به نژادی گیاهان زراعی و باغی
دوره ٤ ■ شماره ١ ■ بهار و تابستان ١٣٩٥
صفحه‌های ١٤٠-١٢٥
انتشار الکترونیکی: بهار ١٣٩٨

اثر نوع تنظیم‌کننده رشد گیاهی و نوع ریزنمونه بر باززایی مستقیم درون‌شیشه‌ای گیاه بابونه آلمانی (*Matricaria chamomilla* L.)

بهمن حسینی[1*]، الهام مرادی‌پور[2]، علیرضا پیرزاد[3]، جعفر امیری[1]، الهام امین‌نژاد[2]

۱. دانشیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.
۲. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گیاهان دارویی، دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.
۳. استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

تاریخ دریافت مقاله: ١٣٩٤/١٢/٠٦ تاریخ پذیرش مقاله: ١٣٩٥/٠٨/١١

چکیده

پژوهش حاضر به‌منظور شناسایی بهترین ترکیب تنظیم‌کننده رشد و مناسب‌ترین ریزنمونه بر باززایی در شرایط درون‌شیشه‌ای بابونه آلمانی انجام گردید. در آزمایش اول، اثر تنظیم‌کننده رشد بنزیل‌آمینوپورین در غلظت‌های ٨/٨، ٤/٤، ٢/٢ و صفر (٠) میکرومولار در ترکیب با تنظیم‌کننده رشد ایندول‌استیک‌اسید در چهار سطح ٢/٢، ١/١، ٠/٥ و صفر (٠) میکرومولار بر باززایی مستقیم شاخساره از ریزنمونه نوک شاخه توده اصفهان بررسی شد. نتایج آنالیز داده‌ها نشان داد که بیشترین و کمترین درصد باززایی (٩٥/٥٤ و ١٤/٢٣ درصد) به‌ترتیب در محیط کشت موراشیگ و اسکوگ حاوی ٤/٤ میکرومولار بنزیل‌آمینوپورین و ٢/٢ میکرومولار ایندول استیک اسید و محیط کشت موراشیگ و اسکوگ بدون تنظیم‌کننده رشد مشاهده شد. سه نوع ریزنمونه مختلف (نوک شاخه، کوتیلدون و هیپوکوتیل) و تیمار تنظیم‌کننده رشدی بنزیل‌آمینوپورین در چهار سطح (١٣/٢، ٨/٨، ٤/٤ و صفر (٠) میکرومولار) و تنظیم‌کننده رشد ایندول‌استیک‌اسید در دو سطح (١/١ و ٢/٢ میکرومولار) به‌منظور شناسایی شرایط بهینه پرآوری بابونه در شرایط درون‌شیشه‌ای بررسی گردید. در ریزنمونه نوک شاخه حداکثر درصد باززایی (٩٣/٨٧ درصد) در محیط حاوی ٤/٤ میکرومولار بنزیل‌آمینوپورین در ترکیب با ٢/٢ میکرومولار ایندول‌استیک‌اسید و حداقل درصد باززایی (١٣/٦٠درصد) در محیط موراشیگ و اسکوگ فاقد تنظیم‌کننده رشد بنزیل‌آمینوپورین با غلظت ١/١ میکرومولار تنظیم‌کننده رشد ایندول‌استیک‌اسید مشاهده گردید. در سایر ریزنمونه‌ها در محیط کشت‌های مختلف کالوس‌زایی مشاهده گردید. بیش از ٩٠ درصد گیاهچه‌ها با پس از گذشت ١ ماه سازگار شدند.

کلیدواژه‌ها: ایندول‌استیک‌اسید، باززایی مستقیم، بنزیل‌آمینوپورین، نوک شاخه.

* نویسنده مسئول
Email: b.hosseini@urmia.ac.ir

مقدمه

بابونه آلمانی با نام علمی *Matricaria chamomilla* L.، گیاهی علفی، یک‌ساله و متعلق به تیره کاسنی[1] است. بابونه شامل چند جنس گیاهی از جمله *Matricaria* sp.، *Anthemis* sp. و *Chrysanthemum* sp. می‌باشد که هر جنس خود دارای گونه‌های متعددی می‌باشد. اما جنس *Matricaria* به‌دلیل کاربرد در صنایع دارویی، آرایشی و بهداشتی، بیشتر مورد توجه محققین گیاهان دارویی می‌باشد و دارای گونه‌های متعددی از جمله *M. chamomilla*، *M. maritima*، *M. aurea* و *M. nobilis* می‌باشد. تعداد کروموزوم پایه بابونه 2n=2x= 18 عدد می‌باشد [۲۷]. در اسانس بابونه حدود ٤٠ نوع ترکیب شیمیایی شناسایی شده است که مهمترین آن‌ها کامازولن، بیسابولول، بیسابولول‌اکسید، پاراسیمن، بتا اوسیمن، بتا- فارنزن می‌باشد که در مجموع ۷۵ درصد از ترکیب اسانس را به‌خود اختصاص داده‌اند [۲۳]. امروزه کشت بافت، کاربرد بسیار گسترده‌ای در زیست‌فن‌آوری دارد [۵]. از میان جنبه‌های مختلف کشت بافت، ریزازدیادی از اهمیت بسیار زیادی برخوردار می‌باشد. این تکنیک از نظر صرفه‌جویی در زمان، راندمان بیشتر، امکان تولید گیاهان عاری از بیماری و مواد تکثیرشده خالص، بسیار کارآمد می‌باشد، همچنین این روش حفظ و انتقال ایمن‌تر ژرم‌پلاسم را فراهم کرده است [۹]. ازدیاد درون‌شیشه‌ای یک روش مؤثر برای تکثیر سریع گونه‌های گیاهی است که باعث تولید نتاجی با یکنواختی بالا می‌شود. در کشت بافت گیاهی شرایط متعدد و پیچیده‌ای تأثیرگذار هستند که از آنها می‌توان به ژنوتیپ گیاه، نوع ریزنمونه، ترکیب‌کننده رشدی محیط کشت و شرایط محیطی اشاره نمود.

در پژوهش‌هایی که در برخی گیاهان دارویی متعلق به خانواده کاسنی صورت گرفته از ریزنمونه‌های مختلفی استفاده شده است. در گیاه براهما کمال (*Saussurea obvallata*)، انواع ریزنمونه (ریشه، هیپوکوتیل، کوتیلدون و برگ) برای القای کالوس و باززایی مورد استفاده قرار گرفته‌اند. در این گیاه، ریزنمونه برگ، به‌عنوان بهترین ریزنمونه، با بیشترین درصد کالوس‌زایی (۱۰۰ درصد) که در محیط کشت موراشیگ و اسکوگ (۱۹٦۲) (ام اس)[2] [۲۱] تکمیل‌شده با ۲/۵ میکرومولار بنزیل‌آدنین و یک میکرومولار نفتالین‌استیک‌اسید بود گزارش گردید [۸]. در گیاه ورنونیا (*Vernonia cinerea*)، بیشترین تعداد شاخساره باززایی شده از ریزنمونه‌های برگ و گره در محیط موراشیگ و اسکوگ تکمیل‌شده با ۲ و ۳ میلی‌گرم در لیتر بنزیل‌آمینوپورین گزارش گردید [۲۸]. در پژوهش دیگری در گیاه لوبیای مخملی (*Mucuna pruriens*) از از ریزنمونه‌های گره ساقه [۱۱] و در نوعی پیچک (*Operculina turpethum*) از ریزنمونه‌های گره [۱٦] جهت باززایی مستقیم استفاده گردید. در گیاه *Tylopbora indica* از برگ [۱۷]، در گیاه *Emilia zeylanica* از ساقه [۲۵] و در *Pentanema indicum* از ریزنمونه‌های نوک شاخه و گره [۳۰] در کشت درون‌شیشه‌ای استفاده شد. در مطالعه‌ای که به‌منظور بررسی تأثیر نوع ریزنمونه و نوع تنظیم‌کننده رشد بر باززایی گیاه دارچین (*Cinnamomum tamala*) انجام گرفت، از ریزنمونه‌های دمبرگ با گره ساقه، نوک شاخه و برگ و از تنظیم‌کننده‌های رشد مانند بنزیل‌آدنین، ایندول‌بوتریک‌اسید و کینتین استفاده شد. دمبرگ همراه با گره ساقه، بهترین ریزنمونه و محیط کشت موراشیگ و اسکوگ همراه با بنزیل‌آدنین بهترین ترکیب تنظیم‌کننده رشد شناخته شدند [۲۹]. در پژوهشی در گیاه آرتمیزیا[3]، ریزنمونه‌های هیپوکوتیل، باززایی مناسبی نشان دادند [۱۸].

1. Asteraceae

2. MS (Murashige and Skoog medium)

3. *Artemisia judaica* L.

سیتوکینین‌ها، باعث تسریع در تقسیم سلولی، تشکیل اندام‌های هوایی و ریخت‌زایی شده درحالی‌که اکسین‌ها برای القای رشد و طویل‌شدن سلولی و هم‌چنین برای ریشه‌زایی مورد استفاده قرار می‌گیرند [٤]. گزارش گردید که در یاس آبی (*Plumbago zeylanica* L.) کاربرد غلظت‌های کم اکسین در ترکیب با سیتوکینین، میزان تکثیر شاخساره را افزایش داده، هم‌چنین پرآوری شاخساره بیشتر تحت تأثیر سیتوکینین بوده و نیز نتایج این پژوهش نشان داد که عدم حضور سیتوکینین‌هایی مانند بنزیل‌آمینوپورین، کینتین و حضور ایندول‌استیک‌اسید به‌تنهایی تأثیری در پرآوری شاخساره نداشتند [٢٦]. در گیاه دارویی نعناع فلفلی (*Mentha piperita* L.)، در نمونه‌های گره کشت‌شده در محیط موراشیگ و اسکوگ تکمیل‌شده با ٤/٤ میکرومولار بنزیل‌آدنین، حداکثر میزان تولید شاخساره به میزان ٤٩/٨ درصد گزارش گردید [٣١]. ریشه‌زایی توسط عوامل مختلفی مانند وجود تنظیم‌کننده‌های رشد در محیط، سن و مرحله نموی گیاه، ترکیب نمک‌های پایه، ژنوتیپ و شرایط کشت کنترل می‌شود [٢]. در گیاه *Eugenia singampattiana*، بالاترین درصد ریشه‌زایی، بیشترین تعداد ریشه در هر ریزنمونه و طویل‌ترین ریشه در محیط کشت موراشیگ و اسکوگ شامل ٠/٥ میلی‌گرم در لیتر بنزیل‌آمینوپورین مشاهده گردید [٢٢].

امروزه استفاده از روش‌های نوین فن‌آورانه جهت تولید گیاهان با عملکرد بالا و قابلیت سازگاری با شرایط مختلف محیطی از اهداف عمده برنامه‌های اصلاحی گیاهان می‌باشد. به‌همین منظور تولید گیاهان همگن از نظر ژنتیکی دارای اهمیت بسیار بالایی می‌باشد و یکی از بهترین روش‌های تولید گیاهان شبیه والد مادری پرتولید و با خصوصیات مطلوب بیوشیمیایی، استفاده از روش‌های تکثیر در شرایط درون‌شیشه‌ای می‌باشد. شناخت فاکتورهای مؤثر در موفقیت کشت بافت، نظیر ترکیب تنظیم‌کننده رشد گیاهی و بهترین نوع ریزنمونه در این موفقیت نقش عمده‌ای دارد. به‌همین منظور در این مطالعه اثر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی و ٣ نوع ریزنمونه از گیاه بابونه آلمانی توده اصفهان بررسی گردید. تاکنون گزارش دیگری در ارتباط با پرآوری درون‌شیشه بابونه آلمانی ارائه نشده است و این اولین گزارش در ارتباط با بررسی شرایط تنظیم‌کننده رشد گیاهی و انتخاب نوع ریزنمونه می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

در این پژوهش، بذرهای بابونه آلمانی توده اصفهان از شرکت پاکان بذر واقع در شهر اصفهان تهیه و کلیه آزمایشات مربوط به کشت درون‌شیشه گیاه بابونه آلمانی در پژوهشکده زیست‌فن‌آوری دانشگاه ارومیه مورد مطالعه قرار گرفت.

محیط کشت پایه و شرایط رشد

در این مطالعه از محیط کشت پایه موراشیگ و اسکوگ حاوی ویتامین B5 گامبورگ و همکاران (١٩٦٨) شرکت زیست آرمان سبز استفاده گردید [١٣]. ٣٠ گرم ساکارز و ٧ گرم آگار به محیط کشت پایه اضافه شد و pH محیط کشت بین ٥/٦ تا ٥/٨ تنظیم گردید. کلیه محیط‌های کشت و گیاهچه‌ها در اتاق رشد با دمای ٢±٢٤ درجه سانتی‌گراد و در شرایط دوره نوری شانزده ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی با شدت نور ٣٠٠٠ لوکس نگهداری شدند.

ضدعفونی بذرها و کشت بذور

به‌منظور جلوگیری از بروز برخی آلودگی‌های قارچی و باکتریایی در آزمایش‌های کشت بافت، از الکل (اتانول) ٧٠ درصد به‌مدت یک دقیقه و هیپوکلریت سدیم ($NaClO_3$) در غلظت ٢/٥ درصد حجمی (v/v) به‌مدت

۱۰ دقیقه جهت سترون‌سازی و ضدعفونی استفاده گردید. سه مرتبه آبشویی با آب مقطر سترون انجام شد. بذرها در محیط کشت موراشیگ و اسکوگ درون پتری‌دیش کشت شدند. بذرها پس از نه روز جوانه زدند و بعد از گذشت سه هفته از کاشت بذور در شیشه، ریزنمونه‌هایی از نوک شاخه از گیاهچه‌ها تهیه شد.

بررسی اثرات نوع ترکیبات تنظیم‌کننده رشدی بر باززایی درون شیشه‌ای گیاه بابونه آلمانی

این آزمایش به‌منظور بررسی تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر میزان باززایی ریزنمونه نوک شاخه توده اصفهان، به‌صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام گردید. فاکتورهای آزمایشی شامل ترکیب تنظیم‌کننده رشدی بنزیل‌آمینوپورین در چهار سطح (۸/۸، ٤/٤، ۲/۲ و صفر (۰) میکرومولار)، و تنظیم‌کننده رشد ایندول‌استیک‌اسید در چهار سطح (۲/۲، ۱/۱، ۰/۵ و صفر (۰) میکرومولار) بود. محلول ذخیره ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر ایندول‌استیک‌اسید پس از حل در اتانول ۹٦ درصد تهیه گردید. هر تکرار آزمایش حاوی ۵ ریزنمونه نوک شاخساره بود. پس از گذشت نه هفته و انجام سه بار واکشت با فواصل زمانی ۳ هفته، درصد و میانگین باززایی مستقیم، در هر ریزنمونه شمارش گردید (شکل ٤- الف).

بررسی اثرات نوع ریزنمونه بر باززایی درون شیشه‌ای گیاه بابونه آلمانی

این آزمایش به‌منظور انتخاب بهترین نوع ریزنمونه از ژنوتیپ اصفهان انجام گردید. آزمایش به‌صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار اجرا شد. تیمارهای آزمایشی شامل نوع ریزنمونه در سه سطح (نوک شاخه، کوتیلدون و هیپوکوتیل) و تیمار تنظیم‌کننده رشدی بنزیل‌آمینوپورین در چهار سطح (۱۳/۲، ۸/ ۸ ، ٤/٤ و صفر میکرومولار) و تنظیم‌کننده رشد ایندول‌استیک‌اسید در دو سطح (۲/۲ و ۱/۱ میکرومولار) بودند و پس از گذشت نه هفته و انجام سه بار واکشت با فواصل زمانی ۳ هفته، درصد و میانگین باززایی مستقیم براساس تعداد شاخساره تولیدی در هر ریزنمونه و در هر تیمار، شمارش گردید.

تجزیه‌وتحلیل آماری داده‌ها و نرم‌افزارهای مورد استفاده

داده‌های حاصل از پژوهش حاضر با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.1 مورد تجزیه‌وتحلیل قرار گرفت و برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel استفاده شد. برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون دانکن (DMRT) استفاده گردید.

نتایج

بررسی اثرات نوع ترکیبات تنظیم‌کننده رشدی بر باززایی درون‌شیشه‌ای گیاه بابونه آلمانی

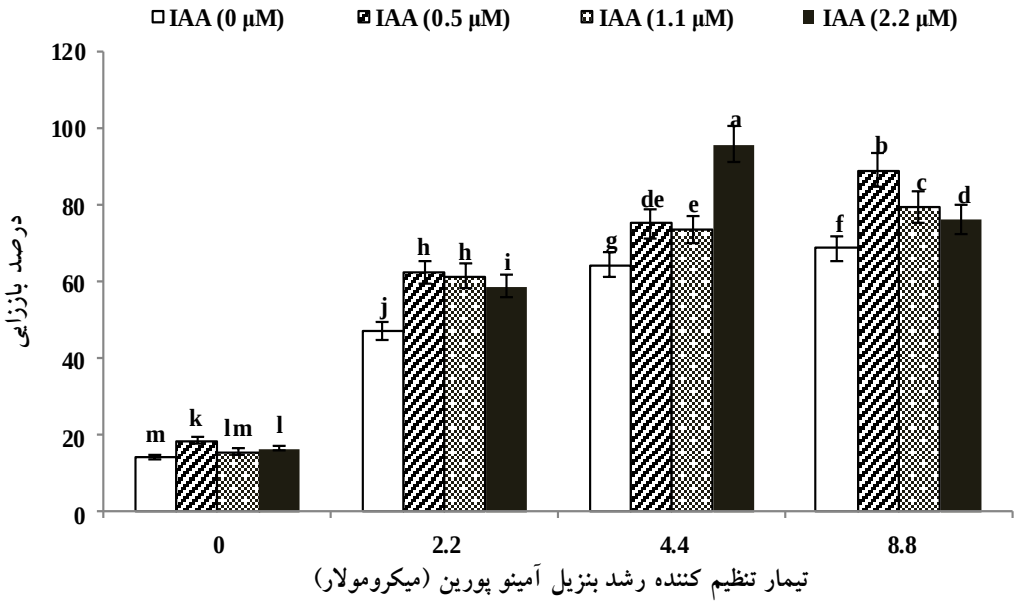
درصد باززایی ریزنمونه

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر متقابل بین غلظت‌های بنزیل‌آمینوپورین با ایندول‌استیک‌اسید بر درصد باززایی ریزنمونه در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). مقایسه میانگین‌ها نشان داد که بیشترین درصد باززایی (۹۵/۸۵درصد) در تیمار ٤/٤ میکرومولار بنزیل‌آمینوپورین در ترکیب با ۲/۲ میکرومولار ایندول‌استیک‌اسید مشاهده شد (شکل ٤). تیمارهای حاوی ۸/۸ میکرومولار بنزیل‌آمینوپورین در ترکیب با ۰/۵ میکرومولار ایندول‌استیک‌اسید و ترکیب ۸/۸ میکرومولار بنزیل‌آمینوپورین با ۱/۱ میکرومولار ایندول‌استیک‌اسید، به‌ترتیب با ۸۸/۹۲ و۷۹/۱۹ درصد، در رده‌های بعدی قرار داشتند. کمترین درصد باززایی در محیط کشت موراشیگ و اسکوگ بدون تنظیم‌کننده رشد با ١٤/٢٣ درصد باززایی

مشاهده شد. افزایش غلظت بنزیل‌آمینوپورین باعث افزایش معنی‌دار درصد باززایی در کلیه سطوح ایندول‌استیک‌اسید شده است. هم‌چنین افزایش غلظت ایندول‌استیک‌اسید از ۰/۵ تا ۲/۲ میکرومولار به‌طور معنی‌داری درصد باززایی را افزایش داده است (شکل ۱). تأثیر غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده رشدی بر درصد باززایی ریزنمونه نوک شاخه در گیاه بابونه آلمانی در شکل ۱ نشان داده شده است.

میانگین باززایی ریزنمونه

اثر غلظت‌های مختلف بنزیل‌آمینوپورین و ایندول‌استیک‌اسید بر میانگین باززایی ریزنمونه نوک شاخه در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). بیشترین میانگین‌ها به‌ترتیب با ۸/۵۰ و ۸/۳۹ گیاهچه در هر ریزنمونه در تیمارهای حاوی ۸/۸ و٤/٤ میکرومولار بنزیل‌آمینوپورین گزارش شد (شکل ٤- ج، د). کمترین میانگین باززایی (۱/۷٦ گیاهچه در هر ریزنمونه) در محیط کشت فاقد تنظیم‌کننده رشد بنزیل‌آمینوپورین مشاهده شد. با افزایش غلظت بنزیل‌آمینوپورین، میانگین باززایی افزایش یافت. بین غلظت‌های ٤/٤ و ۸/۸ میکرومولار بنزیل‌آمینوپورین نیز تفاوت معنی‌داری مشاهده نگردید. در نتایج مربوط به اثر تنظیم‌کننده رشد ایندول‌استیک‌اسید بر باززایی نوک شاخه، کمترین میانگین باززایی با ۵/۲۸ گیاهچه در هر ریزنمونه، در محیط بدون تنظیم‌کننده رشد گزارش شد. سپس ٦/٧١، ٦/٦٦ و ٦/٢٥ گیاهچه در هر ریزنمونه به‌ترتیب در غلظت‌های ۲/۲، ٤/٤ و ۸/۸ میکرومولار ایندول‌استیک‌اسید گزارش شد که تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نشان ندادند. تأثیر غلظت‌های مختلف بنزیل‌آمینوپورین و ایندول‌استیک‌اسید بر میانگین باززایی نوک شاخه بابونه آلمانی در شکل‌های ۲ و ۳ نمایش داده شده است.

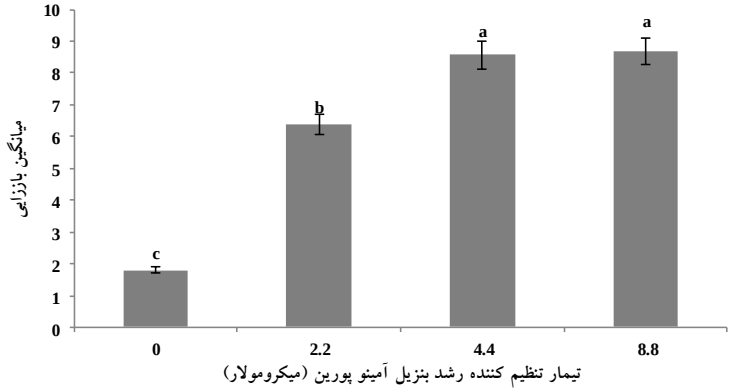


شکل ۱. اثرات متقابل بنزیل‌آمینوپورین و ایندول‌استیک‌اسید بر درصد باززایی ریزنمونه نوک شاخساره در گیاه بابونه آلمانی در محیط کشت پایه موراشیگ و اسکوگ. حروف غیرمشابه نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد می‌باشند.

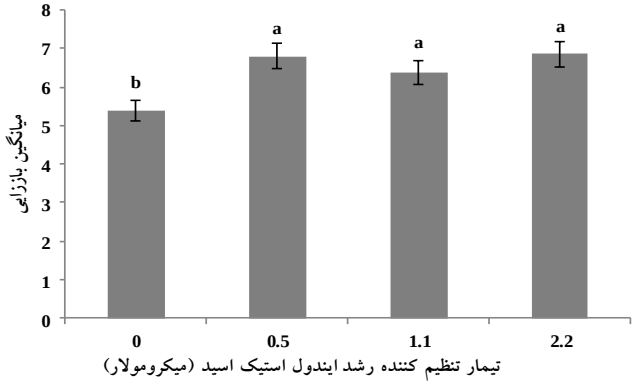
جدول ۱. نتایج تجزیه واریانس اثر نوع ترکیبات تنظیم‌کننده رشد بر باززایی نوک شاخه بابونه آلمانی

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		درصد باززایی	میانگین باززایی
BAP	۳	۱۰۰۵۷/۱۸**	۱۱۹/۱۵٤**
IAA	۳	٤٤۳/۵٦**	۵/۲۵**
BAP×IAA	۹	۱۵۰/۱۷**	۱/۷۷ns
اشتباه آزمایشی	۳۲	۱	۱
برش‌دهی اثر متقابل (BAP×IA)			
BAP(0µM)	۳	۹/۰٤ **	۰/۱۰ns
BAP(4.4µM)	۳	۱٤۷/۰٤**	۱/۷٤ns
BAP(8.8µM)	۳	۵۲۱/٤۸ **	٦/۱۸**
BAP(13.2µM)		۲۱٦/۵۰ **	۲/۵۷ns
ضریب تغییرات (CV%)		۱/۷۵	۱٦/۰٦

ns، **: به‌ترتیب نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد می‌باشد.



شکل ۲. تأثیر غلظت‌های مختلف بنزیل‌آمینوپورین بر میانگین باززایی ریزنمونه نوک شاخه گیاه بابونه آلمانی در محیط کشت پایه موراشیگ و اسکوگ. حروف غیر مشابه نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد در بین میانگین‌ها می‌باشند.



شکل ۳. تأثیر غلظت‌های مختلف ایندول‌استیک‌اسید بر میانگین باززایی ریزنمونه نوک شاخه گیاه بابونه آلمانی در محیط کشت پایه موراشیگ و اسکوگ. حروف غیر مشابه نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد در بین میانگین‌ها می‌باشند.

شکل ٤. تأثیرغلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده رشد بر باززایی ریزنمونه نوک شاخساره در گیاه بابونه آلمانی.
الف) تهیه ریزنمونه نوک شاخساره، ب) شروع باززایی در محیط کشت پایه موراشیگ و اسکوگ حاوی غلظت ٤/٤ میکرومولار بنزیل‌آمینوپورین در ترکیب با ۲/۲ میکرومولار ایندول‌استیک‌اسید، ج و د) ریزازدیادی در شرایط درون شیشه در محیط کشت پایه موراشیگ و اسکوگ حاوی غلظت ٤/٤ میکرومولار بنزیل‌آمینوپورین در ترکیب با ۲/۲ میکرومولار ایندول‌استیک‌اسید، ر) ریشه‌زایی گیاهچه بابونه آلمانی در شرایط درون شیشه در نصف غلظت محیط کشت موراشیگ و اسکوگ بدون تنظیم‌کننده رشد، ه) سازگاری گیاهچه‌های بابونه آلمانی باززایی شده در گلدان حاوی پرلیت.

بررسی اثرات نوع ریزنمونه بر باززایی درون‌شیشه‌ای گیاه بابونه آلمانی

درصد باززایی و میانگین باززایی ریزنمونه نوک شاخه

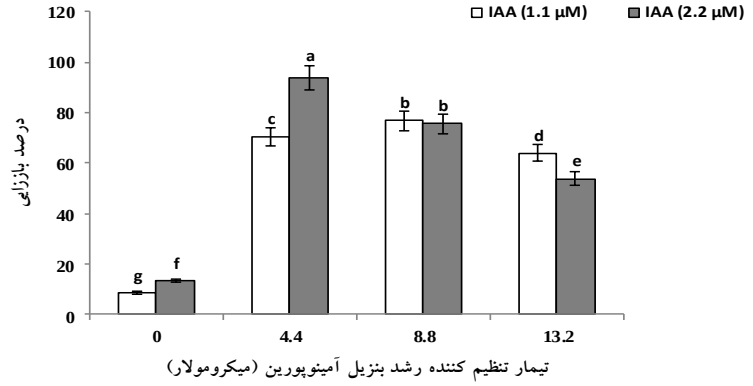
نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر غلظت‌های مختلف بنزیل‌آمینوپورین در ترکیب با ایندول‌استیک‌اسید بر درصد باززایی ریزنمونه نوک شاخه در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۲). در ریزنمونه نوک شاخه حداکثر درصد باززایی (۹۳/۸۷ درصد) در محیط حاوی ٤/٤ میکرومولار بنزیل‌آمینوپورین در ترکیب با ۲/۲ میکرومولار ایندول‌استیک‌اسید و حداقل شاخساره باززایی‌شده (۱۳/٦۰درصد) در محیط موراشیگ و اسکوگ فاقد تنظیم‌کننده رشد بنزیل‌آمینوپورین با غلظت ۱/۱ میکرومولار تنظیم‌کننده رشد ایندول‌استیک‌اسید مشاهده گردید (شکل ۵). در شرایط بدون بنزیل‌آمینوپورین، در هر دو سطح ایندول‌استیک‌اسید کمترین درصد باززایی ریزنمونه‌ها مشاهده شد. هم‌چنین سطوح بالاتر بنزیل‌آمینوپورین (۱۳/۲ میکرومولار) نیز باعث کاهش درصد باززایی در دو سطح ایندول‌استیک‌اسید شده است. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده مقادیر ٤/٤ و ۸/۸ میکرومولار بنزیل‌آمینوپورین در ترکیب با ایندول‌استیک‌اسید نتایج مناسب‌تری را تولید کرده‌اند

(نمودار ٤). نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر غلظت‌های مختلف بنزیل‌آمینوپورین در ترکیب با ایندول‌استیک‌اسید بر میانگین باززایی ریزنمونه نوک شاخه در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار می‌باشد (جدول ۲). بیشترین میانگین باززایی ریزنمونه (۱۱ گیاهچه در هر ریزنمونه) در تیمار حاوی ٤/٤ میکرومولار بنزیل‌آمینوپورین در ترکیب با ۲/۲ میکرومولار ایندول‌استیک‌اسید و کمترین میانگین باززایی با ۱/٤۱ گیاهچه در هر ریزنمونه در محیط کشت ام اس بدون تنظیم‌کننده رشد مشاهده گردید. محیط کشت بدون تنظیم‌کننده رشد بنزیل‌آمینوپورین کمترین میانگین باززایی را در دو سطح غلظت ایندول‌استیک‌اسید داشت. با افزایش غلظت بنزیل‌آمینوپورین، میانگین باززایی نوک شاخه در غلظت بالاتر ایندول‌استیک‌اسید به‌شدت افزایش یافت، ولی با افزایش بیشتر غلظت بنزیل‌آمینوپورین (۸/۸ و ۱۳/۲ میکرومولار) میانگین باززایی کاهش یافت. هر چند که این کاهش در محیط‌های غلیظ‌تر (ایندول‌استیک‌اسید ۲/۲ میکرومولار) بیشتر بود (شکل ٦).

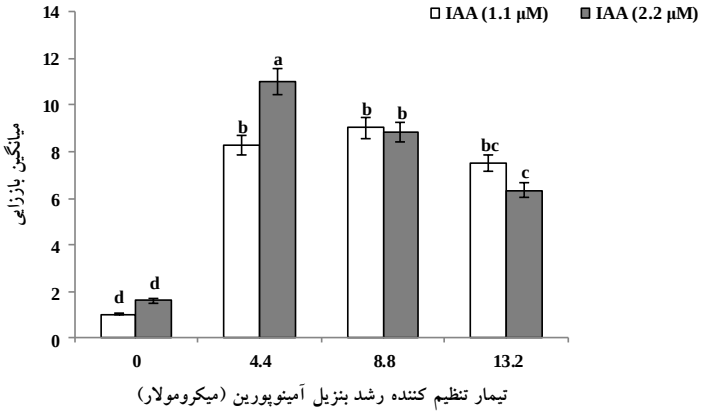
جدول ۲. نتایج تجزیه واریانس ریزنمونه نوک شاخه در گیاه بابونه آلمانی

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		درصد باززایی	میانگین باززایی
BAP	۳	٦۲۱۲/۵۷ **	۸۵/۲۰ **
IAA	۱	۱۰۷/۱۰ **	۱/٤۲ ns
BAP×IAA	۳	۳۰٤/٤٤ **	٤/۱۷ **
اشتباه آزمایشی	۱٦	۱	۰/۸۱
برش‌دهی اثر متقابل (BAP×IAA)			
BAP(0µM)	۱	۳٦/٦۰ **	۰/٤۸ ns
BAP(4.4µM)	۱	۱٤۷/۰٤ **	۱۱/۳٤ **
BAP(8.8µM)	۱	۵۲۱/٤۸ **	۰/۰٦ ns
BAP(13.2µM)		۲۱٦/۵۰ **	۲/۰٤ ns
ضریب تغییرات (CV%)		۱/۷۵	۱۳/٤۵

ns، **: به‌ترتیب نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد می‌باشد.



شکل ۵. اثرات متقابل بنزیل‌آمینوپورین و ایندول‌استیک‌اسید بر درصد باززایی ریزنمونه نوک شاخساره گیاه بابونه آلمانی در محیط کشت پایه موراشیگ و اسکوگ. حروف غیر مشابه نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد در بین میانگین‌ها می‌باشند.



شکل ٦. اثرات متقابل بنزیل‌آمینوپورین و ایندول‌استیک‌اسید بر میانگین باززایی شاخساره گیاه بابونه آلمانی در محیط کشت پایه موراشیگ و اسکوگ. حروف غیرمشابه نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد در بین میانگین‌ها می‌باشند.

جدول ۳. نتایج تجزیه واریانس ریزنمونه هیپوکوتیل در گیاه بابونه آلمانی

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		درصد کالوس زایی	میانگین کالوس زایی
BAP	۳	۱٤۳٥٥/۲٤ **	۳٥/۸۹ **
IAA	۱	٦٦/۷۳ **	۰/۱۷ ns
BAP×IAA	۳	۲۲/۲٤ **	۰/۰٥ ns
اشتباه آزمایشی	۱٦	۰/٦۲	۰/۰۸
برش‌دهی اثر متقابل (BAP×IAA)			
BAP(0µM)	۱	۳/۸۳ ns	۸/٤۲ ns
BAP(4.4µM)	۱	٦٦/۷۳ **	۰/۱۷ ns
BAP(8.8µM)	۱	٦٦/۷۳ **	۰/۱۷ ns
BAP(13.2µM)		٤/٥٥ ns	٦ ns
ضریب تغییرات (CV%)		۱/۰۸	۷/۸۷

ns، **: به‌ترتیب نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد می‌باشد.

درصد و میانگین کالوس‌زایی ریزنمونه هیپوکوتیل

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر غلظت‌های مختلف بنزیل‌آمینوپورین در ترکیب با ایندول‌استیک‌اسید بر درصد کالوس‌زایی ریزنمونه هیپوکوتیل در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۳). در ریزنمونه هیپوکوتیل حداکثر درصد کالوس‌زایی (۱۰۰ درصد) در محیط کشت‌های حاوی ٤/٤، ۸/۸ و ۱۳/۲ میکرومولار بنزیل‌آمینوپورین در ترکیب با ۲/۲ میکرومولار ایندول استیک اسید و محیط ۱۳/۲ میکرومولار بنزیل‌آمینوپورین در ترکیب با ۱/۱ میکرومولار ایندول‌استیک‌اسید و حداقل درصد کالوس‌زایی (صفر درصد) در محیط‌های حاوی ۱/۱ و ۲/۲ میکرومولار تنظیم‌کننده رشد ایندول‌استیک‌اسید بدون بنزیل‌آمینوپورین مشاهده گردید. اثر غلظت‌های مختلف بنزیل‌آمینوپورین در ترکیب با ایندول‌استیک‌اسید

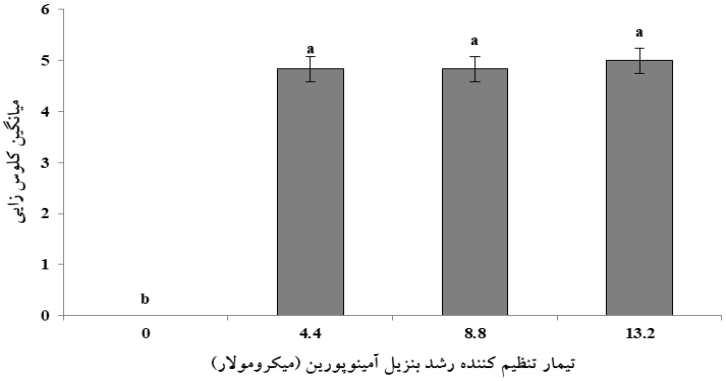
بر میانگین کالوس‌زایی ریزنمونه هیپوکوتیل در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار نبوده است (جدول ۳). نتایج تجزیه واریانس اثر بنزیل‌آمینوپورین به‌طور جداگانه بر میانگین کالوس‌زایی در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بوده است. بیشترین میانگین‌ها به‌ترتیب با ۵، ٤/۸۳ و٤/۸۳ عدد کالوس در تیمارهای حاوی ۱۳/۲، ۸/۸ و ٤/٤ میکرومولار بنزیل‌آمینوپورین گزارش شد. کمترین میانگین باززایی (تعداد کالوس) در تیمار بدون بنزیل‌آمینوپورین مشاهده شد (شکل ۷).

درصد و میانگین کالوس‌زایی ریزنمونه کوتیلدون

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر غلظت‌های مختلف بنزیل‌آمینوپورین در ترکیب با ایندول‌استیک‌اسید بر درصد کالوس‌زایی ریزنمونه کوتیلدون در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود (جدول ٤). در ریزنمونه کوتیلدون، حداکثر درصد کالوس‌زایی (۱۰۰ درصد) در محیط‌های حاوی ٤/٤ و ۸/۸ میکرومولار بنزیل‌آمینوپورین در ترکیب با ۱/۱ میکرومولار ایندول‌استیک‌اسید و محیط حاوی ٤/٤ میکرومولار بنزیل‌آمینوپورین در ترکیب با ۲/۲ میکرومولار ایندول‌استیک‌اسید و حداقل درصد کالوس‌زایی (صفر درصد) در محیط کشت‌های حاوی ۱/۱ و ۲/۲ میکرومولار تنظیم‌کننده رشد ایندول‌استیک‌اسید مشاهده گردید (شکل ۸). اثر غلظت‌های مختلف بنزیل‌آمینوپورین در ترکیب با ایندول‌استیک‌اسید بر میانگین کالوس‌زایی ریزنمونه کوتیلدون در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار نبوده است (جدول ٤). نتایج تجزیه واریانس اثر بنزیل‌آمینوپورین به‌طور جداگانه بر میانگین کالوس‌زایی در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بوده است. بیشترین میانگین‌ها به‌ترتیب با ۵، ٤/۸۳ و ٤/۵ عدد کالوس در تیمارهای حاوی ٤/٤، ۸/۸ و ۱۳/۲ میکرومولار بنزیل‌آمینوپورین گزارش شد. کمترین میانگین باززایی (بدون کالوس) در تیمار بدون بنزیل‌آمینوپورین مشاهده شد (شکل۹). ریزنمونه‌های مختلف گیاه بابونه آلمانی در شکل ۱۰ نشان داده شده‌اند.

بحث

کشت درون‌شیشه‌ای در گیاهان دارویی جهت کاربردهای مختلفی از جمله انتقال ژن، تکثیر کلونی، تولید گیاهان عاری از ویروس و تولید متابولیت‌های ثانویه مورد استفاده قرار می‌گیرد. در ارتباط با موفقیت تولید گیاهان در شرایط درون‌شیشه‌ای، فاکتورهای متعددی نظیر ژنوتیپ، نوع ریز نمونه، نوع تنظیم‌کننده‌های رشد، غلظت و ترکیب آنها، مکمل‌های رشد و اسیدهای آمینه مؤثر می‌باشند [۲].

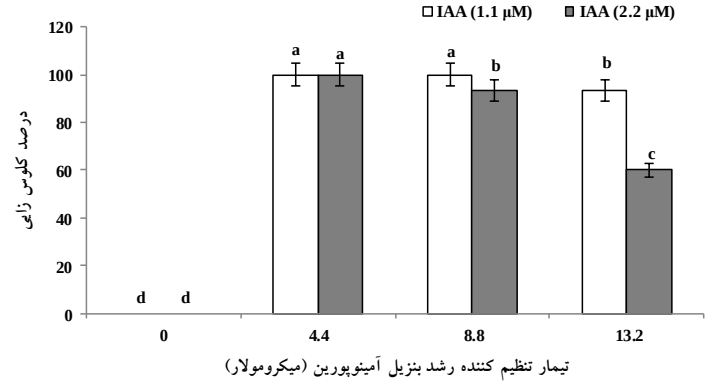


شکل ۷. تأثیر غلظت‌های مختلف بنزیل‌آمینوپورین بر میانگین کالوس‌زایی هیپوکوتیل گیاه بابونه آلمانی در محیط کشت پایه موراشیگ و اسکوگ. حروف غیر مشابه نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد در بین میانگین‌ها می‌باشند.

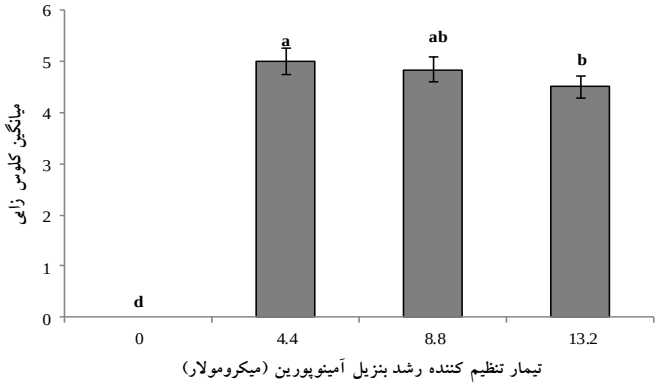
جدول ٤. نتایج تجزیه واریانس ریزنمونه کوتیلدون در گیاه بابونه آلمانی

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		درصد کالوس‌زایی	میانگین کالوس‌زایی
BAP	٣	١٣٧٩٧/٢٧ **	٣٤/٥٠ **
IAA	١	٦٧/٣٣ **	٠/١٧ ns
BAP×IAA	٣	٢٢/٢٤ **	٠/٠٥ ns
اشتباه آزمایشی	١٦	٣/٦٢	٠/١٢
برش‌دهی اثر متقابل (BAP×IAA)			
BAP(0µM)	١	٣/٨٣ ns	٤/١٦ ns
BAP(4.4µM)	١	٠ ns	٠ ns
BAP(8.8µM)	١	٦٦/٧٣ **	٠/١٧ ns
BAP(13.2µM)		٦٧/٩٤ **	٠/١٧ ns
ضریب تغییرات (CV%)		٢/٦٦	٩/٨٧

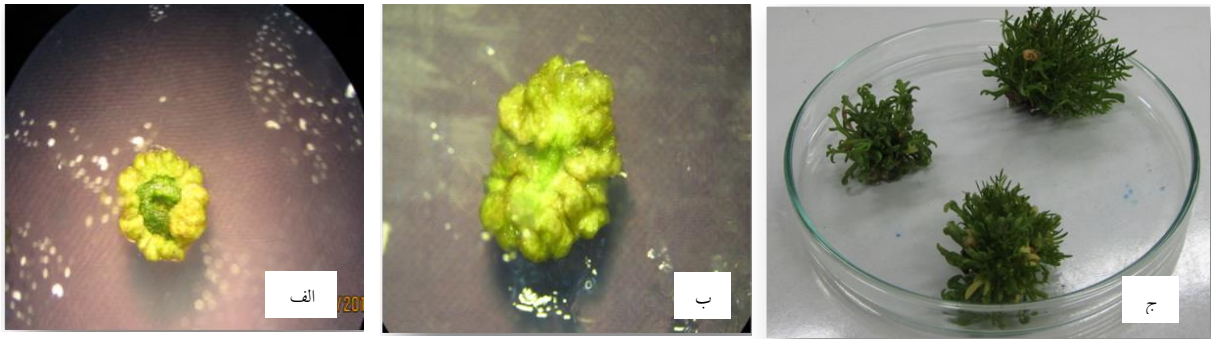
ns، **: به‌ترتیب نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال ١ درصد می‌باشد.



شکل ٨. اثرات متقابل بنزیل‌آمینوپورین و ایندول‌استیک‌اسید بر درصد کالوس‌زایی کوتیلدون گیاه بابونه آلمانی در محیط کشت پایه موراشیگ و اسکوگ. حروف غیرمشابه نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد در بین میانگین‌ها می‌باشند.



شکل ٩. تأثیر غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده رشد بنزیل‌آمینوپورین بر میانگین کالوس‌زایی کوتیلدون گیاه بابونه آلمانی در محیط کشت پایه موراشیگ و اسکوگ. حروف غیرمشابه نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد در بین میانگین‌ها می‌باشند.



شکل ۱۰. کشت ریزنمونه‌های مختلف گیاه بابونه آلمانی پس از ٦ هفته در محیط کشت پایه موراشی و اسکوگ تکمیل‌شده با بنزیل آمینوپورین و ایندول‌استیک‌اسید. الف) ریزنمونه کوتیلدون گیاه بابونه آلمانی، ب) ریزنمونه هیپوکوتیل گیاه بابونه آلمانی، ج) ریزنمونه نوک شاخه گیاه بابونه آلمانی

در محیط کشت بافت، غلظت‌های مختلفی از اکسین‌ها به‌طور متداول در ترکیب با سیتوکینین‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند. با اعمال تغییراتی در نوع و غلظت نسبی اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها در محیط کشت، امکان القای رشدهای تمایز نیافته همراه با ریخت‌زایی فراهم می‌گردد [۱۰] در این مطالعه و در آزمایشات دیگری اثر نوع توده بر باززایی این گیاه معنی‌دار تشخیص داده شده بود و به‌همین دلیل در این مطالعه فقط از یک نوع توده اصفهان استفاده گردید. آغاز باززایی در حدود ۳ هفته پس از انتقال ریزنمونه نوک شاخساره به محیط کشت ام اس حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی آغاز گردید (شکل ٤-ب). در هر بار واکشت در اثر تحریک ریزنمونه توسط محیط کشت، نرخ باززایی و پرآوری افزایش پیدا کرد.

تکثیر درون‌شیشه‌ای توسط فاکتورهای متعددی تحت تأثیر قرار می‌گیرد، یکی از فاکتورهای بسیار مهم، نوع، غلظت و نسبت تنظیم‌کننده‌های رشد اضافه‌شده به محیط کشت می‌باشد. در کشت درون‌شیشه‌ای از تنظیم‌کننده‌های رشد جهت تسریع در رشد استفاده می‌شود. به‌عنوان یک قاعده کلی جهت انجام هرچه بهتر رشد، اکسین یا سیتوکینین و یا هر دو باهم به محیط کشت افزوده می‌شوند، ولی نسبت مناسب اکسین به سیتوکینین به نوع گونه و ریزنمونه بستگی دارد. جهت شاخه‌زایی بیشتر از تنظیم‌کننده‌های رشد سیتوکنینی استفاده می‌شود. نتایج این آزمایش نیز نقش مؤثر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی در پاسخ ریزنمونه‌ها را مشخص نمود. نقش سیتوکینین‌ها در تحریک تقسیم سلولی، رفع خواب جوانه‌ها، القای تشکیل جوانه نابجا، رشد جوانه‌های جانبی و کنترل چرخه سلولی به‌خوبی ثابت شده است [١٤].

در پژوهش حاضر، بیشترین درصد باززایی در محیط کشت موراشیگ و اسکوگ حاوی ٤/٤ میکرومولار بنزیل‌آمینوپورین در ترکیب با ۲/۲ میکرومولار ایندول‌استیک‌اسید و کمترین درصد باززایی در محیط موراشیگ و اسکوگ بدون تنظیم‌کننده رشد مشاهده شد. با تغییر غلظت تنظیم‌کننده رشد گیاهی بنزیل‌آمینوپورین در محیط کشت پایه موراشیگ و اسکوگ، درصد باززایی و هم‌چنین تعداد ریزنمونه باززا شده در هر تیمار تغییر یافت. هم‌چنین این نتایج نشان داد که ترکیب تنظیم‌کننده رشدهای سیتوکینینی و اکسینی بر شاخص‌های مورد مطالعه معنی‌دار بوده و برای باززایی مؤثر در این گیاه باید از هر دو تنظیم‌کننده بنزیل‌آمینوپورین و ایندول استیک اسید استفاده نمود. در بررسی تأثیر ترکیبات مختلف محیط کشت با استفاده از ترکیب بنزیل‌آمینوپورین و

ایندول‌استیک‌اسید بر باززایی مستقیم از گیاه زوفا[1] گزارش گردید که بیشترین درصد باززایی (۹۳ درصد)، در تیمارهایی با غلظت ٤/٤ میکرومولار بنزیل آمینوپورین در ترکیب با غلظت ۰/۵ میکرومولار ایندول استیک اسید، به‌دست می‌آید [۳]. در پژوهشی، جهت ازدیاد درون‌شیشه‌ای گیاه *Pentanema indicum*، بهترین محیط تنظیم‌کننده رشدی، غلظت ٤ میکرومولار بنزیل آمینوپورین در ترکیب با ۱ میکرومولار ایندول استیک اسید گزارش شد [۳۰]. در اکالیپتوس[2]، بیشترین درصد باززایی در ترکیب تنظیم‌کننده رشدی بنزیل‌آمینوپورین با غلظت ٤/٤ میکرومولار و ایندول‌استیک‌اسید با غلظت ۲/۷ میکرومولار به‌دست آمد [۲٤]. به‌نظر می‌رسد تنظیم‌کننده‌های رشد سیتوکینینی در غلظت و نسبت مناسب با تحریک مریستم‌های موجود در انتهای نوک شاخساره منجر به تحریک شاخه‌زایی گردید. با تغییر غلظت تنظیم‌کننده رشد بنزیل‌آمینوپورین و نسبت آن با تنظیم‌کننده رشد ایندول‌استیک‌اسید، درصد و میانگین باززایی تغییر یافت که با نتایج سایر محققین مورد بررسی مطابقت دارد.

انتخاب نوع ریزنمونه در موفقیت باززایی درون‌شیشه‌ای اهمیت زیادی داشته و تحت کنترل عوامل مختلفی می‌باشد. فصل، سن و وضعیت فیزیولوژیکی گیاه دهنده ریزنمونه نیز در موفقیت اندام‌زایی نقش دارند. منبع ریزنمونه مورد استفاده، برای تعیین اندام و پتانسیل تولید مهم است که به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر شرایط فیزیولوژیکی و فتوسنتزی گیاه والد قرار می‌گیرد. سن فیزیولوژیکی ریزنمونه‌ها، نوع و اندازه ریزنمونه‌ها از فاکتورهای دیگری است که بر تشکیل اندام‌ها درون شیشه مؤثر هستند. در این پژوهش، بیشترین درصد باززایی از ریزنمونه‌های نوک شاخه به‌دست آمد. هم‌چنین در این پژوهش، ریزنمونه‌های هیپوکوتیل و کوتیلدون باززایی نشان نداده و فقط تولید کالوس نمودند. موقعیت ریزنمونه در گیاه مادری روی رشد و نمو آن مؤثر می‌باشد. هر چه از قسمت بالاتر گیاه، ریزنمونه تهیه گردد، احتمال موفقیت در کشت بافت بیشتر خواهد بود [۲]. به‌همین دلیل احتمال می‌رود که این عامل در این پژوهش، دلیل عملکرد موفقیت‌آمیز ریزنمونه نوک شاخه نسبت به ریزنمونه‌های هیپوکوتیل و کوتیلدون باشد.

در مطالعه حاضر از سه نوع ریزنمونه مختلف جهت ریزازدیادی بابونه در محیط کشت‌های مختلف تنظیم‌کننده رشدی استفاده گردید. در بین ریزنمونه‌های مورد مطالعه حداکثر باززایی در ریزنمونه نوک شاخساره به‌دست آمد. پاسخ ریزنمونه‌های مختلف در محیط کشت حاوی ترکیب متفاوت تنظیم‌کننده رشدی متغیر بود و حداکثر باززایی در محیط کشت حاوی غلظت‌های ٤/٤ و ۸/۸ میکرومولار تنظیم‌کننده رشد بنزیل‌آمینوپورین مشاهده گردید. در تکثیرگیاهان دارویی متعلق به خانواده کاسنی که از طریق کشت بافت صورت گرفته از ریزنمونه‌های مختلفی استفاده شده است. هم‌چنین پاسخ ریزنمونه‌های مختلف، نسبت به غلظت‌های متفاوت نفتالین‌استیک اسید، بنزیل‌آدنین و بنزیل آمینوپورین بسیار متفاوت می‌باشد. در گیاه دارویی *Eclipta alba* از ریزنمونه نوک شاخه، برای باززایی مستقیم در محیط کشت موراشیگ و اسکوگ حاوی ۵ میکرومولار بنزیل‌آدنین و ۰/۵ میکرومولار نفتالین‌استیک‌اسید استفاده شده است [۱۵]. در پژوهش دیگری درگیاه نعناع فلفلی[3] گزارش شده است که حداکثر میزان تولید شاخساره (٤۹/۸ عدد) از ریزنمونه‌های گره کشت‌شده در محیط موراشیگ و اسکوگ تکمیل‌شده با ٤/٤ میکرومولار بنزیل‌آمینوپورین

1. *Hyssopus officinalis* L.
2. *Eucalyptus tereticomi*
3. *Mentha piperita* L.

به‌دست آمد [۳۱]. در این مطالعه نیز اثر تنظیم‌کننده رشدی بنزیل‌آمینوپورین بر درصد باززایی و میانگین شاخساره باززایی‌شده در هر تیمار معنی‌دار گردید که نشان‌دهنده ضرورت حضور تنظیم‌کننده رشدی سیتوکینینی در محیط کشت باززایی می‌باشد.

در فلفل خوراکی[1] جهت تعیین پتانسیل باززایی، از سه ریزنمونه هیپوکوتیل، کوتیلدون و مریستم انتهایی در محیط کشت موراشیگ و اسکوگ تکمیل‌شده با غلظت‌های متفاوتی از بنزیل‌آمینوپورین استفاده شد. بیشترین درصد باززایی (۷۵ درصد) از ریزنمونه مریستم انتهایی در محیط موراشیگ و اسکوگ حاوی ۵ میلی‌گرم در لیتر بنزیل‌آمینوپورین در ترکیب با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر نفتالین‌استیک‌اسید به‌دست آمد [۷]. در گیاه *Telfairia occidentalis* قدرت باززایی نوک شاخه، بهتر از مریستم انتهایی گزارش گردید [٦]. نتایج بررسی‌ها بر روی گیاه بادرنجبویه[2] نشان داد که ریز نمونه نوک شاخه در محیط موراشیگ و اسکوگ شامل تنظیم‌کننده رشدهای بنزیل‌آمینوپورین و نفتالین‌استیک‌اسید، بیشترین باززایی را نشان داد که با نتایج این مطالعه مطابقت دارد [۲۰]. در گیاه *Citrulus colocynthis* جهت باززایی از ریزنمونه‌های نوک شاخه استفاده گردید. بیشترین تعداد شاخساره باززایی‌شده (۲۳ عدد) در محیط کشت موراشیگ و اسکوگ حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر بنزیل‌آمینوپورین و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر نفتالین‌استیک‌اسید به‌دست آمد [۱۹] که با نتایج این بررسی مطابقت داشتند. به‌نظر می‌رسد در غالب گیاهان، نوع ریزنمونه، محیط رشد و سطوح تنظیم‌کننده رشدهای داخلی در القای شاخساره تأثیر می‌گذارند و این فاکتورها باعث تفاوت‌هایی در نتایج به‌دست‌آمده می‌شوند [۱۲]. نتایج به‌دست‌آمده از این پژوهش، می‌تواند برای تکثیر موفقیت‌آمیز گیاه بابونه آلمانی در کشت بافت مورد استفاده قرار گیرد. سازگاری گیاهچه‌های باززایی‌شده پس از انتقال گیاهان ریشه‌دار به محیط پرلیت در داخل گلدان با بیش از ۹۰ درصد انجام گردید (شکل ٤، ه).

1. *Capssicum annume*
2. *Mellissa officinalis*

منابع

۱. امیدبیگی ر (۱۳۸۷) رهیافت‌های تولید و فرآوری گیاهان دارویی. جلد سوم. انتشارات آستان قدس رضوی. ٤۰۰ صفحه.

۲. باقری ه. و آزادی پ (۱۳۸۱) کشت بافت گیاهی: تکنیک‌ها و آزمایش‌ها. چاپ اول، انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد. ۱٥٤ صفحه.

۳. علیزاده م (۱۳۹۰) بررسی فاکتورهای مؤثر در باززایی درون‌شیشه‌ای گیاه زوفا (*Hyssopus officinalis* L.). پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه ارومیه.

٤. فارسی م. و ذولعلی ج (۱۳۸٤) بیوتکنولوژی گیاهی. انتشارات دانشگاه مشهد، ٥۷۰ صفحه.

٥. مشایخی ک (۱۳۸٦) جنین‌زایی رویشی گیاهی. انتشارات فراغی. ٤۸۳ صفحه.

6. Adesoye A I, Okooboh G O, Akande S R, Balogun M O and Odu B O (2012) Effect of phytohormones and genotype on meristem and shoot tip culture of *Telfairia occidentalis* Hook F. Journal of Applied Biosciences. 49: 3415– 3424.
7. Ashrafuzzaman M, Hossain M M, Razi Ismail, Shahidul Haque M, Shahidullah S M and Shahin Z (2009) Regeneration potential of seedling explants of chili (*Capsicum annum*). African Journal of Biotechnology. 8(4):591-596.
8. Dhar U and Joshi M (2005) Efficient plant regeneration protocol through callus for *Saussurea obvallata* (DC) Edgew. (Asteraceae): effect of explant type, age and plant growth regulators. Plant Cell Reports. 24(4): 195-200.
9. Dixon R A and Gonzales R A (1996) Handbook of Plant Tissue and Cell culture. Department of Botany, Mehta, A. R. MS. Univesity, BARODA. Plant Cell Culture. 800.

10. Edwin R F and Paul D S (1984) Plant propagation by tissue culture. Handbook and Directory of commercial laboratories. Exegetics Ltd. Eversley, Basingstok, Hants. RG27OQY, England. 700.
11. Faisal M and Anis M (2006) Thidiazuron induced high frequency axillary shoot multiplication in *Psoralea corylifolia*. Biologia Plantarum. 50(3): 437-440.
12. Faraco F and Echeverrigaray S (2001) Micropropagation of *Cunila galioides*, a popular medicinal plant of south Brazil. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 64:1-4.
13. Gamborg O L, Miller R A and Ojima K (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Experimental Cell Research. 50: 151- 158.
14. Gaspar TH, Kevers C, Penel C, Greppin H, Reid D M and Thorpe T A (1996) Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In vitro* Cellular and Developmental Biology Plant. 32 (4): 272-289.
15. Husain M K and Anis M (2006) Rapid *in vitro* propagation of *Eclipta alba* (L.) Hassk by shoot tip culture. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology. 15(2): 147-149.
16. Jahangir A, Iftekhar A, Akhtar Sh, Mizanur R, Anisuzzaman M and Mohammad Firoz A (2010) Micropropagation and antimicrobial activity of *'Operculina turpethum'* (Syn. *'Ipomoea turpethum'*), an endangered medicinal Plant. Plant Biology and Omics. 3(2): 40-46.
17. Jayanthi M and Mandel P K (2001) Plant regeneration through somatic embryogenesis and RAPD analysis of regenerated plants in *Tylophora indica* (Burm. F. Merrill). *In vitro* Cellular and Developmental Biology Plant. 37(5): 576-580.
18. Liu C Z, Murch S J, Demerdash M EL and Saxena P K (2003) Regeneration of the egyptian medicinal plant *Artemisia judaica* L. Plant Cell Reports. 21(6): 525-530.
19. Meena M C, Meena R and Patni V (2010) High frequency plant regeneration from shoot tip explants of *Citrullus colocynthis* (Linn.) Schrad. An important medicinal herb. African Journal of Biotechnology. 9(31): 5037-5041.
20. Meftahizade H, Moradkhani H, Naseri B, Lotfi M and Naseri A (2010) Improved *in vitro* culture and micropropagation of different *Melissa officinalis* L. genotypes. Medicinal of Plants Research. 4(3): 240-246.
21. Murashige T and Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum. 15: 473-497.
22. Pavendan P and Rajasekaran C S (2011) Effect of different concentrations of plant growth Regulators for micropropagation of *Eugenia singampattiana* beddome endangered tree species. Research Journal of Botany. 6: 122-127.
23. Rezaie A, Mohajeri D, Zarkhah A and Nazeri M (2012) Comparative assessment of *Matricaria chamomilla* and zink oxide on healing of experimental skin wounds on rats. Annals of Biological Research. 3(1): 550-560.
24. Roberson D, Cristiane L, Francine L, Henrique K and Marguerite Q (2005) Plant regeneration from cotyledonary explants of *Eucalyptus cammaldulensis*. Agricultural Science. 62: 406-412.
25. Robinson J Ph, Britto S J and Balakrishnan B (2009) Regeneration of plants through somatic embryogenesis in *Emilia zeylanica* C. B. clarke a potential medicinal herb. Botany Research International. 2(1): 36-41.
26. Rout G R, Saxena C, Samantaray S and Das P (1999) Rapid clonal propagation of *Plumbago zeylanica* L. Plant Growth Regulators. 28: 1-4.
27. Samatadze T E, Muravenko O, Popov K and Zelenin A (2001) Genome comparison of the *Matricaria chamomilla* L. varieties by the chromosome C- and OR- banding patterns. Caryologia. 54(4): 299-306.
28. Seetharam Y N, Rajanna L N, Jyothishwaran G, Aravind B, Sharanabasappa G and Mallikharjun P B (2007) *In vitro* shoot regeneration from leaf and nodal explants of *Vernonia cinerea* (L.) less. Indian Journal of Biotechnology. 6: 418-420.
29. Sharma G and Nautiyal A R (2009) Influence of explants type and plant growth on *In Vitro* multiple shoots regeneration of a Laurel from Himalaya. Nature and Science. 7(9): 1-7.
30. Sivanesan I and Jeong B R (2007) Micropropagation and *in vitro* flowering in *pentanema indicum* ling. Plant Biotechnology. 24(5): 527-532.
31. Van Eck J M and Kitto S L (1992) Regeneration of peppermint and organ mint from leaf disks. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 30: 41-49.

Breeding of Agronomic and Horticultural Crop
(Journal of Agriculture, University of Tehran)

Vol. 4 ■ No. 1 ■ Spring & Summer 2016

Effect of plant growth regulators and explant type on direct *in vitro* shoot regeneration of *Matricaria chamomilla* L.

Bahman Hosseini[1*], Elham Moradipour[2], Alireza Pirzad[3], Jafar Amiri[1], Elham Aminnezhad[2]

1. Associate Professor, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran.
2. Former M.Sc. Student, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran.
3. Assistant Professor, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran.

Received: February 25, 2016 Accepted: November 1, 2016

Abstract

In order to find the best plant growth regulators combination and explants type on German chamomile regeneration under *in vitro* conditions, present study was performed. In first experiment, the effect of different benzyl amino pourin concentrations (8.8, 4.4, 2.2 and 0 µM) in combination with indole acetic acid (2.2, 1.1, 0.5 and 0 µM) on direct shoot regeneration from shoot tip explants of Isfahan genotypes were evaluated. The ANOVA results showed that the highest regeneration percentage (95.54%) and the lowest regeneration percentage (14.23) were observed on media supplemented with 4.4 µm benzyl amino pourin in combination with 2.2 µm indole acetic acid and MS free hormone respectively. The maximum mean number of shoots was obtained in on media containing benzyl amino pourin (4.4 µm) in combination with indole acetic acid (2.2 µm). In second experiment, in order to identify the optimum in vitro proliferation conditions of *Matricaria Chamomilla*, three various explants type (Shoot tip, Cotyledon and Hypocotyl) in different plant growth regulators combination of benzyl amino pourin (13.2, 8.8, 4.4 and 0 µM) and indole acetic acid (1.1 and 2.2 µM) were analyzed. ANOVA results revealed that highest regeneration percentage (93.87) was obtained in MS media supplemented with benzyl amino pourin (4.4 µM) and indole acetic acid (2.2 µM) and in hypocotyl and cotyledon explants in different culture media callus were obtained. More than 90% of the regenerated plants were successfully acclimatized and transferred to the greenhouse.

Keywords: Benzyl amino pourin, direct regeneration, german chamomile, indole acetic acid, shoot apical.

Corresponding author: b.hosseini@urmia.ac.ir