کالوس‌زایی و ریخت‌زایی درون‌شیشه‌ای در بابونه آلمانی (*Matricaria chamomilla* L.)

In vitro callus induction and morphogenesis of German chamomile (*Matricaria chamomilla* L.)

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

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد اصلاح نباتات، دانشگاه محقق اردبیلی ۲- عضو هیات علمی دانشگاه محقق اردبیلی

koohileila@gmail.com

چکیده

بابونه آلمانی با نام علمی *Matricaria chamomilla* L. یکی از مهمترین گیاهان دارویی اسانس‌دار است که در صنایع مختلف داروسازی و آرایشی- بهداشتی استفاده فراوانی دارد. با توجه به خصوصیات دارویی و ترکیبات اسانس آن، مطالعات بیوتکنولوژیکی مخصوصا کشت درون شیشه‌ای این گیاه می‌تواند حائز اهمیت باشد. در این مطالعه تاثیر هورمون‌های گیاهی NAA و کینتین بر القاء کالوس و ریخت‌زایی ریزنمونه‌های برگ و هیپوکوتیل بابونه آلمانی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی مورد مطالعه قرار گرفته است. درصد کالوس زایی ریزنمونه هیپوکوتیل به طور معنی‌داری بیشر از برگ بود. علاوه بر این، ریزنمونه برگ در محیط‌های MS فاقد هورمون و نیز حاوی NAA ۰/۵mg/l بدون حضور کینتین کالوس تولید نکرده در حالی‌که ریزنمونه هیپوکوتیل در این محیط‌های کشت درصد کالوس‌زایی نسبتاً بالایی نشان داد. این اختلاف پاسخ کالوس‌زایی ممکن است ناشی از تفاوت در هورمون‌های داخلی این گیاه باشد. بیشترین درصد کالوس‌زایی مربوط به محیط‌های حاوی هر دو نوع تنظیم‌کننده رشد گیاهی بود. بالاترین وزن تر کالوس با ریزنمونه برگ (۳۹٤/۷ mg) و هیپوکوتیل (۲۹٦/۷ mg) در محیط کشت MS حاوی NAA ۰/۵ mg/l و Kin ۱ mg/l به دست آمد. همچنین بیشترین درصد ریشه‌زایی مستقیم و غیر مستقیم (٤۰/۰۸٪) در محیط کشت MS حاوی NAA ۱/۵ mg/l حاصل شد.

کلمات کلیدی: بابونه آلمانی، کالوس‌زایی، ریشه‌زایی، کشت بافت

مقدمه:

رویکرد جهانی به استفاده از گیاهان دارویی و ترکیبات طبیعی در صنایع دارویی، آرایشی- بهداشتی و غذایی، نیاز مبرم به تحقیقات پایه ای و کاربردی وسیع در این زمینه را نمایان می‌سازد. بابونه آلمانی با نام علمی *Matricaria chamomilla* L. به دلیل دارا بودن اسانس و متابولیت‌های ثانویه مهم از اهمیت دارویی ویژه‌ای برخوردار است (٤) و در فارماکوپه ۲٦ کشور آمده است (۳). گل‌های بابونه حاوی ۲- ۰/۲٤ درصد روغن فرّار می‌باشد. در بین ترکیب‌های اسانس آن آلفا- بیسابولول و کامازولن به دلیل خاصیت ضد التهابی از اهمیت زیادی برخوردار هستند، این ترکیبات ٦۵-۵۰ درصد از کل روغن فرّار را شامل می‌شوند. بهینه کردن شرایط کشت بافت و کشت سلول علاوه بر این‌که امکان مطالعه درون شیشه‌ای را برای پاسخگویی به مجهولات محققین علوم مختلف می‌دهد، باعث ارتقای تولید، افزایش کمی و کیفی متابولیت‌های ثانویه و کاهش ترکیبات سوء می‌شود. علاوه بر این، کشت بافت و سلول با فراهم کردن امکان دستورزی در سطوح عالی‌تر مهندسی ژنتیک همچون تراریختی و خاموشی ژن، زمان و بازده بهنژادی و ایجاد گیاهان برتر را بهبود می‌بخشد. این تحقیق به منظور بررسی قابلیت کشت بابونه آلمانی در شرایط کشت درون شیشه‌ای و همچنین تعیین تنظیم‌کننده‌های رشدی مناسب جهت کالوس‌دهی و ریشه‌زایی این گیاه در شرایط درون‌شیشه‌ای انجام گرفت.

مواد و روش‌ها:

website : www.agrobreedcongress.ir

این پژوهش در آزمایشگاه کشت بافت گروه اصلاح نباتات دانشگاه محقق اردبیلی انجام شد. بذور پس از ضدعفونی سطحی توسط الکل ۷۰٪ به مدت یک دقیقه و هیپوکلریت سدیم به مدت ۱۲ دقیقه روی محیط کشت پایه MS (۲) کشت شده و در اتاقک رشد با شرایط دمای ۳ ± ۲۵ درجه سانتی گراد و دوره نوری ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. بعد از جوانه‌زنی بذور و رشد مناسب گیاهچه‌ها، ریزنمونه‌های برگ و هیپوکوتیل تهیه و در محیط کشت MS حاوی سطوح مختلف NAA[1] (۰، ۰/۵، ۱/۵ mg/l) و کینتین (۰، ۱ mg/l) در داخل پتری‌دیش‌ها کشت شدند. زیرکشت ریزنمونه‌ها و کالوس‌های حاصل، هر ٤ هفته یکبار انجام گرفت. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با چهار تکرار انجام گرفت. صفات درصد ریزنمونه کالوس داده، وزن تر کالوس و تعداد کالوس‌های ریشه داده یادداشت شدند. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزارهای SPSS16.0 و MSTATC صورت گرفت.

نتایج و بحث:

ریزنمونه‌های برگ و هیپوکوتیل کشت شده در اکثر محیط‌های کشت پس از گذشت ۲-۳ هفته متورم شده و تولید کالوس نمودند. همچنین در برخی از محیط‌های کشت ریشه‌زایی مستقیم نیز مشاهده شد. برخی از کالوس‌ها نیز بعد از مدتی تولید ریشه نابجا نمودند (شکل ۱). براساس نتایج حاصل از تجزیه واریانس بین سطوح مختلف تیمارهای هورمونی NAA و کینتین و نوع ریزنمونه تفاوت معنی‌داری از نظر درصد کالوس‌زایی و وزن تر کالوس وجود داشت (جدول ۱). به طور کلی درصد کالوس‌زایی ریزنمونه هیپوکوتیل بیشتر از برگ بود. همچنین ریزنمونه‌های برگی در محیط‌های MS فاقد هورمون‌های گیاهی و حاوی NAA ۰/۵ mg/l بدون وجود کینتین کالوس تولید نکردند، در حالی‌که ریزنمونه هیپوکوتیل در این محیط‌های کشت درصد کالوس‌زایی بالایی نشان داد. این تفاوت در پاسخ کالوس‌زایی می تواند ناشی از تفاوت این ریزنمونه‌ها از نظر هورمون‌های داخلی باشد. بیشترین درصد کالوس‌زایی مربوط به محیط‌های حاوی هر دو نوع تنظیم‌کننده رشد گیاهی بوده است (۱). بالاترین وزن تر کالوس در ریز نمونه برگ (۳۹٤/۷ mg) و در ریز نمونه هیپوکوتیل (۲۹٦/۷ mg) در محیط کشت MS حاوی NAA ۰/۵ mg/l و Kin ۱ mg/l به دست آمد که به طور معنی‌داری بیشتر از سایر تیمارها بود (جدول ۲). اثر غلظت هورمون NAA بر ریشه‌زایی بابونه آلمانی نشان داد که این صفت به طور معنی‌داری تحت تاثیر غلظت NAA و کینتین قرار دارد (جدول۱). جدول۱- تجزیه واریانس کالوس‌زایی، وزن تر کالوس و ریشه‌زایی بابونه آلمانی در شرایط درون شیشه‌ای

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		درصد کالوس‌زایی	وزن تر کالوس	درصد ریشه‌زایی
NAA	۲	۱۰۳۷٦/۳٤٦**	۷۵۵۲۸/۲٤٤**	۳۰۹۵/۹۳۳*
کینتین	۱	٦٤۲۵/۸۷۸**	۲٤۰۳٤۸/۲۳۵**	۵٦۷۳/٦٤۰*
ریزنمونه	۱	۲۰٤۷۲/۰۳۷**	۱۱۰۵۳/۸۳۵ ns	۷۲/۸۷۸ ns
کینتین×NAA	۲	۲۷۰۰/٦۲٦**	۹۵٤۵۸/۵٤۷**	۲۰۷٦/۵۲٤ns
NAA×ریزنمونه	۲	۵۸۱۵/۵۷۰**	۹۵٦۵/٤٦٤ns	٤۸٦/۹۷۷ns
کینتین×ریزنمونه	۱	۳۸۲۳/۸۹۵**	۳۹۵۳۸/۲۷۱**	۱/۰٤۸ ns
کینتین×NAA×ریزنمونه	۲	۲۸۸۷/۳۱٤**	٤۳۳۳۰/۵٦۱**	۱۷۹۳/٤۸۳ ns
خطا	۳٦	۳۱/۲۸۹	٤۹۰٦/۵۸۵	۸٤۳/۹٤٤

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

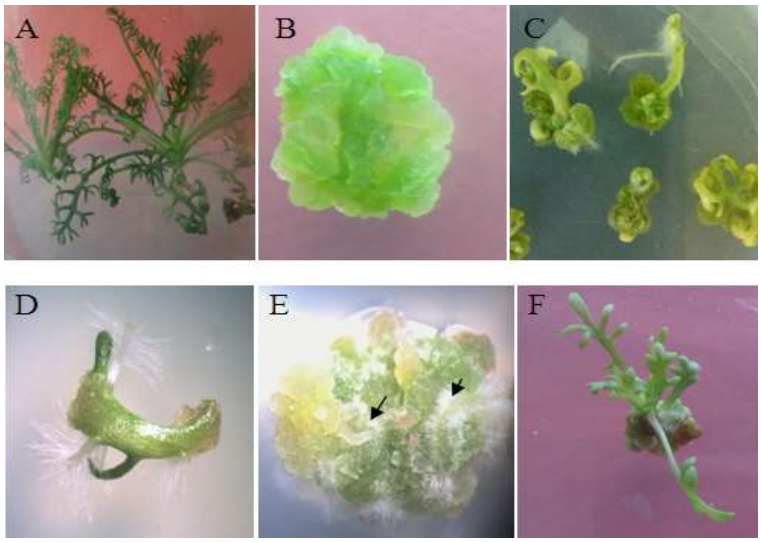
1- α-Naphthalenacetic acid

جدول۲- میانگین درصد کالوس‌زایی و وزن تر کالوس ریزنمونه‌های برگ و هیپوکوتیل بابونه آلمانی در سطوح مختلف هورمون‌های گیاهی

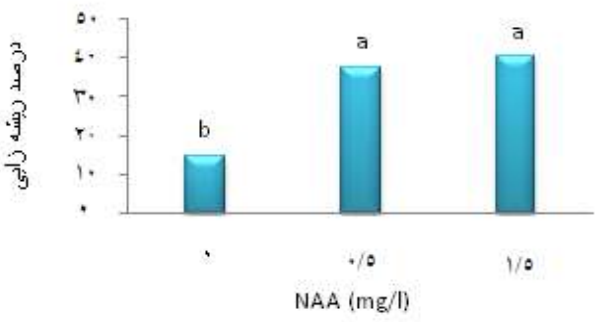
ریز نمونه	Kin (mg/l)	NAA (mg/l)	در صد کالوس‌زایی	وزن تر کالوس (mg)
	۰	۰	۰ d	۰ d
	۰	۰/۵	۰ d	۰ d
برگ	۰	۱/۵	۱۰۰ a	۲۶۷/۹۵۷ b
	۱	۰	۲۲/۹۷۵ c	۲۷۸/۴۴۳ b
	۱	۰/۵	۱۰۰ a	۳۹۴/۷۰۰ a
	۱	۱/۵	۱۰۰ a	۱۹۱/۵۸۹ bc
	۰	۰	۷۹/۹۶۴ b	۴۶/۱۵۲ d
	۰	۰/۵	۹۷/۵۰۰ a	۱۰۳/۰۶۱ cd
هیپوکوتیل	۰	۱/۵	۱۰۰ a	۱۹۹/۸۹۵ bc
	۱	۰	۹۹/۳۳ a	۵۹/۱۲۸ d
	۱	۰/۵	۱۰۰ a	۲۹۶/۱۰۳ ab
	۱	۱/۵	۱۰۰ a	۲۴۶/۲۴۷ b

حروف غیر مشترک نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ هستند.

بیشترین درصد ریشه‌زایی (۴۰/۰۸٪) در محیط کشت MS حاوی ۱/۵ mg/l NAA حاصل شد ولی اختلاف آن با ۰/۵ mg/l NAA معنی دار نبود (شکل ۲). همچنین ریشه‌زایی مستقیم در محیط‌هایی که فقط حاوی هورمون‌های NAA در غلظت ۰/۵ و ۱/۵ mg/l بودند مشاهده گردید (شکل۱ –D). ساقه‌زایی نابجا در محیط حاوی ۰/۵ mg/l NAA در ریزنمونه هیپوکوتیل و در محیط حاوی ۱/۵ mg/l NAA در ریز نمونه برگ مشاهده شد (شکل۱– F). گزارشی مبنی بر استفاده از ریز نمونه هیپوکوتیل برای کالوس‌زایی بابونه آلمانی در منابع یافت نشد. این تحقیق نشان داد که هیپوکوتیل بابونه آلمانی از پتانسیل کالوس‌زایی بالاتری نسبت به برگ برخوردار است.



شکل۱– A: گیاهچه بابونه آلمانی حاصل از بذر کشت شده در محیط کشت پایه MS، B: القاء کالوس از ریز نمونه هیپوکوتیل، C: القاء کالوس از ریزنمونه برگ D: ریشه‌زایی مستقیم از ریزنمونه برگ E: ریشه‌زایی غیرمستقیم از ریزنمونه هیپوکوتیل F: ساقه نابجا باززا شده از کالوس بابونه آلمانی



شکل۲- درصد ریشه‌زایی کالوس بابونه آلمانی در سطوح مختلف NAA

References:

1. Kintzios, S., Michaelakis, A., 1999. Induction of somatic embryogenesis and in vitro flowering form inflorescences of chamomile *(Chamomilla recutita* L.*).* Plant Cell Report. 18: 684-690.

2. Murashige, T., Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant, 15:473–476.

3. Salamon, I., 1992. Chamomile: A Medicimal Plant. The Herb, Spice, and Medicinal Plant Digest .10: 345-354.

4. Vaverková, S., Hollá, M., Mikulásová, M., Habán, M., Otepka, P., I. Vozár. 2008. Quantitative properties and content of essential oil in the flower head of *Anthemis tinctoria* L. ISHS Acta Horticulturae. I International Symposium on Chamomile Research, Development and Production. 31 August 2007. Presov, Slovk Republic. 749.