

تشکیل کالوس و تولید موسیلاژ در قطعات جداگشت برگ و ریشه چهارگونه بارهنگ

حسن ابراهیمزاده ، مسعود میر معصومی و سید محمد فخر طباطبائی

به ترتیب استاد و مدرس گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم دانشگاه تهران و مدرس گروه باغبانی

دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران

تاریخ پذیرش مقاله ۲۴/۱۱/۷۵

خلاصه

چهارگونه بارهنگ (*Plantago*) که در فلات ایران بهتر از بقیه نقاط زمین می‌رویند، از منابع مهم تولید طبیعی موسیلاژ جهان شناخته شده‌اند. قطعات برگ و ریشه این چهارگونه یعنی: بارهنگ تخم مرغی (*P.ovata*)، بارهنگ بزرگ (*P.major*) بارهنگ ککی (*P.psyllium*) و بارهنگ نیزه‌ای (*P.lanceolata*) در پنج محیط کشت پایه MSH, MSV, B5, NT, MS با غلظتهای هورمونی متفاوت کشت گردیدند و شرایط مناسب برای تشکیل کالوس مشخص شدند. بارهنگ ککی، بیش از گونه‌های دیگر توانایی تشکیل کالوس از خود نشان داد و گونه‌های دیگر به ترتیب زیر در گروه‌های بعدی قرار گرفتند: تخم مرغی، نیزه‌ای و بزرگ. محاسبه میانگین اثر متقابل گونه و محیط کشت تولید کالوس و گروه‌بندی آنها نشان داد که مناسب‌ترین محیط برای کشت برگ و ریشه، و به ترتیب اندازه کالوس از بزرگ به کوچک، NT-1 برای بارهنگ ککی (۵/۹۷ میلی‌متر) NT-1 برای بارهنگ تخم مرغی (۴/۹۱ میلی‌متر)، MSH برای بارهنگ نیزه‌ای (۴/۱۷ میلی‌متر) و B5-2 (۲/۸۳ میلی‌متر) برای بارهنگ بزرگ است و از این نظر قطعات جداگشت برگ و ریشه تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند. با اندازه‌گیری مقدار موسیلاژ در کالوسهای حاصل از تیمارهای مختلف مشاهده گردید که مناسب‌ترین محیط برای کالوسهای حاصل از برگ و ریشه، و به ترتیب میانگین مقدار موسیلاژ از بالا به پائین، MSH-3 برای بارهنگ بزرگ (۲۰/۵ درصد)، NT-3 برای بارهنگ نیزه‌ای (۱۲/۵۴ درصد) است. از این نظر، قطعات جداگشت برگ و ریشه تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نشان نمی‌دهند. حداکثر مقدار موسیلاژ در کالوس حاصل از برگ و ریشه بارهنگ تخم مرغی، بیشتر از بذر آن است، درحالیکه در بارهنگ بزرگ با کشت قطعات برگ و ریشه، تولید موسیلاژ با شدت بیشتری انجام می‌گیرد و به ۳ برابر مقدار آن در بذر، بالغ می‌شود. این تولید در کالوس حاصل از برگ و ریشه بارهنگ ککی شدت بیشتری نیز داشته تا ۷/۳ برابر حداکثر مقدار آن در بذر افزایش حاصل می‌نماید. تولید موسیلاژ در کالوسهای حاصل از کشت قطعات برگ و ریشه بارهنگ نیزه‌ای نسبت به گونه‌های دیگر شدت کمتری دارد. بنابراین، توانایی تولید موسیلاژ در کالوس بالا بوده و از کشت در شیشه نیز می‌توان برای تولید موسیلاژ استفاده نمود. بعلاوه بارهنگ ککی که با کشت در مزرعه محصول بذر کمتری دارد درصد موسیلاژ پائین‌تری تولید می‌کند، با کشت در شیشه تولید بیشتری از خود نشان می‌دهد و به گونه‌های بارهنگ تخم مرغی و بارهنگ بزرگ نزدیکتر می‌شود.

واژه‌های کلیدی: بارهنگ بزرگ یا بارهنگ معمولی (قاشقی)، بارهنگ تخم مرغی (اسفرزه)، بارهنگ نیزه‌ای

(کاردی)، بارهنگ ککی یا پسیلیوم (اسفرزه فرنگی)، کشت بافت، موسیلاژ

مقدمه

برخی گونه‌های تیره بارهنگ (*Plantaginaceae*) که در فلات ایران بهتر از بقیه نقاط زمین می‌رویند، از منابع مهم تولید طبیعی موسیلاژ در جهان شناخته شده‌اند. تحقیق مورد بحث بر روی قطعات برگ و ریشه چهارگونه بارهنگ (*Plantago*) صورت گرفته است که به لحاظ محتوای موسیلاژی بیشتر از گونه‌های دیگر این تیره، مورد توجه مراکز «اقتصادی - شیمیایی» داخلی و بازارهای مهم برون مرزی هستند. بویژه بذر گونه‌های مورد مطالعه غنی از موسیلاژ بوده و رقم بزرگ صادرات را در بعضی از کشورهای دنیا تشکیل می‌دهند (۲). این گونه‌ها عبارتند از: بارهنگ بزرگ (بارهنگ معمولی) معروف به قاشقی (*P. major*)، بارهنگ تخم‌مرغی معروف به اسفرزه (*P. ovata*)، بارهنگ نیزه‌ای معروف به کاردی (*P. lanceolata*) و بارهنگ ککی معروف به پسلیوم (*P. psyllium*). منظور از تحقیق حاضر، بیش از همه اعتلای سطح تولید موسیلاژ در اندامهای دیگر چهارگونه یاد شده علاوه بر بذر آنها بوده است. لازم به توضیح است که بذرهای بارهنگ تخم‌مرغی در طب سنتی به روشهای مختلف در درمان بیماریها به کار می‌رود (۱۲). بعلاوه موسیلاژ اندامهای مختلف گیاه کاربردهای داروئی و صنعتی جدیدی در برخی کشورها پیدا کرده است (۱۳). از کشورهای مهم مصرف کننده موسیلاژ آمریکا، انگلیس، آلمان، فرانسه و بلژیک هستند و همین مقادیر زیاد موسیلاژ بذور و اندامهای دیگر وجه اصلی اهمیت گیاه را در حال حاضر تشکیل می‌دهد (۱۲). علاوه بر بارهنگ تخم‌مرغی یا اسفرزه (که به لحاظ موسیلاژ بذر اهمیت دارد سه گونه دیگر نیز از نظر برخی صفات چشمگیر می‌باشند. مثلاً بارهنگ بزرگ ضمن اینکه بذرهای نسبتاً پر شمار محتوی موسیلاژ تولید می‌کند برگها و ریشه آنها، در شرایطی استعداد تولید موسیلاژ بیش از حد متعارف نشان می‌دهد (۳). بارهنگ ککی نیز بویژه از نظر کیفیت موسیلاژ تا حدودی جلب نظر می‌نماید، به طوریکه مصارف غدیده مشابه اسفرزه (بارهنگ تخم‌مرغی) را احراز کرده و به همین نظر گاهی در ایران از آن به عنوان اسفرزه فرنگی یاد شده است (۴). بارهنگ نیزه‌ای نیز از نظر تولید موسیلاژ خصلتهای متفاوت از سه گونه دیگر دارد که کمتر بر دقایق این خصلتها تعمق علمی شده است (۵). مجموعه قراین یاد شده ضرورت تحقیق حاضر را ایجاب نموده است. بارهنگ تخم‌مرغی از جمله گونه‌هایی است که قبلاً هم برای

کشت بافت مورد استفاده قرار گرفته است (۱۴ و ۱۵). در این گونه، کشت بافت با استفاده از قطعات محور زیر لپه (*hypocotyl*) دانه رست (*seedling*) و با کشت در محیط MS (۹) محتوی هورمونهای ۲ و ۴-دی کلرو فنوکسی استیک اسید، کینتین و نفتالن استیک اسید با غلظتهای متفاوت صورت گرفته و در نتیجه آن ریشه و جوانه نو پدید تشکیل شده است. بعلاوه گیاهان باززائی شده بطور موفقیت آمیزی به گلدانها انتقال داده شده‌اند.

مطالعه کشت سلول در بارهنگهای معمولی و ککی، با ایجاد کالوس از بذر در محیطهای B5 و NT و استفاده از آن برای کشت تعلیقی انجام شد. متعاقب آن با استفاده از محیط MSH (۳) کشت سلول گونه‌های مذکور در این محیط صورت گرفت (۱۱).

در پژوهش حاضر، از قطعات برگ و ریشه چهارگونه یاد شده

استفاده شد و پس از تعیین شرایط هورمونی لازم برای تشکیل کالوس در محیط کشتهای MS، NT، B5، MSV و MSH مقدار موسیلاژ کالوسهای حاصل مورد اندازه گیری قرار گرفت.

مواد و روشها

بذر گونه‌های مورد مطالعه از مرکز تحقیقات کویری و بیابانی اصفهان تهیه شد. بمنظور کشت بافت، بذرها، ابتدا با اتانل ۹۶٪ به مدت یک دقیقه و سپس با محلول تازه تهیه شده هیپوکلریت کلسیم ۵٪ به مدت ۲۰ دقیقه سترون شدند و بلافاصله با آب مقطر سترون پنج بار شستشو گردیدند. سپس در روی میز سترون به پتری دیشهای محتوی محیط کشت MS جامد شده با ۸/۰ درصد آگار منتقل شدند (۱۵) بذر در هر پتری). پتریها به اتاق رشد با دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی با شدت ۲۰۰۰ لوکس و ۸ ساعت تاریکی انتقال داده شدند و پس از تشکیل دانه رست (*seedling*) از بذر، که مدت ۱۰ تا ۲۰ روز بطول میانجامد، قطعات ۱/۵ سانتیمتری برگ و ریشه به عنوان قطعات جدا کشت به محیط کشتهای مختلف منتقل گردیدند و مدت دو ماه در این محیط نگه داشته شدند. هر تیمار هورمونی شامل ۴ تکرار (۴ پتری) و هر تکرار حاوی ۴ قطعه بود. تجزیه و تحلیل داده‌ها به صورت مشاهده‌ای و یا از طریق آماری با استفاده از طرح کاملاً تصادفی و مقایسه میانگینها بوسیله آزمون دانکن انجام گرفت.

آزمایش در جدول ۲ و شکل‌های ۲-۵ ارائه شده است. برای قطعات جداگشت برگ و ریشه بارهنگ تخم مرغی، میانگین قطر کالوس در محیط‌های NT-1 و MSH-2 بزرگتر از محیط‌های دیگر بوده در محیط‌های B5-1 و B5-4، ۸۰ درصد را شامل می‌شود. برای قطعات برگ و ریشه بارهنگ بزرگ، محیط‌ها از نظر تأثیر بر میانگین قطر کالوس باهم تفاوت قابل توجهی ندارند (جدول ۲) ولی درصد قطعات مولد کالوس در محیط‌های MSH-1، B5-4 به صد درصد و در محیط MSH-2 به ۹۰ درصد بالغ می‌شود.

در محیط‌های NT-1، B5-2، NT-4 و MS-4، ۸۰ درصد قطعات تولید کالوس می‌نمایند (شکل ۳). برای قطعات برگ و ریشه بارهنگ ککی، میانگین قطر کالوس در سه محیط NT-1، MSH-1 و B5-2 بالاتر از محیط‌های دیگر بوده (جدول ۲)، در محیط‌های B5-2 و NT-4 صد درصد قطعات، در محیط‌های B5-1، MS-1، MS-2، NT-4، MS-3، MSH-4، MSH-1 و در محیط‌های B5-4 و NT-1 هشتاد درصد قطعات، کالوس به وجود می‌آورند (شکل ۴). بالاخره برای قطعات برگ و ریشه بارهنگ نیزه‌ای، MSH-2 بر روی میانگین قطر کالوس اثر بهتری دارد، محیط B5-4 پس از آن قرار دارد و محیط‌های MSH-3، B5-2 و NT-1 مراتب بعدی را به دست می‌آورند (جدول ۲). در این گونه، درصد قطعات مولد کالوس در محیط‌های MSH-1 و MSH-2، صد درصد، در محیط‌های MSH-3 و NT-1، هشتاد درصد است (شکل ۵). قدرت تولید کالوس در گونه‌های مختلف تفاوت بسیار معنی‌داری با سطح اطمینان بالای ۰/۹۹۹ درصد با یکدیگر نشان می‌دهند. مقایسه میانگین گونه‌ها و گروه‌بندی آنها در سطح خطای ۵٪ و با حداقل تفاوت معنی‌دار ۱ و با استفاده از آزمون دانکن مشخص می‌نماید که توانائی بارهنگ ککی در تولید کالوس بیش از سایر گونه‌ها بوده، بارهنگ تخم مرغی، بارهنگ نیزه‌ای و بارهنگ بزرگ به ترتیب در گروه‌های بعدی قرار می‌گیرند (شکل ۶).

اثر متقابل بسیار معنی‌داری با سطح اطمینان بالای ۰/۹۹۹ درصد بین گونه‌ها و محیط‌های کشت وجود دارد. میزان تولید کالوس تحت تأثیر محیط کشت بستگی به نوع گونه دارد. بطوریکه بین ترکیبات محیط کشت و گونه اثر متقابل دیده می‌شود. مقایسه میانگین اثر متقابل گونه و محیط کشت بر تولید کالوس و گروه‌بندی آنها در

برای تعیین مقدار موسیلاژ در بافت کالوس، ابتدا یک گرم کالوس را در درون یک هاون سائیده، سپس آنرا به درون یک ارلن مایر ۱۰۰ میلی‌لیتری ریخته ۱۰ میلی‌لیتر اسید کلریدریک یک دهم نرمال به آن اضافه کردیم و تا به جوش آمدن محلول به آرامی حرارت دادیم. پس از ۵ دقیقه حرارت را قطع کرده و بلافاصله محلول را از خلال چندین لایه پارچه ممل صاف کردیم و درحالی‌که بافت‌های کالوس هنوز گرم بودند، بمنظور جدا کردن مقادیر باقیمانده موسیلاژ آنها را دوبار با ۵ میلی‌لیتر آب جوش شستشو دادیم. محلول حاصل از هر بار شستشو را صاف کردیم. به محلول صاف شده حاوی موسیلاژ ۶۰ میلی‌لیتر الکل اتیلیک ۹۵٪ اضافه کرده تکان دادیم و بمدت ۵ ساعت در یخچال قرار دادیم. موسیلاژ در ته ظرف رسوب می‌کند. به منظور تعیین مقدار موسیلاژ، محلول روئی را دور ریخته و ظرف محتوی موسیلاژ را در آن ۵۰ درجه سانتیگراد به مدت ۱۲ ساعت قرار دادیم. رسوب حاصل را وزن کردیم که معرف مقدار موسیلاژ در یک گرم بافت کالوس است (۱۲).

نتایج و بحث

نتایج حاصل از تأثیر محیط‌های کشت پایه و تنظیم‌کننده‌های رشد بر تولید کالوس^۱ و درصد جداگشت‌های مولد آن^۲ در جدول ۱ و شکل ۱ ارائه شده است. برای جداگشت‌های برگ و ریشه، میانگین قطر کالوس (جدول ۱) و همچنین میانگین درصد تولید کالوس (شکل ۱)، در محیط NT بیشتر از محیط‌های دیگر بوده برای جداگشت‌های برگ و ریشه بارهنگ بزرگ محیطها از نظر تأثیر بر میانگین قطر کالوس با هم تفاوت معنی‌داری نشان نمی‌دهند (جدول ۱)، ولی درصد تولید کالوس در جداگشت‌ها در محیط MSH بیشتر از محیط‌های دیگر است (شکل ۱). برای قطعات برگ و ریشه بارهنگ ککی، میانگین قطر کالوس در دو محیط MS و B5 بیشتر از محیط‌های دیگر است (شکل ۱). بالاخره برای قطعات برگ و ریشه بارهنگ نیزه‌ای، محیط NT بر روی میانگین قطر کالوس اثر نسبتاً بهتری داشته است (شکل ۱). در کلیه این موارد، پاسخ قطعات برگ و ریشه به محیط‌های مختلف نسبتاً یکسان بوده است.

اثر محیط کشت‌های پایه و هورمون‌های رشد بر تولید کالوس و درصد قطعات مولد آن با حفظ محیط کشت‌های پایه و تغییر غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد نیز مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج حاصل از این

جدول ۱ - واکنش قطعات جداگشت برگ و ریشه چهارگونه بارهنگ به تولید کالوس تحت تاثیر محیط کشت‌های پایه و تنظیم کننده‌های محیط

رنگ کالوس	تولید کالوس (mm)				قطعات اندامهای				تنظیم کننده‌های رشد (mg/L)				محیط کشت	
	بارهنگ	بارهنگ	بارهنگ	بارهنگ	بارهنگ	بارهنگ	بارهنگ	بارهنگ	IAA	Kin	BAP	NAA		2,4-D
نیزه‌ای	ککی	بزرگ	تخم مرغی	بارهنگ	ککی	بزرگ	تخم مرغی	کشت شده	IAA	Kin	BAP	NAA	2,4-D	پایه
قهو‌ای	کرم قهو‌ای	قهو‌ای شفاف	سبز شفاف	۲	۲	۲	۲	برگ	-	-	-	-	۰/۲	MS
قهو‌ای	کرم قهو‌ای	سبز قهو‌ای	سبز شفاف	۲	۲	۲	۲	ریشه	-	-	-	-	-	-
زرد شفاف	شفاف کرم	شفاف	شفاف قهو‌ای	۲	۱۱	۲	۲	برگ	-	۰/۱	-	-	۲/۲	MSH
زرد شفاف	شفاف کرم	شفاف	شفاف و قهو‌ای	۲	۱۱	۲	۲	ریشه	-	-	-	-	-	-
قهو‌ای تیره	قهو‌ای شفاف	شفاف سبز	سبز قهو‌ای	۲	۳	۲	۲	برگ	-	۰/۱	-	-	-	MSV
زرد شفاف	قهو‌ای شفاف	شفاف سبز	سبز و قهو‌ای	۲	۲	۲	۲۰	ریشه	-	-	-	-	-	-
سبز قهو‌ای	زرد شفاف	سبز شفاف	شفاف و قهو‌ای	۵	۱۳	۳	۱۱	برگ	-	-	۰/۱	-	-	NT
سبز قهو‌ای	زرد شفاف	سبز شفاف	شفاف و قهو‌ای	۵	۱۱	۵	۱۱	ریشه	-	-	-	-	-	-
قهو‌ای کم رنگ	شفاف قهو‌ای	شفاف	شفاف و سیاه	۲	۷	۲	۲	برگ	۰/۵	۰/۲	-	-	۰/۵	۲ BS
قهو‌ای کم رنگ	شفاف قهو‌ای	شفاف	شفاف و سیاه	۲	۳	۲	۳	ریشه	-	-	-	-	-	-

کالوس ضعیفی آشکار می‌نمایند. بهترین محیط برای تولید کالوس از قطعات برگ و ریشه این گونه B5-2 است که در آن کالوسها موسیلاژ کم تا متوسطی بوجود می‌آورند.

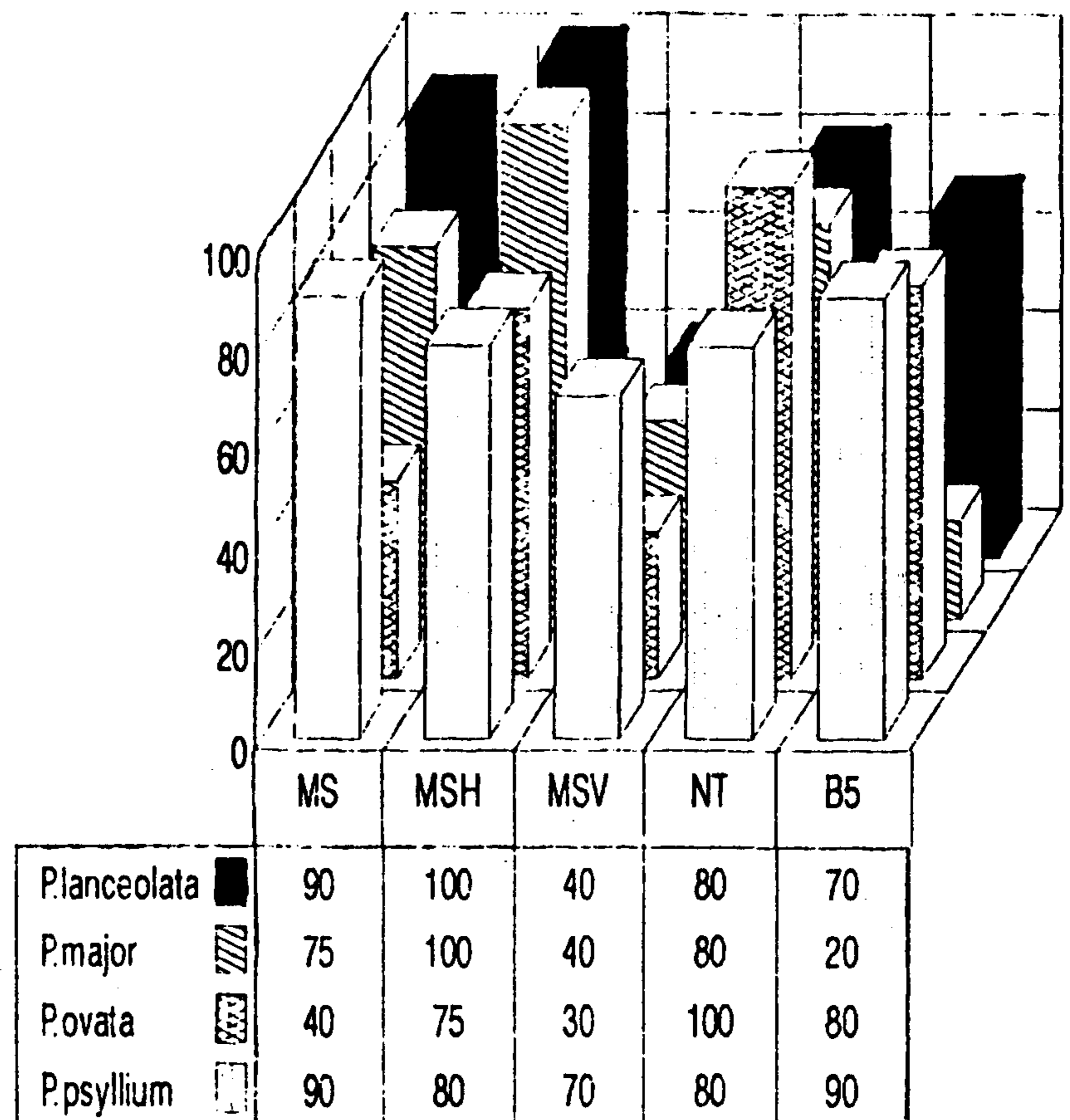
بهترین محیط برای تولید موسیلاژ بارهنگ ککی، MSH-2 برای قطعات برگ و MS-2 برای قطعات ریشه است که در آنها نمونه‌ها قدرت تولید کالوس متوسطی از خود نشان می‌دهند؛ بهترین محیط برای تولید کالوس از قطعات برگ و ریشه این گونه NT-1 است که در آن کالوسها موسیلاژ متوسط ایجاد می‌نمایند. برای قطعات برگ و ریشه بارهنگ نیزه‌ای، بهترین محیط برای تولید موسیلاژ MSH-2 است که در عین حال بهترین محیط برای تولید کالوس نیز می‌باشد.

از نظر قدرت تولید موسیلاژ، بین بافت کالوس گونه‌ها تفاوت بسیار معنی داری در سطح ۰/۹۹۹ درصد اطمینان مشاهده می‌گردد. مقایسه میانگین‌های گونه‌ها و گروه‌بندی آنها در سطح خطای ۵٪ و با حداقل تفاوت معنی داری ۱/۵۳، با استفاده از آزمون دانکن مشخص می‌نماید که توانائی بارهنگ بزرگ در تولید موسیلاژ بیش از سایر گونه‌ها بوده، بارهنگ تخم‌مرغی، بارهنگ ککی، و بارهنگ نیزه‌ای به ترتیب در گروه‌های بعدی قرار می‌گیرند (شکل ۷).

اثر متقابل بسیار معنی داری در سطح ۰/۹۹۹ درصد اطمینان بین گونه‌ها و محیطهای کشت وجود دارد. میزان تولید موسیلاژ تحت تاثیر محیطهای کشت به نوع گونه بستگی دارد. میانگین مقدار موسیلاژ در محیطهای کشت و گروه‌بندی آنها در سطح خطای ۵٪ و با حداقل تفاوت معنی داری ۲/۸۶ وجود هشت گروه را در جمعیت مورد مطالعه نشان می‌دهد. بهترین شرایط برای تولید موسیلاژ از کالوس برگ و ریشه، MSH-3 برای بارهنگ بزرگ، NT-3 برای بارهنگ تخم‌مرغی، MSH-3 برای بارهنگ ککی و MSH-2 برای بارهنگ نیزه‌ای است که میانگین تولید موسیلاژ در آنها ۳۲/۷۵، ۲۰/۸۸، ۱۶/۶۸، ۱۴/۷۳ درصد می‌باشد (جدول ۵). دو نوع قطعه جداگشت برگ و ریشه تفاوت معنی داری از نظر تولید موسیلاژ در محیط کشتهای مختلف نشان نمی‌دهند.

مقایسه حداکثر مقدار موسیلاژ کالوس حاصل از برگ (۲۲/۲۸ درصد) و ریشه (۱۹/۴۸) بارهنگ تخم‌مرغی (جدول ۴) با برگ (۱۷/۲ درصد)، ریشه (۱۵/۵ درصد) (۳) و بذر

Callus Production (%)



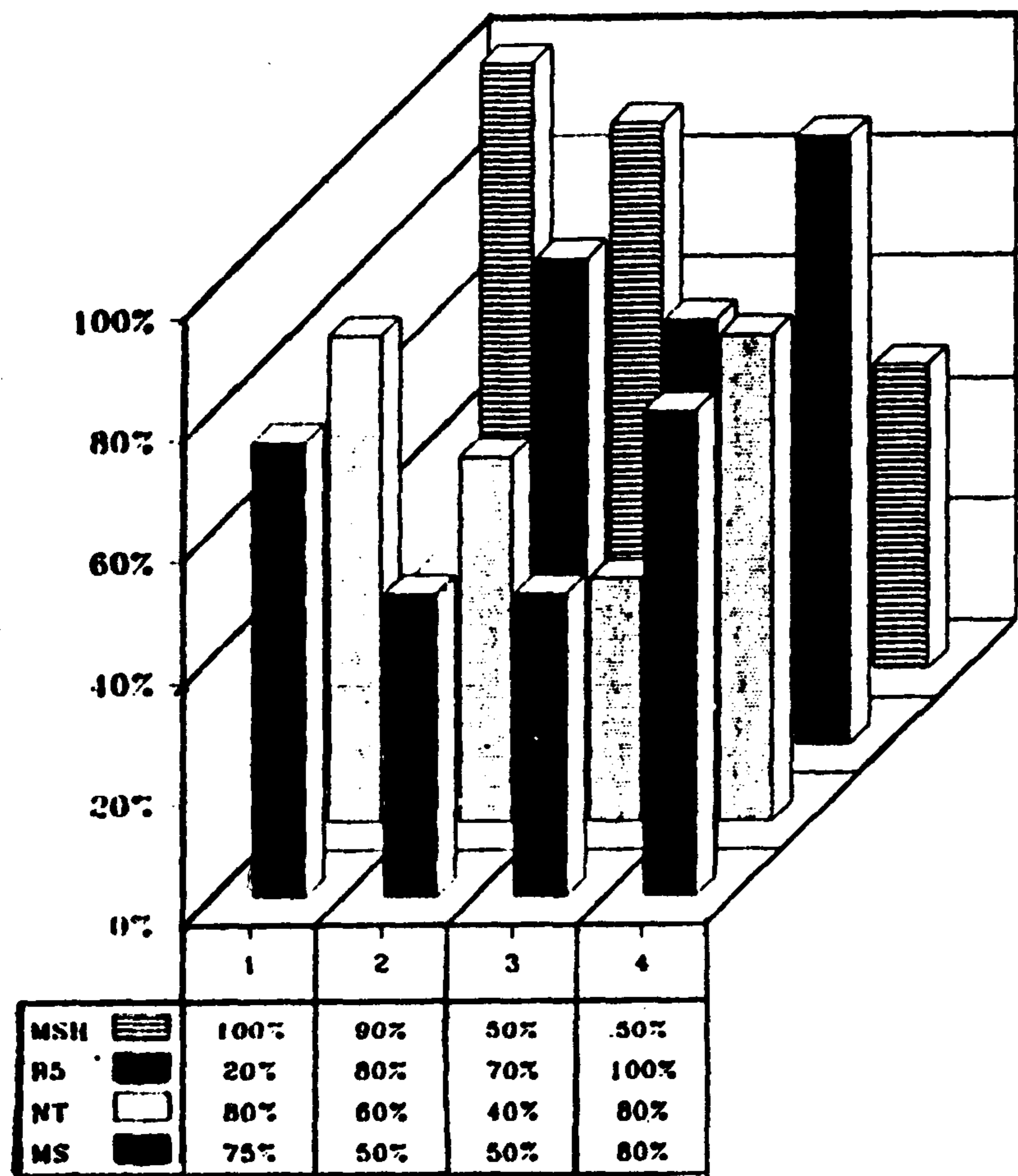
شکل ۱- میانگین تولید کالوس از کشت قطعات جداگشت برگ و ریشه چهارگونه بارهنگ تحت تاثیر محیط کشتهای پایه و تنظیم‌کننده‌های مختلف رشد.

سطح خطای ۱٪ و با حداقل تفاوت معنی داری ۳/۱ با استفاده از آزمون دانکن وجود نه گروه را در جمعیت مورد مطالعه نشان می‌دهد. بهترین شرایط برای کشت برگ و ریشه، NT-1 برای بارهنگ ککی، NT-1 برای بارهنگ تخم‌مرغی، MSH-2 برای بارهنگ نیزه‌ای، B5-2 برای بارهنگ بزرگ است که میانگین تولید کالوس در آنها به ترتیب ۹، ۱۱، ۱۲ و ۴/۵ میلی‌متر به دست می‌آید (جدول ۳). دو نوع قطعه جداگشت برگ و ریشه تفاوت معنی داری از نظر تولید کالوس در محیطهای کشت مختلف نشان نمی‌دهند.

نتایج حاصل از اندازه‌گیری مقدار موسیلاژ در بافتهای کالوس حاصل از کشت گونه‌های مورد مطالعه در محیط کشتهای فوق الذکر در جدول ۴ ارائه شده است. برای قطعات برگ و ریشه بارهنگ تخم‌مرغی، بهترین محیط برای تولید موسیلاژ NT-3 است که در آن نمونه‌ها قدرت تولید کالوس متوسطی از خود نشان می‌دهند، بهترین محیط برای تولید کالوس از قطعات برگ و ریشه این گونه NT-1 است که در آن کالوسها موسیلاژ متوسطی دارند.

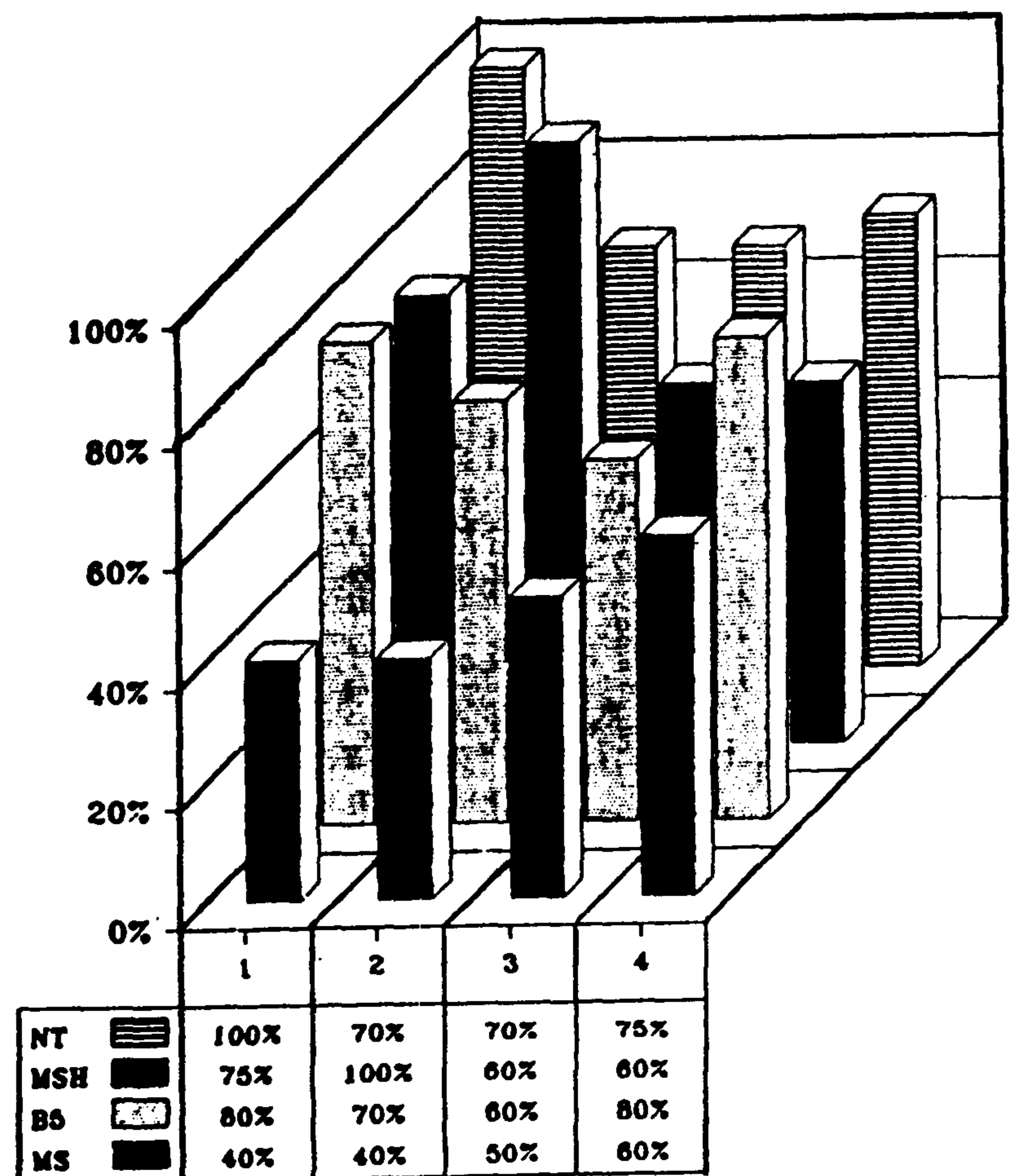
برای قطعات برگ و ریشه بارهنگ بزرگ بهترین محیط برای تولید موسیلاژ MSH-3 است که در آن نمونه‌ها قدرت تولید

Plantago major



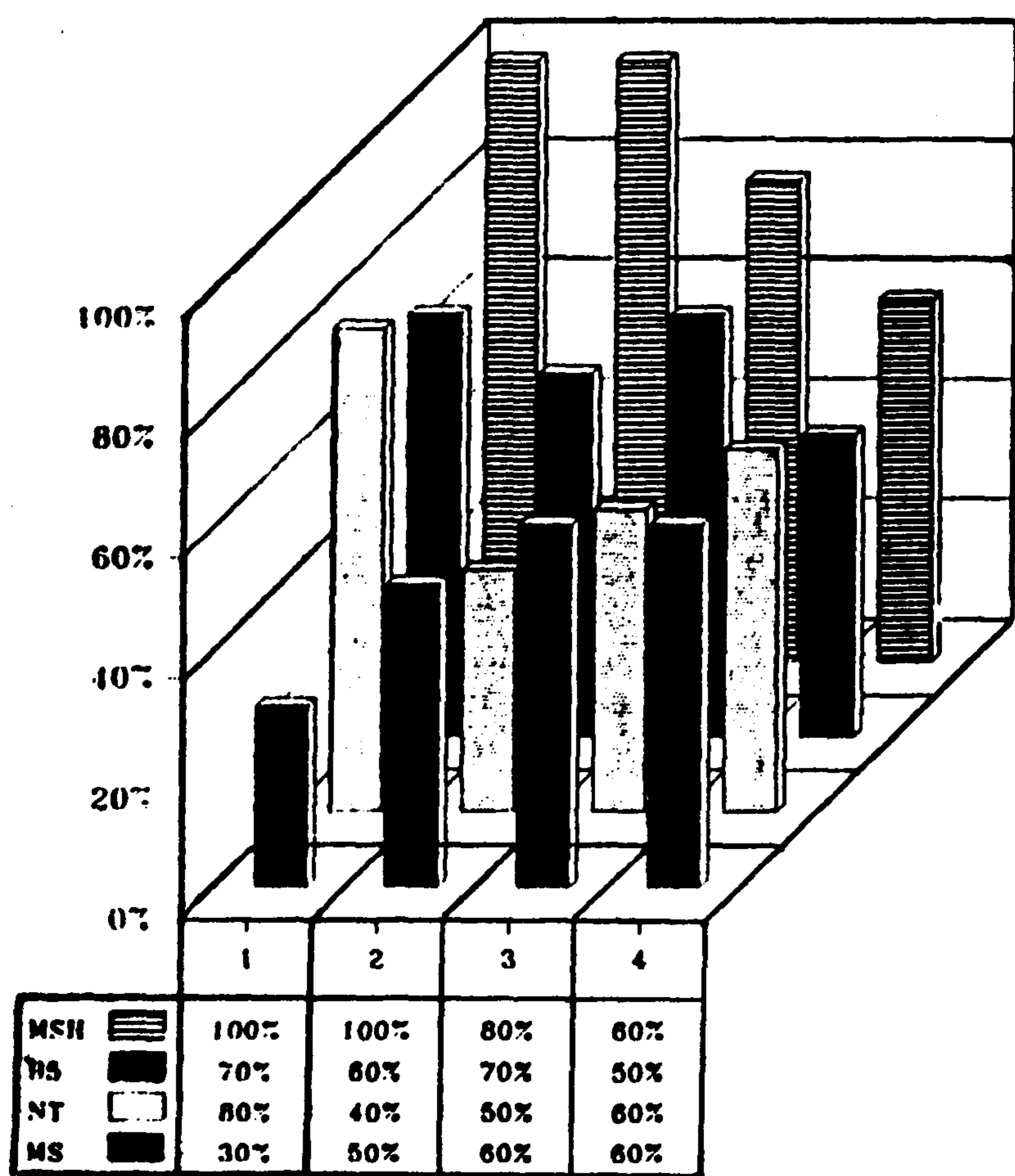
شکل ۳- میانگین تولید کالوس از قطعات جداگشت برگ و ریشه بارهنگ بزرگ (بارهنگ معمولی) تحت تاثیر محیط کشتهای پایه و تنظیم کننده های مختلف رشد.

Plantago ovata



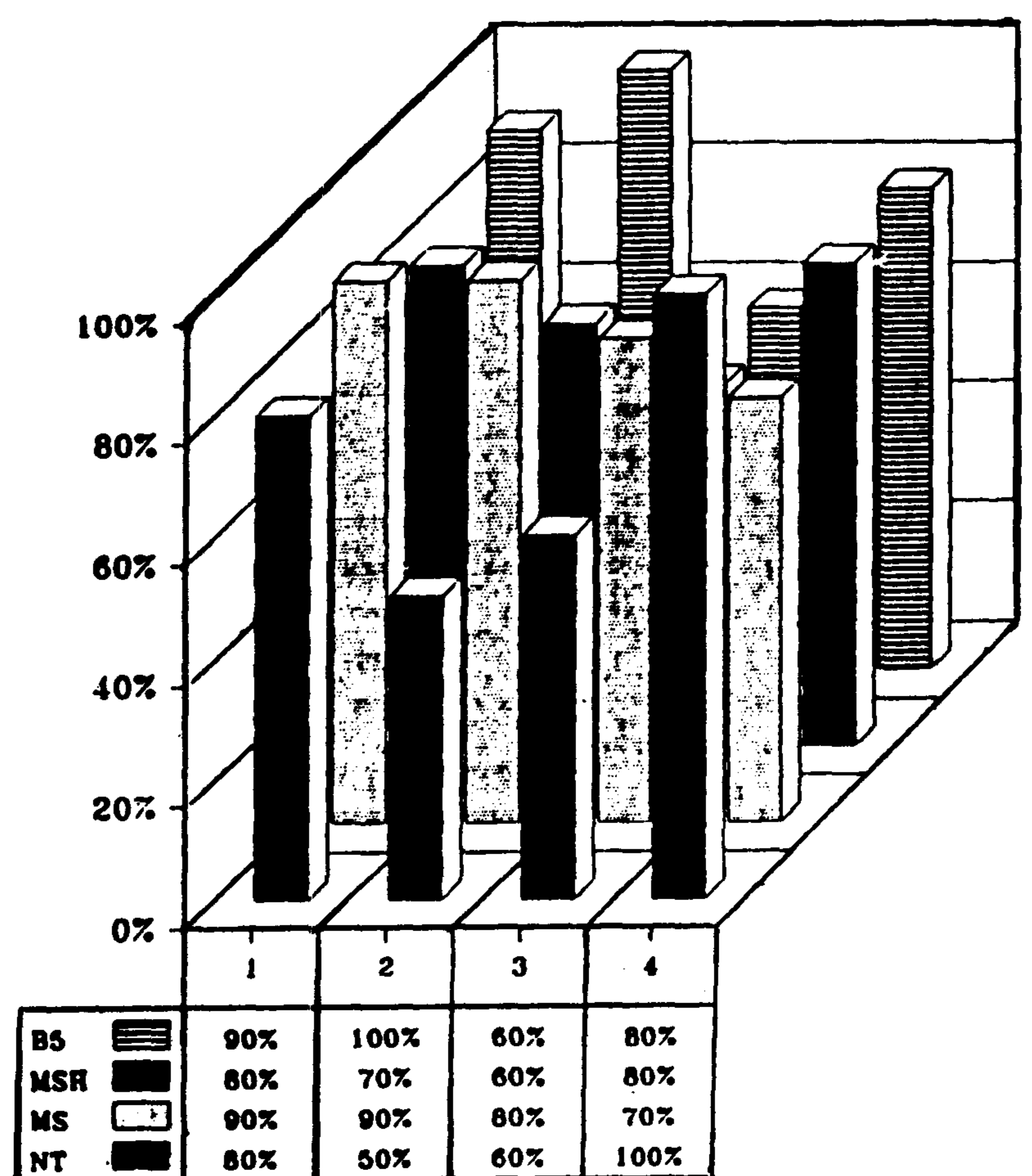
شکل ۲- میانگین تولید کالوس از کشت قطعات جداگشت برگ و ریشه بارهنگ تخم مرغی (اسفرزه) تحت تاثیر محیط کشتهای پایه و تنظیم کننده های مختلف رشد.

Plantago lanceolata



شکل ۵- میانگین تولید کالوس از کشت قطعات جداگشت برگ و ریشه بارهنگ نيزه ای (کاردی) تحت تاثیر محیط کشتهای پایه و تنظیم کننده های مختلف رشد.

Plantago psyllium



شکل ۴- میانگین تولید کالوس از کشت قطعات جداگشت برگ و ریشه بارهنگ ککی تحت تاثیر محیط کشتهای پایه و تنظیم کننده های مختلف رشد.

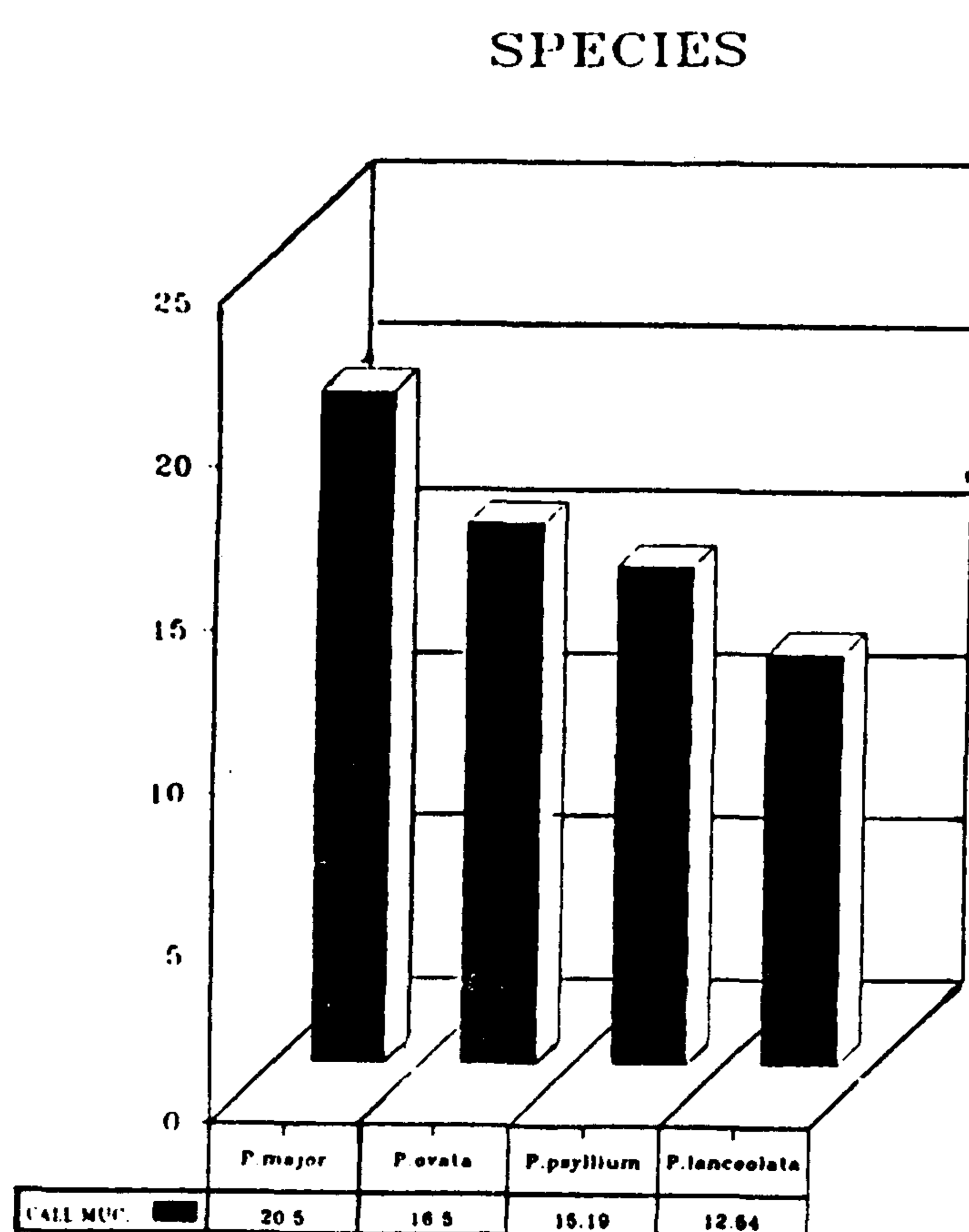
جدول ۲ - واکنش قطعات جدا کشت برگ و ریشه (به ترتیب در) بارهنگ تخم مرغی، بارهنگ معمولی، بارهنگ ککمی و در تولید کالوس تحت تاثیر غلظتهای مختلف تنظیم کننده های رشد.

		تولیدی کالوس (mm)						تنظیم کننده های رشد (mg/l)				محیط کشت پایه
ریشه	برگ	ریشه	برگ	ریشه	برگ	ریشه	برگ	BA	Kin	NAA	2,4-D	
۳	۳	۴	۴	۲	۲	۴	۴	-	-	-	۰/۴	MS-1
۴	۴	۴	۵	۲	۲	۲	۴	-	۰/۱	-	۰/۸	MS-2
۵	۲	۴	۴	۲	۲	۲	۲	-	۰/۱	-	۱/۲	MS-3
۵	۳	۴	۴	۲/۵	۲/۵	۱/۵	۴	-	۰/۱	-	۲	MS-4
۳	۳	۱۱	۱۱	۴	۴	۴	۴	-	-	-	۰/۴	MSH-1
۹	۹	۷	۵	۵	۵	۴	۶	-	۰/۱	-	۰/۸	MSH-2
۷	۷	۵	۲	۲	۲	۲	۴	۴	۰/۱	-	۱/۲	MSH-3
۳	۳	۴	۵	۲	۲	۴	۴	-	۰/۱	-	۲	MSH-4
۵	۵	۱۱	۱۳	۱۱	۳	۱۱	۱۱	۱	-	۲	-	NT-1
۲	۲	۲	۵	۲	۲	۲	۵	-	۰/۲	۰/۵	۲/۵	NT-2
۲/۵	۲/۵	۲	۳	۲	۲	۲	۵	-	۱	-	۲	NT-3
۴	۱/۵	۱۱	۱۱	۲	۲	۶	۵	-	۱	۲	-	NT-4
۴	۴	۳	۷	۲	۲	۲	۴	-	۰/۲	۰/۵	۲/۵	BS-1
۵	۶	۹	۹	۶	۳	۵	۲/۵	۱	-	۲	-	BS-2
۳	۳	۲	۴	۵	۱	۵	۱۱	۱	-	۰/۵	۲/۵	BS-3
۶	۶	۶	۸	۴	۴	۸	۱۱	۱	-	۲/۵	۰/۵	BS-4

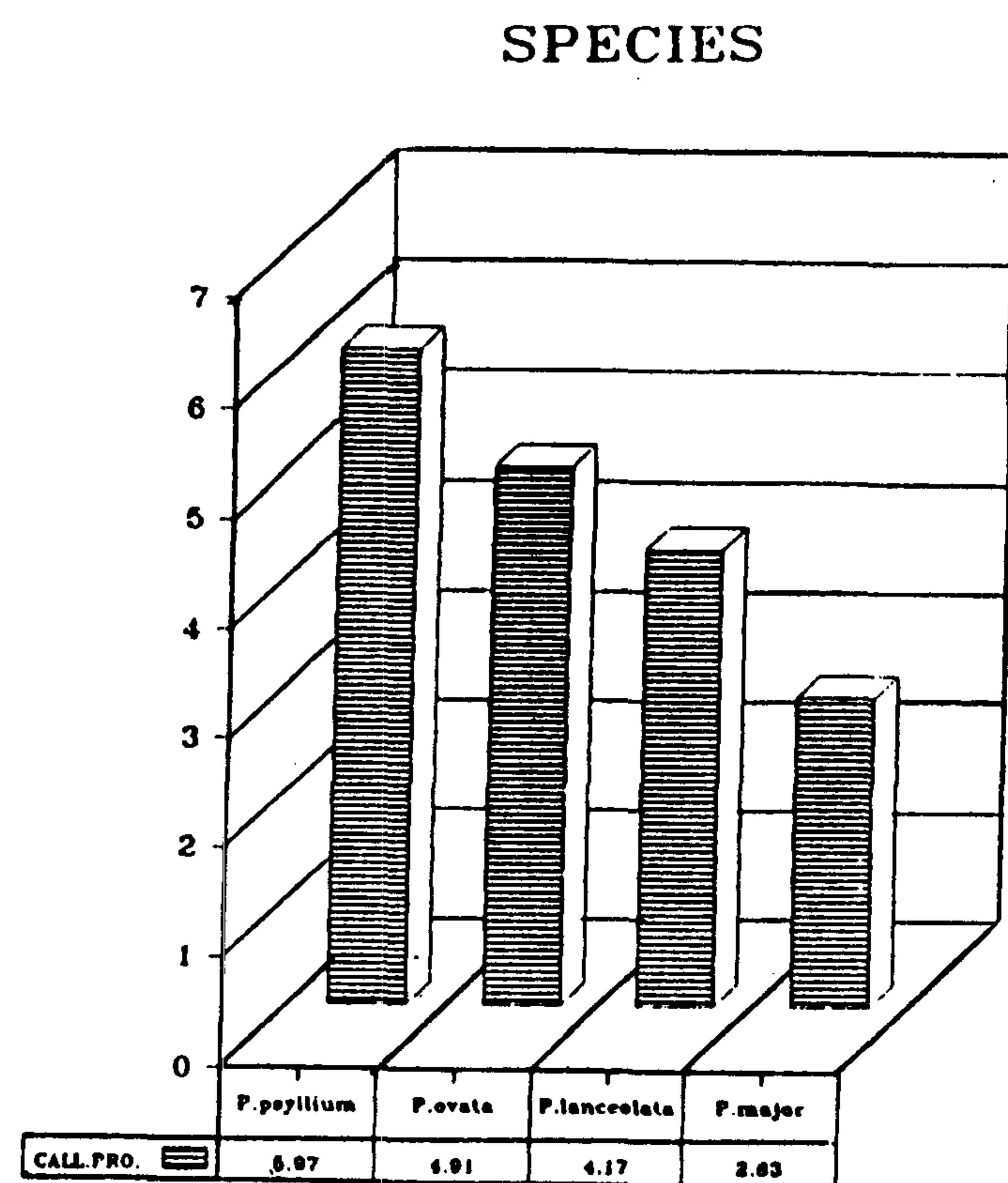
جدول ۳- مقایسه اثر متقابل گونه و محیط کشت با استفاده از آزمون دانکن

گونه	x	محیط کشت	میانگین تولید کالوس	گونه	x	محیط کشت	میانگین تولید کالوس
بارهنگ ککی	N-1	۱۲	a	بارهنگ تخم مرغی	۴/۵	efghi	NT-3
بارهنگ ککی	NT-4	۱۱	ab	بارهنگ ککی	۴/۵	efghi	MS-2
بارهنگ ککی	MSH-1	۱۱	ab	بارهنگ ککی	۴/۵	efghi	MSH-4
بارهنگ تخم مرغی	NT-1	۱۱	ab	بارهنگ بزرگ	۴/۵	efghi	B5-2
بارهنگ تخم مرغی	B5-4	۹/۵	abc	بارهنگ ککی	۴	fghi	MS-3
بارهنگ ککی	B5-2	۹	abcd	بارهنگ نیزه ای	۴	fghi	MS-3
بارهنگ نیزه ای	MSH-2	۹	abcd	بارهنگ ککی	۴	fghi	MS-1
بارهنگ تخم مرغی	B5-4	۸	bcde	بارهنگ ککی	۴	fghi	MSH-1
بارهنگ ککی	B5-4	۷	cdef	بارهنگ نیزه ای	۴	fghi	B5-1
بارهنگ نیزه ای	MSH-3	۶	defg	بارهنگ تخم مرغی	۴	fghi	MSH-1
بارهنگ ککی	MSH-2	۶	defg	بارهنگ نیزه ای	۴	fghi	MS-4
بارهنگ نیزه ای	B5-4	۶	defg	بارهنگ بزرگ	۴	fghi	NT-1
بارهنگ نیزه ای	B5-2	۵/۵	efgh	بارهنگ ککی	۴	fghi	NT-2
بارهنگ تخم مرغی	NT-4	۵/۵	efgh	بارهنگ تخم مرغی	۴	fghi	MSH-4
بارهنگ ککی	B5-1	۵	efgh	بارهنگ نیزه ای	۴	fghi	MS-2
بارهنگ نیزه ای	NT-1	۵	efgh	بارهنگ بزرگ	۴	fghi	B5-4
بارهنگ تخم مرغی	MSH-2	۵	efgh	بارهنگ بزرگ	۴	fghi	MSH-2

میانگین هائی که با حروف یکسان نشان داده شده اند تفاوت معنی داری با هم ندارند.



شکل ۷ - میانگین تولید موسیلاژ از قطعات جداگشت برگ و ریشه گونه های مختلف بارهنگ.



شکل ۶ - میانگین تولید کالوس از قطعات جداگشت برگ و ریشه گونه های مختلف بارهنگ.

جدول ۴ - مقادیر موسیلاژ (گرم در ۱۰۰ گرم، ماده خشک) در بافت کالوس حاصل از قطعات جداگشت برگ و ریشه چهارگونه بارهنگ در محیط کشتهای مختلف

محیط کشت	بارهنگ تخم مرغی		بارهنگ ککی		بارهنگ بزرگ		بارهنگ نیزه‌ای	
	کالوس برگ	کالوس ریشه	کالوس برگ	کالوس ریشه	کالوس برگ	کالوس ریشه	کالوس برگ	کالوس ریشه
MS-1	۱۲/۵۰	۱۱/۶۰	۱۴/۹۹	۱۴/۱۰	۲۰/۹۱	۲۵/۷۳	۱۲/۷۰	۱۳/۰۰
MS-2	۱۴/۸۰	۱۶/۲۰	۱۵/۲۰	۱۷/۲۰	۱۳/۰۰	۱۴/۰۰	۱۲/۸۶	۱۲/۱۲
MS-3	۱۴/۵۰	۱۴/۰۰	۱۶/۵۰	۱۶/۷۰	۱۸/۵۰	۱۹/۵۰	۱۲/۰۲	۱۲/۸۵
MS-4	۱۳/۰۰	۱۳/۰۰	۱۵/۵۰	۱۶/۰۰	۱۷/۰۰	۱۷/۵۰	۱۴/۳۲	۱۰/۱۷
MSH-1	۱۳/۳۴	۱۲/۶۹	۱۶/۲۰	۱۶/۵۱	۲۴/۰۰	۲۴/۲۰	۱۲/۹۹	۱۲/۲۴
MSH-2	۱۷/۹۳	۱۹/۲۰	۲۲/۰۰	۱۴/۵۱	۲۷/۹۱	۲۷/۳۶	۱۵/۱۵	۱۴/۳۱
MSH-3	۱۸/۵۰	۱۸/۰۰	۱۶/۳۷	۱۶/۹۸	۳۵/۲۱	۳۰/۲۸	۱۲/۱۹	۱۳/۳۰
MSH-4	۱۷/۰۰	۱۷/۰۰	۱۴/۳۹	۱۴/۷۱	۲۸/۱۲	۲۸/۷۳	۱۲/۵۰	۱۳/۱۸
B5-1	۲۰/۲۸	۱۶/۲۳	۱۵/۷۰	۱۶/۰۰	۱۳/۵۰	۱۴/۰۰	۱۳/۲۱	۱۳/۹۶
B5-2	۱۷/۰۰	۱۷/۰۰	۱۰/۷۹	۱۴/۴۵	۱۴/۹۶	۱۸/۲۶	۱۲/۵۰	۱۲/۲۰
B5-3	۱۹/۱۵	۱۸/۹۷	۱۵/۸۱	۱۵/۱۹	۱۹/۰۰	۲۰/۰۰	۱۰/۷۵	۱۰/۰۵
B5-4	۱۷/۶۷	۸/۶۹	۱۵/۶۰	۱۵/۱۱	۱۶/۲۰	۱۶/۰۰	۱۱/۵۰	۹/۴۶
NT-1	۱۲/۶۴	۱۴/۶۶	۱۲/۸۵	۱۵/۱۹	۱۷/۲۸	۱۸/۱۶	۱۳/۰۹	۱۲/۹۹
NT-2	۱۸/۳۸	۱۸/۹۴	۱۵/۰۲	۱۴/۹۸	۲۰/۱۲	۲۱/۱۸	۱۲/۵۳	۱۴/۱۶
NT-3	۲۲/۲۸	۱۹/۸۶	۱۵/۹۵	۱۵/۲۳	۲۱/۰۰	۲۲/۰۰	۱۲/۸۰	۱۲/۵
NT-4	۱۸/۳۹	۱۶/۸۶	۱۴/۰۰	۱۴/۳۰	۱۲/۲۶	۱۵/۷۴	۱۲/۸۲	۱۰/۷۷

آن در بذر تجاوز می‌نماید. در دو حالت اخیر، مقدار موسیلاژ کالوس حاصل از برگ ۳ برابر بذر در بارهنگ بزرگ و ۷/۳ برابر بذر در بارهنگ ککی می‌باشد. حداکثر مقدار موسیلاژ کالوس حاصل از برگ (۱۵/۵ درصد) و ریشه (۱۴/۳۱) بارهنگ نیزه‌ای (جدول ۴) کمتر از گونه‌های دیگر است.

مقایسه این نتایج با آنچه که از مطالعه مقدار موسیلاژ در بارهنگ ککی و بارهنگ نیزه‌ای در محیط کشتهای MS گزارش شده (۷) نشان می‌دهد که در این گونه‌ها با کشت بافت، تولید موسیلاژ افزایش حاصل کرده ۵/۵ تا ۶ برابر می‌شود.

بنابراین، همانطور که از طریق انتخاب گونه و شرایط اقلیمی و خاکی مناسب می‌توان مقدار محصول بذر و تولید موسیلاژ را در شرایط مزرعه افزایش داد (۵)، با انتخاب شرایط مناسب برای کشت بافت نیز می‌توان مقدار موسیلاژ را تا چند برابر مقدار آن در بذر بالا برد و به این ترتیب به تولید موسیلاژ در شرایط آزمایشگاه مبادرت

(۲۶/۳ درصد) این گونه نشان می‌دهد که با کشت قطعات برگ و ریشه بر مقدار موسیلاژ موجود در آنها افزوده شده ولی هیچگاه تا حد مقدار آن در بذر افزایش حاصل نمی‌نماید. موقعی که این مقایسه بین حداکثر مقدار موسیلاژ کالوس حاصل از برگ (۳۵/۲۱ درصد) و ریشه (۳۰/۲۸ درصد) بارهنگ بزرگ (جدول ۴) با برگ (۲۷/۳ درصد)، ریشه (۲۱/۳ درصد) (۷) و بذر (۱۱/۶ درصد) (۶) این گونه انجام می‌گیرد ملاحظه می‌گردد که با کشت برگ و ریشه، بر مقدار موسیلاژ افزوده شده و از مقدار آن در بذر تجاوز می‌نماید.

بالاخره اگر بخواهیم مقدار موسیلاژ کالوس حاصل از برگ (۲۴ درصد) و ریشه (۱۷/۲ درصد) بارهنگ ککی (جدول ۴) را با برگ (۱۹/۱ درصد)، ریشه (۱۶/۸ درصد) و بذر (۳/۳ درصد) (۶) این گونه مقایسه کنیم خواهیم دید که در این حالت نیز با کشت قطعات برگ و ریشه بر مقدار موسیلاژ افزوده شده و از مقدار

نمود. در این روش تولید، فاصله بین بارهنگ ککی بابرهنگ بارهنگ ککی فراهم می‌گردد. تخم مرغی و بارهنگ بزرگ کمتر می‌شود و وضعیت بهتری برای

REFERENCES

مراجع مورد استفاده

- ۱- ابراهیم زاده معبود ح، م. میر معصومی و س. م. فخر طباطبائی. ۱۳۷۲. تحقیق پیرامون تولید زراعی موسیلاژ در ایران. اولین کنگره زراعت و اصلاح نباتات ایران، دانشگاه تهران، دانشکده کشاورزی.
- ۲- ابراهیم زاده معبود ح، م. میر معصومی و س. م. فخر طباطبائی. ۱۳۷۶. بررسی تولید موسیلاژ در چند منطقه ایران. مجله پژوهش و سازندگی جلد ۴، شماره ۳، صفحه ۴۶ - ۵۱
- ۳- امین، غ.، ۱۳۷۱. یادداشتهای مربوط به خصوصیات شیمیائی گیاهان تیره بارهنگ در ایران. بخش فارماکوگنوزی دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران.
- ۴- فخر طباطبائی، س. م. میر معصومی و م. ت. میرحاجی. ۱۳۶۹. بررسی به زراعی دو گونه مشابه داروئی در ایران. چهارمین سمینار گیاهان داروئی ایران. دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران.
- ۵- میر معصومی، م. ۱۳۷۱. بررسی موسیلاژها در تیره بارهنگ با کشت بافت و کشت در مزرعه. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشکده علوم دانشگاه تهران.
- 6- Barna K.S. & whakhlu A.K., 1986. Axillary shoot induction and plant regeneration in *Plantago ovata* Forsk. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 15, 169-173.
- 7- Brautigama M. & Franz G., 1985. Experiments with tissue culture of mucilage- producing plant tissues. *Scientia Pharmaceutica*, 53, 237 - 246.
- 8- Gamborg O.L. 1975. Callus and cell culture. in : *Plant Tissue Culture Methods* (O.L. Gamborg and L.R. Wetter; eds.) pp. 1-10. National Research Council of Canada ; Prairie Regional Laboratory, Saskatoon, Saskatchewan, Canada.
- 9- Murashige T. & Skoog F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.*, 15, 473-497.
- 10- Nagata T. & Takebe I. 1971. Planting of isolated tobacco mesophyll protoplasts on agar medium. *Planta* 99, 12-20.
- 11- Schank. R.U. & Hildebrandt A.C., 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can. J. Bot.* 50: 199-204.
- 12- Sharma P.K. & Koul A.K. , 1986. Mucilage in seeds of *Plantago ovata* and its wild allies. *J. of Ethnopharmacol.*, 17, 289-295.
- 13- Tomoda, M., N. Shimizu, Y. Oshima, M. Takahashi, M. Murakami, & H. Hikino, 1986. Hypoglycemic activity of twenty plant mucilages.
- 14- whakhlu A.K. & Barna K.s., 1988. Callus initiation, growth and plant regeneration in *Plantago ovata* Forsk. *CV. GT-2 Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 17, 235-241.

**Callus Formation and Mucilage Production in Leaf and Root Explants
of Four Plantago Species**

H. EBRAHIMZADEH, M. MIRMASUMI AND M.F. TABATABAEI

Professor and Instructor, college of Science, University of Tehran and Instructor

College of Agriculture , University of Tehran, Iran.

Accepted 12 Feb. 1997.

SUMMARY

Leaf and root explants of four *Plantago* species were cultured on MS, NT, B5, MSV and MSH basal media with various concentrations of plant growth regulators. The order of ability of callus formation in different species was *P. psyllium*, *P. ovata*, *P. lanceolata* and *P. major*. Mucilage contents of calli derived from leaf and explants cultured on different media are also reported. The best callus production was obtained from leaf and root explants of *P. psyllium*, *P. ovata*, *P. lanceolata* and *P. major* on NT-1 (5.97mm), NT-1 (4.91mm), MSH2(4.17mm) and B5-2 (2.83mm) media respectively. There were no significant differences between callus production of leaf and root explants. Mucilage contents derived from leaf and root calli of *P. ovata* was more than leaf and root of intact plants and lower than seed of this species ; whereas in *P. major* and *P. psyllium*, callus mucilage were 3 and 7.3 times of seeds, respectively. In *P. lanceolata*, callus mucilage was lower than other species. Mucilage production of calli was higher than the other plant parts and therefore can be used for in vitro production. Since *P. psyllium* produces lower seeds with low mucilage in field while producing high callus mucilage in vitro, it is more suitable than the other species for this purpose.