مجله زیست فناوری گیاهان دارویی
سال چهارم، شماره اول، بهار و تابستان ۱۳۹۷

کشت بافت و باززایی درون شیشه‌ای گیاه دارویی *Plantago major*

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

چکیده

استفاده از گیاهان به عنوان دارو پیشینه‌ی بسیار قدیمی دارد و در تمام تمدن‌های گذشته از آن‌ها به عنوان داروهای گیاهی استفاده می‌کردند. بارهنگ یکی از جنس‌های خانواده پلانتاجیناسه و گیاهی دارویی است. بارهنگ کبیر (*Plantago major*) یکی از با ارزش-ترین گونه‌های این جنس است و متابولیت‌های ثانویه باارزشی دارد. ریزنمونه‌های برگ، ساقه و ریشه این گیاه در شرایط درون شیشه‌ای بر روی محیط (MS) با ترکیب غلظت‌های مختلفی از تنظیم کننده‌های رشدی TDZ و IBA کشت گردیدند. بعد از چهار هفته، درصد کالوس زایی و باززایی ریزنمونه‌ها محاسبه شدند. بیشترین درصد کالوس‌زایی (۱۰۰%) در سطح ۲:۱ میلی‌گرم بر لیتر TDZ: IBA در هر سه ریزنمونه و بیشترین باززایی(۱۰۰%) در برگ‌ها و در ترکیبات هورمونی ۱:۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر TDZ: IBA ، ۱ :۱/۵میلی‌گرم بر لیتر TDZ: IBA بترتیب با درصد باززایی مستقیم (۳۰% و ۶۹/۰۵ %) و ۲ :۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر TDZ: IBA ، ۲:۱ میلی‌گرم برلیتر TDZ: IBA با درصد باززایی غیر مستقیم (۸۳/۳۳% و ۱۰۰%) نشان داده شد. غلظت ۲:۱ میلی‌گرم بر لیتر TDZ: IBA توانست بیشترین درصد باززایی و کالوس را در هر سه ریزنمونه نشان دهد و بالاترین فراوانی در تعداد شاخه در محیط حاوی ۱:۲ میلی‌گرم بر لیترTDZ: IBA (برگ ۴۱/۶۷) و ۲:۲ میلی‌گرم بر لیتر TDZ: IBA (ساقه ۲۱) و (ریشه ۹) مشاهده گردید. گیاهچه‌های باززا شده برای ریشه زایی به محیط ۰/۵ میلی گرم بر لیتر IBA انتقال یافتند و گیاهچه‌های ریشه دارشده به گلدان‌های حاوی پیت ماس و پرلیت (۸۰:۲۰%) منتقل شدند و در فواصل منظم با محلول هوگلند و آب مقطر آبیاری گردیدند. نتایج ما نشان داد که باززایی‌ها از نوع شاخه‌های جانبی (Adventitious shoot) هستند و گیاه بارهنگ کبیر پتانسیل بالایی برای باززایی دارد و ریزنمونه برگ این گیاه در مقایسه با ریزنمونه های دیگر باززایی بهتری را نشان دادند.

واژه‌های کلیدی: بارهنگ کبیر، باززایی، القاء کالوس، کشت بافت

[۱] نویسنده مسئول، دانشجوی دکتری ژنتیک مولکولی، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران. ایمیل: Samaneh.rahamooz@znu.ac.ir
[۲] استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران
[۳] دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی، زنجان، ایران

مقدمه

گیاهان گروه بزرگ و متنوعي از ترکیبات آلي به نام متابولیت‌هاي ثانویه را تولید مي‌کنند که توسط انسان به عنوان ترکیب دارویي مصرف مي‌شوند (Oksman-Caldentey and Inzé, 2004). بزرگترین جنس از خانواده بارهنگ، پلانتاجیناسه (*Plantaginaceae*)، جنس *Plantago L.* است و شامل حدود ۲۷۵ گونه می‌باشد (Beara et al., 2012). بارهنگ کبیر (*P. major L.*)، جزء گسترده‌ترین گونه‌های گزارش شده در مقالات می‌باشد (Fons et al., 2008). گونه بارهنگ کبیر (*P. major*) گیاهی با توزیع جغرافیایی وسیع در چمنزارهای معتدل جهان است و در مناطق وسیعی از اروپا و مناطق معتدلی از آسیا، جنوب استرالیا و همچنین شمال آفریقا و آمریکا رشد می‌کند (Haddadian et al., 2014). این گیاه از جمله گیاهان دارویی ارزشمند است که در سال‌هاي اخیر مورد توجه زیادي قرار گرفته است و حدود ۴۸۳ گونه از جنس *Plantago* در سراسر دنیا توزیع شده است(Zubair, 2012). بارهنگ داراي خواص دارویي متعددي است، به عنوان مثال برگ‌ها و بذرهاي این گیاه داراي موسیلاژ مي‌باشند که از این مواد براي فرمولاسیون تعدادي از داروهاي خاص استفاده مي‌شود (Brautigam and Franz, 1985) . با توجه به مواد فیتوشیمیایی موجود در برگ، ریشه و دانه‌های *P.major*، این گونه دارای ویژگی‌های درمانی از جمله ضدزخم، ضد التهاب، ایمن سازی، آنتی‌اکسیدان، ضدویروس، ضدمیکروب، ضدسرطان و التیام دهنده جراحات می‌باشد (Zubair, 2012). برخی از محققان گزارش کردند که *P. major* حاوی ترکیبات فعال بیولوژیکی مانند آلکالوئیدها، پلی‌ساکاریدها، لیپیدها، مشتقات اسیدکافئیک، فلاونوئیدها، گلیکوزیدهای ایریدوئید، ترپنوئیدها، اسیدهای چرب و برخی از مشتقات ساختاری آن‌هاست (Samuelsen, 2000; Ringbom et al., 2001). ترکیبات فلاونوئیدی یکی از مشخص‌ترین کلاس‌های ترکیبات در *plantago* است (Kawashty et al.,1994). یکي از روش‌هایي که امروزه بیش از هر موضوع دیگر در زمینه بررسي متابولیت‌هاي گیاهي مورد توجه قرار دارد، روش کشت اندام، بافت و سلول-گیاهي است (Zhoua and Wu, 2006).

هدف از این مطالعه ایجاد پروتوکل ساده و ارزشمند برای القاء کالوس و باززایی این گیاه دارویی می‌باشد.

مواد و روش ها

مواد گیاهی

بذر گیاه بارهنگ کبیر از موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور تهیه گردید. بذور ابتدا سه دفعه با آب مقطر استریل شستشو داده شدند سپس با محلول تجاری هیپوکلریت سدیم ۵% به مدت ۱۰ دقیقه ضدعفونی شدند و مجدد با آب مقطر استریل شستشو داده شدند و در نهایت در اتانول ۷۰% به مدت ۳۰ ثانیه غوطه ور شدند و مجددا با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. بذور ضدعفونی شده در شرایط استریل بر روی محیط کشت موراشیگ و اسکوگ (MS) با ۹% آگار و فاقد هورمون‌های گیاهی، کشت گردیدند. pH محیط بر روی ۵/۸ قبل از اضافه نمودن آگار تنظیم شد و سپس بوسیله اتوکلاو در ۱۲۱ درجه سانتیگراد به مدت ۲۰ دقیقه استریل گردید. کشت‌ها در اتاقک رشد با تناوب نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ تاریکی در ۲±۲۵ درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

کشت بافت

برای القاء کالوس و باززایی، از گیاهان رشد یافته یک ماهه استریل، ریز نمونه‌هاي برگ، ساقه و ریشه به طول ۲-۱ سانتی متر برش داده شدند و بر روی پتری دیش‌های حاوی محیط کشت جامد MS حاوي ترکیب غلظت-هاي مختلف تنظیم کننده‌هاي رشد گیاهی سیتوکینین TDZ (۱، ۱/۵و۲ میلی گرم بر میلی لیتر) و اکسین (۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی گرم بر میلی لیتر) IBA کشت گردیدند. در هر تکرار ۱۰ ریز نمونه کشت گردید. نمونه‌ها در دماي۲±۲۵ درجه سانتیگراد و در شرایط

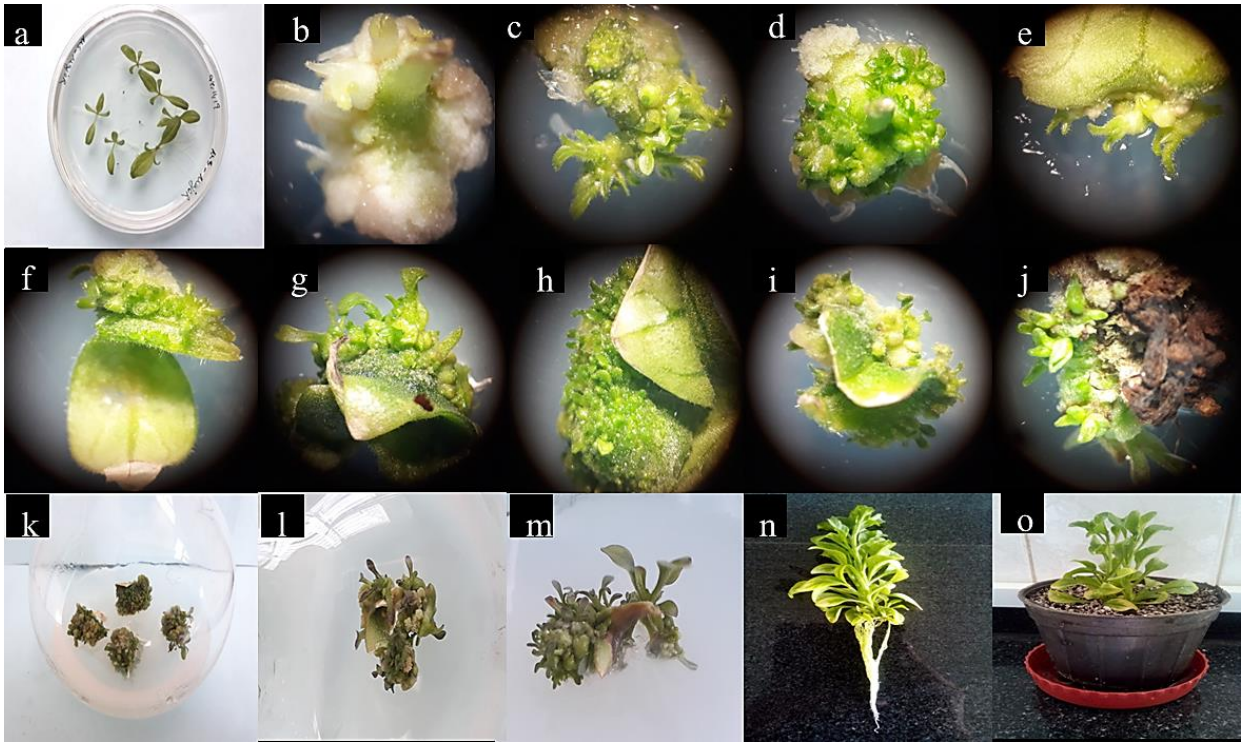
استاندارد ۱۶ساعت روشنایی شدت نور ۲۰۰۰ لوکس و ۸ ساعت تاریکی قرار داده شدند. ریزنمونه‌ها به محیط تازه هر دو هفته برای پیشگیری از قهوه‌ای شدن انتقال یافتند و پس از القاء کالوس، ریزنمونه‌ها به محیط MS با ۰/۵میلی گرم بر لیترTDZ برای القا شاخساره انتقال یافتند و شاخه‌های بدست آمده به محیط MS با (۰/۵میلی گرم بر لیترIBA برای القاء ریشه انتقال یافتند.

آزمایشات فاکتوریل بر پایه طرح کاملا تصادفی با ۳ تکرار و ۱۰ ریزنمونه در هر پتری دیش انجام گرفت. داده ها توسط نرم افزار SPSS 16 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. میانگین ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ($p\leq0.05$) مقایسه گردید.

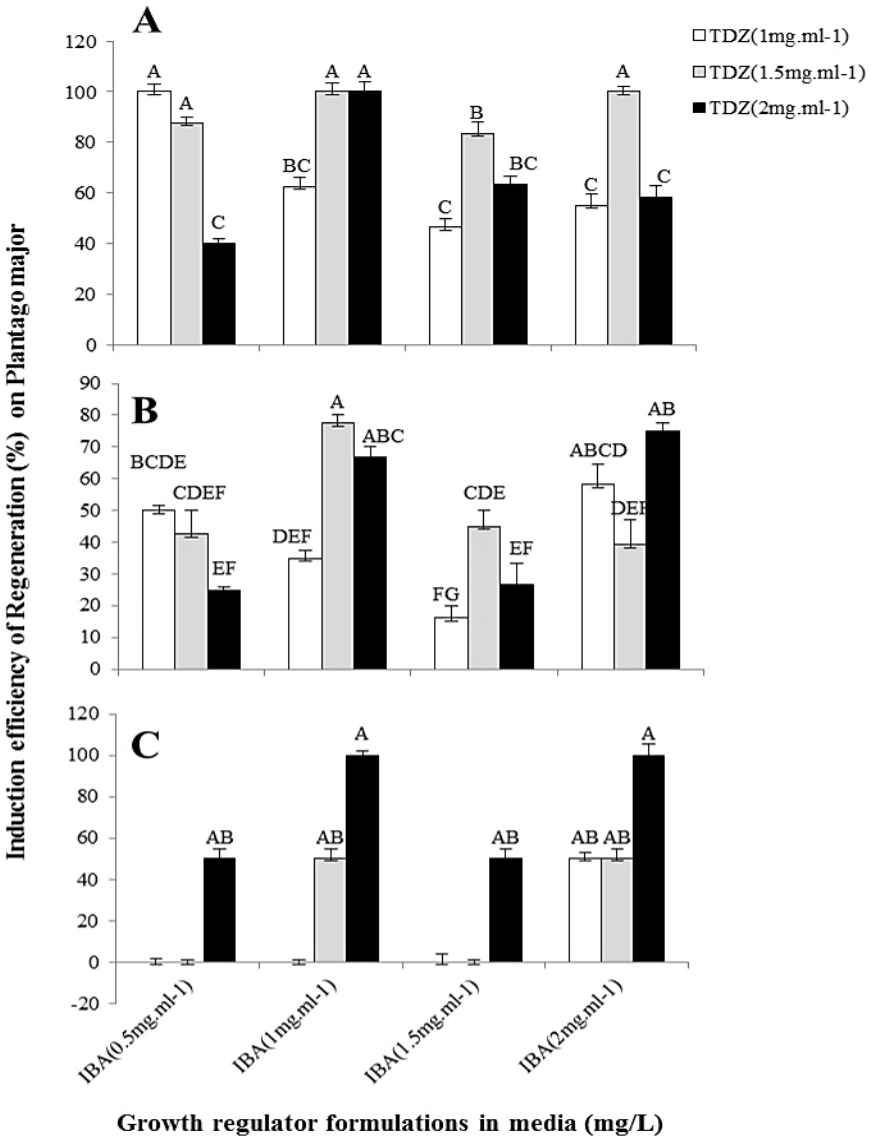
نتایج و بحث

از گیاهچه‌های چهار هفته‌ای برای گرفتن ریزنمونه استفاده گردید. آن‌ها بر روی محیط MS جهت القاء کالوس و باززایی کشت شدند. بعد از چند بار واکشت متوالی، بعد از دو هفته، کالوس‌ها در اغلب ریزنمونه‌ها پدیدار گردیدند (شکل 1b). ریزنمونه‌ها به محیط MS با TDZ ۰/۵ میلی گرم بر لیتر برای القاء شاخساره انتقال یافتند، باززایی بعد از حدود ۲-۳ هفته مشاهده گردید (شکل1). بالاترین فراوانی کالوس‌زایی(۱۰۰%) در برگ، در محیط MS حاوی ترکیبات (۱/۵:۱/۵و۲:۱ میلی گرم بر لیتر :TDZ IBA) و در ساقه غلظت‌های (۰/۵: ۱ ، ۱/۵:۱، ۱/۵:۱:۵، ۱/۵:۲، ۲:۱، ۲:۲ میلی گرم بر لیترTDZ: IBA) و در ریشه تمام غلظت‌ها بجز(۰/۵: ۱ و ۱:۱/۵میلی گرم بر لیترTDZ: IBA) مشاهده شد. بیشترین درصد باززایی در برگ‌ها (۱۰۰%) در ترکیب (۰/۵: ۱، ۱،۲:۱/۱،۵:۲/۵:۱ میلی گرم بر لیترTDZ: IBA) و در ساقه (۱/۵:۱و ۲:۱ میلی گرم بر لیترTDZ: IBA) و در ریشه (۱: ۲ و ۲:۲ میلی گرم بر لیترTDZ: IBA) نشان داده شد (شکل۲) و باززایی مستقیم و غیرمستقیم نیز برآورد گردید، بیشترین درصد باززایی مستقیم (۶۹/۰۵%) و غیر مستقیم (۱۰۰%) در برگ بترتیب در (۰/۵: ۱ و ۲:۱ میلی گرم بر لیتر TDZ: IBA) دیده شد و در ساقه بترتیب در ۲:۱/۵ میلی گرم بر لیتر (۱۶/۶۷%) و ۱/۵:۱ میلی گرم بر لیتر (۷۷/۵۰%) و ریشه تنها پتانسیل باززایی غیر مستقیم از طریق کالوس را در ۲:۱ و ۲:۲ میلی گرم بر لیتر (۱۰۰%) نشان داد، در حالیکه بیشترین مقدار جوانه در هر ریزنمونه (برگ، ساقه و ریشه) بترتیب در ترکیب هورمونی ۱:۲ (۴۱/۶۷) و ۲:۲ میلی گرم بر لیتر (۲۱) و (۹) بدست آمد. محققان در سال ۱۹۹۸ در تحقیق بر روی گیاه *P.major* ترکیبات مختلف تنظیم کننده‌های رشد (2,4-D, IAA, IBA, NAA and Kin) را به محیط MS اضافه نمودند و نتایج آنها گویایی تأثیر بهتر غلظت‌های هورمون‌های (2 $mg.l^{-1}$ 2,4-D + 0.5 $mg.l^{-1}$ Kin) برای تکثیر کالوس و (0.5 $mg.l^{-1}$ IAA + 1 $mg.l^{-1}$ Kin) برای رشد ساقه و (2 $mg.l^{-1}$ IBA +1 $mg.l^{-1}$ NAA) جهت ایجاد ریشه می‌باشد (Saker and Kawashity, 1998). محققان دیگری در سال ۲۰۰۵ نیز ریزنمونه‌های برگ را برای القاء کالوس و تشکیل جوانه و ریشه با استفاده از ترکیبات NAA، BAP در محیط MS استفاده کردند و نتیجه بهینه آنها نشان دهنده این است که محیط MS به همراه ۰/۸ تا ۱/۲ میلی گرم بر لیتر NAA برای کالوس دهی و محیط MS به همراه ۳/۵ تا ۴/۵ میلی گرم بر لیتر BAP مناسب تشکیل جوانه و القاء ریشه در محیط MS (1.2, 1.4) می‌باشد (Li and Li, 2005a). در مطالعه‌ای دیگر از کالوس‌های کشت شده *P. major* ، تولید ریشه و سپس جوانه‌های ساقه توسط واکشت بر روی MS +1 $mg.l^{-1}$ 2,4-D + 0.5 BAP، و بر روی محیط MS + 0.5 $mg.l^{-}$ BAP [1] انجام گرفت (Mathur *et al*., 1991). تکثیر ساقه و ریشه‌زایی کشت‌های نوک ساقه *P. major* سپس در ترکیب MS modified + 0.5 µM BAP و سپس µM MS modified + 1 NAA بدست آمد (Mederos et al., 1997/1998). آنچه که به نتایج برگرفته از مطالعات ما مشابهت نشان می‌دهد، تحقیقات Li و همکارش در سال ۲۰۰۵ است این محققان محیط MS را با ترکیب ۰/۵ تا ۴ میلی گرم بر لیتر TDZ ۰/۱ تا ۰/۳ میلی گرم

بر لیتر IAA بکار بردند و حاصل اینکار تشکیل جوانه‌های جانبی می باشد و برای ریشه‌زایی نیز از محیط MS استفاده نمودند (Li and Li, 2005b). مطالعه ما در پیرو نتایج ارزشمند محققان نامبرده می‌باشد و ترکیب TDZ:IBA می‌تواند باززایی۱۰۰% را نشان دهد چنانچه در این تحقیق ما به این مطلب پی بردیم که در تمام سطوح هورمونی بکار برده شده در ریزنمونه برگ، کاربرد TDZ منجر به باززایی شده است. در مطالعات دیگر یافتیم که TDZ کاملا از توسعه ریشه جلوگیری می‌کند که نتایج ما نشان داد، برگ‌ها در غلظت ۱/۵ :۲ میلی گرم بر لیتر شاهد ۱۰ درصد ریشه‌دهی می‌باشند. این جنس مقدار زیادی ترکیبات ارزشمند داروئی دارد، از جمله اکوبین و کاتالپول، بنابراین کشت‌های درون شیشه‌ای می-تواند برای تولید این ترکیبات مفید باشد.



شکل۱- کشت بافت و باززایی گیاه *plantago major* (a) بذرهای کشت شده گیاه در محیط کشت MS; (b) القاء کالوس از ریزنمونه ساقه (c,d) باززایی از کالوس در نمونه ساقه (e,f) باززایی از کالوس از برگ (g,h,i) باززایی مستقیم از برگ (j) باززایی از ریشه (k,l,m) باززایی از برگ (adventitious shoot) (n,o) انتقال گیاه باززا شده به خاک



شکل۲- القاء ساقه از نمونه‌های A) برگ ، B) ساقه و C)ریشه *plantago major* با استفاده از تنظیم کننده‌های رشدی در محیط MS

منابع

Beara, I.N., Lesjak, M.M., Orčić, D.Z., Simin, N.Đ., Četojević-Simin Dragana, D., BiljanaBožin, N. and Mimica-Dukić, M. (2012). Comparative analysis of phenolic profile, antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxic activity of two closely-related Plantain species: *Plantago altissima L.* and *Plantago lanceolata L.* Journal of Food Science and Technology, 47, 64-70.

Brautigam, N. and Franz, G. (1985). Experiments with tissue culture of mucilage–producting plant tissues. Journal of Pharmaceutical Sciences, 53, 237-46.

Fons, F., Gargadennec, A. and Rapior, S. (2008). Culture of *Plantago* species as bioactive components resources: a 20 -year review and recent applications. Acta Botanica Gallica, 155(2), 277-300.

Haddadian, K., Haddadian, K. and Zahmatkash, M. (2014). A review of *plantago* plant. Indian Journal of Traditional Knowledge, 13(4), 681-685.

Kawashty, S.A., Gamal, E.D., Abdalla, M.F. and Saleh, N.A.M. (1994). Flavonoids of *Plantago* species in Egypt**.** Biochemical Systematics and Ecology**,** 22, 729-33.

Li, Y. and Li, P. (2005a). In vivo culture method of *Plantago major*. Patent Written in Chinese CN 1701657, 9.

Li, Y. and Li, P. (2005b). Method for culturing *Plantago major* by inducing adventitious buds. Patent Written in Chinese CN 1685811, 9.

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, 249-254.

Mederos, S., Martin, C., Navarro, E. and Ayuso, M.J. (1997/1998). Micropropagation of a medicinal plant, *Plantago major* L. Plant Biology, 40, 465-468.

Oksman-Caldentey, K.M. Inzé, D. (2004). Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. Trends in Plant Sciences, 9(9), 433-440.

Ringbom, T., Huss, U., Stenholm, A., Flock, S., Skattebøl, L., Perera, P. and Bohlin, L. (2001). Cox-2 inhibitory effects of naturally occurring and modified fatty acids. Journal of Natural Products, 64,745-9.

Saker, M.M. and Kawashity, S.A. (1998). Tissue culture and flavonoid content of *Nepeta* and *Plantago* species endemic in Egypt. Fitoterapia, 69, 358-364.

Samuelsen, A.B. (2000). The traditional uses, chemical constituents and biological activities of *Plantago major* L. A review. Journal of Ethnopharmacology, 71,1–21.

Zhoua, L.G. and Wu, J.U. (2006). Development and application of medicinal plant tissue cultures for production of drugs and herbal medicinals in China. Natural Product Reports, 23, 789–810.

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 , 2012:20 [Doctoral thesis].

Journal of Medicinal Plants Biotechnology
Vol 4, No 1, Spring & Summer 2018

Tissue culture and in vitro regeneration of *Plantago major*

Samaneh Rahamooz-Haghighi[1]*, Khadijeh Bagheri [2] and Ali Sharafi[3]

Abstract

The use of plants as a medicine has a very old history and has been used as herbal medicines in all of its past civilizations. *Plantago* is one of genus belonging to the *Plantaginaceae* family and is a medicinal plant. *Plantago major* is one of the most valuable species of this genus and has valuable secondary metabolites. Part of leaves, stem, and root excised from in vitro *P.major* were cultured on (MS) medium supplemented with various plant growth regulators TDZ and IBA at different concentrations. After 4 weeks, callus percent, explants with shoot and number of shoots per explant were calculated. The best callus percent observed in all three of explant in 2:1 TDZ: IBA (100%). The best regeneration percent (100%) observed in leaves (100%) in 1:0.5 and 1.5:1 $mg.ml^{-1}$ concentration (69.05%, 30%) by direct regeneration and 1.5:2, 2:1 $mg.ml^{-1}$ by indirect regeneration (83.33%, 100%) respectively. Although 2:1 $mg.ml^{-1}$ showed the most callus and regeneration percent in all of the explants but the high frequency of a number of the shoots was obtained in the medium containing 1:2 $mg.ml^{-1}$ TDZ:IBA (Leave 41.67) and 2:2 $mg.ml^{-1}$ TDZ: IBA in Stem (21) and root (9) . Rooting was obtained on MS medium supplemented with 0.05 mg.ml-^{1} IBA. Two weeks later, the Seedlings were transferred to MS PGRs-free medium then were successfully transplanted to sterile 80% peat moss and 20% perlite mix in the pot after two weeks and at regular intervals, seedlings were watered with Hoagland solution and distilled water with a survival rate of 100%. Our result showed that regenerations were adventitious shoot. Therefore, this plantain has the good ability of regeneration as leaves showed great regeneration percent.

Keywords: *Plantago major* L, Tissue culture, Regeneration, Callus

[1]* Corresponding author, Ph.D. Student of Molecular Genetics & Genetic Engineering, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran. Email: Samaneh.rahamooz@znu.ac.ir
[2] Assistant Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran
[3] Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran