نشریه علمی ـ پژوهشی اکوفیزیولوژی گیاهان زراعی، جلد هشتم، شماره ۲(۳۰)، تابستان ۱۳۹۳، صفحه ۲۱۴-۲۰۳

نقش تنظیم کننده‌های رشد گیاهی و جداکشت‌های مختلف بر پاسخ کشت بافتی و سوسپانسیون سلولی بابونه آلمانی (*Matricaria chamomilla* L.)

لیلا کوهی[۱]، ناصر زارع[۲*]، رسول اصغری زکریا[۳] و پریسا شیخ‌زاده مصدق[۲]

چکیده

بابونه آلمانی (*Matricaria chamomilla* L.) یکی از گیاهان دارویی مهم است که در صنایع مختلف داروسازی و آرایشی- بهداشتی مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این تحقیق که در سال ۱۳۹۱ در دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه محقق اردبیلی انجام گرفته است، پاسخ درون شیشه‌ای جداکشت‌های برگ و هیپوکوتیل بابونه آلمانی در محیط کشت گامبورگ (B5) و تحت تأثیر نوع و سطوح مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی در قالب آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی مورد بررسی شده و کشت سوسپانسیون سلولی آن انجام گرفت. جداکشت‌های هیپوکوتیل و برگ کشت شده بعد از گذشت یک تا دو هفته شروع به تولید کالوس کردند. از بین ترکیب تنظیم کننده رشدی بیشترین رشد کالوس (۲۶۴/۱ میلی‌گرم) مربوط به جداکشت برگ در محیط حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D و یک میلی‌گرم بر لیتر BAP بوده و کمترین مقدار آن (۴۰/۴۲ میلی‌گرم) در محیط حاوی ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D با جداکشت برگ مشاهده شد. برخی از جداکشت‌ها و کالوس‌ها در تعدادی از تیمارها ریشه‌های نابجا تولید کردند. بیشترین درصد ریشه‌زایی در جداکشت برگ (۵۸/۷۳٪) مربوط به محیط حاوی چهار میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D و یک میلی‌گرم بر لیتر کینتین و در مورد جداکشت هیپوکوتیل (۴۸/۶۱٪) مربوط به محیط حاوی ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA بود. بیشترین درصد کالوس‌های ترد (۴۲/۲۲٪) در جداکشت هیپوکوتیل در محیط B5 حاوی چهار میلی‌گرم بر لیتر NAA و سه میلی‌گرم بر لیتر BAP به‌دست آمد. کشت سوسپانسیون سلولی با انتقال کالوس‌های نرم حاصل از ریزنمونه هیپوکوتیل به محیط کشت MS مایع حاوی ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D و یک میلی‌گرم بر لیتر کینتین استقرار یافت. منحنی رشد سلولی نشان داد که تکثیر سلول‌ها از روز چهارم بعد کشت شروع شده و تا روز ۱۳ ادامه می‌یابد. سپس، رشد سلولی متوقف شده و کشت‌ها وارد مرحله ایستایی می‌شوند.

واژگان کلیدی: بابونه آلمانی، سوسپانسیون سلولی، کالوس‌زایی، کشت درون شیشه‌ای، *Matricaria chamomilla* L.

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد اصلاح نباتات، دانشگاه محقق اردبیلی
۲- استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل
۳- دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل
* (نگارنده‌ی مسئول)

تاریخ دریافت: ۹۲/۸/۵
تاریخ پذیرش: ۹۳/۴/۱۱

zarenasser@yahoo.com

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

بابونه آلمانی (*Matricaria chamomilla* L.) و مترادف با *Matricaria recutita* L. از تیره مرکبان (Asteraceae)، گیاهی دیپلوئید (2n=2x=18) است (Mozaffarian, 1996; Omidbaigi, 2009) که دارای واریته‌های تتراپلوئید (2n=4x=36) نیز می‌باشد (Samatadze *et al*., 2001). این گیاه، از مهم‌ترین گیاهان دارویی شناخته شده می‌باشد که در تمام دارونامه‌های معتبر معرفی شده است. علاوه بر این، این گیاه یکی از پرمصرف‌ترین گیاهان دارویی در جهان است که هر ساله مقادیر فراوانی از آن در صنایع داروسازی، آرایشی- بهداشتی و صنایع غذایی استفاده می‌شود (Mann and Staba, 1986; Singh *et al*., 2011). مهم‌ترین ترکیب‌های موجود در گل‌های بابونه عبارتند از: اسانس، فلاونوئید و کومارین‌ها. اسانس حاصل از گل‌های بابونه حاوی ترکیبات شیمیایی سس‌کوئی‌ترپنوئیدی و پلی‌استیلنی است که از طریق حلال‌ها و یا تقطیر با آب استخراج می‌شود. آلفا-بیسابلول و کامازولن مهم‌ترین اجزاء در اسانس بابونه می‌باشند و کیفیت اسانس بابونه به وجود مقادیر بالای این دو ترکیب بستگی دارد (Franke and Schilcher, 2005).

بیوتکنولوژی نقش مهمی در تولید، اصلاح و افزایش بهره‌وری محصولات گیاهان دارویی دارد. یکی از بخش‌های مهم بیوتکنولوژی، کشت بافت است که کاربردهای متفاوت آن در زمینه گیاهان دارویی از جنبه‌های مختلف قابل بررسی است. دلایل استفاده محققان از این روش‌ها به‌دست آوردن گیاهان همگن، ایجاد تغییرات سوماکلونال، حذف عوامل بیماری‌زا، تولید متابولیت‌های ثانویه، نگهداری ذخایر توارثی به مدت زمان طولانی، انتقال ژن و دو رگ‌گیری بین گونه‌ای می‌باشد (Farsi and Bagheri, 2008). موفقیت در بسیاری از تکنیک‌های گزینش در شرایط درون‌شیشه‌ای و اعمال فنون دست‌ورزی ژنتیکی در گیاهان عالی، به وجود یک سیستم مناسب کشت درون‌شیشه‌ای بستگی دارد. با این حال، گزارش‌های محدودی در مورد کشت بافت بابونه با استفاده از بخش‌های مختلف گیاه به‌عنوان منبع جداکشت وجود دارد.

پاسامونتی و همکاران (Passamonti *et al*., 1998) در آزمایشی روی ریزازدیادی واریته‌های انتخاب شده از بابونه *Chamomilla recutita* L. Rauschert از بذر واریته‌های Minardi و Italia (دیپلوئید 2n=2x=18) و واریته‌های Lutea و BK2 (2n=4x=36) برای شروع کشت‌های استریل استفاده کردند. بعد از ضدعفونی سطحی بذرها و جوانه‌زنی آنها، نوساقه‌های انتخاب شده برای پرآوری به محیط کشت MS منتقل شدند. این محققین بهترین محیط کشت برای پرآوری ژنوتیپ‌های مورد استفاده را محیط MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر کینتین گزارش کردند. در حالی که تولید کالوس از بذرهای کشت شده روی محیط کشت موراشیگ و اسکوگ MS حاوی ۰/۰۵ میکرومولار NAA و ۱۱/۶ میکرومولار کینتین را نیز گزارش کردند (Passamonti *et al*., 1998).

اچویگری و همکاران (Echeverrigaray *et al*., 2000) باززایی بابونه رومی (*Anthemis nobilis* L.) با استفاده از جداکشت برگ در محیط کشت MS حاوی ۴/۵ -۱ میکرومولار BA و ۱ میکرومولار NAA را بررسی کرده و گزارش نمودند که جداکشت‌ها روی محیط کشت MS حاوی ۲/۲۵ میکرومولار از BA و ۰/۶ میکرومولار از IAA ساقه‌های نابجا تولید کردند. کشت سوسپانسیون سلولی، شامل توده‌های سلولی پراکنده و در حال رشد در محیط کشت مایع و در حال تکان است. این کشت‌ها معمولاً با انتقال قطعاتی از کالوس ترد و تمایزنیافته به یک محیط کشت مایع

Archive of SID

www.SID.ir

که به طور یکنواخت و مداوم تکان داده می‌شود، شروع می‌شوند. پیشرفت در زمینه کشت‌های سلولی برای تولید ترکیبات دارویی، تولید انواع گسترده‌ای از مواد دارویی مثل آلکالوئیدها، ترپنوئیدها، استروئیدها، ساپونین‌ها، فنولیک‌ها، فلاونوئیدها، آمینواسیدها را ممکن ساخته است (Farsi and zolala, 2011؛ Mulabagal *et al*., 2004). بنابراین، این تحقیق به منظور بررسی پاسخ درون‌شیشه‌ای جداکشت‌های هیپوکوتیل و قطعات برگی بابونه آلمانی تحت تاثیر سطوح مختلف تنظیم‌کننده‌های گیاهی متفاوت انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق که در دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه محقق اردبیلی انجام گرفته از رقم مجاری بابونه آلمانی (*Matricaria chamomilla* L.) استفاده شد.

ضد عفونی بذور و کشت آنها

بذور بابونه پس از شستشو با آب مقطر، به مدت ۳۰ ثانیه در الکل ۷۰٪ غوطه‌ور شدند. پس از آبکشی با آب مقطر استریل، به مدت ۱۵ دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۱٪ غوطه‌ور شدند. سپس بذور بعد از سه بار آبکشی در ظروف شیشه‌ای حاوی محیط کشت MS جامد کشت شده و در اتاقک رشد با شرایط دمای ۲±۲۵ درجه سلسیوس و تناوب نوری ۸ ساعت تاریکی و ۱۶ ساعت روشنایی با نور فلورسنت نگهداری شدند.

تهیه و کشت جداکشت

پاسخ به کشت بافت دو جداکشت هیپوکوتیل و قطعات برگی بابونه مورد ارزیابی قرار گرفت. برای تهیه جداکشت‌های هیپوکوتیل، قسمت هیپوکوتیل گیاهچه‌های رشد کرده در تاریکی، در شرایط استریل جدا شده و با استفاده از اسکالپل تیز و استریل در داخل آب مقطر استریل به قطعاتی با طول ۱۰-۵ میلی‌متر برش داده شدند. برای تهیه جداکشت برگ، برگ‌های تازه و خوب رشد کرده تحت شرایط استریل از گیاهان درون شیشه‌ای جدا شده و با استفاده از اسکالپل تیز و در داخل آب مقطر به قطعات کوچک بریده شدند. جداکشت‌های تهیه شده پس از خشک شدن با کاغذ صافی استریل، روی محیط کشت‌های حاوی سطوح مختلف اکسین و سایتوکنین در ظروف پتری کشت شدند. کشت‌ها در اتاقک رشد با دمای ۲±۲۵ درجه سلسیوس نگهداری و هر چهار هفته یک بار زیرکشت شدند. چهار تا پنج هفته بعد از کشت جداکشت‌ها، درصد کالوس‌زایی، ریشه‌زایی، درصد کالوس‌های ترد، وزن تر کالوس‌ها، تولید ساقه‌های نابجا و همچنین رنگ کالوس‌های تولید شده ثبت گردید.

کشت سوسپانسیون

برای ایجاد کشت سوسپانسیون، کالوس‌های ترد و نرم به ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت MS مایع حاوی ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D و یک میلی‌گرم بر لیتر کینتین منتقل شده و روی شیکر با دور RPM ۱۳۰ و دمای ۲±۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند. پس از استقرار کشت سوسپانسیون، کشت‌ها هر دو هفته یک بار زیرکشت شدند.

برای اندازه‌گیری رشد سلول‌ها در کشت سوسپانسیون و تعیین منحنی رشد سلول‌ها از شاخص حجم سلول ساکن (Settled Cell Volume, SCV) استفاده شد. برای این منظور، هر سه روز یک‌بار حدود ۱۵ میلی‌لیتر از محیط کشت حاوی سلول‌ها و توده‌های سلولی در فالکون درجه‌بندی ریخته شده و به مدت ۳۰ دقیقه در حالت سکون نگهداری شد تا سلول‌ها و توده‌های سلولی رسوب کنند. در نهایت حجم سلول یادداشت گردید و به‌صورت درصد از کل محیط برداشت شده محاسبه گردید.

Archive of SID

www.SID.ir

آزمایش به صورت فاکتوریل با طرح پایه کاملاً تصادفی در چهار تکرار انجام گرفت. عوامل مورد مطالعه شامل نوع جداکشت (هیپوکوتیل و برگ) و ترکیب تنظیم کننده رشدی (صفر، ۰/۵، ۱/۵ یا ۴ میلی‌گرم بر لیتر از اکسین‌های NAA یا 2,4-D در ترکیب با صفر، ۱ یا ۳ میلی‌گرم بر لیتر از سایتوکنین‌های BAP یا کینتین) بودند.

تجزیه و تحلیل داده‌ها و رسم شکل‌ها با استفاده از نرم‌افزارهای Excel و SPSS صورت گرفت. مقایسه میانگین‌ها نیز با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵٪ انجام گرفت.

نتایج و بحث

جداکشت‌های هیپوکوتیل و برگ کشت شده در محیط کشت‌های B5 بعد از گذشت یک تا دو هفته در اکثر محیط‌های کشت شروع به تولید کالوس کردند (شکل‌های ۱ و ۲). کالوس‌های تولید شده با توجه به ترکیب‌های هورمونی به کار رفته و نوع جداکشت، رنگ‌های متفاوتی داشتند و برخی به رنگ ارغوانی و دارای آنتوسیانین بودند (شکل ۲، F). درصد کالوس‌زایی جداکشت‌ها به طور معنی‌داری ($P\leq 0.01$) تحت تأثیر ترکیب تنظیم کننده رشدی، نوع جداکشت و اثر متقابل جداکشت × ترکیب تنظیم کننده رشدی قرار گرفت (جدول ۱). جداکشت برگ در محیط فاقد هورمون کالوس تولید نکرد. در حالی که، درصد کالوس‌زایی جداکشت هیپوکوتیل در همین محیط ۶۰/۲۱ درصد بود (جدول ۲).

درصد کالوس‌زایی جداکشت‌های برگ در محیط حاوی ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D به تنهایی، ۶۳/۱۹ درصد، محیط حاوی ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D و سه میلی‌گرم بر لیتر کینتین، ۷۵ درصد و محیط حاوی چهار میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D و یک میلی‌گرم بر لیتر کینتین، ۹۱/۶۷ درصد بود. در بقیه ترکیب‌های تیماری همه (۱۰۰٪) جداکشت‌ها کالوس‌زایی نشان دادند (جدول ۲).

وزن تر کالوس نیز به طور معنی‌داری ($P\leq 0.01$) تحت تأثیر ترکیب تنظیم کننده رشدی و اثر متقابل جداکشت × ترکیب تنظیم کننده رشدی قرار گرفت (جدول ۱). بیشترین وزن تر کالوس (۲۶۴/۱ میلی‌گرم) مربوط به جداکشت برگ در محیط حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D و یک میلی‌گرم بر لیتر BAP بوده و کمترین مقدار آن (۴۰/۴۲ میلی‌گرم) در جداکشت برگ در محیط حاوی ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D به‌دست آمد (شکل ۳). ریشه‌زایی کالوس‌ها به طور معنی‌داری تحت تاثیر ترکیب تنظیم کننده رشدی و اثر متقابل جداکشت × ترکیب تنظیم کننده رشدی بود. در حالی‌که بین دو نوع جداکشت اختلاف معنی‌داری از نظر صفت ریشه‌زایی وجود نداشت (جدول ۱). مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که بیشترین درصد ریشه‌زایی در جداکشت برگ (۵۸/۷۳٪) مربوط به محیط حاوی چهار میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D و یک میلی‌گرم بر لیتر کینتین و در مورد جداکشت هیپوکوتیل (۴۸/۶۱٪) مربوط به محیط حاوی ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA بود (شکل ۴). ریشه‌زایی در هر دو محیط ذکر شده از نوع ریشه‌زایی غیرمستقیم بوده و شکل ریشه‌ها با توجه به ترکیب تنظیم کننده رشدی به کار رفته از نظر شکل ظاهری و رشد متفاوت بود. برای مثال ریشه‌ها در محیط حاوی چهار میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D و یک میلی‌گرم بر لیتر کینتین ضخیم و بدشکل بودند (شکل ۱، F).

براساس نتایج تجزیه واریانس داده‌ها اثر ترکیبات هورمونی، جداکشت و اثر متقابل جداکشت × ترکیب تنظیم کننده رشدی در مورد صفت درصد کالوس‌های ترد در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار به دست آمدند (جدول ۱). همه کالوس‌های تولید شده از جداکشت برگ از نوع متراکم بودند (شکل ۱، D).

Archive of SID

www.SID.ir

بیشترین درصد کالوس‌های ترد (۴۲/۲۲٪) در جداکشت هیپوکوتیل (شکل ۲، D) مربوط به محیط حاوی چهار میلی‌گرم بر لیتر NAA و سه میلی‌گرم بر لیتر BAP بود (شکل ۵). کالوس‌های ترد حاصل از جداکشت هیپوکوتیل و محیط کشت MS حاوی ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D و یک میلی‌گرم بر لیتر کینتین چند روز پس از انتقال به محیط کشت مایع، رشد خود را سر گرفته و به صورت توده‌های سلولی تکثیر شدند (شکل ۶). بررسی منحنی رشد سلول‌های بابونه آلمانی در کشت سوسپانسیون (شکل ۷) نشان داد سلول‌ها حدود چهار روز تکثیر چندانی نداشته ولی پس از آن تکثیر سلولی شروع شده و سلول‌ها وارد مرحله رشدی سریع شدند. این مرحله رشدی سلول‌ها تا حدود ۱۳ روز بعد کشت ادامه داشته و پس از آن رشد سلولی کاهش یافته و کشت‌ها وارد مرحله ایستایی شدند.

محیط کشت B5 در بسیاری از تحقیقات برای کشت‌های کالوس و سوسپانسیون مورد استفاده قرار می‌گیرد. غلظت مواد معدنی در محیط B5 کمتر از محیط MS می‌باشد. بر اساس نتایج، محیط‌های حاوی فقط 2,4-D و ترکیب 2,4-D با کینتین در جداکشت برگ درصد کالوس‌زایی کمتری را نسبت به بقیه تیمارها داشته‌اند. در حالی که جداکشت هیپوکوتیل در همه محیط‌های B5 حاوی هورمون به القاء کالوس پاسخ داده بودند. به عبارت دیگر پاسخ کالوس‌زایی جداکشت برگ در محیط B5 حاوی هورمون 2,4-D به تنهایی و یا در ترکیب با کینتین، نسبت به کالوس‌زایی جداکشت هیپوکوتیل پایین است. در مطالعه‌ای که روی کالوس‌زایی گیاه *Taxus baccata* L. انجام شده، بهترین محیط برای کالوس‌زایی و رشد کالوس‌ها را محیط B5 حاوی چهار میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر کینتین بیان کرده‌اند (Ashrafi *et al*., 2010).

مولینا (Molina, 2004) در مطالعه‌ای روی گیاه *Salvia canariensis* L. بیان کردند که هورمون NAA به تنهایی و یا در ترکیب با BAP در القاء کالوس جداکشت‌های ساقه و دمبرگ در هر دو محیط کشت MS و B5 خیلی موثر بوده است. در مطالعه حاضر نیز محیط کشت B5 حاوی NAA به تنهایی و یا در ترکیب با BAP در القاء کالوس جداکشت‌های برگ و هیپوکوتیل موثرتر بودند (جدول ۲).

وزن تر و خشک کالوس به طور گسترده به عنوان معیاری از رشد کالوس‌ها مورد اندازه‌گیری قرار می‌گیرد. در این مطالعه، رشد کالوس در جداکشت برگ در محیط‌های حاوی BAP به تنهایی و یا در ترکیب با NAA یا 2,4-D نسبت به بقیه تیمارها بیشتر به‌دست آمد (شکل ۳)، که برعکس وضعیت مشاهده شده در مورد ریشه‌زایی در این محیط‌ها است (شکل ۴). به عبارت دیگر، به منظور دستیابی به عملکرد بالای کالوس در این گیاه توصیه می‌شود که از سایتوکینین BAP استفاده شود (شکل ۳). در بین ترکیب‌های تنظیم کننده رشدی مورد استفاده، در محیط‌های حاوی BAP به تنهایی و یا در ترکیب با NAA و یا 2,4-D ریشه‌زایی در هیچ کدام از جداکشت‌های برگ و هیپوکوتیل مشاهده نشد (شکل ۴). ولی در محیط‌های حاوی NAA به تنهایی و یا در ترکیب با کینتین از هر دو جداکشت برگ و هیپوکوتیل ریشه‌زایی مشاهده شد. با توجه به نتایج حاصل، محیط‌های B5 حاوی چهار میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D و یک میلی‌گرم بر لیتر کینتین، محیط حاوی ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA و محیط فاقد هورمون (شاهد) محیط‌های مناسبی برای ریشه‌زایی می‌باشند (شکل ۴).

اکسین‌ها و سایتوکینین‌ها برای تقسیم و همچنین ریخت‌زایی سلول‌ها هم در کشت سلولی و در گیاه کامل و به‌ویژه در انتقال سلول‌ها از مرحله G_1

Archive of SID

www.SID.ir

به S و از مرحله G_2 به M ضروری هستند. گزارش‌های متعددی در گیاهان مختلف نشان داده که اکسین‌ها به عنوان مهم‌ترین فاکتور در القای کالوس عمل کرده و سایتوکنین‌ها این نقش را تسهیل می‌نمایند. اکسین‌ها با تحریک اسیدی شدن دیواره سلولی منجر به افزایش انبساط‌پذیری (extensibility) آن می‌شوند. از طرف دیگر، اکسین باعث القاء رونویسی mRNAهای رمز کننده پروتئین‌های مرتبط با رشد سلولی می‌شوند. سایتوکینین‌ها نیز از طریق تنظیم تولید پروتئین‌های درگیر در رشته‌های دوک، به‌طور مستقیم چرخه سلولی را تحت تاثیر قرار می‌دهند (Stals and Inze, 2001; Richard *et al*., 2002; Silveria *et al*., 2004).

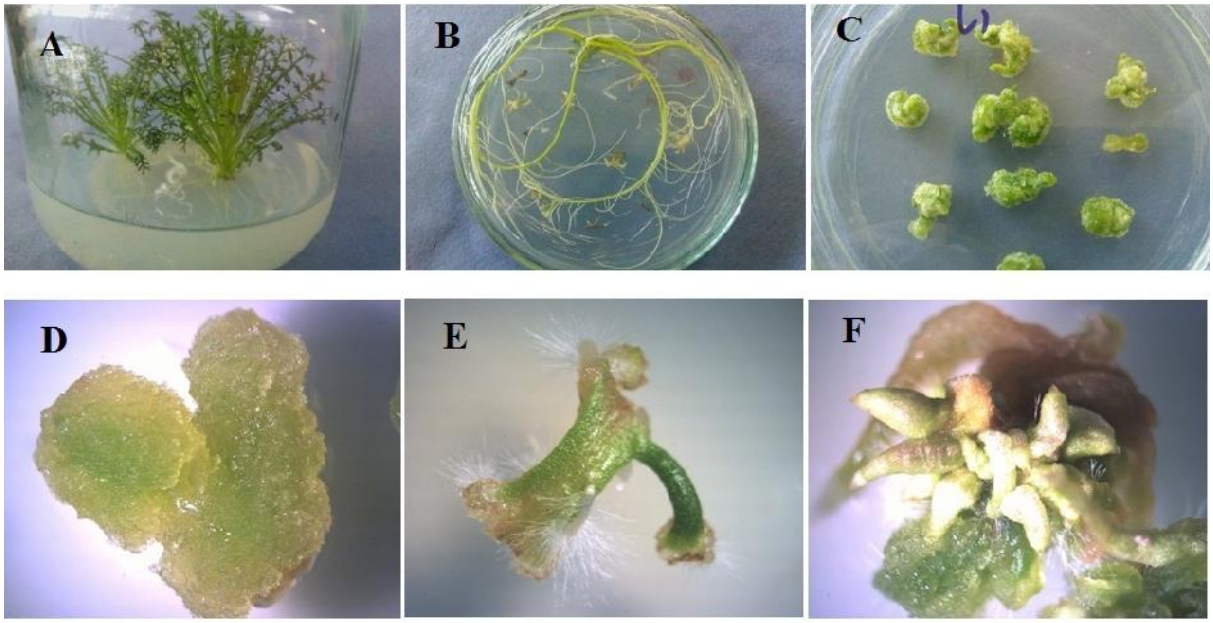
کالوس‌ها به طور عمده به دو گروه کالوس‌های متراکم یا فشرده و کالوس‌های ترد تقسیم می‌شوند. وجود کالوس‌های ترد برای استقرار کشت سوسپانسیون از اهمیت زیادی برخوردار هستند. با توجه به نتـایج، جداکشت هیپـوکوتیل در اکثر محیط‌های B5 که در آنها از ترکیب دو هورمون اکسین و سایتوکینین استفاده شده است، برای به دست آوردن کالوس‌های ترد مناسب می‌باشد (شکل۴).

از روش‌های ارزیابی رشد در کشت‌های سوسپانسیون سلول گیاهی، (SCV) و حجم سلول بسته‌بندی شده (PCV) می‌باشد (Street, 1977). هرن و همکاران (Hren *et al*., 2006) در مطالعه‌ای روی کشت سوسپانسیون سلولی Taxus x media Rehd نشان دادند که PCV به عنوان روشی قابل اطمینان و سریع برای اندازه‌گیری رشد سلول به جای وزن خشک و تر سلول می‌باشد. علاوه بر این، در کشت سوسپانسیون سلولی خشخاش ایرانی، SCV و PCV همبستگی بسیار بالایی (۰/۹۷) با تراکم سلولی (تعداد سلول در میلی‌لیتر) نشان داده است (Farjaminezhad, 2011).

عدم تکثیر سلول‌های بابونه آلمانی در چهارروز اول بعد از زیر کشت ناشی از سازگار شدن سلول‌ها به محیط جدید است. به‌طوری که اگر شرایط رشد برای سلول مناسب و بهینه نباشد این دوره می‌تواند تا چند هفته هم دوام داشته باشد. کاهش تکثیر سلولی و در نهایت توقف آن حدود ۱۳ روز پس از کشت نیز ممکن است به دلیل تخلیه عنـاصر تغذیه‌ای و تنظیم‌کننده‌های رشد موجود در محیط کشت و همچنین تولید و ترشح متابولیت‌های ثانویه توسط سلول‌ها و در نتیجه تجمع این مواد در محیط کشت باشد (Ryu *et al*., 1990; Silveira *et al*., 2004; Godoy-Hernández and Vázquez-Flota, 2006).

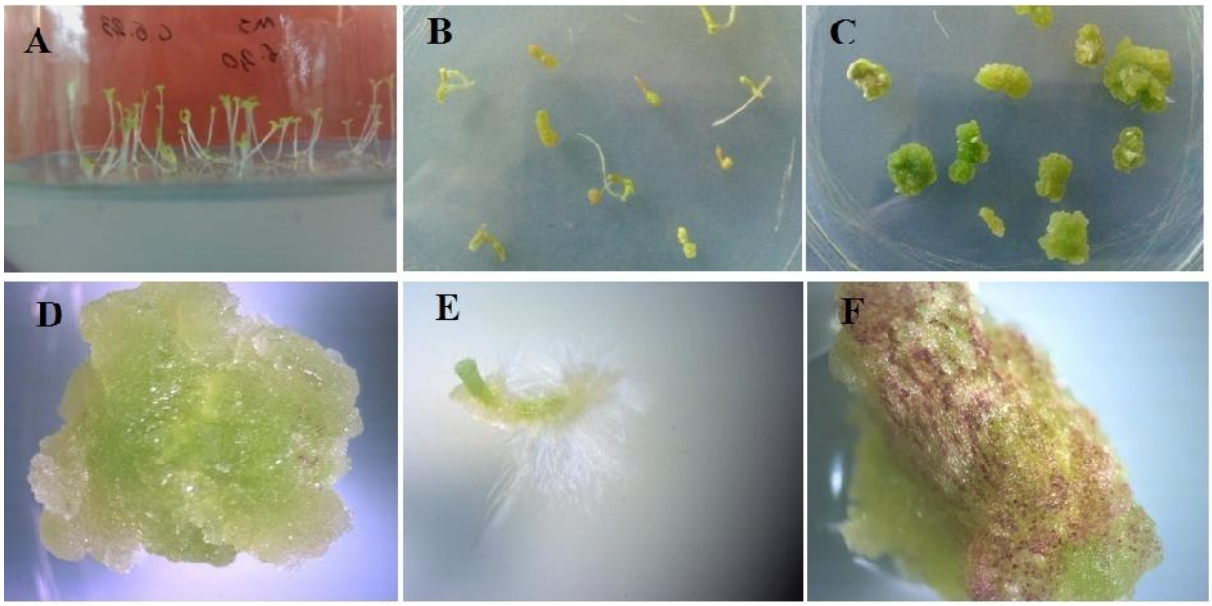
Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱- کالوس‌زایی جداکشت برگ بابونه آلمانی: A) گیاهچه‌های حاصل از بذر کشت شده در محیط کشت پایه MS که برای تهیه جداکشت برگ استفاده شدند. B) ریشه‌زایی مستقیم در جداکشت برگ در محیط B5 فاقد هورمون؛ C و D) کالوس‌زایی جداکشت برگ در محیط‌های حاوی تنظیم کننده‌های رشد گیاهی؛ E و F) ریشه‌های نابجا تولید شده از بافت کالوس

Figure 1- Callus induction from leaf explant of German Chamomile. A) Seedlings from seeds grown on MS basal medium for Preparation of leaf explant. B) Direct rooting of leaf explant on hormone-free B5 medium. C, D) callus induction of leaf explants on media containing plant growth regulators. E, F) Adventitious roots from callus tissue



شکل ۲- کالوس‌زایی جداکشت هیپوکوتیل بابونه آلمانی A) هیپوکوتیل گیاهچه‌های رشد کرده در تاریکی B) کالوس‌زایی و ریشه-زایی جداکشت‌های هیپوکوتیل در محیط B5 فاقد هورمون C و D)کالوس‌زایی جداکشت هیپوکوتیل E) ریشه‌زایی مستقیم جداکشت هیپوکوتیل F) کالوس‌های بنفش حاوی آنتوسیانین

Figure 2- Callus induction from hypocotyl explant of German Chamomile. A) Hypocotyl of seedlings grown in the dark. B) Callus induction and rooting of hypocotyl explants on hormone-free B5 medium. D) Callus induction of hypocotyl explaant. E) Direct rooting of hypocotyl explants. F) Purple callus containing anthocyanin

www.SID.ir

جدول ۱- تجزیه واریانس تاثیر ریزنمونه و تنظیم کننده‌های رشد گیاهی بر پاسخ درون شیشه‌ای بابونه آلمانی

Table 1- Variance analysis of the effects of explant and plant growth regulators on in vitro response of German chamomile

منابع تغییر SOV		درجه آزادی df	میانگین مربعات MS: وزن تر کالوس Callus fresh weight	درصد کالوس‌زایی Percentage of callus induction	درصد ریشه‌زایی percentage of rooting	درصد کالوس‌های ترد percentage of friable callus
Hormones	ترکیب هورمونی	12	30885.98**	3033.55**	41.34**	343.65**
Explant	ریزنمونه	1	2705.35 ns	2614.12**	1.24 ns	5604.38 **
ریزنمونه × ترکیب هورمونی Explant×Hormones		12	8553.99**	727.92**	4.35**	343.65**
Error	خطا	78	697.56	39.84	0.98	13.03
CV (%)	ضریب تغییرات		21.60	6.87	41.90	49.17

ns غیر معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪، **معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪

ns: non significant, significant at the %5 and **: significant at the 1% probability level

جدول ۲- مقایسه میانگین درصد کالوس‌زایی جداکشت‌های برگ و هیپوکوتیل بابونه آلمانی در محیط کشت B5 حاوی ترکیب‌های مختلف تنظیم کننده رشد گیاهی بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪

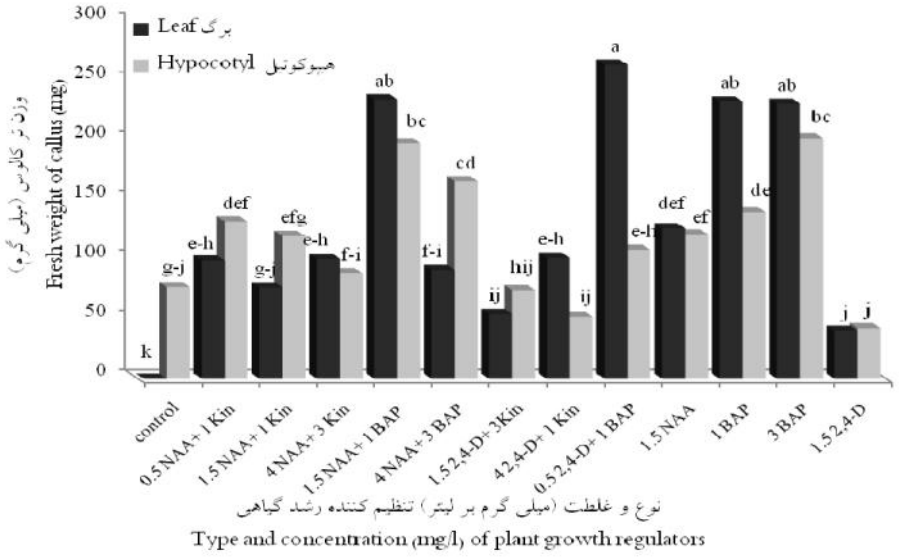
Table 2- Mean comparison of percentage of callus induction from leaf and hypocotyl explants of German chamomile on B5 medium containing different combinations of plant growth regulators by Duncan's tests at 5% probability level

درصد کالوس‌زایی Percentage of callus induction		BAP (mg/lit)	Kinetin (mg/lit)	NAA (mg/lit)	2,4-D (mg/lit)
هیپوکوتیل Hypocotyle	برگ Leaf				
60.21[b]	0[d]	0	0	0	0
100[a]	100[a]	0	1	0.5	0
100[a]	100[a]	0	1	1.5	0
100[a]	100[a]	0	3	4	0
100[a]	100[a]	1	0	1.5	0
100[a]	100[a]	3	0	4	0
100[a]	75[b]	0	3	0	1.5
100[a]	91.67[a]	0	1	0	4
100[a]	100[a]	1	0	0	0.5
100[a]	100[a]	0	0	1.5	0
100[a]	100[a]	1	0	0	0
100[a]	100[a]	3	0	0	0
100[a]	63.19[c]	0	0	0	1.5

حروف متفاوت در هر ستونا اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد با آزمون چنددامنه‌ای دانکن را نشان می‌دهد.

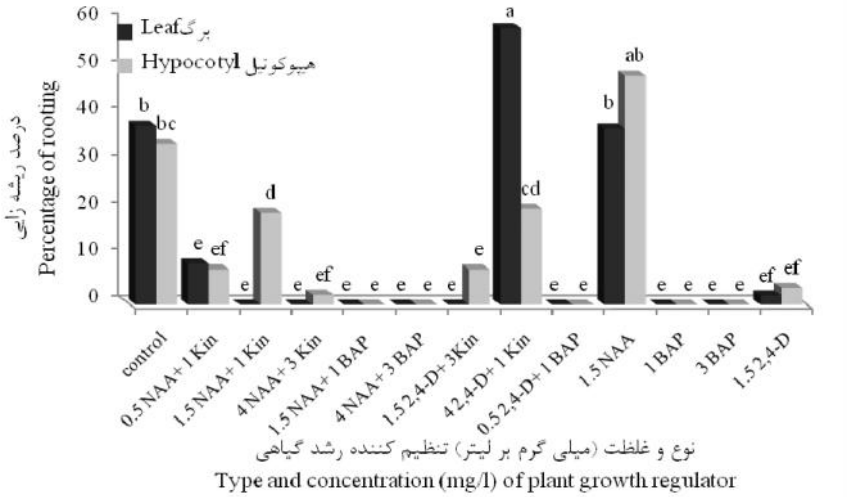
Different letters in each column indicate significant differences at the 5% using Duncan test.

www.SID.ir



شکل ۳- مقایسه میانگین وزن تر کالوس جداکشت‌های برگ و هیپوکوتیل بابونه آلمانی در محیط کشت B5 حاوی ترکیب‌های مختلف تنظیم کننده رشد گیاهی بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪؛ حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح احتمال ۵ درصد است

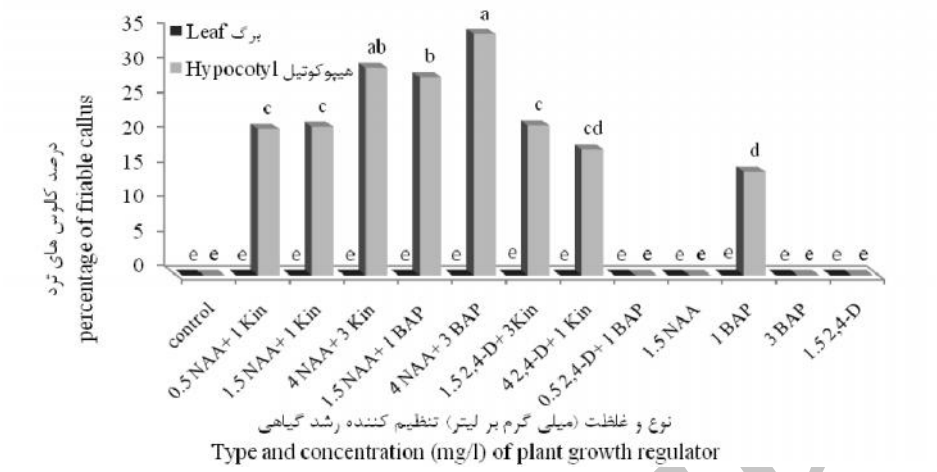
Figure 3- Mean comparison of callus fresh weight from leaf and hypocotyl explants of German chamomile on B5 medium containing different plant growth regulators by Duncan's tests at 5% probability level



شکل ۴- مقایسه میانگین درصد ریشه‌زایی جداکشت‌های بابونه آلمانی در محیط کشت B5 حاوی ترکیب‌های مختلف تنظیم کننده رشد گیاهی بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪

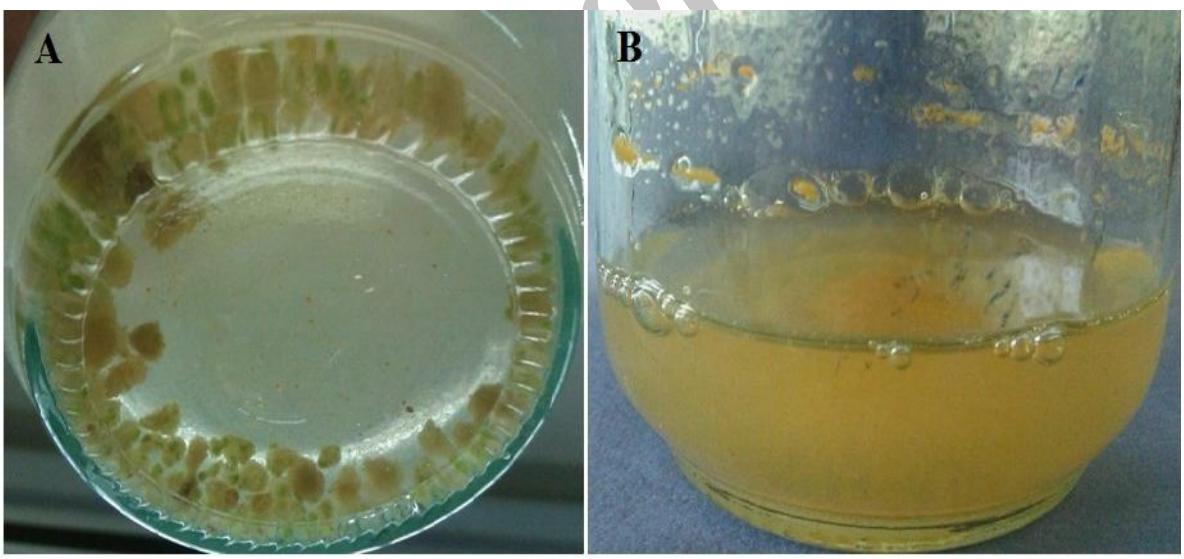
Figure 4- Mean comparison of percentage rooting from explants of German chamomile on B5 medium containing different plant growth regulators by Duncan's tests at 5% probability level

www.SID.ir



شکل ۵- مقایسه میانگین درصد کالوس‌های ترد حاصل از ریزنمونه‌های برگ و هیپوکوتیل بابونه آلمانی در محیط کشت B5 حاوی ترکیب‌های مختلف تنظیم کننده رشد گیاهی بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪

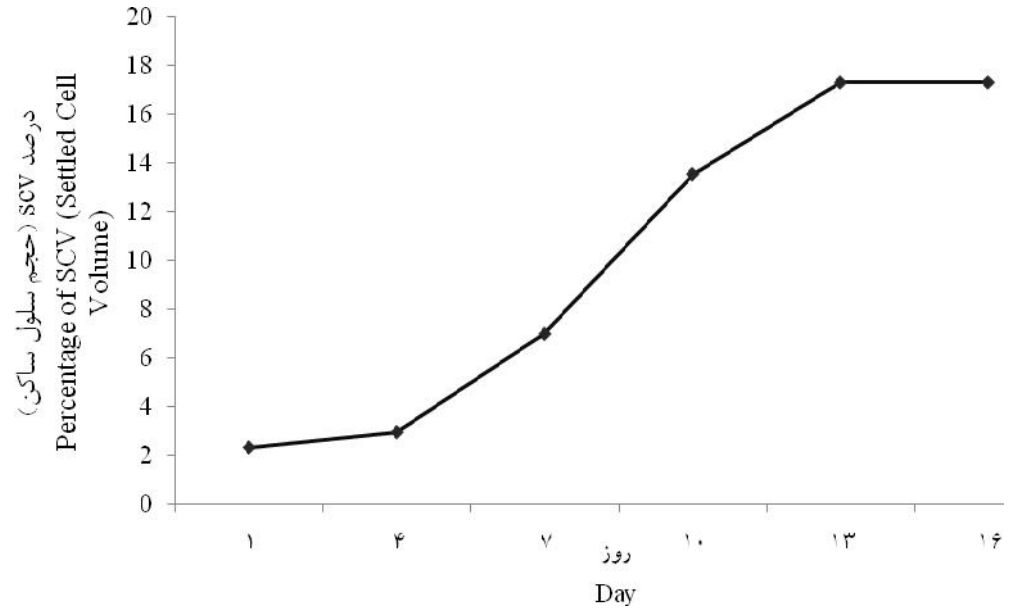
Figure 5- Mean comparison of percentage of friable calli from leaf and hypocotyl explants of German chamomile on B5 medium containing different plant growth regulators by Duncan's tests at 5% probability level



شکل ۶- رشد سلول‌های بابونه آلمانی در کشت سوسپانسیون: A) توده‌های سلولی کشت سوسپانسیون .*M. chamomilla* L B) تغییر رنگ محیط کشت بر اثر افزایش تراکم سلولی

Figure 6- German chamomile cell growth in suspension culture: A) Masses cell suspension culture of *M. chamomilla* L. B) Discoloration caused by high cell density

www.SID.ir



شکل ۷- منحنی رشد کشت سوسپانسیون بابونه آلمانی در محیط کشت MS حاوی ۱/۵ میلی گرم بر لیتر 2,4-D و یک میلی گرم بر لیتر کینتین

Figure 7- Suspension culture growth curve of German Chamomile on MS medium supplemented with 1.5 mg/l 2,4-D and 1 mg/l Kin

References

منابع مورد استفاده

- Ashrafi, S., M.R. Mofid, M. Otroshi, M. Ebrahimi, and M. Khosroshahi. 2010. Effect of plant growth regulators on the callogenesis and Taxol production in cell suspension of *Taxus baccata* L. *Trakia Journal of Sciences*. 8: 36-43.
- Echeverrigaray, S., F. Fracaro, L.B. Andrade, S. Biasio, and L. Atti-serafini. 2000. In vitro shoot regeneration from leaf explants of Roman Chamomile. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 60: 1-4.
- Farjaminezhad, R. 2011. The effect of elicitors on the production of Thebaine in *Papaver bracteatum* Lindl on in vitro condition. M.Sc. Thesis. University of Mohaghegh ardabili. 117 pp. (In Persian).
- Farsi, M. and J. Zolala. 2011. Introduction to plant biotechnology. Ferdowsi university of Mashhad publication. Mashhad, Iran. 553 pp. (In Persian).
- Farsi, M., and A. Bagheri. 2008. Principles of plant breeding. Jihad-e-Daneshgahi of Mashhad University Publications. Mashhad, Iran. 376 pp. (In Persian).

Archive

www.SID.ir

- Franke, R. and H. Schilcher. 2005. Chamomile, Industrial Profiles. CRC Press, New York. 278 pp.
- Godoy-Hernández, G. and F.A. Vázquez-Flota. 2006. Growth Measurements: Estimation of Cell Division and Cell Expansion. In: Plant cell culture protocols (eds. Loyla-vargas V. M. and F. Vazquez-Flota) 51-58. 2nd ed. Humann Press Inc.
- Hren, M., S. Baebler, M. Camloh, M. Kovac, M. Ravnikar, and J. Zel. 2006. Yew (*Taxus x media* Rehd.) cell suspension cultures as a source of taxanes. *Acta Physiologiae Plantarum*. 28: 3-8.
- Mann, C. and E.J. Staba. 2002. The chemistry, pharmacology and commercial formulations of chamomile. In: Craker, L.E., Simon, J.E. (eds), Herbs, spices and medicinal plants-recent advances in botany, horticulture and pharmacology. USA: Haworth Press Inc.
- Molina, S.M. 2004. In vitro callus induction and plants from stem and petiole explants of *Salvia canariensis* L. *Plant Tissue Culture*. 14:167-172.
- Mozaffarian, V. 1996. Dictionary of Iranian Plant Names. Farhang Moaser publication, Tehran, Iran. 671pp. (In Persian).
- Mulabagal, V., C.Y. Lee, S.F. Lo, S.M. Nalavade, C.Y. Lin, and H.S. Tasy. 2004. Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures. *Botanical Bulltine Academia Sinica*. 45: 1-22.
- Omidbaigi, R. 2009. Production and processing of medicinal plants. Astan Quds Publication. Tehran, Iran. 347pp. (In Persian).
- Passamonti, F., E. Piccioni, A. Standardi, and F. Veronesi. 1998. Micropropagation of *Chamomilla recutita* (L.) Rauschert. *Acta Horticulture*. 457: 303-309.
- Richard, D., M. Lescot, D. Inze, and L. De Veylder. 2002. Effect of auxin, cytokinin, and sucrose on cell cycle gene expression in *Arabidopsis thaliana* cell suspension cultures. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 69: 167–176.
- Ryu, D.D.Y., S.O. Lee, and R.J. Romani. 1990. Determination of growth rate for plant cell cultures: comparative studies. *Biotechnology and Bioengineering*. 35: 305-311.
- Samatadze, T.E., O.V. Muravenko, K.V. Popov, and A.V. Zelenin. 2001. Genome comparison of the *Matricaria chamomilla* L. varieties by the chromosome C- and OR-banding patterns. *Caryologia*. 54: 299-306.
- Silveira, V., E.I.S. Floh, W. Handro, and M. Pedro Guerra. 2004. Effect of plant growth regulators and levels of intracellular protein, starch and polyamines in embryogenic suspension cultures of *Pinus taeda*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 76: 53-60.
- Singh, O., Z. Khanam, N. Misra, and M.K. Srivastava. 2011. Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) An overview. *Pharmacognosy Reviews*. 5: 82-95.
- Stals, H. and Inze, D. 2001. When plant cells decide to divide. *Trends Plant Science*. 8: 359–364.
- Street, H.E. 1977. Plant tissue and cell culture. 2nd Ed, Blackwelt. Oxford.

Archive of SID

www.SID.ir