بررسی اثر نوع ریز نمونه و سطوح مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد بر کال‌زایی و باززایی در گیاه دارویی بابونه (*Matricaria aurea* L.)

شیما وطن‌دوست[۱] و علیرضا زبرجدی[۱،۲*]

[۱] ایران، کرمانشاه، دانشگاه رازی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی

[۲] ایران، کرمانشاه، دانشگاه رازی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی برای تنش خشکی

تاریخ دریافت: ۹۶/۱۱/۲۲ تاریخ پذیرش: ۹۸/۲/۱۱

چکیده

بابونه (*Matricaria aurea* L.) یک گیاه دارویی مهم و متعلق به خانواده کاسنی می‌باشد که به شکل گسترده‌ای در داروسازی، صنایع غذایی، آرایشی و بهداشتی مصرف می‌شود. باتوجه به اهمیت این گیاه، بهینه‌سازی کشت بافت آن می‌تواند زمینه‌ساز تحقیقات و استفاده بیشتر از این گیاه گردد. به‌منظور بهینه‌سازی کشت بافت این گیاه آزمایش‌های القاء کالوس و باززایی غیرمستقیم انجام شد. هر دو آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار روی محیط کشت MS اجرا گردید. در هر دو آزمایش سطوح مختلف تنظیم کننده‌های رشد گیاهی NAA و BAP به همراه دو ریز نمونه ساقه و برگ مورد مقایسه قرارگرفتند. نتایج نشان داد که در محیط کشت فاقد هورمون رشد (شاهد) القای کالوس مشاهده نشد. بررسی‌ها نشان داد که القای کالوس ریز نمونه‌ها در ترکیب هورمونی (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP) سریع‌تر بود. ترکیب‌های (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP) و همچنین (۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP) بهترین ترکیب هورمونی جهت القای کالوس ریز نمونه‌های ساقه و برگ (۱۰۰ درصد) شناخته شدند. ریز نمونه برگ در سطح ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP با میانگین ۱۵/۳۱ میلی‌متر بالاترین قطر کالوس را داشت. بیشترین درصد باززایی غیرمستقیم (۸۵/۵۹ درصد)، درکالوس‌های حاصل از برگ و ترکیب هورمونی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP مشاهده شد.

واژه‌های کلیدی: بابونه، باززایی غیرمستقیم، کالوس، NAA، BAP

* **نویسنده مسئول: تلفن:** ۰۹۱۸۱۳۲۱۸۰۹، **پست الکترونیکی:**zebarjadiali@yahoo.com

مقدمه

بابونه یکی از مهم‌ترین گیاهان دارویی است که شامل چندین جنس می‌باشد اما جنس *Matricaria* L. به دلیل کاربرد بسیار بیشتر موردتوجه محققین گیاهان دارویی قرارگرفته است و دارای گونه‌های متعددی می‌باشد (۱۶). یکی از گونه‌ها بابونه اوراً یا بابونه اروپایی زرد بانام علمی *Matricaria aurea* و از تیره کاسنی یا مرکبان (Asteraceae) است (۳۲). از گل‌های بابونه در صنایع داروسازی و صنایع غذایی استفاده زیادی می‌شود (۵). مهم‌ترین ترکیبات موجود در گل‌های بابونه عبارتند از: اسانس، فلاونوئید و کومارین (۳۲). اسانس حاصل از گل-های بابونه دارای خواص ضدعفونی‌کننده، آرام‌بخش، ضد اسپاسم، ضدآلرژی، ضدنفخ، ضدقارچ (۴و ۱۲)، ضد التهاب (۱۸)، ضد میکروب (۳۳) می‌باشد. مهم‌ترین اثرات فلاونوئیدها خواص آنتی‌اکسیدانی قوی آن‌هاست (۳)، همچنین به خاطر اثر مرطوب‌کنندگی در صنایع بهداشتی و آرایشی به‌صورت گسترده‌ای استفاده می‌شود (۵). از دم-

کرده گل‌های بابونه جهت کاهش تورم دست و پا، بهبودی دل‌درد و از بین بردن نفخ استفاده می‌شود (۱۷).

اگرچه تقاضا برای مواد مؤثره موجود افزایش‌یافته است اما تولید آن‌ها در مقیاس تجاری امری مشکل و پرهزینه است و از طرفی غلظت پایین این ترکیبات در گیاه، مشکلات مرتبط با اهلی نمودن و کشت زراعی این گیاهان مانع تأمین این مواد از طبیعت شده است. به همین دلیل توجه محققین به راهکارهایی مثل کشت سلول‌ها، اندام‌ها و بافت‌ها و مهندسی ژنتیک معطوف شده است (۲۳ و ۳۰). کشت بافت نسبت به سایر روش‌های مرسوم دارای مزیت-هایی ازجمله تولید تعداد زیادی گیاه با محتوای ژنتیکی یکسان و کیفیت یکنواخت در زمان کوتاه‌تر و فضای نسبتاً محدود (۴۲)، تولید گیاهان عاری از بیماری، توانایی تولید چند نسل در طی یک سال، تسریع برنامه‌های اصلاحی در جهت تکثیر واریته‌های جدید می‌باشد (۱۰). در کشت بافت از هر بخش گیاه نظیر نوک ساقه، جوانه برگ، سلول-های مزوفیل، اپیدرم و... می‌توان برای تولید کالوس استفاده کرد (۶). امروزه روش‌های بیوتکنولوژی و اصلاح گیاهی براساس باززایی گیاه از طریق کشت بافت قرارگرفته است. باززایی گیاه از سلول و بافت گیاهی به دلیل وجود خاصیت پرتوانی امکان‌پذیر است. گزارش‌هایی متعددی از کشت بافت بابونه برای تولید کالوس و باززایی غیرمستقیم وجود دارد که به تعدادی از آنها اشاره می‌شود. در گزارش راچلینی و بکر از تنظیم‌کننده‌های رشد مثل NAA و 2,4-D در القای کالوس استفاده شده است و محیط MS حاوی ۲/۷ میکرومول NAA را برای القای کالوس ریز نمونه ساقه بابونه مناسب دانستند و همچنین بهترین باززایی غیرمستقیم را در محیط MS حاوی یک میلی‌گرم در لیتر کینتین و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA مشاهده کردند (۳۴). در تحقیقات راچلینی و همکاران (۱۹۸۴) روی کشت ساقه بابونه، محیط MS حاوی ۲/۷ میکرو مول NAA و ۱۱/۹ میکرومول Kin را برای کال‌زایی مناسب دانستند (۳۵). در آزمایش کوهی و همکاران (۲۰۱۱) تأثیر دو نوع تنظیم‌کننده رشد NAA (۰، ۱/۵ و ۴ میلی‌گرم بر لیتر) و BAP (۰، ۱ و ۳ میلی‌گرم بر لیتر) روی برگ و هیپوکوتیل بابونه مورد بررسی قرارگرفت. هر دو ریز نمونه در تمام ترکیبات هورمونی کالوس‌زایی نشان دادند، فقط ریز نمونه برگ در محیط کشت MS کالوس‌زایی نداشت (۲۲). در بررسی سلاروا و همکاران نشان دادند ترکیبی از NAA و Kin در غلظت ۲/۷ میکرومول از هرکدام منجر به القای کالوس گل بابونه می‌شود و همچنین در بررسی باززایی غیرمستقیم بابونه به این نتیجه رسیدند که محیط MS به همراه ۰/۱ میلی‌گرم کینتین یا ترکیب هورمونی (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر کینتین و ۰/۵ میلی‌گرم NAA) بهترین پاسخ را می‌دهد (۷). در آزمایشی اثر تنظیم‌کننده‌های رشد مختلف و ریز نمونه‌های مختلف روی کالوس‌زایی و باززایی غیرمستقیم بابونه مورد بررسی قرارگرفت. در آزمایش کالوس‌زایی مشاهده شد که در صفت درصد القای کالوس و حجم کالوس فقط اثرات ساده معنی‌دار شد و مقایسه میانگین آن نشان داد که ریز نمونه ساقه بیشترین درصد کالوس‌زایی (۵۷/۳۲ درصد) به خود اختصاص داده است و بیشترین درصد کالوس‌زایی جوانه جانبی و برگ به ترتیب با میانگین ۴۹/۶۹ و ۴۴/۷۶ درصد بود. همچنین ریز نمونه ساقه با میانگین ۱۱/۲۳ بیشترین حجم کالوس را داشت که با ریز نمونه جوانه جانبی با میانگین ۱۱/۱۰ اختلاف معنی-داری نداشت (۲۶). بهترین سطح 2,4-D برای صفت‌های فوق ۱ میلی‌گرم در لیتر و بهترین سطح کینتین نیز برای این دو صفت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر بود. در آزمایش باززایی غیرمستقیم نیز گزارش کرد که باززایی هر سه ریز نمونه تنها در محیط حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin مشاهده شد. به‌طوری که ریز نمونه برگ بیشترین باززایی را با میانگین ۷۷ درصد داشت. در تحقیقات دهقان گرده و همکاران (۲۰۱۱) (۹) روی گیاه بابونه و ریز نمونه هیپوکوتیل در سطوح مختلف هورمون‌های (2,4-D، BA، NAA و Kin)، به این نتیجه رسیدند که محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۴۵ میلی‌گرم در لیتر

BAP کمترین درصد کالوس‌زایی (۵۲/۲۳) را داشت و بیشترین درصد شاخه‌زایی (۳۸/۳۳) نیز در محیط کشت حاوی ۰/۱۸۶ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۲۲۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP مشاهده شد. در مطالعه صیادی و همکاران (۲۰۱۴) (۳۷)، اثرات تنظیم‌کننده‌های رشد NAA (۰، ۱، ۲ و ۴ میلی‌گرم در لیتر) و Kin (۰، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) را بر روی ریز نمونه‌های برگ، ساقه و جوانه جانبی ازنظر القای کالوس روی محیط کشت MS بررسی کردند. آنها نشان دادند که غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۱ میلی‌گرم در لیترKin بهترین ترکیب هورمونی ازلحاظ صفات مورد بررسی شامل روز تا القای کالوس، درصد کال‌زایی و حجم کالوس می‌باشد. به طوری که این ترکیب کمترین زمان را برای شروع القای کالوس را داشت و همچنین بیشترین درصد کال‌زایی ریز نمونه‌های برگ، جوانه‌جانبی و ساقه به ترتیب با میانگین ۹۳/۲۶، ۸۹/۶۸ و ۸۰/۷۵ درصد بود و بیشترین حجم کالوس در ریز نمونه‌های ساقه، جوانه‌جانبی و برگ به ترتیب با میانگین ۱۷/۴۹، ۱۶/۲۰ و ۱۵/۵۲ درصد بود.

در تحقیق مرادی‌پور و همکاران (۲۰۱۷) اثر دو نوع تنظیم‌کننده رشد گیاهی، BAP و TDZ در غلظت‌های ۴/۴ و ۸/۸ میکرو مولار در ترکیب با ۲/۲ میکرو مولار IAA بر باززایی مستقیم ریز نمونه نوک شاخه در چهار ژنوتیپ گیاه بابونه آلمانی (*Matricaria chamomilla* L.) مورد ارزیابی قرارگرفت. نتایج این تحقیق نشان داد که بیشترین درصد باززایی در ژنوتیپ اصفهان (۹۲/۴۹ درصد) در محیط کشت MS حاوی ۴/۴ میکرو مولار BAP به همراه ۲/۲ میکرو مولار IAA به دست آمد. همچنین حداکثر ریشه‌زایی (۱۰۰ درصد) در محیط‌های 1/2MS فاقد تنظیم‌کننده رشد و MS حاوی ۵/۰ و ۱ میکرو مولار IBA به دست آمد (۲۷).

در تحقیق معصومی اصل و همکاران (۲۰۱۶) که بر باززایی مستقیم دو گونه بابونه آلمانی (*Matricaria chamomilla* L.) و شیرازی (*Matricaria recutita* L.) انجام شد هر دو ریز نمونه، ساقه دارای گره و کوتیلدون به ترتیب با ۷۸/۷۵ و ۷۵ درصد دارای باززایی قابل قبولی بودند (۲۵).

ولی‌زاده (۱۹۷۶) (۴۳) در تحقیق خود اثر غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی NAA (۰ ، ۰/۱ ، ۰/۵ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) و BA (۰، ۱ و ۳ میلی‌گرم در لیتر) بر روی القاء کالوس را مورد مطالعه قرارداد. نتایج نشان داد که القاء کالوس در اکثر تیمارهای هورمونی مشاهده شد و بالاترین فراوانی القاء کالوس در ریز نمونه جنین نابالغ در محیط کشت حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۱ میلی-گرم در لیترBA و در ریز نمونه برگ در تیمار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۳ میلی‌گرم در لیتر BA به دست آمد.

باتوجه به اینکه بابونه دارای خواص دارویی و مواد مؤثره زیادی می‌باشد اما محدودیت در کشت زراعی و همچنین برداشت بی‌رویه آن باعث به خطر افتادن انقراض این گیاه می‌شود، یکی از روش‌های حفاظت از گیاهان دارویی و بهبود کمیت و کیفیت مواد مؤثره این گیاهان تولید آن‌ها در خارج از زیستگاه‌های طبیعی می‌باشد لذا تولید آن از طریق فنون کشت بافت گیاهی در شرایط آزمایشگاهی مورد توجه قرارگرفته است. بهینه‌سازی شرایط القای کالوس اولین مرحله برای تولید مقدار زیادی ترکیبات فعال است، در کشت بافت گیاهی نیز می‌توان از هر بخش گیاه برای تولید کالوس استفاده کرد. تنظیم‌کننده‌های رشد برای القای کالوس و ترویج رشد بسیاری از سلول‌های بنیادی مورد نیاز می‌باشند، از آن‌جایی که هرگونه گیاهی نیاز به انواع و سطوح مختلف تنظیم‌کننده دارد بنابراین انتخاب مناسب-ترین تنظیم‌کننده و تعیین غلظت مطلوب آن ضروری است. این پژوهش نیز باهدف بررسی تأثیر ریز نمونه و غلظت-های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد در کال‌زایی و باززایی غیرمستقیم گیاه بابونه و بهینه‌سازی پروتکل مناسب انجام شد.

مواد و روشها

این پژوهش در آزمایشگاه کشت بافت گیاهان دارویی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه رازی کرمانشاه طی سال ۱۳۹۴ انجام شد. بذرهای گیاه بابونه از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه شد. برای استریل کردن بذور ابتدا بذور در اتانول ۷۰ درصد به مدت ۱ دقیقه تکان داده شد و پس از شستشو با آب مقطر به مدت ۱۵–۱۰ دقیقه به‌وسیله هیپوکلریت سدیم (NaOCl) ۱/۵ درصد قرار گرفتند. پس از این مرحله بذور با آب مقطر استریل در سه زمان ۱، ۳ و ۵ دقیقه‌ای شستشو داده شدند. سپس بذور با کاغذ صافی استریل خشک شدند و روی محیط MS بدون هورمون کشت شدند. همه‌ی مراحل استریل بذر زیر هود لامینار و در شرایط استریل انجام شد. سپس شیشه‌های کشت شده با پارافیلم پیچیده شد و به اتاقک رشد (فیتوترون) با دمای۲۵±۲°C و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی منتقل گردیدند. پس از جوانه‌زنی در شرایط استریل، گیاهچه‌های ۳۰ روزه را به زیر هود لامینار برده و ریز نمونه برگ و ساقه در قطعات ۱–۰/۵ سانتی‌متری جدا شد و روی محیط MS پایه حاوی غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده رشد به همراه ساکارز با غلظت ۳۰ گرم در لیتر و آگار ۸ گرم در لیتر با pH=۵/۸ قرار داده شدند. تمامی تیمارها پس از ۱۴ روز در محیط‌های مشابه واکشت شدند. به‌منظور بررسی تأثیر نوع ریز نمونه و همچنین تأثیر ترکیبات هورمونی بر القای کالوس، آزمایش فاکتوریل با سه فاکتور بر پایه طرح کاملاً تصادفی (CRD) در سه تکرار انجام شد. فاکتور اول ریز نمونه در دو سطح (ساقه و برگ)، فاکتور دوم هورمون NAA در چهار سطح (۰، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) و فاکتور سوم هورمون BAP در چهار سطح (۰، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) مورد استفاده قرارگرفت. صفات اندازه‌گیری شده عبارتند از: روز تا القای کالوس، درصد القای کالوس (از طریق شمارش تعداد کالوس‌های تولید شده تقسیم بر تعداد ریز نمونه‌های کشت شده ضرب در ۱۰۰ محاسبه شد) (۴۴)، قطر کالوس (نحوه محاسبه به این صورت است که به کمک کاغذ میلی‌متری طول و عرض کالوس‌ها اندازه‌گیری شد و سپس در هم ضرب شده و از آن جذرگرفته شد)، صفات درصد و قطر کالوس ۴ هفته بعد از کشت یادداشت‌برداری شد. کالوس‌ها ۵–۳ روز بعد از القاء در همین محیط‌های کشت وارد فاز باززایی غیرمستقیم شدند، لذا آزمایش باززایی غیرمستقیم از کالوس‌ها نیز به شکل فاکتوریل با سه فاکتور و در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام گرفت. فاکتور اول ریز نمونه در دو سطح (کالوس‌های حاصل از ساقه و کالوس‌های به دست آمده از برگ)، فاکتور دوم هورمون NAA در چهار سطح (۰، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) و فاکتور سوم هورمون BAP در چهار سطح (۰، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) در محیط کشت MS بکار رفت، صفت درصد باززایی نیز ثبت گردید. نو ساقه‌های باززاشده به محیط MS بدون تنظیم‌کننده رشدی منتقل شدند و در همین محیط ریشه‌دار شدند. نو ساقه‌هایی که ریشه‌دار شده بودند، بعد از رشد کافی ریشه‌ها از شیشه خارج و به‌آرامی با آب شستشو داده شد تا بقایای محیط کشت و آگار از اطراف آن‌ها به‌طور کامل حذف شود، سپس به گلدان‌های حاوی پرلیت، ورمی‌کولیت و خاک (دو قسمت خاک مزرعه یک قسمت ماسه اتوکلاو شده) منتقل شدند، هنگام انتقال گیاهچه‌ها به خاک باید توجه نمود که حداقل تنش به آن‌ها وارد شود. جهت سازگاری تدریجی گیاهان طی انتقال از شرایط استریل درون شیشه‌ای به شرایط معمولی رشد، به مدت دو هفته داخل اتاقک رشد با دمای ۲۵±۱°C و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. در طول مدت سازگاری جهت بالا بردن رطوبت نسبی ابتدا گلدان‌ها با سرپوش شفاف پوشیده شدند و پس از مدتی در سرپوش‌ها منافذی ایجاد شد و به‌تدریج سرپوش‌ها حذف شدند. همچنین از آب مقطر استریل جهت آبیاری گلدان‌ها استفاده شد. هدف از انتقال گیاهان باززا شده به گلدان

رسیدن به گیاه کامل با توانایی تولید بذر بود. درنهایت بذور گیاهان منتقل شده به گلدان جمع‌آوری گردید. تحلیل داده‌های آزمایش با استفاده از نرم‌افزارهای Excel 2007، SAS 9.1 و SPSS 16 انجام شد. برای انجام آزمون مقایسه میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۱ درصد استفاده گردید.

نتایج

نتایج تجزیه واریانس صفات اندازه‌گیری شده در آزمایش کالوس‌دهی در جدول ۱ نشان داده شده است. درصد القای کالوس یکی از صفات مهم در مطالعه القای کالوس می‌باشد که در اکثر آزمایشات کالوس‌زایی گزارش می‌شود. نتایج آزمایش نشان داد که فقط بین دو ریز نمونه بکار رفته تفاوت معنی‌داری ازنظر تأثیر بر روی صفت درصد کال زایی مشاهده نشد اما سایر اثرات برای این صفت در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار می‌باشد. اثرات نوع ریز نمونه، غلظت‌های مختلف NAA، BAP و همچنین اثرات متقابل بین آنها بر روی صفت تعداد روز تا شروع القای کالوس و همچنین قطر کالوس در سطح احتمال ۱ درصد ازنظر آماری بسیار معنی‌دار بود.

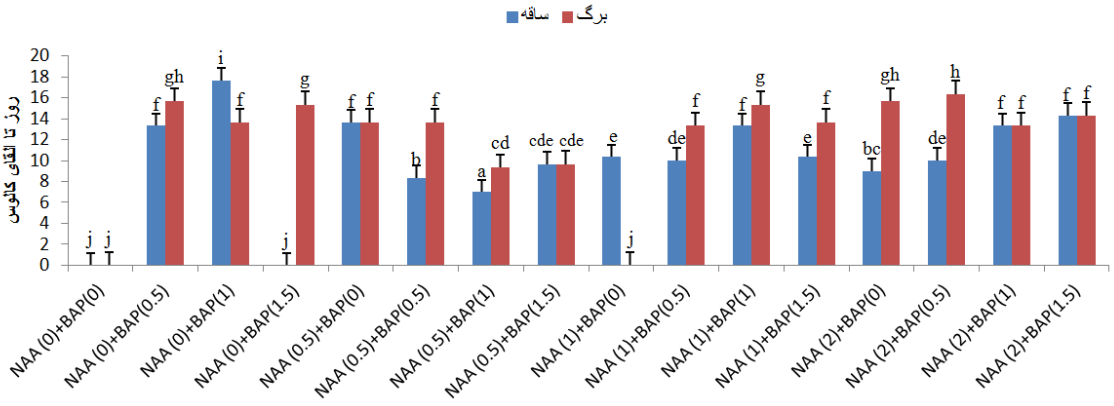
جدول-۱- تجزیه واریانس اثرات ریز نمونه و تنظیم کننده‌های رشد بر روی صفات اندازه‌گیری شده در آزمایش کالوس‌دهی در گیاه بابونه

		میانگین مربعات		
منابع تغییرات	درجه آزادی	روز تا القای کالوس	درصد کالوس‌دهی	قطر کالوس
ریز نمونه(A)	۱	۱۰۰/۰۴۲**	۰/۰۰۸^{ns}	۱۱۹/۶۱۷**
(B) NAA	۳	۶۲/۴۴**	۱/۲۶۷**	۱۷۶/۴۴۹**
(C) BAP	۳	۱۳۰/۵۲۸**	۰/۹۳۳**	۱۱۶/۹۲۲**
A×B	۳	۱۸/۸۱۹**	۰/۰۴۴**	۱۱/۰۷۴**
A×C	۳	۴۹/۴۵۸**	۰/۲۰۸**	۸۳/۱۶۴**
B×C	۹	۱۰۴/۱۰۲**	۰/۱۳۳**	۱۳/۲۰۲**
A×B×C	۹	۵۰/۷۹۲**	۰/۰۲۷**	۱۱/۶۶۷**
خطا	۶۴	۰/۲۸۱	۰/۳۴۰	۰/۲۵۸
ضریب تغییرات(CV)%		۴/۸۰	۱۲/۴۲	۷/۰۴

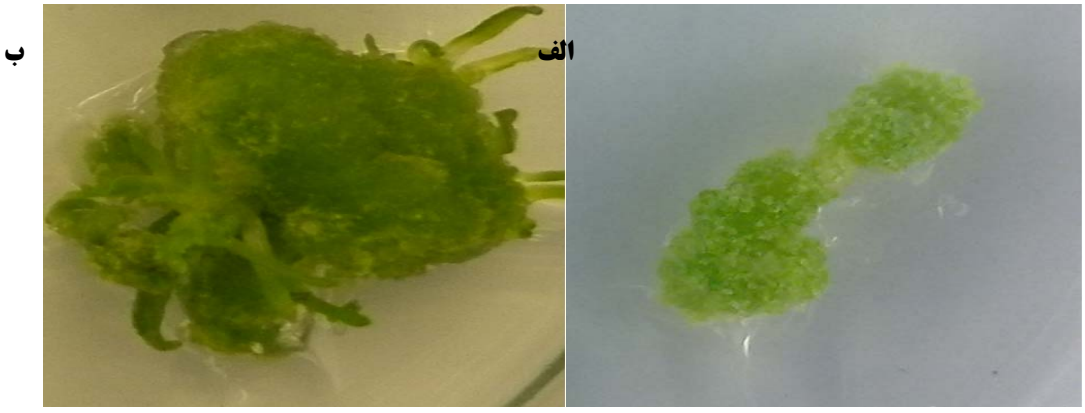
^{ns} و ** به ترتیب نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار و اختلاف معنی‌دار در سطح ۱درصد

اثرات متقابلNAA در BAP در ریز نمونه بر صفت روز تا القای کالوس بابونه در (جدول ۱) معنی‌دار شده است. لذا مقایسه میانگین اثرات متقابلNAA در BAP در ریز نمونه بر صفت روز تا القای کالوس بابونه در شکل ۱ مشخص‌شده است. نمودار نشان می‌دهد که کمترین مدت‌زمان برای القای کالوس در ترکیب تیماری (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP) بود که در ریز نمونه ساقه با میانگین ۷ روز و ریز نمونه برگ با میانگین ۹/۳۳ روز مشاهده گردید. پس از چهار هفته کشت، تمام ریز نمونه‌ها ازلحاظ رشدی در مرحله مناسبی قرار گرفتند و یادداشت‌برداری درصد و قطر کالوس انجام شد (شکل ۲).

مقایسه میانگین اثرات متقابل NAA درBAP برای صفت درصد کالوس‌زایی بابونه بر روی ریز نمونه‌های ساقه و برگ در شکل ۳ الف نشان داده شده است، این نمودار نشان می‌دهد که در ریز نمونه برگ ترکیب‌های هورمونی (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP) و (۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP) و (۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP) بیشترین درصد کالوس‌زایی (۱۰۰ درصد) را به خود اختصاص داده‌اند.



شکل۱- تأثیر غلظت‌های مختلف NAA و BAP بر صفت روز تا القای کالوس در ریز نمونه برگ و ساقه

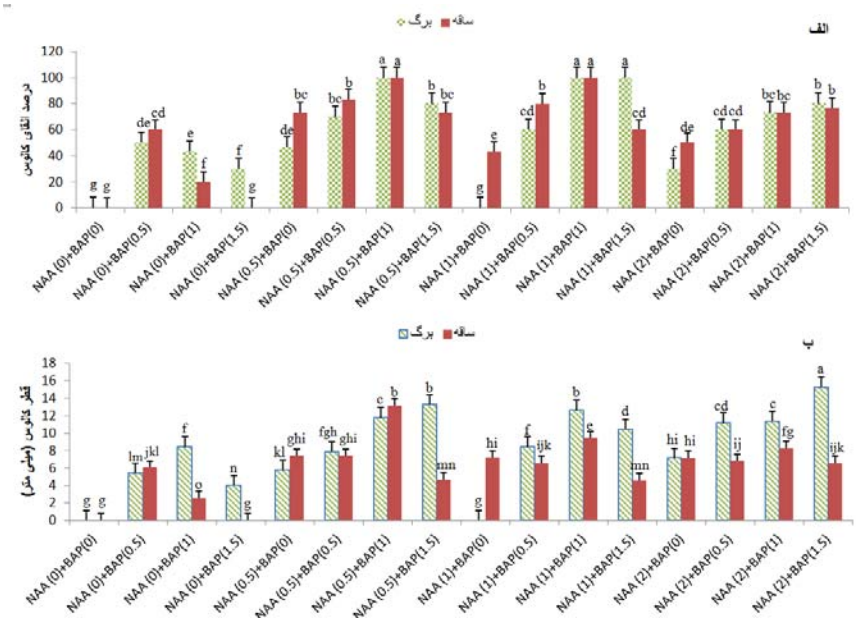


شکل۲- کالوس حاصل از ریز نمونه ساقه (الف). کالوس حاصل از ریز نمونه برگ (ب)

ریز نمونه ساقه نیز در ترکیب‌های هورمونی (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP) و (۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP) بالاترین درصد القای کالوس ۱۰۰ درصد را داشت. مقایسه میانگین تأثیر ترکیبات NAA و BAP روی صفت قطر کالوس ریز نمونه‌های برگ و ساقه بابونه در شکل ۳ ب آورده شده است. این نمودار نشان می‌دهد که ریز نمونه برگ در سطح (۲ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP) با میانگین ۱۵/۳۱ میلی‌متر بالاترین قطر کالوس را داشت. بیشترین قطر کالوس ریز نمونه ساقه نیز در سطح (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP) به میزان ۱۳/۱۰ میلی‌متر بود.

نتایج تجزیه واریانس باززایی غیرمستقیم در جدول ۲ نشان داده شده است. این جدول نشان می‌دهد که اثرات ساده ریز نمونه و تنظیم‌کننده‌های رشد و همچنین اثرات متقابل دوگانه و سه‌گانه آنها در سطح ۱ درصد برای درصد باززایی معنی‌دار شده است.

مقایسه میانگین تأثیر ترکیبات مختلف NAA و BAP روی صفت درصد باززایی غیرمستقیم ریز نمونه‌های کالوس حاصل از برگ و ساقه بابونه در شکل ۴ آورده شده است.



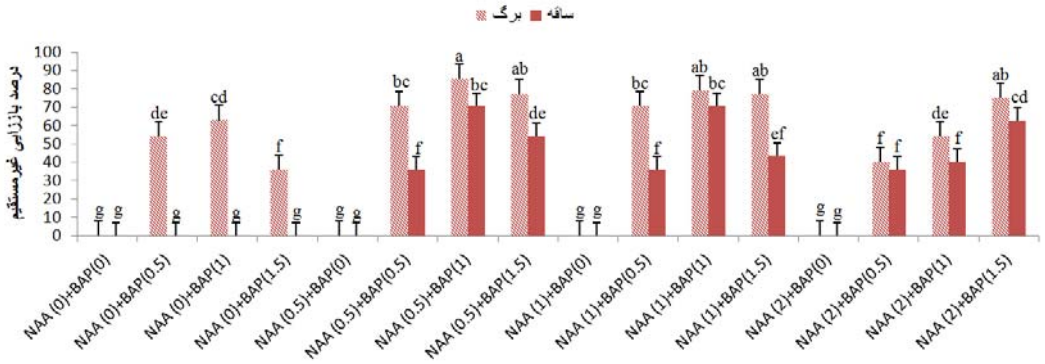
شکل۳- تأثیر غلظت‌های مختلف NAA و BAP در ریز نمونه برگ و ساقه بر روی صفت درصد القای کالوس (الف) و صفت قطر کالوس (ب)

جدول ۲- تجزیه واریانس صفت درصد باززایی غیرمستقیم در بابونه

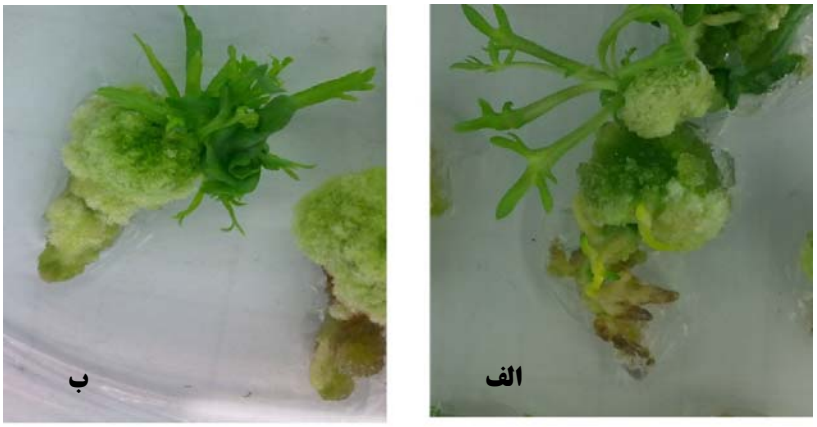
منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
ریز نمونه(A)	۱	۱/۰۴**
(B) NAA	۳	۰/۴۵۲**
(C) BAP	۳	۱/۶۷**
A×B	۳	۰/۰۹۷**
A×C	۳	۰/۱۲۰**
B×C	۹	۰/۰۹۵**
A×B×C	۹	۰/۰۲۶**
خطا	۶۴	۰/۰۰۳
ضریب تغییرات(CV)%		۱۶/۳۱

**نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۱ درصد

این نمودار نشان می‌دهد که بالاترین درصد باززایی غیرمستقیم در کالوس حاصل از ریز نمونه برگ با استفاده از (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP) به میزان ۸۵/۵۹ درصد بود، بیشترین درصد باززایی غیرمستقیم کالوس حاصل از ساقه نیز در سطح (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP) به میزان ۷۰/۴۷ درصد بود که با سطح (۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP) اختلاف معنی‌داری نداشت. نو ساقه حاصل از کالوس ریز نمونه‌های ساقه و برگ در شکل ۵ نشان داده شده است.



شکل۴- تأثیر غلظت‌های مختلف NAA و BAP بر روی صفت باززایی غیرمستقیم در ریز نمونه کالوس حاصل از برگ و ساقه

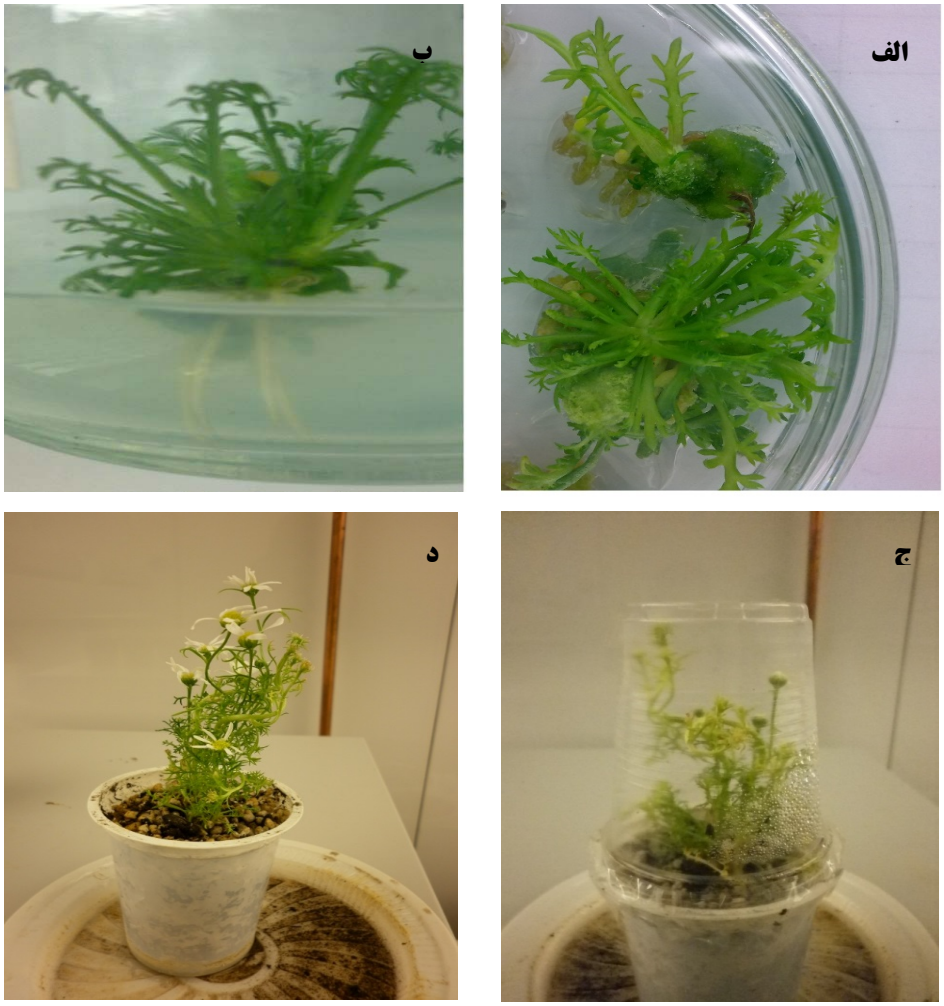


شکل ۵- نو ساقه حاصل از کالوس ریزنمونه‌برگ (الف). نو ساقه حاصل از کالوس ریزنمونه‌ساقه (ب)

انتقال گیاهچه‌های ریشه‌دار از محیط درون شیشه‌ای به محیط گلدانی به‌راحتی انجام پذیرفت. به دلیل وجود شرایط مناسب و رعایت برخی نکات ازجمله تأمین رطوبت و همچنین تغذیه گیاهان با مواد غذایی محیط کشت MS، پس از گذشت حدوداً ۴ هفته گلدان‌ها از اتاق سازگاری به محیط گلخانه منتقل شد. میزان موفقیت در سازگاری گیاهان در این مرحله بیش از ۹۰ درصد ثبت گردید. درنهایت پس از گلدهی گیاهان منتقل شده، بذور رسیده جمع‌آوری و در یخچال نگهداری گردید. باتوجه به اینکه برای تحقیقات آینده (انتقال ژن به‌منظور تغییر متابولیت های ثانویه بابونه) بهینه‌سازی کشت بافت و حصول بذر از گیاهان باززا شده ضروری است، این نتایج بیانگر موفقیت آزمایش حاضر می‌باشد. مراحل باززایی کالوس حاصل از ریز نمونه برگ بابونه در شکل ۶ نشان داده شده است.

بحث

دراین آزمایش اثر ریز نمونه و غلظت‌های مختلف NAA و BAP بر روی گیاه دارویی بابونه (*M. aurea*) مطالعه شد. بهینه‌سازی القای کالوس اولین گام در شرایط کشت بافت است زیرا کالوس می‌تواند در تهیه پروتوپلاست، تولید جنین سوماتیک، تولید اندام‌های ریشه و ساقه و تولید متابولیت‌های ثانویه مورد استفاده قرارگیرد (۲۰). عوامل مختلفی مانند ژنوتیپ مورد استفاده، نوع ریز نمونه، شرایط محیطی، محیط کشت و تنظیم‌کننده‌های رشد و ... می‌تواند روی القای کالوس تأثیر بگذارد (۱۹). در مطالعه حاضر نتایج برای صفات ارزیابی شده نشان داد که کالوس‌زایی در این گیاه علاوه بر تحت تأثیر قرارگرفتن تیمارهای هورمونی مختلف، تحت تأثیر ریز نمونه نیز قرار می‌گیرد. ریز نمونه برگ و ساقه روی محیط MS فاقد هورمون، کالوس‌زایی نداشتند، Koohi و همکاران (۲۰۱۱) (۲۲) نیز در آزمایش خود نشان دادند که در ریز نمونه برگ روی محیط فاقد هورمون اثری از کالوس دیده نشد. ولی زاده (۲۰۱۷) (۴۳)، نیز در آزمایش خود نشان داد که در ریز نمونه برگ روی محیط کشت فاقد اکسین اثری از کالوس دیده نشد. میزان تولید کالوس بستگی به ترکیب هورمون-های رشد بکار رفته و تعادل بین هورمون‌های اکسین و سیتوکینین دارد (۱). زیرا این تنظیم‌کننده‌ها باعث تنظیم رشد و تقسیم سلولی و همچنین رشد بهتر اندام‌های گیاهی می‌شوند. ازآنجاکه نیاز گونه‌های گیاهی و بافت‌های مختلف به این مواد متفاوت بوده، انتخاب تنظیم‌کننده رشد مناسب و تعیین غلظت بهینه آن مهم می‌باشد (۸). لذا دراین آزمایش شرایط بهینه‌سازی کشت بافت برای گیاه بابونه انجام شد. ریز نمونه‌های موجود بر روی محیط‌های کشت بسته به غلظت تنظیم‌کننده‌های رشدی بکار رفته، واکنش‌های متفاوتی از خود نشان دادند.



شکل۶-نوساقه حاصل از کالوس ریز نمونه برگ (الف). ریشه‌دار شدن نوساقه در محیط کشت MS بدون تنظیم‌کننده‌های رشدی (ب). انتقال گیاه کامل باززا شده به گلدان (ج). گلدهی گیاهان باززا شده (د)

۷ تا ۱۷ روز پس از کشت بسته به نوع هورمون مورد استفاده در محیط کشت القای کالوس از نواحی برش خورده ریز نمونه‌ها آغاز شد و کالوس سبزرنگی تشکیل شد و درنهایت کالوس تمام سطح ریز نمونه را پوشاند. در آزمایش ولی زاده (۲۰۱۷) (۴۳) القای کالوس از جنین نابالغ و برگ بابونه به ترتیب ۱۲ و ۱۵ روز بعد از کشت ریز نمونه رخ داد. القای کالوس از نواحی برش خورده آغاز می‌شود و زخم در ریز نمونه باعث تحریک تولید کالوس می‌شود (۳۸)، باتوجه به اینکه در این آزمایش نیز برای تسریع القای کالوس در ریز نمونه‌ها زخم‌هایی ایجاد شد. کالوس‌های القا شده در برگ دارای رنگ سبز تیره و کالوس‌های ساقه سبز روشن بودند. کالوس‌های سبز به دلیل آنکه قادر به عمل فتوسنتز بوده و منبع کربن مورد نیاز خود را تأمین می‌کنند رشد بهتری نسبت به کالوس‌ها بارنگ کرم دارند (۱۱). نتایج تحقیق نیز این موضوع را تأیید می‌کند که کالوس‌های حاصل از برگ نسبت به کالوس ساقه رشد بهتر و حجم بیشتری داشتند. زبرجدی و همکاران (۲۰۱۳) (۴۶) نیز کالوس دهی گیاه دارویی سرخارگل را در غلظت‌های مختلف NAA و BAP مورد بررسی قراردادند که نتایج نشان داد که بیشترین میزان کالوس دهی در زیزنمونه برگهای اولیه در تیمار BAP (۰/۲ میلی‌گرم در لیتر) و NAA (صفر) به میزان ۹۷ درصد

و در زیزنمونه هیپوکتیل در تیمار BAP (۰/۲ میلی‌گرم در لیتر) و NAA (۰/۶ میلی‌گرم در لیتر) به میزان ۹۱ درصد مشاهده گردید که با نتایج آزمایش حاضر همخوانی نشان داد. کمترین مدت‌زمان برای القای کالوس در هردو ریز نمونه در ترکیب تیماری ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP مشاهده گردید و با استفاده از این تیمار هورمونی می‌توان تقریباً حجم نسبتاً زیادی کالوس را در مدت‌زمان کمتری به دست آورد. تولید کالوس بیشتر در مدت‌زمان کمتر یکی از اهداف مهم روش‌های کشت بافت می‌باشد و این امر باعث صرفه‌جویی در وقت و هزینه می‌شود. صیادی و همکاران (۲۰۱۴) (۳۷) گزارش کردند که غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۱ میلی‌گرم در لیتر Kin کمترین مدت‌زمان را برای شروع کالوس‌زایی ریز نمونه‌های بابونه با میانگین ۱۱ روز را به خود اختصاص داده است. محمدی (۲۰۱۰) (۲۶) نیز در آزمایش خود مشاهده کرد که القای کالوس ۱۱ تا ۱۸ روز بعد از کشت از ریز نمونه برگ، ساقه و جوانه‌جانبی بابونه اتفاق می‌افتد.

دراین پژوهش دیده شد که برای تولید کالوس وجود هورمون‌ها ضروری است و همچنین القای کالوس در بابونه در تیمار هورمونی هم‌زمان اکسین و سیتوکینین بسیار مؤثرتر از زمانی است که اکسین یا سیتوکینین به‌تنهایی استفاده می‌شود، به‌طوری که ترکیب‌های (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP) و همچنین (۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و۱ میلی‌گرم در لیتر BAP) بهترین ترکیب هورمونی جهت القای کالوس ریز نمونه‌های ساقه و برگ (۱۰۰ درصد) شناخته شدند. ولی زاده (۲۰۱۷) (۴۳) در آزمایش خودروی بابونه به این نتیجه رسید که استفاده هم‌زمان اکسین و سیتوکنین اثر بهتری نسبت به استفاده اکسین به‌تنهایی بر القای کالوس داشت. اسکوگ و میلر (۱۹۵۷) (۴۰) نیز در بررسی‌های خود نشان دادند که نسبت یکسان اکسین و سیتوکنین سبب تولید کالوس یا پینه می‌شود. ریچلینگ و بیدربرک (۱۹۹۱) (۳۶) در تحقیقات خود نشان دادند که هورمون Kin در غلظت مساوی یا کمتر از اکسین برای رشد کالوس بابونه ضروری می‌باشد. محمدی (۲۰۱۰) (۲۶) نیز در آزمایش خود نشان داد که افزایش هورمون NAA و 2,4-D تا غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر باعث افزایش کال‌زایی بابونه می‌شود اما استفاده از Kin با همان غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر برای کال‌زایی ضروری و میزان القای کالوس را چندین برابر می‌کند. شینویاما و همکاران (۲۰۰۴) (۳۹) در تحقیقات خود روی گیاه داوودی نشان دادند که افزایش غلظت Kin و 2,4-D در حد ۱ میلی‌گرم در لیتر تولید کالوس را افزایش داده است. در گیاه *Allium chinense* نیز مشخص شد که بیشترین میزان تولید کالوس در محیط کشت همراه با هورمون‌های ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D بوده و با افزایش میزان اکسین یا سیتوکینین اثرات کاهشی دیده شد (۴۵). موافقی و همکاران (۲۰۰۸) (۲۹) نیز بیشترین مقدار شاخص کالوس را در محیط کشت حاوی (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP) در گیاه کور مشاهده کردند. معتمدی و همکاران (۲۰۱۰) (۲۸) در آزمایش خود نشان دادند که بیشترین میزان کالوس‌زایی گیاه گلرنگ در محیط کشت حاوی (۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP) به میزان ۹۷ درصد بود. تنوع در فراوانی تولید کالوس در پاسخ به سطوح مختلف هورمونی، می‌تواند به دلیل تمایز در بیان ژن‌های کنترل‌کننده تولید کالوس باشد. همچنین ممکن است که در بعضی از سطوح هورمونی مورد استفاده، برخی از ژن‌های مسئول در سنتز کالوس به‌طور کامل بیان نشوند (۲۴).

نتایج آزمایش باززایی غیرمستقیم نشان می‌دهد که در محیط فاقد هورمون BAP باززایی صورت نگرفته است. به این دلیل که سیتوکینین‌ها نقش بسیار مؤثری در پیشرفت و القای قسمت‌های هوایی به‌طور مستقیم و غیرمستقیم دارند. برای تحریک رشد جوانه‌های جانبی و کاهش چیرگی رأسی، معمولاً یک یا چند سیتوکینین در مرحله تکثیر در محیط استفاده می‌شود (۱۴). براساس برخی گزارش‌ها

BAP به‌عنوان مؤثرترین سیتوکینین مورد استفاده در شاخه-زایی بسیاری از گیاهان معرفی‌شده است (۱۳). اثرات محرک BAP برای القاء و تشکیل قسمت‌های هوایی برای گونه‌های دارویی مثل کرچک و بابونه نیز گزارش‌شده است (۲و ۴۱). دراین آزمایش نیز با اضافه کردن هورمون BAP به محیط MS در کالوس حاصل از برگ باززایی غیرمستقیم اتفاق افتاد، اما باززایی غیرمستقیم برای کالوس حاصل از ساقه با کاربرد هم‌زمان BAP با یکی از ترکیبات اکسینی مثل NAA انجام شد. بنابراین مشخص می‌شود که با کاربرد ترکیبات تنظیم‌کننده رشد مختلف، بین کالوس-های حاصله از ریز نمونه ساقه و برگ ازنظر درصد باززایی اندام‌های هوایی تفاوت وجود دارد، این عامل به خاطر این است که نسبت تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی در بافت‌ها و اندام‌های مختلف گیاهی متفاوت است و این مسئله می-تواند بر روی کالوس‌زایی و باززایی از کالوس‌های موجود اثرگذار باشد (۱۳). بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که بسته به نوع ریز نمونه استفاده شده و مقدار هورمون‌های درون-زای آن، نیاز به مصرف اکسین و سیتوکینین خارجی مورد نیاز برای القا جوانه‌های نا به‌جای شاخه تفاوت می‌کند. جورج و دبورگ (۲۰۰۸) (۱۵) نیز بیان کردند که نسبت سیتوکینین به اکسین بسیار مهم است و در باززایی نقش مهمی ایفا می‌کند، و نسبت اکسین پایین و سیتوکینین بالا را برای شاخه‌زایی لازم دانستند، که مطابقت آن با نتایج این تحقیق آشکار است، به‌طوری که بیشترین باززایی غیرمستقیم هر دو نوع ریز نمونه دراین تحقیق در محیط (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP) دیده شد. ریچلینگ و بکر (۱۹۷۶) (۳۴) بیشترین باززایی غیرمستقیم گیاه بابونه را در محیط MS حاوی ۰/۵ میلی-گرم در لیتر NAA و۱ میلی‌گرم در لیتر Kin مشاهده کردند. کاظم (۲۰۱۲) (۲۱) در آزمایش خود نشان داد که ترکیب هورمونی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و۱ میلی‌گرم در لیتر BAP بیشترین درصد باززایی غیرمستقیم (۶۵ درصد) را در گیاه باباآدم دارد. اما محمدی (۲۰۱۰) (۲۶) در آزمایش خود نشان داد که سیتوکینین به‌تنهایی و بدون حضور اکسین روی شاخه‌زایی کالوس‌های بابونه تأثیر داشت. نکته قابل‌ذکر در این مرحله این است که وقتی نوساقه حاصل از کالوس‌ها به محیط‌های بدون تنظیم‌کننده رشدی منتقل شدند طی چندین هفته هیچ‌کدام از کالوس‌ها تمایزی به سمت نوساقه‌دهی بیشتر نشان ندادند، در حالیکه ریشه‌دهی مشاهده گردید. علت ریشه‌زایی در غیاب اکسین را می‌توان به وجود هورمون‌های اکسین داخلی نسبت داد. محمدی (۲۰۱۰) (۲۶) در مطالعات خود روی بابونه به همین نتیجه دست‌یافت، اما با نتایج پاسامونتی و همکاران (۱۹۹۸) (۳۱) روی بابونه تضاد داشت، این محققین برای ریشه‌زایی شاخه‌های باززا شده از محلول اکسین ایندول بوتریک اسید استفاده کردند.

نتیجه‌کلی

به‌طور کلی می‌توان نتیجه گرفت که برگ و ساقه هر دو ریز نمونه مناسب برای تولید کالوس می‌باشد. در بابونه برای القای مؤثر کالوس لازم است از تیمار هم‌زمان اکسین و سیتوکینین استفاده گردد، به‌طوری که ترکیب (۰/۵ میلی-گرم در لیتر NAA و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP) کمترین مدت‌زمان و همچنین بهترین ترکیب هورمونی جهت القای کالوس ریز نمونه‌های ساقه و برگ (۱۰۰درصد) شناخته شد. وجود هورمون BAP برای القاء و تشکیل قسمت‌های هوایی در هر دو نوع ریز نمونه ضروری و نسبت اکسین پایین و سیتوکینین بالا برای شاخه‌زایی مؤثرتر بود بطوری-که کالوس‌های حاصل از برگ و ساقه بیشترین باززایی غیرمستقیم را در ترکیب (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP) داشتند.

سپاسگزاری

بدینوسیله از زحمات کلیه همکاران محترم گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی دانشگاه رازی که ما را در انجام این پژوهش یاری نمودند سپاسگزاری می‌گردد.

منابع

1. Abbasi, B., Saxena, P. K., Murch, S. J., and Liu, C. Z., 2007. Echinacea biotechnology: Challenges and opportunities. In Vitro Cellular and Development Biology- Plant, 43, PP: 481-492.

2. Alam, I., Sharmin, S. A., Mondal, S. C., Alam, M. J., Khalekuzzaman, M., Anisuzzaman, M., and Alam, M. F., 2010. In vitro micropropgation through cotyledonary node culture of castor bean (*Ricinus communis* L.), Australian Journal of Crop Science, 4 (2), PP: 81-84.

3. Asgari, S., Naderi, G. H., and Asgari, N., 2005. The protective effects of flavonoids against RBC hemolysis caused by free radicals. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 21 (4), PP: 505-515.

4. Ayoughi, F., Barzegar, M., Sahari, M. A., and Naghdibadi, H., 2011. Chemical compositions of essential oils of Artemisia dracunculus L. and endemic *Matricaria chamomilla* L. and an evaluation of their anti oxidative effects, Journal Agricultural Science and Technology, 13, PP: 79- 88.

5. Azizi, M., 2006. Study of four Chamomile varieties (*Matricaria chamomilla* L.) modified in climatic conditions of Iran, Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 22 (4), PP: 386-396.

6. Bagheri, A., Moshtaghi, N., and Sharifi, A., 2007. Plant Biotechnology. Mashhad Jehad Daneshgahi, 236 p.

7. Cellarova, E., Grelakova, K., Repack, M., and Honsariv, R., 1982. Morphogenesis in callus tissue cultures of some Matricaria and Achillea Species. Biologia plantarum (PRAHA), 24 (6), PP: 430-433.

8. Chan, L. K., Koay, S. S., Low, P. H., and Boey, P. L., 2008. Effect of plant growth regulators and subculture frequency on callus culture and the establishment of *Melastomamala bathricum* cell suspension cultures for the production of pigments. Biotechnology, 7 (4), PP: 678-685.

9. Dehghan-Gardeh, S., Zare, N., Asghari-Zakaria, R., and Azimi, F., 2011. Callus and plant regeneration Golden chamomile (*Tinctoria anthemis*), First National Congress Economic in Agriculture and Natural Resource, Ghom, 14-15 December.

10. Dhawan, V., and Bhojwani, S. S., 1986. Micropropagation in crop plants. Glimpses Plant Research, 7, PP: 1–75.

11. Ehsanpoor, A., and Amini, F., 2003. Plant cell tissue culture. Isfahan Jehad Daneshgahi, 181p.

12. Fallahi, J., Koocheki, A., and Rezvani Moghaddam, P., 2008. Effects of biofertilizers on quantitative and qualitative yield of chamomile (*Matricaria recutita* L.) as a medicinal plant. Iranian Journal of Field Crops, 7 (1), PP: 127 - 35.

13. Farsi, M., and Zolali, J., 2003. Principles of Plant Biotechnology. (Translation), Ferdowsi Mashhad University Press, 508 p.

14. George, E. F., Hall, M. A., and. Klerk, G. J. D., 2008. Plant propagation by tissue culture, Volume 1. The Background. Springer, 502 p.

15. George, E. F., and Deburgh, P. C., 2008. Micropropagation. Uses and methods, PP: 29-64.

16. Ghanavati, M., 2007. Study of salinity effect on some growth characters of two *matricaria* spices, A department of plant breeding, Shahrekord University, PP: 25-68.

17. Hadi, M., Khabandeh, N., Darzi, M., and Yasa, N., 2000. The effects of planting date and plant density on chamazalene amount of oil and *chamomile*. National Conference of Iranian Medicinal Plants, Research Institute of Forests and Rangelands, 119, PP: 24-26.

18. Haghi, G., Safaei, A., and Safari, J., 2004. Identification and quantitative determination of flavonoids in the flower and in extract of *Matricaria chamomilla* by HPLC, Abstract book: 3th International Congress of Health, Environment and Natural Products, Mashhad 87.

19. Han, Y., Jin, X., Wu, F., and Zhang, G., 2011. Genotypic differences in callus induction and plant regeneration from mature embryos of barley (*Hordeum vulgare* L.), Journal of Zhejiang University Science, 12 (5), PP: 399-407.

20. Hassandokht, M. R., and Ebrahimi, R., 2006. Principles of plant tissue culture. Marz Danesh, 328 p.

21. Kazem, S., 2012. Optimization of tissue culture and gene transformation in (*Arctium lappa*), Biotechnology, Master of Science Thesis, Dept., of Agronomy and Plant Breeding, Razi University, Kermanshah. Iran.

22. Koohi, L., Zare, N., Asghari-Zakaria, R., SheikhZade Mosaddegh, P., and Daryani, P.,

2011. In vitro callus induction and regeneration of German *Chamomile* in response to different hormones compounds, the 12th Congress of Iranian Genetics, Tehran, 21-23 may.

23. Kumar, J., and Gupta, P. K., 2008. Molecular approaches for improvement of medicinal and aromatic plants, Plant Biotechnology Reports, 2, PP: 93-112.

24. Mahmoudi, B., 2002. Plant fragrant essential oils and healing effects of understanding (aromatherapy). Tehran, Noor Danesh Prees, 1, PP: 1-6.

25. Masomi-Asl, A., Ariaeenezhad, A., and Dehdari, M., 2016. Investigation of direct regeneration in *Matricaria chamomilla*, L., and *Matricaria recutite* L., in *in vitro* conditions, Journal of Horticultural Science, 4(29), PP: 601-609.

26. Mohamadi, Z., 2010. Study of callus, regeneration and suspension cultures of different genotypes of chamomile (*Matricaria chamomilla*). Master's Thesis in Plant Breeding, Agronomy and Plant Breeding Dept, Faculty of Agriculture, Ilam University.

27. Moradipour, E., Hosseini, B., and Pirzad, A., 2017. Effects of plant growth regulators on direct shoot regeneration from shoot apical explants in four genotypes of *Matricaria chamomilla* L., Journal of Plant Researches (Iranian Journal of Biology), 2(30), PP: 364-375.

28. Motamedi, J., Zebarjadi, A. R., Kahrizi, D., Salmanian, A. H., and Soheilikhah, Z. H., 2010. Study of callus induction and shoot regeneration of Safflower (*Carthamus tinctorius*, L.,) using hypocotyl and cotyledon explants culture, Journal of Agricultural Biotechnology, 1, PP: 99-111.

29. Movafeghi, A., Habibi, G. H., and Aliasgarpoor, M., 2008. Plant regeneration of *Capparis spinosa* L., using hypocotyl explant, Iranian Journal of Plant Biology, 21 (2), PP: 289-297.

30. Mulabagal, V., and Tsay, H. S., 2004. Plant cell cultures-an alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites. International Journal of Applied Science and Engineering, 2, PP: 29-48.

31. Passamonti, F., Piccioni, E., Standardi, A., and Veronesi, F., 1998. Micropropagation of *Chamomilla recutita* L, Rauschert, Journal Acta Horticulturae, 457, PP: 303–309.

32. Rahimi-Kolamrody, H., 2011. Botany, cultivation of diploid and triploid chamomile and oil mixtures and compared with samples available in Iran, PhD's thesis of Pharmacy, Faculty of Medical Sciences, Isfahan University, PP: 174.

33. Rani, M., Ozguven, M., and Kirici, A., 2011. The effects of some Herb's essential oils on some microbes, Journal of Medicinal Plants, 6 (20), PP: 3525-9.

34. Reichling, J., and Becker, H., 1976. Tissue-culture of *Matricaria chamomilla* L., 1. Isolation and maintenance of tissue-culture-preliminary phytochemical investigations. Planta Medica, 30 (3), PP: 258–268.

35. Reichling, J., Bisson, W., and Becker, H., 1984.Comparative-study on the production and accumulation of essential oil in the whole plant and in the callus culture of *Matricaria chamomilla*. Planta Medica, 50 (4), PP: 334–337.

36. Reichling, J., and Beiderbeck, R., 1991. *Chamomilla recutita* L., Rauschert (Camomile): *In vitro* culture and the production of secondary metabolites, Medicinal and Aromatic Plants III. Springer, Berlin Heidelberg New York, PP: 156–175.

37. Sayadi, V., Mehrabi, A. A., Saidi, M., and Nourollahi, K. H., 2014. In vitro culture and callus induction of chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) explants under different concentrations of plant growth regulators, International Journal of Biosciences, 4 (10), PP: 206-211.

38. Schultz, W., Hose, S., AbonMandou, R. A., and Czygan, F. C., 1990. *Melissa officinalis* L. (Lemon balm), *In vitro* culture and the production and analysis of volatile compounds, Biotechnology in Agriculture and Forestry, 24, 242 p.

39. Shinoyama, H., Nomura, Y., Tsuchiya, T., and Kazuma, T., 2004. A simple and efficient method for somatic embryogenesis and plant regeneration from leaves of Chrysanthemum (dendranthema×grandiflorum (Ramat.) Kitamura), Journal Plant Biotechnology, 21 (1), PP: 25-33.

40. Skoog, F., and Miller, C. O., 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultures *in vitro*. Symposia of the Society for Experimental Biology, 11, PP: 118–131.

41. Stefaan, P., Werbrouck, O., and Debergh, P. C., 1994. Applied aspects of plant regeneration. In: Dixon RA and Gonzales RA (eds) Plant Cell Culture: A Practical Approach, Oxford

University Press, Oxford New York, PP: 127-145.

42. Tripathi, L., and Tripathi, J. N., 2003. Role of biotechnology in medicinal plants, Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 2, PP: 243-253.

43. Valizadeh, M., 2017. *In vitro* shoot regeneration of medicinal plant *Anthemis hyaline* DC. Journal of Crop Breeding, 9 (21), PP: 76-81.

44. Vatandoost, S. H., 2015. Optimization of tissue culture and gene transformation in *Matricaria aurea*. Master od science Thesis, Dept. of Production Engineering and Plant Genetics, Faculty of Science and Agricultural Engineering, Campus of Agriculture and Natural Resources, Razi University, Kermanshah.

45. Yan, M. M., Xu, C., Kim, C. H., and Um, Y. C., 2009. Effects of explant type, culture media and growth regulators on callus induction and plant regeneration of Chines jiaotou (*Allium chinense*), Scientia Horticulturae, 123, PP: 124-128.

46. Zebarjadi, A. R., Motamedi, M. J., Taravat, E., and Ismaili, A., 2013. Micropropagation of medicinal purple coneflower (*Echinacea purpurea* L.) using cotyledon and hypocotyl segments, Journal of Plant Researches (Iranian Journal of Biology), 3(26), PP: 311-319.

Effect of explant types and different levels of plant growth regulators on callogenesis and regeneration in medicinal plant, *Matricaria aurea*

Vatandoost SH.[1] and Zebarjadi A.R.[1,2]

[1] Dept. of Production Engineering and Plant Genetics, Faculty of Science and Agricultural Engineering, Campus of Agriculture and Natural Resources, Razi University, Kermanshah, I.R. of Iran.

[2] Dept. of Biotechnology for Drought Tolerance Research, Razi University, Kermanshah, I.R. of Iran.

Abstract

Matricaria aurea is an important medicinal plant belongs to Asteraceae family, which is used widely in pharmacy, food industry, and cosmetics purposes. Regarding importance of this medicinal plant, optimization of its tissue culture could be predisposing factor of many types of research about the usage of this plant. Callus induction and indirect regeneration were applied for optimization of *M. aurea* tissue culture. Both experiments were conducted in a randomized complete design that was arranged as 2×4×4 factorial with 3 replications on MS medium. For both experiments, various levels of NAA and BAP were compared along with two explants (stems and leaves). The result showed that there was no callus induction observed in growth hormone-free medium. The result showed that callus induction for both explants was faster in 0.5 mg/l NAA+1 mg/l BAP. Two hormone compositions: 0.5 mg/l NAA+1 mg/l BAP and 1 mg/l NAA+1 mg/l BAP were the best composition for callus induction of both stems and leaves. The highest callus diameter (15.31 mm) obtained with 2 mg/l NAA + 1.5 mg/l BAP on leaves. Also, highest indirect regeneration (85.59%) was observed in 0.5 mg/l NAA + 1 mg/l BAP on calli that were obtained from leaves.

Key words: *Matricaria aurea*, Indirect regeneration, Callus, NAA, BAP