بهینه سازی تولید درون شیشه ای پینه گیاه دارویی بابونه (*Matricaria chamomilla* L.)

محمد مهدی جوکار، الهام سطوتی خرم *، علی مهراس مهرابی
گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمانشاه، کرمانشاه، ایران.
* نویسنده مسئول

چکیده

گیاه دارویی بابونه به دلیل داشتن خواص ضد عفونی کننده، ضد تشنج، ضد آلرژی وآرام بخشی و کاربردهای آرایشی یکی از مهمترین گیاهان دارویی شناخته شده و یکی از پر مصرف ترین آن ها در سراسر جهان است. لذا در این پژوهش جهت فراهم نمودن مقدمات اولیه کاربرد تکنیک های مختلف بیوتکنولوژیکی اقدام به بهینه سازی استقرار پینه در این گیاه دارویی با ارزش نمودیم. بدین جهت بذور بابونه را استریل و در محیط MS پایه بدون هورمون کشت گردیدند. پس از جوانه زدن از گیاهچه های استریل به دست آمده ریز نمونه برگ و ریشه تهیه شد و در قالب طرح آماری کاملاً تصادفی در محیط کشت MS با سطوح مختلف هورمونی شامل نفتالین استیک اسید (4 و 6 میکرومولار)، تو، فور- دی (4 و 6 میکرومولار) و بنزیل آدنین (2 و 4 میکرو مولار) کشت گردیدند. در طی کشت، صفاتی همچون تعداد پینه تولید شده در هر پتری، درصد پینه زایی، سرعت رشد پینه ها، درصد آلودگی، تعداد و درصد پینه های کلروزه و نکروزه مورد مطالعه قرار گرفته شد. نتایج بیانگر مناسبتر بودن ریز نمونه ریشه جهت تولید پینه در حجم مناسب بود. بهترین محیط کشت برای پینه زایی در ریز نمونه های ریشه محیط کشت MS حاوی 4 میکرومولار بنزیل آدنین و 4 میکرومولار توفور-دی بود. این در حالی بود که بهترین محیط کشت برای پینه زایی در ریز نمونه های برگ، محیط کشت MS حاوی 2 میکرومولار بنزیل آدنین و 4 میکرومولار نفتالین استیک اسید بود. بیشترین رشد پینه در ریزنمونه های برگ و ریشه در محیط کشت MS غنی شده با 4 میکرومولار نفتالین استیک و 2 میکرومولار بنزیل آدنین مشاهده گردید.

مقدمه

بابونه با نام علمی .Matricaria chamomilla L گیاهی یک یا چند ساله از خانواده Asteracea (کاسنی) می باشد. در حدود 40 گونه از این گیاه علفی در نقاط مختلف ایران می رویندکه عمدتاً دارای ارتفاعی کمتر از 50 سانتی متر می باشند. بابونه در بسیاری از نقاط ایران به صورت خودرو رشد نموده و در تعدادی از استانهای کشور هم به صورت زراعی کشت می گردد (صالحی، 1387). از نظر جغرافیایی مناطق وسیعی از ایران کم آب بوده و دارای خاک های شور و آهکی می باشد. لذا یکی از مهمترین چالش های پیش رو کشاورزی ایران در دهه های آینده زیر کشت بردن مناطق خشک و شور می باشد. در بین گیاهان مختلف، کشت گیاهان دارویی در مناطق ذکر شده به دلیل طبیعت وحشی و بکر امکان بیشتری داشته و از جنبه اقتصادی، ارز آوری فراوانی نیز در بر خواهد داشت. در بین گیاهان دارویی مختلف، بابونه به دلیل داشتن ترکیبات فلاونوئید، کومارین و تانن و خواص دارویی مختلف همچون ضد عفونی کننده، ضد تشنج، ضد آلرژی و آرام بخشی جایگاه ویژه ای دارد (زینلی، 1389). از آنجایی که امروزه با افزایش مصرف داروهای شیمیایی و بروز عوارض جانبی آن ها نیاز به جایگزینی گیاهان دارویی با داروهایی شیمیایی بیش از پیش احساس می شود، مطالعه و پژوهش بر روی گیاهان دارویی جهت توسعه کشت آن ها مسأله مهمی بوده و اولویت ویژه ای دارد. لذا در این پژوهش جهت فراهم نمودن مقدمات اولیه کاربرد تکنیک های مختلف بیوتکنولوژیکی اقدام به بهینه سازی استقرار پینه در این گیاه دارویی با ارزش نمودیم.

مواد و روش ها

بذر گیاه بابونه با نام علمی .Matricaria chamomilla L از موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع تهیه شد. سپس بذور در هیپوکلریت سدیم 5% به مدت بیست دقیقه و الکل 70% به مدت یک دقیقه قرار گرفته و ضد عفونی شدند و سپس در محیط MS پایه بدون هورمون با پنج تکرار در پتری کشت گردید. بذرهای کشت شده برای جوانه زدن درون ژرمیناتور قرار داده تا جوانه زده و به مرحلهٔ 10-20 برگی برسند. 35 تا 40 روز بعد از کشت، از برگ و ریشه گیاهچه های رشد کرده ریز نمونه استریل تهیه گردید.

جهت بهینه سازی تولید پینه، ریز نمونه هادر قالب طرح کاملاً تصادفی در پنج تکرار در محیط کشت MS غنی شده با سطوح مختلف هورمونی قرار داده شدند. به این منظور محیط کشت MS با سطوح مختلف نفتالین استیک اسید (4 و 6 میکرو مولار)، تو، فور- دی (4 و 6 میکرو مولار) و بنزیل آدنین (2 و 4 میکرو مولار) غنی گردیدند.

از آنجا که گیاه بابونه گیاه کند رشدی است، بازکشت در فواصل زمانی 2 ماهه انجام گرفت و صفاتی همچون تعداد پینه تولید شده در هر پتری، درصد پینه زایی، سرعت رشد پینه ها، درصد آلودگی، تعداد و درصد پینه های کلروزه و نکروزه مورد مطالعه قرار گرفتند.

اندازه گیری رشد پینه ها در فواصل زمانی ده روزه به مدت 40 روز صورت پذیرفت و قطر پینه ها طبق فرمول زیر محاسبه گردید:

مجذور عرض در طول پینه (بر حسب میلی متر) = قطر کالوس (میلی متر)

داده های با استفاده از نرم افزارMCTAT-Cتجزیه واریانسی کطرفه گردیده و میانگین های حاصله با استفاده از آزمون مقایسه میانگین چند دامنه ای دانکن مورد مقایسه قرار گرفتند.

نتایج و بحث

اگرچه پینه زایی در ریزنمونه های برگ مناسب بود لیکن نتایج این پژوهش بیانگر مناسبتر بودن ریز نمونه ریشه جهت تهیه پینه در حجم مناسب بود. بهترین محیط کشت برای پینه زایی در ریز نمونه های ریشه محیط کشت MS حاوی 4 میکرومولار بنزیل آدنین و 4 میکرومولار توفور-دی بود. این در حالی بود که بهترین محیط کشت برای پینه زایی در ریز نمونه های برگ، محیط کشت MS حاوی 2 میکرومولار بنزیل آدنین و 4 میکرومولار نفتالین استیک اسید بود. بیشترین رشد پینه در ریزنمونه های برگ نیز در محیط کشت MS غنی شده با 4 میکرومولار نفتالین استیک و 2 میکرومولار بنزیل آدنین و سپس در محیط کشت MS غنی شده با 6 میکرومولار نفتالین استیک و 2 میکرومولار بنزیل آدنین مشاهده گردید. این در حالی بود که کمترین میزان رشد در ریزنمونه های برگ در محیط کشت MS غنی شده با 6 میکرومولار توفور-دی و 2 میکرومولار بنزیل آدنین و 6 میکرومولار توفور-دی و 4 میکرومولار بنزیل آدنین مشاهده گردید. در ریزنمونه های حاصل از ریشه نیز بیشترین سرعت رشد پینه در محیط کشت MS حاوی 4 میکرومولار نفتالین استیک و 2 میکرومولار بنزیل آدنین مشاهده گردید. این در حالی بود که کمترین رشد پینه در ریزنمونه های ریشه در محیط کشت MS حاوی 6 میکرومولار توفور-دی و 4 میکرومولار بنزیل آدنین مشاهده گردید.

طبق بررسی های صورت گرفته با استفاده از پایگاه های علمی مختلف، تحقیقات کمی در خصوص کشت بافت و ریز افزایی گیاه بابونه صورت گرفته است. در خصوص ریزافزایی بابونه سلاروواو همکاران (1982) در تحقیقی به بررسی مورفولوژی پینه ها در گیاهان خانواده بابونه و بومادران پرداختند. آن ها در پژوهش خویش از سطوح مختلف کاینتین و نفتالین استیک اسید جهت ریزافزایی و باززایی ساقه گیاه مذکور استفاده نمودند و به این نتیجه رسیدند که ریزافزایی و باززایی بابونه در محیط های کشت حاوی نفتالین

استیک اسید با راندمان بیشتری صورت می گیرد. نتایج حاصل از تحقیق حاضر با یافته های سلاروواو و همکاران در خصوص مفید بودن حضور نفتالین استیک اسید بر تولید و رشد پینه از ریز نمونه های برگ همخوانی دارد. در تحقیق دیگری سینگ و همکاران (2011) در کشت بافت گیاه دارویی بابونه از برگ و ساقه به عنوان ریزنمونه استفاده نمودند. آن ها ریزنمونه ها را در محیط کشت MS قرار داده و از ریشه و ساقه گیاه بابونه پینه بدست آورده و دریافتند اسانس تولیدی توسط گیاهان باز زایی شده از هر دو ریز نمونه مشابه یکدیگر هستند. این در حالی است که یافته های این پژوهش بیانگر مناسبتر بودن ریزنمونه های ریشه برای تولید پینه می باشد. همچنین بر خلاف یافته های این پژوهش آنها مشاهده نمودند که بیشترین میزان رشد پینه در حضور تو فور-دی و کاینتین صورت می گیرد. آن ها همچنین از شیره نارگیل 10% بجای تو فور دی و کاینتین استفاده نمودند .

منابع

1. بقالیان، ح. و م ،نقد آبادی1379،گیاهان اسانسدار،نشر اندرز،برگردان.ص 138

2. زینلی ،ح، مظفریان،و، صفایی ،ل،دوازده امامی ،س و س، هوشمند 1389 بررسی تنوع مورفولوژی، فنولوژیکی و مقدار اسانس در بابونه آلمانی (Matricaria recutita)

3. صالحی سورقمی،م.1378،گیاهان دارویی و گیاه درمانی،به نشر انتشارات دنای تغذیه،ص 192.

4. Birsin, A.M. and M. Ozgen. (2004). A comparison of callus induction and plant regeneration from differentembryo explants of Triticale. Cellular and Molecular Biology Letters. 9:353-361.

5. Cellarova, E., K. Grelakova, M. Repoak and R. Honcariv. (1982) Morphogenesis in Callus Tissue Cultures of Some Matricaria and Achillea Species. Biologia Plantarum. 24 (6):430-433.

6. Errabii, T., C.B. Gandonou, M. Essalmani, J. Abrini, M. Idaomar and N. Skali-Senhagi (2006). Growth, proline and ion accumulation in sugarcane callus cultures under drought-induced osmotic stress and its subsequent relief. African Journal of Biotechnology. 5(16):1488-1493.

7. Singh, O., Z. Khanam, N. Misra and M.K. Srivastava. (2011) Pharmacognosy review online. 5(9):82-95.

In vitro callogenesis optimization of Chamomile (Matricaria chamomilla L.).

Mohammad Mahdi Jowkar, Elham Satvati Khoram* and Ali Mehras Mehrabi
Department of Agronomy and Plant Breeding, Collage of Agriculture, Kermanshah branch, Islamic Azad University, Kermanshah, I.R. Iran.
*Corresponding author

Abstract
Chamomile (Matricaria chamomilla L.) has many therapeutic applications and is one of the most consumed medicinal plants on earth. Therefore in order to endorse various biotechnological applications on it, we tried to optimize its callogenesis by this experiment. Chamomile seeds were sterilized and cultured on basic MS medium to obtain sterile explants. Root and leaf explants were seized and cultured in a completely randomized experimental design on MS medium supplemented with NAA (4, 6 µM), 2,4-D (4, 6 µM) and BA (2, 4 µM). Various parameters such as: infection, chlorotic and necrotic calli, initiated calli, callogenesis percentage and calli growth rate were studied. Results indicate leaf explants as the suitable explants type for chamomile callogenesis. Within leaf explants, MS medium supplemented with 4 µM NAA and 2 µM BA resulted in the best calli induction, callogenesis and calli growth. This was while within root explants, MS medium supplemented with 4 µM 2,4-D and 2 µM BA resulted in the best calli induction and callogenesis. The most callus growth of leaf and root explants were obtained on MS medium supplemented with 4 µM NAA and 2 µM BA.