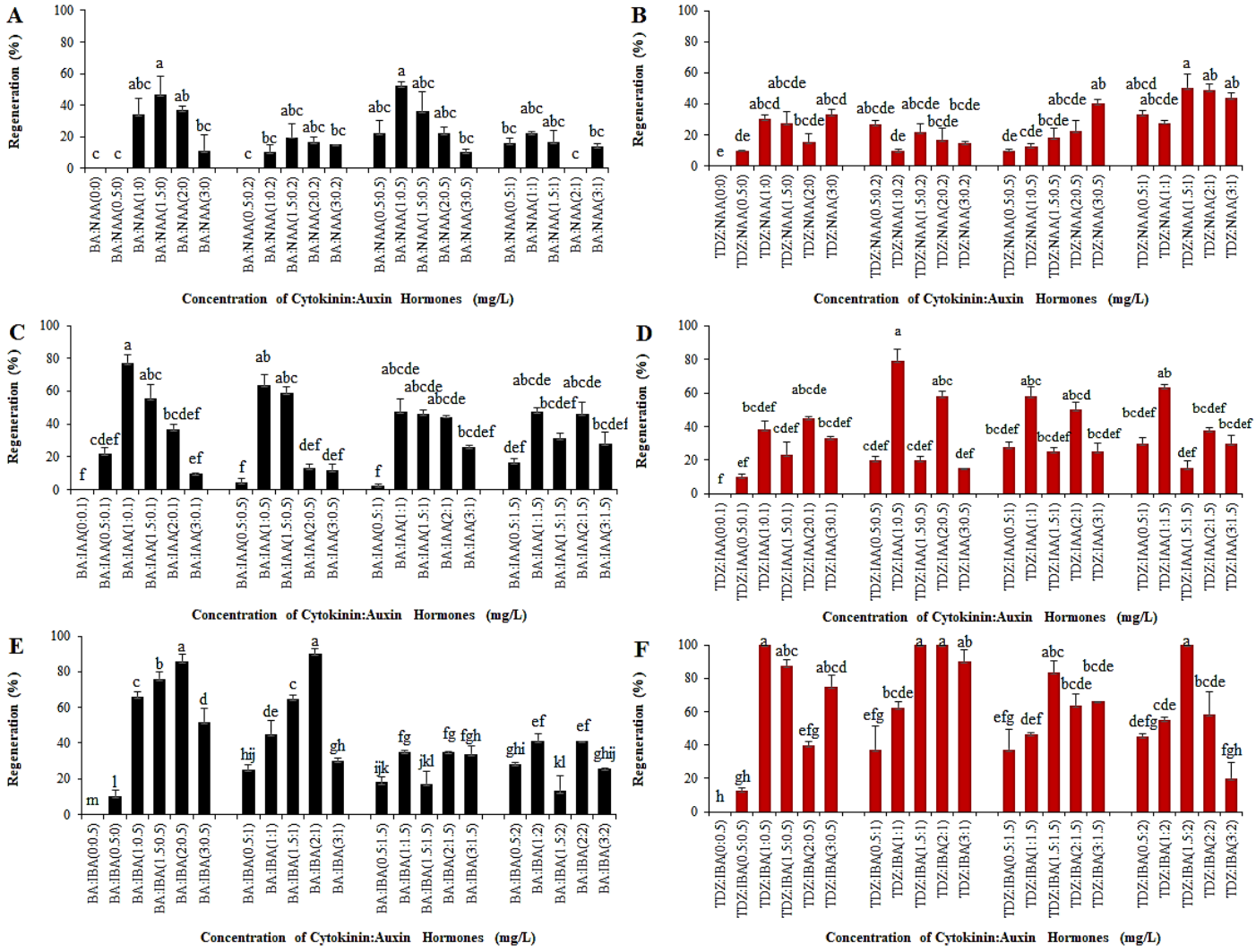
نتایج بصورت میانگین ± انحراف معیار بیان شدند



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 ۱/۵میلی گرم بر لیتر BAP ، (F) باززایی مستقیم در غلظت ۱میلی‌گرم بر لیتر BAP. (G-I) القاء کالوس از ریزنمونه ساقه و باززایی غیرمستقیم از کالوس در نمونه ساقه در غلظت ۱/۵:۰/۱ میلی‌گرم 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 میلی‌گرم برلیتر BAP:IAA و (O) تشکیل کالوس و باززایی از ریشه در غلظت۱/۵:۱ میلی‌گرم برلیتر TDZ:IBA

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.1.12.6

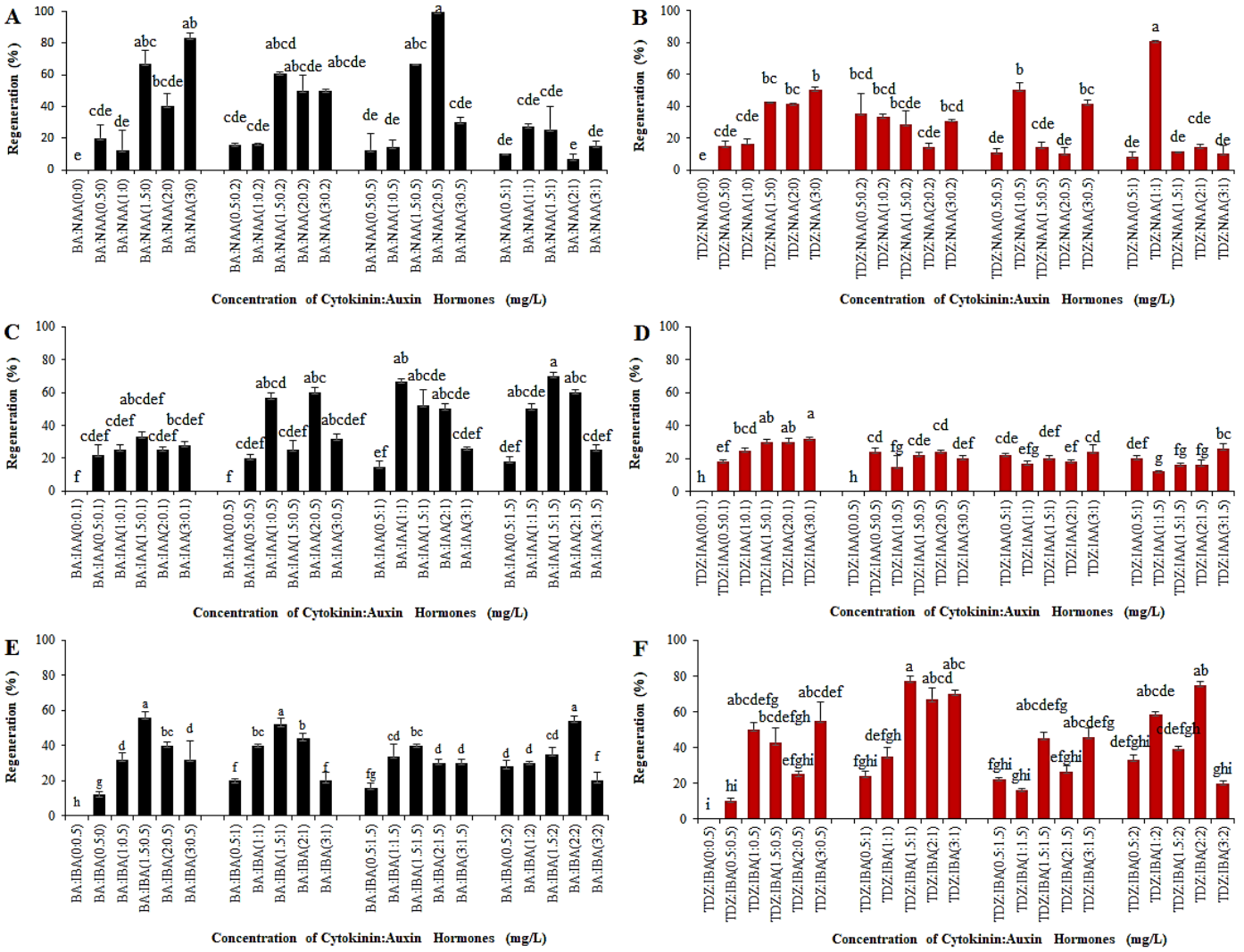
۰/۵: ۲ میلی‌گرم برلیتر BAP: NAA و ۱: ۰/۵میلی‌گرم برلیتر TDZ: NAA به ترتیب بیشترین (۱۰۰ درصد) و کمترین باززایی (۸/۳۳ درصد) را در ریزنمونه ساقه نشان دادند (شکل ۹). در ریزنمونه ریشه (۱۰۰ درصد باززایی) در غلظت ۱/۵ میلی‌گرم برلیترBAP ، ۱: ۱/۵ BAP: NAA ، ۰/۱: ۱/۵ BAP: IAA، ۰/۲: ۱/۵ ؛۰/۲: ۲ و ۰/۲ : ۳ میلی‌گرم برلیتر TDZ: NAA، ۱: ۱/۵ TDZ: IAA و ۲:۱؛ ۲:۲؛ ۱: ۳؛ ۲: ۳ TDZ: IBA مشاهده گردید (شکل ۱۰). فراوانی بالای تعداد شاخه‌های باززا شده ۶۷/ ۴۱ 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 ۱/۱:۵ میلی‌گرم برلیتر TDZ:IBA در ریزنمونه ساقه و ۲:۰/۲ میلی گرم برلیتر TDZ:NAA در ریزنمونه ریشه بدست آمد.



شکل ۸– درصد باززایی در ریزنمونه برگی بارهنگ کبیر (*Plantago major*). A) تیمارهای مختلف BAP:NAA، B) TDZ:NAA، C) BAP:IAA، D) TDZ:IAA، E) BAP:IBA و 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.

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.1.12.6

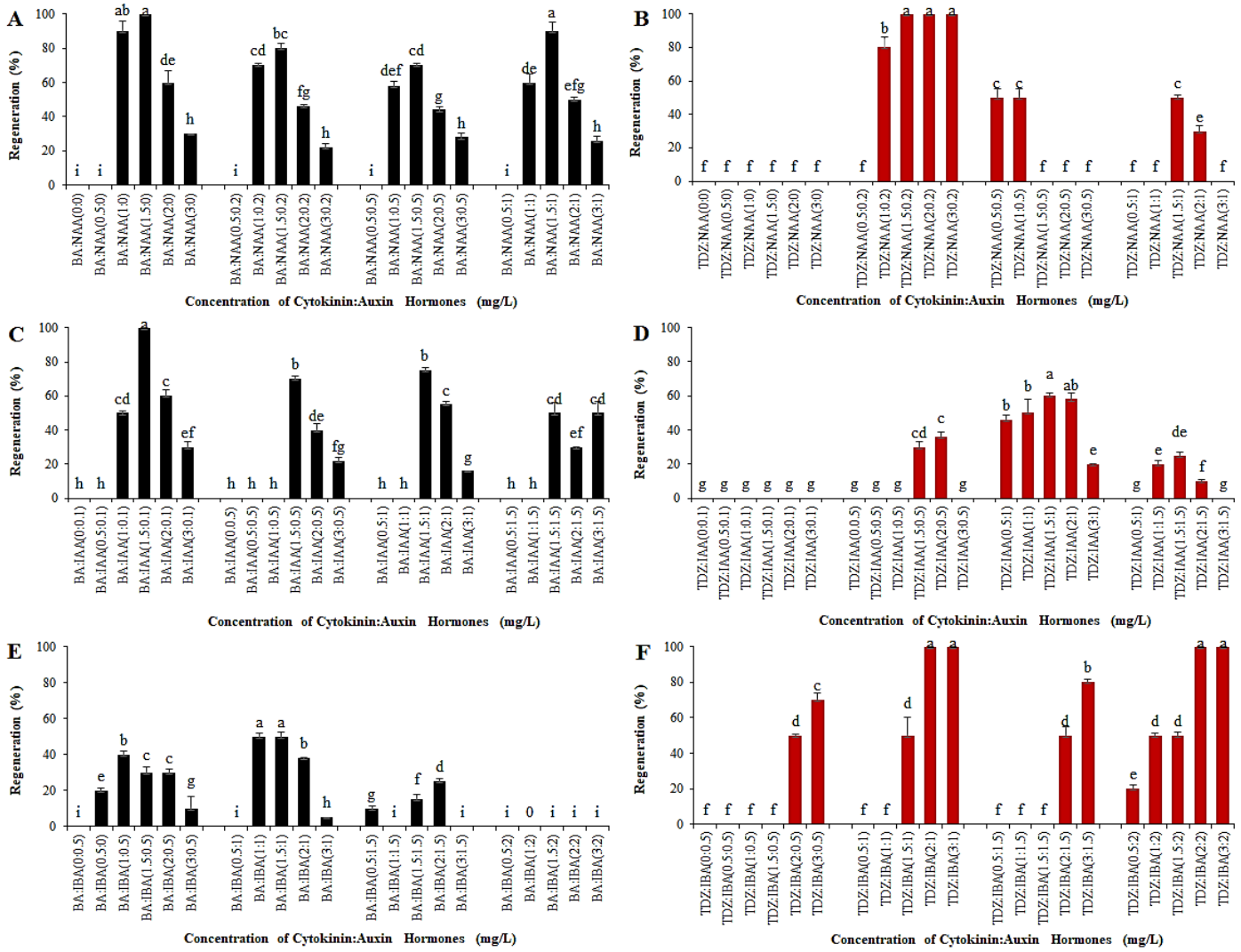
بعضی از گیاهچه‌های باززا شده در محیط بدون هورمون، ریشه‌دار شدند و نیازی به انتقال به محیط هورمون دار نداشتند با این حال گیاهچه‌های بدون ریشه به محیط ریشه‌زایی حاوی غلظت ۰/۵ میلی‌گرم برلیتر IBA منتقل شدند (شکل۱۱).



شکل ۹- درصد باززایی در ریزنمونه ساقه بارهنگ کبیر (*Plantago major*). A) تیمارهای مختلف BAP:NAA، B) TDZ:NAA، C) BAP:IAA، D) TDZ:IAA، E) BAP:IBA و 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.

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 گرفتند و با نرخ بقای ۸۰ درصد در گلخانه سازگاری یافتند (شکل۱۲).

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.1.12.6



شکل ۱۰- درصد باززایی در ریزنمونه ریشه بارهنگ کبیر (*Plantago major*). A) تیمارهای مختلف BAP:NAA، B) TDZ:NAA، C) BAP:IAA، D) TDZ:IAA، E) BAP:IBA و 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.

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

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.1.12.6

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

شکل ۱۲- مرحله سازگاری و انتقال گیاهچه‌های باززاشده 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.

نتایج ما نشان داد که بیشترین و معنی‌دارترین (تفاوت در سطح ۵ درصد) باززایی درترکیب TDZ: IBA برای هر سه ریزنمونه بدست آمد. به طورکلی، ریزنمونه ریشه نسبت به دو ریزنمونه برگ و ساقه باززایی کمتری را نشان می‌دهد و همچنین بیشترین باززایی‌ها از نوع غیرمستقیم بودند. ریزنمونه برگی بیشتر از دو ریزنمونه دیگر باززایی مستقیم را نشان داده است بطوری که در غلظت سیتوکینین ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم برلیتر BAP باززایی مستقیم قابل توجهی مشاهده گردید (شکل ۷ D-F). تیمار ریزنمونه‌ها با هورمون سیتوکینینBAP باززایی مستقیم بیشتری را موجب می‌شود اما تیمار با سیتوکینین TDZ باززایی بیشتر از نوع غیرمستقیم را نشان دادند.

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.1.12.6

بحث

بذر بارهنگ کبیر به دلیل اهمیت فراوان برای تحقیقات متعددی استفاده می‌گردد و اغلب از کلکسیون‌های خصوصی، باغ‌های گیاه شناسی 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 GA_3 استفاده کرده‌اند (۱۳).Pons (1992) بیان کرد تأثیر پیش تیمار ۱۰ میلی مولار KNO_3 بر جوانه‌زنی بذرهای 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 KNO_3 باعث افزایش درصد جوانه‌زنی در مقایسه با پیش تیمارGA_3 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 (۲۹و ۳۳) و همچنین سرمادهی بذرهای 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 بذرهای سرما دیده نسبت به سایر پیش تیمارها سرعت و درصد جوانه-زنی 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 (۳۸و ۴۱) در حالی که در مطالعات دیگر، بیان شد که اکثر بذرهای بارهنگ در شرایط روشنایی طول روز نیز جوانه می‌زنند و بذرهای 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، گزارش-های قبلی محققان درباره گونه بارهنگ کبیر را تأیید می-کند، زیرا مشاهده گردید که شرایط روشنایی طول روز (۱۶ ساعت) برای جوانه‌زنی گیاه مفیدتر بود و علاوه بر جوانه-زنی، رشد بهتر گیاه را به همراه داشت. محققان بسیاری از محیط‌های مختلفی برای کشت‌های درون شیشه‌ای گونه-های بارهنگ استفاده کردند از جمله این محیط ها 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 (۱۰و ۱۹) در مطالعات تغییر یافته است. دراین پژوهش محیط MS برای کشت این گیاه انتخاب گردید و برای بهینه ساختن شرایط تکثیر و جوانه-زدن بذرها، غلظت‌های مختلفی از آن تهیه شد. یافته‌ها بهتر بودن محیط کامل MS را نشان دادند. محققان تنظیم کننده های 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 ۱میلی‌گرم برلیتر 2,4-D و ۰/۵ میلی‌گرم برلیتر BAP زیرکشت شدند و سپس به محیط حاوی ۰/۵ میلی‌گرم برلیترBAP منتقل شدند (۲۶). ساقه-

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.1.12.6

زایی و ریشه‌زایی از کشت‌های نوک ساقه بارهنگ کبیر بر روی محیط MS تغییریافته به همراه ۰/۱ میلی گرم برلیتر BAP و سپس ۰/۱۸ میلی‌گرم 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 درون زا 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 برگی 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 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 می توان با تولید انبوه از طریق ریزازدیادی، تولید و خالص‌سازی گردند. این گیاه پتانسیل خوبی برای پاسخ به هورمون‌های برون زا 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 اگروباکتریوم رایزوژنز و ازدیاد این متابولیت‌های با ارزش و ارزیابی‌های 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 می دارند.

منابع

۱. پشم فروش، ن.، و احمدآبادی، م.، ۱۳۹۹. بهینه سازی کشت بافت و باززایی گیاه سنبل الطیب (Valeriana officinalis)، مجله پژوهشهای گیاهی (مجله زیست شناسی ایران)، جلد۳۳، 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 زیست شناسی 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.

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.1.12.6

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 inActinidia 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. Esmaeili, F., Shooshtari, L., Ghorbanpour, M., and Etminan, 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 annuum 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 vularis 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 (*Lycopersicum 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

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.1.12.6

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].

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.1.12.6

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 **s**eed 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-Naphtalen 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