نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۹، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۴، ص. ۶۰۹-۶۰۱
شاپا: ۴۷۳۰ - ۲۰۰۸

Journal of Horticultural Science
Vol. 29, No. 4, Winter 2016, P. 601-609
ISSN: 2008 - 4730

بررسی باززایی مستقیم در بابونه‌های آلمانی (*Matricaria chamomilla* L.) و شیرازی (*Matricaria recutita* L.) در شرایط درون شیشه‌ای

اسد معصومی اصل[1*]- آمنه آریایی نژاد[2]- مسعود دهداری[3]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۱/۲۸
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۳/۱۲

چکیده

بابونه‌های آلمانی (*Matricaria chamomilla* L.) و شیرازی (*Matricaria recutita* L.) از مهم‌ترین گیاهان دارویی خانواده کاسنی می‌باشند که در صنایع داروسازی، بهداشتی، آرایشی و غذایی استفاده می‌شوند. ریزازدیادی درون شیشه‌ای گیاهان، پتانسیل بالایی جهت تولید داروهای گیاهی، احیاء و حفظ گیاهان، ایجاد تنوع سوماکلونی، تکثیر به صورت صنعتی، تولید متابولیت‌های ثانویه با ارزش و افزایش مواد موثره دارد. در این مطالعه تاثیر هورمون‌های گیاهی NAA، BAP، 2ip، Zeatin و کینتین بر باززایی مستقیم گیاهچه از ریزنمونه‌های برگ، کوتیلدون و ساقه (فاقد گره و دارای گره) بابونه‌های آلمانی و شیرازی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان دادند که در باززایی مستقیم هر دو نوع بابونه بهترین ریزنمونه، ساقه دارای گره و کوتیلدون به ترتیب با ۷۸/۷۵ و ۷۵ درصد شاخساره‌زایی بودند. همچنین برترین رقم و ترکیب هورمونی، رقم بابونه شیرازی با ترکیب هورمونی ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر 2-ip به همراه ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA در محیط کشت MS بود. تولید ریشه هم تحت‌تاثیر هورمون اکسین (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA) و هم به‌صورت خودبخودی انجام شد. بر اساس نتایج این تحقیق، بابونه پاسخ مناسبی به باززایی مستقیم نشان داد.

واژه‌های کلیدی: ریزازدیادی، ریزنمونه، ژنوتیپ، هورمون

مقدمه

بابونه از قدیمی‌ترین گیاهان دارویی شناخته‌شده توسط انسان است. مردم مصر و یونان باستان از خواص دارویی آن مطلع بوده و برای درمان بعضی بیماری‌ها از این گیاه استفاده می‌کرده‌اند. از مواد موثره گل‌های بابونه داروهای ضد تورّم، داروهایی برای معالجه دل‌درد، نفخ شکم و زخم‌های پوستی تهیه می‌شود. در اکثر کشورهای غربی از دم‌کرده گل‌های بابونه به عنوان اشتهاآور و هضم‌کننده غذا استفاده می‌شود. اسانس گل‌های این گیاه اثر ضد میکروبی دارد و از آن در صنایع داروسازی، بهداشتی و آرایشی و غذایی استفاده می‌شود. در صنایع بهداشتی و آرایشی از مواد موثره گل‌های بابونه کرم‌های مرطوب‌کننده و روشن‌کننده پوست تولید می‌شود (۱۰ و ۲۴).

ریزازدیادی درون‌شیشه‌ای گیاهان، پتانسیل بالایی جهت تولید داروهای گیاهی با کیفیت بالا را فراهم کرده است. در ریزازدیادی، میزان تکثیر به‌طور چشمگیری افزایش یافته و همچنین امکان تولید مواد گیاهی عاری از بیمارگر فراهم می‌شود (۳۱). تکثیر، پرآوری و ریشه‌زایی شاخساره‌های بدست آمده از در کشت درون شیشه‌ای تحت تاثیر عوامل زیادی از جمله : گونه، ژنوتیپ، رقم، محیط کشت، نمک‌های معدنی، مواد آلی، کربوهیدرات‌ها، هورمون‌ها و شرایط محیطی قرار می‌گیرد که از مهمترین این عوامل، اثرات هورمون‌هایی نظیر نوع و غلظت اکسین و سیتوکینین می‌باشد که از این بین، نقش نسبت اکسین به سیتوکنین از همه مهم‌تر است (۱۲ و ۲۵). تاثیر ترکیب هورمونی بر تقویت رشد و پرآوری ریزنمونه ها امری واضح است (۱، ۲، ۷ و ۲۰، ۲۴)، طوریکه نتایج آزمایشات مختلف نشان‌داده است که در بسیاری از ژنوتیپ‌ها، سیتوکینین جهت تکثیر شاخساره در غلظت مناسب مورد نیاز می‌باشد، اما حضور غلظت‌های پایین اکسین نیز در کنار سیتوکینین، نرخ تکثیر شاخساره را افزایش می‌دهد (۳۰).

در روش باززایی مستقیم، ابتدا بافت‌های مریستمی کشت شده و سپس اندام‌زایی مستقیم (شاخساره‌زایی و ریشه‌زایی) صورت می‌گیرد. در این روش، شاخساره‌های فراوانی از بافت ریزنمونه بدون واسطه پینه تولید می‌شود ولی در باززایی غیرمستقیم شاخه‌زایی با واسطه پینه

۱، ۲ و ۳- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد اصلاح نباتات، استادیار و دانشیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج
(*- نویسنده مسئول: Email: Masoumiasl@yu.ac.ir)

است (۳).

قنبری و همکاران (۱۱) در مطالعه باززایی مستقیم گیاه مریم‌گلی کبیر (*Salvia sclarea* L.)، بیشترین تعداد شاخساره باززایی شده را در محیط کشت MS[1] حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP[2] به همراه ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر IAA[3] مشاهده نمودند.ریزازدیادی گیاه آب قاشقی (*Centella asiatica*) با استفاده از ریزنمونه‌های تک‌گره نیز در ترکیب هورمونی ۳ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۰۲۵ میلی‌گرم در لیتر IAA در محیط کشت MS بهترین نتیجه را به دنبال داشت (۳۰). در گیاه ریحان (*Ocimum basilicum* L.) بیشترین میزان تشکیل شاخساره، روی محیط کشت MS دارای ۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA[4] به‌دست آمد (۵). در گیاه نعناع فلفلی (*Mentha piperita* L.) نیز حداکثر تعداد و طول شاخساره در محیط کشت MS حاوی ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر کینتین مشاهده گردید (۳۵).

اچیوریگارای و همکاران (۸) در بررسی شاخساره‌زایی درون شیشه‌ای از ریزنمونه برگی بابونه رومی (*Anthemis nobilis*) مشاهده کردند که تشکیل جوانه نابجا و ایجاد شاخساره در محیط کشت MS حاوی ۰/۲۵ تا ۱ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۱۸ میلی‌گرم در لیتر NAA تحریک می‌گردد. ریشه‌زایی شاخساره‌های بدست آمده روی محیط کشت MS حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA انجام و ریزازدیادی در شرایط درون شیشه‌ای بطور موفقیت آمیز انجام دادند.

مرادی پور و همکاران (۲۱) در تحقیقی روی باززایی بابونه (*M. chamomilla* L.) نشان دادند که بالاترین میزان باززایی مستقیم (۹۲/۴۸ درصد) در محیط کشت MS حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BAP در ترکیب با ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر IAA در ژنوتیپ اصفهان بدست آمد. حداکثر تعداد شاخساره (۲۵ شاخساره در هر ریزنمونه) نیز در ژنوتیپ ارومیه روی محیط کشت MS حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BAP در ترکیب با ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر IAA بدست آمد. ریشه‌زایی شاخساره های بدست آمده نیز در محیط کشت ½MS حاوی ۰/۵ و ۱ میلی گرم بر لیتر IBA بدست آمد.

هدف پژوهش حاضر، بررسی اثر ریزنمونه‌های مختلف (برگ، کوتیلدون و ساقه فاقد گره و دارای گره) و هورمون‌های متفاوت گیاهی (NAA، BAP، 2ip[5]، Zeatin و کینتین) روی باززایی مستقیم گیاهچه از بابونه‌های آلمانی و شیرازی می‌باشد. از آنجائیکه گزارشی از باززایی مستقیم این دو رقم مهم در دسترس نبوده و باززایی مستقیم گیاه امکان تولید تعداد زیادی گیاه یکنواخت از لحاظ ژنتیکی را فراهم می نماید، لذا انجام چنین تحقیقی ضروری به نظر می‌رسد.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در آزمایشگاه مرکزی دانشکده کشاورزی دانشگاه یاسوج انجام شد. بذرها از موسسه پاکان بذر اصفهان تهیه گردیدند. بذور بابونه آلمانی توسط الکل اتانول ۷۰٪ به مدت ۵ دقیقه و هیپوکلریت سدیم ۳ درصد به مدت ۱۲ دقیقه و بذور بابونه شیرازی توسط اتانول ۷۰٪ به مدت ۱۰ دقیقه و هیپوکلریت سدیم ۳٪ به مدت ۱۵ دقیقه ضدعفونی و سپس چندین بار شستشو با آب مقطر استریل انجام گردیدند. پس از ضدعفونی، بذرها بر روی محیط کشت پایه MS جهت جوانه‌زنی کشت گردیده و سپس در اتاقک رشد با دمای ۳± ۲۵ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. برای تهیه ریزنمونه‌های برگ و ساقه (فاقد و دارای گره) از گیاهچه‌های جوان و جهت تهیه ریزنمونه‌های کوتیلدونی، از بذور جوانه‌زده (سه تا پنج روز پس از کاشت) استفاده گردید. ریزنمونه‌ها در محیط‌کشت MS دارای سطوح مختلف NAA (۰/۱و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر)، BAP، Zeatin و 2ip (هرکدام در سه سطح ۰/۵، ۱، ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر) و کینتین (۲، ۲/۵و ۳ میلی‌گرم بر لیتر) کشت شدند. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار انجام گردید. فاکتورها شامل رقم (در دو سطح)، ریزنمونه (در چهار سطح) و ترکیبات هورمونی بود. در نهایت، صفات درصد تولید شاخساره، طول اندام هوایی، وزن تر و خشک اندام هوایی، درصد تولید ریشه، طول ریشه، وزن تر و خشک ریشه اندازه‌گیری شدند.

تجزیه‌های آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۱ انجام گردید. به‌منظور بررسی نرمال بودن داده‌ها و مقایسه میانگین اثرهای اصلی و متقابل به ترتیب از نرم‌افزارهای Minitab14 و MSTAT-C و جهت رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel استفاده شد.

نتایج و بحث

ضدعفونی بذور با اتانول ۷۰ درصد به مدت ۵–۱۰ دقیقه و هیپوکلریت سدیم ۳ درصد به مدت ۱۲–۱۵ دقیقه موجب کنترل آلودگی های باکتریایی و قارچی شد. هیپوکلریت سدیم سبب اکسید شدن سلول‌های میکروارگانیسم‌ها شده و بیشتر اجزای اصلی سلول از جمله لیپیدها، پروتئین‌ها و DNA را تحت‌تاثیر قرار می‌دهد (۱۵ و ۲۷). اتانول نیز ماده‌ای دهیدراته‌کننده می‌باشد که باعث تخریب غشای سلولی، واسرشت شدن سریع پروتئین‌ها و در ادامه برهم خوردن سوخت وساز سلول می‌شود (۶ و ۱۶). نتیجه این آزمایش،

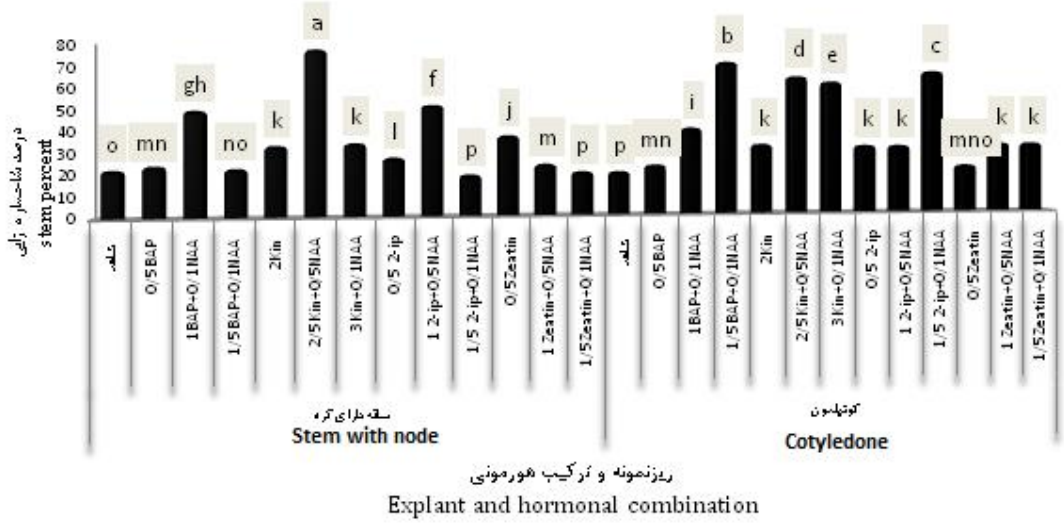
1. Murashige and Skoog
2. 6-Benzylaminopurine
3. Indol AceticAcid
4. α- Naphthyl AceticAcid
5. 2-Isopantinyl Adenin

موثر بودن استفاده توام از اتانول و هیپوکلریت سدیم را نشان داد.

در آزمایش باززایی مستقیم، ریزنمونه‌های برگ و ساقه (فاقد گره) در اکثر محیط‌های کشت پس از ۳ تا ۵ روز زرد گردیده و از بین رفتند، لیکن در تعداد محدودی از محیط‌های کشت حاوی BAP و NAA پس از ۱۰ تا ۱۵ روز شاخساره و پس از سه هفته نیز ریشه‌زایی مستقیم (بین ۰ تا ۲۰ درصد) آغاز گردید. به علت اینکه ریزنمونه‌های برگ و ساقه فاقد گره، پاسخ مناسبی به باززایی مستقیم نشان ندادند آنها را حذف و در ادامه از ریزنمونه‌های کوتیلدون و ساقه دارای گره استفاده شد که این زیزنمونه‌ها برخلاف ریزنمونه‌های قبلی، زرد نشده و درصد شاخساره‌زایی بالاتری نیز نشان دادند. ریزنمونه‌های ساقه دارای گره و کوتیلدون در اکثر محیط‌های کشت، پس از ۵ تا ۷ روز تولید شاخساره و پس از ۱۵ تا ۲۰ روز تولید ریشه نمودند. مقایسه میانگین برهم کنش ریزنمونه و ترکیب هورمونی، بیشترین درصد شاخساره زایی (۷۸/۷۵) با ریزنمونه ساقه دارای گره و ترکیب هورمونی ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر کینتین به همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA (نمودار ۱) و کمترین درصد شاخساره‌زایی (۲۱) در هر دو ریزنمونه با تیمار شاهد و نیز با ترکیب هورمونی ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر 2-ip به همراه ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA در ریزنمونه ساقه دارای گره به دست آمد.

عملکرد اصلی سیتوکینین‌ها در گیاهان، تسریع تقسیم سلولی می‌باشد (۹). جابونسکی و اسکوگ (۱۴) خاطر نشان ساختند که بافت پینه در مغز ساقه تنباکو (*Nicotiana tabacum*) در پاسخ به کینتین یا IAA به تنهایی رشد می‌نماید، اما برای ادامه رشد بافت مغز ساقه در محیط کشت هم کینتین و هم IAA باید حضور داشته باشند. ساروار و همکاران (۲۸) در آزمایشی که بر روی باززایی مستقیم شاخساره از گیاه نعناع فلفلی (*Mentha piperita* L.) با استفاده از ریزنمونه‌های مختلف (مریستم شاخه، گره، میان‌گره و دمبرگ) انجام دادند، تعداد شاخساره به‌دست آمده در ریزنمونه‌های مختلف متفاوت بود و ریزنمونه‌های مریستم شاخه و گره پاسخ مطلوبی به باززایی نشان دادند. در تحقیق حاضر نیز اهمیت انتخاب نوع ریزنمونه و استفاده توامان از سیتوکینین و اکسین در باززایی شاخساره و ریشه تایید شد.

در مطالعه‌ای که توسط نوروزی‌شرف و همکاران (۲۳) بر روی تکثیر درون شیشه‌ای پامچال (*Primula acaulis* L.) با استفاده از ریزنمونه‌های نوک شاخساره صورت گرفت، مشاهده نمودند که تعداد ریشه‌های اصلی و فرعی به طور معنی‌داری تحت تاثیر غلظت‌های مختلف هورمون ها قرار گرفت؛ به‌طوری‌که بیشترین تعداد ریشه در محیط حاوی ۳ میلی‌گرم بر لیتر BA و ۰/۸ میلی‌گرم بر لیتر NAA مشاهده گردید. در این مطالعه، ریشه‌ها همانند شاخساره‌ها، به‌طور مستقیم و بدون تشکیل پینه ایجاد شدند. از نتایج مهم این پژوهش، تولید ریشه پس از انتقال شاخساره‌های تولید شده به محیط ریشه‌زایی بود. این نتیجه در پژوهش بنسون و همکاران (۴) بر روی گونه *P. Scotica* (گونه نادر اسکاتلندی) نیز مشاهده شده است.



نمودار ۱- مقایسه میانگین برهم‌کنش دو نوع ریزنمونه و ترکیب هورمونی برای صفت درصد شاخه‌زایی در باززایی مستقیم بابونه

Figure 1- Mean comparison for interaction of two types of explanst and hormonal combination for stem induction percent in direct regeneration

طبق نتایج حاصل از جدول تجزیه واریانس (جدول ۱)، برهم‌کنش سه‌گانه رقم، ریزنمونه و ترکیب هورمونی برای کلیه صفات

به جز درصد شاخساره‌زایی و وزن خشک ریشه در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار گردید که خود بیانگر متفاوت بودن اثر ریزنمونه، رقم و ترکیب هورمونی بر ویژگی‌های مرتبط با صفات مورد ارزیابی در باززایی مستقیم دو رقم بابونه می‌باشد.

مقایسه میانگین برهم‌کنش سه‌گانه رقم، ریزنمونه و ترکیب هورمونی برای صفات مورد ارزیابی با ریزنمونه‌های ساقه دارای گره و کوتیلدون (جدول ۲) نشان داد که بیشترین میانگین طول شاخساره (۷/۲۳ سانتی‌متر)، بیشترین میانگین وزن‌تر شاخساره (۴۴۳/۷۲ میلی‌گرم)، بالاترین میانگین وزن خشک شاخساره (۳۸/۳۰ میلی‌گرم)، بیشترین درصد ریشه‌زایی (۹۵)، بالاترین میانگین طول ریشه (۸/۲۹ سانتی‌متر) و بیشترین میانگین وزن‌تر ریشه (۲۳۴/۷۶ میلی‌گرم) در رقم بابونه شیرازی با ریزنمونه کوتیلدون و ترکیب هورمونی شامل ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر 2ip همراه با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA به‌دست آمد. سیتوکینین‌های طبیعی مثل Zeatin و 2-ip بیشتر از سیتوکینین های مصنوعی چون BA و کینتین سبب افزایش طول شاخساره می شوند (۱۶). تاثیر کاربرد غلظت‌ها و ترکیبات مختلف انواع سیتوکینین بر القای شاخساره‌زایی در کشت‌بافت عدس (*Lens culinaris* Medik.) رقم گچساران نیز نشان داد که 2ip در القای شاخه‌زایی موثرتر از BAP می باشد (۳۴).

در گیاه بادرنجبویه (*Melissa officinalis* L.) باززایی از ریزنمونه نوک شاخه در محیط کشت MS همراه با ۱ میلی گرم در لیتر NAA و ۳ میلی‌گرم در لیتر BAP صورت گرفت (۱۸). میترا و همکاران (۱۹) نیز باززایی مستقیم را در ریزنمونه جوانه شاخه کشت شده اسفناج در محیط کشت MS حاوی ۱ میلی گرم در لیتر NAA و ۱ میلی گرم در لیتر BA گزارش کردند. باززایی گیاه نعناع فلفلی با استفاده از ریزنمونه‌های قطعات گرهی و نوک شاخه در محیط کشت MS حاوی ۱ میلی گرم در لیتر BAP توسط قانتی و همکاران (۱۳) با موفقیت صورت گرفت.

جدول ۱- تجزیه واریانس صفات مورد بررسی در باززایی مستقیم بابونه با ریزنمونه‌های ساقه دارای گره و کوتیلدون

Table 1- Analysis of variance for assessed traits in direct regeneration of Chamomile by stem with node and cotyledon explants

منابع تغییر Source of variance	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean square							
		درصد شاخساره زایی Shooting percent	طول شاخساره Shoot length	وزن تر شاخساره Shoot fresh weight	وزن خشک شاخساره Shoot dry weight	درصد ریشه زایی Rooting percent	طول ریشه Root length	وزن تر ریشه Root fresh weight	وزن خشک ریشه Root dry weight
رقم Cultivar	1	3.993 ns	0.0797**	26.828**	0.0078 ns	0.7933 ns	0.0008 ns	7.947*	0.0233 ns
ریزنمونه Explant	1	30.752**	0.113**	4.855*	0.4118 ns	26.705**	0.0302**	531.958**	1.847**
ترکیب هورمونی Hormonal comb.	12	19.038**	0.1511**	28.776**	3.248**	15.0191**	0.0111**	63.927**	0.4446**
رقم×ریزنمونه Cultivar*explants	1	4.301 ns	0.0265*	11.502**	2.352**	4.382*	0.0041**	0.0072 ns	0.0034 ns
رقم ×ترکیب هورمونی Cultivar*Hormonal comb.	12	5.350**	0.077**	11.126**	1.522**	5.035**	0.0032**	18.388**	0.0891**
ریزنمونه ×ترکیب هورمونی Explants*Hormonal comb.	12	11.314**	0.0903**	37.876**	3.551**	6.687**	0.064**	28.793**	0.1612**
رقم×ریزنمونه×ترکیب هورمون Cultivar*Explants*Hor.*comb.	12	2.750 ns	0.0728**	17.424**	1.810**	2.975**	0.0013**	18.437**	0.0937 ns
خطا Error	156	1.47	0.0063	0.1987	0.1432	0.707	0.0002	1.830	0.0095
ضریب تغییرات (درصد) CV(%)		20.16	14.84	7.34	10.81	15.18	1.45	16.53	7.10

**، *: به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد، ns: غیرمعنی‌دار

**,*:Significant difference in 1 and 5 probability level, respectively, ns: Non significant

جدول ۲- مقایسه میانگین برهم‌کنش سه گانه رقم، ریزنمونه، ترکیب هورمونی برای صفات مورد ارزیابی در باززایی مستقیم بابونه با ریزنمونه ساقه دارای گره و کوتیلدون

Table 2- Mean comparison of three-way interactions of cultivar explants and hormonal combination for evaluated traits in direct regeneration of Chamomile by stem with node and cotyledon explants

رقم Cultivar	ریزنمونه Explant	ترکیب هورمونی Hormonal comb. (mg/l)	طول شاخساره Shoot length (cm)	وزن ترشاخساره Shoot fresh weigh (mg)	وزن خشک شاخساره Shoot dry weight (mg)	درصدریشه زایی Rooting percent (%)	طول ریشه Root length (cm)	وزن تریشه Root fresh weight (mg)
بابونه آلمانی German Chamomile	ساقه دارای گره Stem with node	Cotnrol	1. 693 ^{z}	83.5^{d}	10.25^{t}	20^{n}	0.5^{z}	9.5^{z}
		0.5BAP 3rs	132.5^{y}	14^{n}	30^{l}	0.725^{z}	12^{z}	
		1BAP + 0.5 NAA	2.875st	91.095^{b}	10^{tu}	30^{l}	1.625^{j}	30^{z}
		1.5BAP + 0.1NAA	2.975^{rs}	77.597^{e}	8.25^{xyz}	40^{l}	1.352^{z}	19^{z}
		2Kin	5.335^{f}	181.407^{no}	18.195^{e}	20^{n}	2.275^{t}	12.5^{z}
		2.5 Kin + 0.5 NAA	6.88^{b}	255.087^{b}	21.675^{c}	85^{b}	8.187^{b}	173.025^{e}
		3 Kin + 0.1NAA	4.375^{ij}	166.095st	16.845^{hi}	20^{n}	3.625^{l}	52.812^{w}
		0.5 2-ip	4.1^{k}	180.325^{op}	12.51^{r}	20^{n}	0.9^{z}	10.5^{z}
		1 2-ip + 0.5 NAA	5.067^{g}	223.79^{f}	16.58^{ijk}	45^{h}	6.573^{g}	110^{kl}
		1.5 2-ip + 0.1NAA	2.782 ^{tu}	118.845^{z}	9.032^{vw}	20^{n}	2.25^{t}	119^{j}
		0.5 Zeatin	3.025^{r}	134.66^{x}	8.08^{yz}	30^{l}	1.025^{z}	42.5^{z}
		1 zeatin + 0.5 NAA	4.012^{kl}	198.75^{i}	14.75^{m}	25^{m}	1.94^{z}	35.934^{z}
		1.5 Zeatin + 0.1NAA	3.85^{mn}	198^{i}	17.5^{fg}	20^{n}	1.85^{z}	53^{w}
	لپه Cotyledon	Cotnrol	2.387^{wx}	100.75^{z}	7.5^{z}	20^{n}	2.125^{v}	53.25^{w}
		0.5BAP	2.837^{t}	104.775^{z}	9.5^{uv}	20^{n}	2.75^{q}	75.5^{r}
		1BAP + 0.5 NAA	3.152^{q}	152.12w	13.2^{opq}	30^{l}	1.11^{z}	50.625^{x}
		1.5BAP + 0.1NAA	3.862^{mn}	183.62^{lm}	16.66^{hij}	60^{e}	3.427^{m}	110.89^{k}
		2Kin	5.027^{g}	193.4^{j}	17.21^{gh}	30^{l}	1.5^{z}	45.5^{z}
		2.5 Kin + 0.5 NAA	6.042^{e}	241.332^{c}	23.162^{b}	80^{c}	1.925^{z}	94.177^{o}
		3 Kin + 0.1NAA	3.787^{n}	182.85^{m}	16.04^{kl}	35^{j}	3.325^{n}	143.62^{h}
		0.5 2-ip	2.572^{v}	99.475^{z}	7.582^{z}	40^{i}	3.875^{j}	127^{i}
		1 2-ip + 0.5 NAA	2.367^{wx}	104.625^{z}	7.782^{z}	45^{h}	3.165^{p}	154.635^{f}
		1.5 2-ip + 0.1NAA	3.545^{o}	165.275^{t}	13.79^{n}	40^{i}	7.195^{d}	203.33^{b}
		0.5 Zeatin	1.532^{z}	55.062^{z}	3.407^{z}	30^{i}	2.36^{r}	72.187^{s}
		1 zeatin + 0.5 NAA	2.675^{uv}	115^{z}	9.5^{uv}	31.2^{k}	1.375^{z}	70.47^{s}
		1.5 Zeatin + 0.1NAA	2.45^{w}	99^{z}	8.375^{xy}	20^{n}	2.02^{xy}	78.25^{q}
	ساقه دارای گره	Cotnrol	2.662^{v}	135.75^{x}	8.687^{wx}	20^{n}	0.4^{z}	50^{z}
		0.5BAP	3.025^{r}	131.187^{z}	11.5^{s}	20^{n}	1.05^{zr}	42^{z}
		1BAP + 0.5 NAA	6.855^{b}	239.227^{d}	20.125^{d}	55^{f}	7.957^{c}	183.29^{c}
		1.5BAP + 0.1NAA	2.812^{t}	108.45^{z}	10^{tu}	20^{n}	2.05^{w}	78^{q}
		2Kin	2.887st	127.625^{z}	11^{s}	20^{n}	2.3st	48^{y}
		2.5 Kin + 0.5 NAA	6.16^{d}	231.33^{e}	19.037^{e}	40^{i}	6.902^{e}	146.83^{g}

بابونه شیرازی Shirazi Chamomile	Stem with node	3 Kin + 0.1NAA	4.737^{h}	184.525^{kl}	15.22^{m}	20^{n}	2.2^{u}	68^{t}
		0.5 2-ip	$3.952l^{m}$	171.25^{r}	13.1^{pqr}	20^{n}	0.85^{z}	35.5^{z}
		1 2-ip + 0.5 NAA	3.382^{p}	183.69^{lm}	13.2^{opq}	40^{i}	1.877^{z}	66.5^{t}
		1.5 2-ip + 0.1NAA	2.575^{v}	75.75^{z}	4^{z}	20^{n}	1.85^{z}	15.25^{z}
		0.5 Zeatin	4.3^{j}	174.5^{q}	13^{qr}	20^{n}	0.7^{z}	15^{z}
		1 zeatin + 0.5 NAA	4.45^{i}	179.375^{p}	13^{qr}	20^{n}	1.1^{z}	20^{z}
		1.5 Zeatin + 0.1NAA	3.75^{n}	167^{s}	9^{vw}	20^{n}	1.3^{z}	25^{z}
لپه Cotyledon		Cotnrol	2.275^{x}	73.5^{z}	5^{z}	20^{n}	1.125^{z}	53.25^{w}
		0.5BAP	1.987^{y}	91.7^{z}	5.375^{z}	40^{i}	2^{y}	62.907^{u}
		1BAP + 0.5 NAA	3.795^{n}	185.04^{k}	16^{l}	25^{m}	5.937^{h}	100.87^{n}
		1.5BAP + 0.1NAA	4.837^{h}	205.062^{h}	17.957^{f}	50^{g}	4.27^{i}	101.66^{n}
		2Kin	2.9^{st}	163.72^{u}	13.6^{nop}	25^{m}	2.062^{w}	61.125^{u}
		2.5 Kin + 0.5 NAA	2.892^{st}	134^{x}	8.747^{wx}	50^{g}	3.247^{o}	105.83^{m}
		3 Kin + 0.1NAA	3.842^{mn}	182.62^{mn}	16.23^{jkl}	70^{d}	3.252^{o}	105.58^{m}
		0.5 2-ip	4.287^{j}	173.625^{q}	13.75^{n}	20^{n}	3.75^{k}	108.5^{l}
		1 2-ip + 0.5 NAA	6.477^{c}	215.082^{g}	17.16^{gh}	35^{j}	6.662^{f}	180.75^{d}
		1.5 2-ip + 0.1NAA	7.23^{a}	443.72^{a}	38.3^{a}	95^{a}	8.295^{a}	234.76^{a}
		0.5 Zeatin	2.562^{v}	86.062^{z}	6^{z}	20^{n}	1.775^{z}	55.312^{v}
		1 zeatin + 0.5 NAA	3.137^{q}	126.82^{z}	8.6^{wxy}	20^{n}	7.502^{q}	111.5^{k}
		1.5 Zeatin + 0.1NAA	3.237^{q}	154.25^{v}	13.65^{no}	35^{j}	2.047^{wx}	87.345^{p}

در هر ستون میانگین‌هایی که دارای حداقل یک حرف مشابه هستند، از نظر آماری در سطح ۵ درصد تفاوت معنی‌داری ندارند

In each culomn means have minimum one same letter are non ignificantly differentn P<0.05)

طبق مطالعه ژنگ و زیوارت (۳۵) کوتیلدون‌ها به جهت دارا بودن سلول‌های مریستمی در انتهای آن‌ها که می‌توانند در غلظت‌های هورمونی مناسب به‌طور مستقیم و بدون واسطه پینه تولید برگ نمایند، به عنوان ریزنمونه‌های مناسبی به منظور القای باززایی معرفی شدند.

به‌منظور تعیین مناسب‌ترین غلظت هورمون های گیاهی جهت ریشه‌زایی شاخساره‌های حاصل از باززایی مستقیم، از محیط کشت حاوی غلظت‌های مختلف IBA استفاده شد. اولین نشانه‌های ریشه‌زایی، پس از ۵ تا ۷ روز مشاهده گردیده و پس از تشکیل و رشد ریشه (چهار هفته پس از انتقال)، صفاتی چون درصدریشه‌زایی، طول ریشه (سانتی‌متر) و وزن تر و خشک ریشه (میلی‌گرم) اندازه‌گیری و ثبت شدند. بر اساس نتایج جدول تجزیه واریانس (جدول ۳)، اثر هورمون IBA برای کلیه صفات در سطح احتمال ۱درصد معنی‌دار گردید و هیچ‌یک از اثرات متقابل معنی‌دار نشدند؛ بدان‌معنا که سطوح مختلف این هورمون بر صفات مرتبط با ریشه‌زایی دارای اثرات متفاوت می‌باشد. بر اساس جدول مقایسه میانگین (جدول ۴)، بالاترین درصد ریشه‌زایی (۷۳/۷۵)، بیشترین میانگین طول ریشه (۶/۶۰ سانتی‌متر)، بیشرین میانگین وزن تر ریشه (۱۷۴/۱۶ میلی‌گرم) و بیشترین میانگین وزن خشک ریشه (۱۶/۴۲ میلی‌گرم) در محیط ریشه‌زایی دارای ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA به دست آمد.

گزارش شده‌است که از بین اکسین‌های مورد استفاده در ریشه‌زایی، IBA موثرترین اکسین در ریشه‌زایی اکثر گیاهان می‌باشد (۲۹). در گیاه آب قاشقی نیز استفاده از ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA در محیط کشت MS بهترین تیمار جهت ریشه‌زایی این گیاه پیشنهاد گردید (۲۹). القای ریشه در شاخه‌های در حال رشد چه به طور مستقیم از طریق تنظیم‌کننده‌های رشد مصنوعی یا پس از حذف سیتوکینین از محیط کشت، بستگی به گونه و رقم دارد. از طرف دیگر توانایی تولید ریشه، بستگی به برهم‌کنش فاکتورهای بیرونی و درونی دارد. اغلب پژوهشگران موفق به ریشه‌دارکردن شاخه‌های پرآوری شده کشت بافتی در محیط‌های حاوی غلظت‌های کم IBA، IAA یا NAA شده‌اند (۱، ۲، و ۲۶).

جدول ۳- تجزیه واریانس اثر غلظت‌های مختلف IBA بر روی صفات ریشه‌زایی در باززایی مستقیم بابونه

Table 3- Analysis of variance for different concentration effects on rooting traits in direct regeneration of Chamomile

منابع تغییر Source of variance	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean Square: وزن خشک ریشه Root dry weight	وزن تر ریشه Root fresh weight	طول ریشه Root length	درصد ریشه زایی Rooting percent
رقم Cultivar	1	2.407 **	0.913**	12.452**	1.636*
ریزنمونه Explant	1	4.012 ns	0.312*	6.485*	0.834*
IBA	3	37.475**	3.67**	5.296**	6.80**
رقم×ریزنمونه Cultivar*explants	1	0.035 ns	0.075 ns	0.001 ns	0.002 ns
رقم × IBA Cultivar* IBA	3	0.248 ns	0.238 ns	0.551 ns	0.022 ns
ریزنمونه × IBA Explants* IBA	3	3.829 ns	0.28 ns	2.612 ns	0.252 ns
IBA× ریزنمونه× رقم Cultivar*Explants* IBA	3	0.202 ns	0.020 ns	0.327 ns	0.0005 ns
خطا Error	32	0.736	0.092	0.937	0.124
ضریب تغییرات (درصد) CV (%)		13.17	15.86	9.09	11.12

**، *: به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد، ns : غیرمعنی‌دار

**,*: Significant difference in 1 and 5 probability level, respectively, ns: Non significant

جدول ٤- مقایسه میانگین اثر هورمون IBA برای صفات ریشه‌زایی در باززایی مستقیم بابونه

Table 4- Mean comparison the effect of IBA hormone for root traits in direct regeneration of Chamomile

غلظت‌های مختلف IBA Different concentrations of IBA (mg/l)	وزن خشک ریشه Root dry weight (mg)	وزن تر ریشه Root fresh weight (mg)	طول ریشه Root lengnth (mm)	درصد ریشه‌زایی Rooting percent (٪)
0 (control)	0.000 c	0.000 c	0. 000c	0.000 c
0.5	73.75 a	6.608 a	174.167 a	16.425 a
1	31.667 b	2.875 b	92.25 b	7.813 b
1.5	30.833 b	2.593 b	87.25 b	7.53 b

در هر ستون میانگین‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشابه هستند از نظر آماری در سطح ۵ درصد تفاوت معنی‌داری ندارند

In each culomn means have minimum one same letter are non ignificantly differentn P<0.05

گیاهچه‌های باززایی شده، بـه گلـدان‌هـای دارای خـاک اسـتریل (نسبت ۳:۱:۱ به ترتیب مخلوط خاک:ماسه:خاک برگ) منتقـل شـدند. به منظور سازگاری گیاه با شـرایط طبیعـی از درپـوش‌هـای شیشـه‌ای استفاده گردید. پس از سازگاری، درپوش‌ها برداشته شده و گیاهـان در اتاقک رشد با شرایط نوری ۱۶ ساعت روشـنایی، ۸ سـاعت تـاریکی و دمای ۳± ۲۵ درجه سانتیگراد نگه‌داری شدند. گیاهچه‌های منتقل شده به خوبی استقرار یافته و رشد نمودند (تصویر ۱).

اگرچه در چند سال اخیر گزارش‌هایی در مورد پینه‌زایی و بـاززایی غیرمستقیم (۲۲ و ۲۹) و باززایی مستقیم برخـی ژنوتیـپ‌هـای بابونـه (۲۱ و ۸) ارائه گردیده ولی باززایی مسـتقیم بـرای ایـن دو رقـم در هیچ گزارشی موجود نیست. از طرفی با توجه بـه اینکـه ایـن دو رقـم (بخصوص رقم آلمـانی) زراعـی هسـتند و تحقیقـات زیـادی روی بـه زراعی آن در داخل کشور انجام شده است، بدست آوردن روشی بـرای تولید تعداد زیادی گیاه یکنواخت از نظر ژنتیکی ضروری به نظر مـی‌رسید که نتایج تحقیق حاضر مـا را در دسـتیابی بـه ایـن مهـم یـاری خواهد کرد.

الف (A) ب (B) ج (C)

ه (H) د (D)

تصویر ۱- الف) ریزنمونه (کوتیلدون) کشت شده پس از ۱۰ روز، ب) گیاهچه باززایی شده، ج) ریشه‌های گیاهچه باززایی شده، د) گیاهچه منتقل شده به گلدان، ه) گیاه سازگار شده

Picture 1- A) Cultured explants (Cotyledon) after 10 day, B) Regenerated plantlet, C) Roots of regenerated plantlet, D) Transferred plantlet in pot, H) Adapted plant

منابع

1- Asadi A.A., Vedadi C., Rahimi M., and Naserian B. 2009. Effect of plant growth hormones on root and shoot regeneration in Rose (Morrasia) under in-vitro conditions. Bioscience Research, Vol. 6, No.1, pp 40-45

2- Azadi P., Khosh-Khui M., Beyramizadeh E., and Bagheri H. 2007. Optimization of factors affecting in vitro proliferation and rooting of *Rosa hybrida* L. cv. 'Rafaela'. International Journal of Agriculture Research, Vol. 2, pp 626-631.

3- Bagheri A., and Safari M. 2009. Fundamentals of plant tissue culture. Mashhad Ferdowsi University Press. 406 pp.

4- Benson E.E., Danaher J.E., Pimbley I.M., Anderson C.T., Wake J.E., Daley S., and Adams L.K. 2000. In vitro micropropagation of *Primula scotica*: a rare Scottish plant. Journal of Biodiversity and Conservation, Vol. 9, pp 711-726.

5- Bicca dode L., Bobrowski V.L., Bollacelbraga E.J., Seixas F.K., and Schuch M.W. 2003. In vitro propagation of *Ocimum basilicum* L. (Lamiaceae). Acta Scientiarum Biological Sciences, Vol. 25, No. 2, pp 435-437.

6- Cronmiller J.R., Nelson D.K., Salman G., Jackson D.K., Dean R.S., Hsu J.J., and Kim C.H. 1999. Antimicrobial efficacy of endoscopic disinfection procedures: a controlled, multifactorial investigation. Gastrointestinal Endoscopy, 50(2): 152-158.

7- Debener T., and Oyant L.H.S. 2009. Genetic engineering and tissue culture of roses. In Genetics and genomics of Rosaceae, Vol. 6, pp 393-409.

8- Echeverrigaray S., Franco F., Andrade L.B., Biasio S., and Atti-Serafini L. 2000. *In vitro* shoot regeneration from leaf explants on Roman Chamomile. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Vol. 60, pp 1-4.

9- Fathi G., and Ismailpour B. 2010. Plant growth regulators (principles and applications). Mashhad Jehad-Danshgahi Press. 288 pp.

10- Fouladi Sh., Zakerin A., and Bayat F. 2011. Secondary methabilites of Chamomile (*Matricaria chamomilla*) under effect of growth regulators. National congress of Agricultural management. Islamic Azad University of Jahrom.

11- Ganbari T., Hosseini B., and Jabbarzade Z. 2011. Assessment the effect of different combinations and concentrations of growth regulators on direct regeneration from shoot tip explants of *Salvia scarea* L. 12th Iranian Genetic congress. Shahid Beheshti University, Tehran.

12- George E.F., Hall M.A., and Klerk G.J.D. 2008. Plant growth regulator I: Introduction; Auxins, their Analogues and Inhibitors. In plant propagation by Tissue Culture, Vol. 2, pp 175-204.

13- Ghanti K., Kaviroj C.P., Venugopal R.B., Jabeen F.T.Z., and Rao S. 2003. Rapid regeneration of *Mentha piperita* L. from shoot tip and nodal explants. Indian Journal of Biotechnology, Vol. 3, pp 594-598.
14- Jablonski J.R., and Skoog F. 1954. Cell enlargement and cell division in excised tobacco pith tissue. Physiology Plant Journal, Vol. 7, pp 16-24.
15- Jang H.H., Ann S.H., and Kim C.W. 2008. Use of hydrogen peroxide as an effective disinfectant to *Actinobacillus ureae*. Process Biochemistry, Vol. 43, pp 225–228.
16- Larson E.L., and Morton H.E. 1991. Disinfection, Sterilisation and Preservation. In Alcohols. Block, S.S. (ed) Philadelphia. pp 191-203.
17- Loyola-vargas V.M., and Va'zquez-flota F. 2006. Plant cell culture protocols. Second edition. Human press. 393 pp
18- 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 Plant Research, Vol. 4, No. 3, pp 240-246.
19- Mitra S.K., and Mukherjee K.K. 2001. Direct organogenesis in Indian spinach. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Vol. 67, pp 191-194.
20- Mohapatra A., Rout G.R., and Das P. 2005. Rapid clonal propagation from nodal explants and *in vitro* flowering of three rose cultivars. Propagation of Ornamental Plants, Vol. 5, pp 219–223.
21- Moradipour E., Hosseini B., Pirzad A.R., and Ghanbari T. 2013. Effect of different explants, genotypes and hormonal combinations on direct regeneration of *Matricaria chamomile* L. 2nd National Congress on Medicinal Plants, Tehran, Iran.
22- Mohammadi Z., Nasrollahneghad, A.S., and Azizi M. 2010. Study callogenesis, regeneration and cell suspension culture in genotypes of Chamomile medicinal plant. MsC thesis in Plant Breeding. Ilam University.
23- Noroozi Sharaf1 A.R., Gholami M., Hamidoghli Y., and Zakizadeh H. 2012. *In Vitro* propagation of primrose (*Primula Acaulis* L.), via shoot tip explants. Agricultural Biotechnology, Vol. 10, No. 2, pp 35-41.
24- Omidbeygi R. 2011. Production and processing of medicinal plants. 3rd volume, 6th edition, Astane-ghods Razavi Press, 397 pp.
25- Pati P.K., Rath S.P., Sharma M., Sood A., and Ahuja P.S. 2006. *In vitro* propagation of rose- a review. Biotechnology Advances Journal, Vol. 24, No. 1, pp 94-114.
26- Rout G.R., Mohapatra A., and Jain S.M. 2006. Tissue culture of ornamental pot plant: A critical review on present scenario and future prospects. Biotechnology Advances, Vol. 24, No. 6, pp 531-560.
27- Sana B., Ghosh D., Saha M., and Mukherjee J. 2006. Purification and characterization of a salt, solvent, detergent and bleach tolerant protease from a new gamma-proteobacterium isolated from the marine environment of the Sundarbans. Process Biochemistry, Vol. 41, pp 208–215.
28- Sarwar S., Zia M., Riaz-ur R., Zarrin F., and Riaz A. 2009. *In vitro* direct regeneration in mint from different explants on half strength MS medium. African Journal of Biotechnology, Vol. 8, No. 18, pp 4667-4671.
29- Sayadi V., Mehrabi A.A., Saidi M., and Khoshnood N. 2014. *In vitro* culture and callus induction of Chamomile explants under different concentrations of plant growth regulators. International Jornal of Bioscience, Vol. 4, No. 10, pp 206-211.
30- Sharma R.K., Wakhlu A.K., and Boleria M. 2004. Micropropagation of *Anethum graveolens* L. Through auxiliary shoot proliferation. Plant Biochemistry Biotechnology, Vol. 13, pp 157-159.
31- Shasany A.K., Khanuja S.P.S., Dhawan S., Yadav U., Sharma S., and Kumar S. 1998. High regenerative nature of Mentha arvensis internodes. Journal of Bioscience, Vol. 23, pp 641-646.
32- Tripathi L., and Tripathi J.N. 2003. Role of biotechnology in medicinal plants. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, Vol. 2, No. 2, pp 243-253.
33- Venkatromalingam K., and Ebbie M.G. 2011. An efficient In vitro culture method of shoot regeneration cora medicinally important plant *Mentha piperita* L. Journal of Plant Sciences, Vol.10, pp 1-5.
34- Zaker Tavallaie F., Bagheri A., Ghareyazie B., and Sharma K.K. 2009. Optimization of tissue culture condition in lentil (*Lens culinaris* Medik. cv. Gachsaran) to induce effective multiple shoot induction. Iranian agronomy research Journal, Vol. 7, No. 2, pp 411-419.
35- Zhang H.X., and Zeevaart J.A.D. 1999. An efficient Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation and regeneration system for cotyledons of spinach (*spinacia oleracea* L.). Plant Cell Reports, Vol. 18, pp 640-645.