دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی

باززایی اندام‌های هوایی گیاه دارویی بابونه شفاف (*Anthemis hyalina* DC.)

محمود ولی‌زاده

استادیار گروه کشاورزی دانشگاه پیام نور (نویسنده مسوول: valizadeh_mahmood@yahoo.com)

تاریخ دریافت: ۹۴/۸/۲۲ تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۰/۱۲

چکیده

بابونه شفاف یکی از گیاهان دارویی مهم بوده و به‌عنوان ضد آلرژی و همچنین درمان خارش‌های پوستی و آکنه مورد استفاده قرار می‌گیرد. تا کنون گزارشی در ارتباط با کشت درون شیشه این گونه وجود نداشته و این مطالعه با هدف دست‌یابی به تیمار هورمونی بهینه جهت باززایی اندام‌های هوایی برای نخستین بار انجام شده است. در تحقیق حاضر اثر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی NAA (۱/۵، ۰/۵، ۰/۱، ۰ میلی‌گرم در لیتر) و BA (۳، ۱، صفر میلی‌گرم در لیتر) بر القاء کالوس و باززایی اندام‌های هوایی در ریزنمونه‌های برگ و جنین نابالغ مورد بررسی قرار گرفته است. این تحقیق بصورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با چهار تکرار انجام شد. نتایج اثرات معنی‌دار تمام فاکتورهای اصلی و اثرات متقابل آن‌ها را در سطح ۰/۰۱ روی صفات اندازه گیری شده نشان دادند. بیشترین فراوانی باززایی اندام‌های هوایی در ریزنمونه برگ و تیمار هورمونی ۱ میلی‌گرم در لیتر BA مشاهده شد. در ریزنمونه جنین بهترین تیمار هورمونی برای باززایی اندام‌های هوایی ۳ میلی‌گرم در لیتر BA بود.

واژه‌های کلیدی: بابونه شفاف، القاء کالوس، باززایی اندام‌های هوایی، ریزنمونه جنین

مقدمه

بابونه شفاف (*Anthemis hyalina* DC.) به خانواده چتریان تعلق دارد. جنس آنتمیس[1] که شامل ۱۳۰ گونه می‌باشد، یکی از گیاهان گل‌دار ناحیه مدیترانه بوده، اما بعضی از گونه‌های آن در جنوب غرب آسیا و جنوب آفریقا یافت می‌شوند. در ایران حدود ۳۹ گونه وجود دارد که در بین آن‌ها ۱۵ گونه بومی ایران می‌باشند (۲۸،۲۳). تعدادی از گونه‌های این جنس در طب سنتی مورد استفاده قرار می‌گیرند (۴۷). بابونه معمولاً برای رفع دل درد و مشکلات دستگاه گوارش مورد استفاده قرار می‌گیرد. همچنین دارای اثرات ضد تورمی بوده و می‌تواند زمان بهبود زخم‌ها را کاهش دهد (۲۹). مطالعات قبلی اثر ضد میکروبی گونه‌های مختلف جنس آنتمیس را تأیید می‌کنند (۴۵). بابونه شفاف به‌عنوان ضد آلرژی و برای درمان خارش‌های پوستی و آکنه مورد استفاده قرار می‌گیرد (۲۱،۲۴). خواص ضد التهابی و مسکن اسانس *A. Nobilis* در موش نشان داده شده است (۳۶). گزارشاتی نیز در ارتباط با فعالیت‌های ضد میکروبی و لارو کشی اسانس گونه‌های *A. xylopoda* و *A. melampodina* وجود دارد (۱۱، ۴۵). ترکیبات اصلی موجود در عصاره بابونه شفاف کارواکرول[2] (٪ ۳۸/۴) و آلفا پینن[3] (٪ ۳۰/۹) می‌باشد (۳۹). ترکیب شیمیایی اسانس حاصل از برگ‌ها و گل‌های بابونه شفاف جمع‌آوری شده از استان قزوین توسط GC[4] و GC-MS[5] مورد آنالیز قرار گرفته است. سیس کریسانتمیل استات[6] (٪ ۱۴/۹ و ٪ ۱۷/۸)، کامفور[7] (٪ ۱۱/۶ و ٪ ۱/۷) و میرسن[8] (٪ ۳/۶ و ٪ ۱۶/۹) به‌ترتیب اصلی‌ترین ترکیبات اسانس گل‌ها و برگ‌ها بودند (۴۱). مطالعات فیتوشیمیایی تعدادی از گونه‌های آنتمیس منجر به جداسازی سزکوئی ترپن لاکتون‌ها[9] و فلاوونوئیدها شده است (۳،۲۰،۴۲). اسانس *A. nobilis* که تا ٪ ۱/۷۵ وزن خشک گل‌ها می‌رسد (۱۹)، شامل میزان بالایی از استرهای با وزن مولکولی پائین می‌باشد که سهم عمده‌ای از کل استرهای موجود در اسانس گیاه را تشکیل می‌دهد. اصلی‌ترین اجزای (٪ ۸۵) اسانس *A. nobilis* ترپن‌های هیدروکربنی[10]، ترپن‌های اکسید شده و استرهای اسید تری گلایسیک[11] و اسید آنجلیک[12] می‌باشد (۱۷). در منابع علمی گزارشاتی در مورد خواص دارویی این گونه از جمله خواص تسکین دهندگی بدلیل وجود استرها (۲۲)، ضد التهابی ناشی از فلاوونوئیدها[13] (۶،۱)، سزکوئی ترپن لاکتون‌ها (۱۲) و آزولن‌ها[14] (۱۴)، ضد انقباض و تشنج ناشی از آپین[15] و لوتئوساید[16] (۷)، فعالیت ضد باکتریایی بدلیل وجود سزکوئی ترپن لاکتون‌ها (۳۵) و سمیت سلولی بدلیل حضور نوبیلین[17] و مشتقات آن مثل ۱ و۱۰- اپوکسی نوبیلین[18] و ۳- دهیدرونوبیلین[19] (۱۷) وجود دارد. تجمع اسانس در *A. nobilis* به بخش‌های هوایی گیاه منحصر می‌باشد (۱۰،۹). اسانس *Chamomilla recutita* در غدد و سلول‌های ترشحی تجمع می‌یابد. ترپن‌ها و کومارین‌های[20] مختلف و همچنین اسیدهای فنولیک[21] که از مهمترین ترکیبات دارویی می‌باشند، در غدد ترشحی موجود در گل‌ها یافت می‌شوند (۳۱،۳۲،۳۳). سزکوئی ترپن هیدروکربنی چامازولن[22]، ترکیبی با ویژگی ضد التهابی بالا، در زمان تقطیر گل‌ها از ماتریسین[23] تولید می‌شود. همچنین عصاره *A. nobilis* در محصولات آرایشی، شامپوها، رنگ مو، خمیر دندان، کرم‌ها و ژل‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد (۳۷). تحقیقاتی در زمینه کشت بافت و ریزازدیادی گونه‌های مختلف بابونه با استفاده از ریزنمونه‌های مختلف صورت گرفته است. در اغلب این مطالعات از قطعات برگ و ساقه بعنوان ریزنمونه جهت القاء کالوس استفاده شده است. ریچلینگ و بکر (۳۰) مطالعه‌ای بر روی القاء کالوس در دو واریته بابونه با استفاده از محیط کشت MS تغییر یافته حاوی ۰/۴۵ میلی‌گرم در لیتر NAA انجام دادند. ریچلینگ و همکاران (۳۴) موفق به القاء کالوس در قطعات اندام‌های هوایی واریته BK2 در محیط کشت MS تغییر یافته حاوی ۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin شدند. پاسامونتی و همکاران (۲۵) یک پروتکل موفق را جهت القاء کالوس و ریز ازدیادی پنج واریته بابونه را با استفاده از محیط کشت MS حاوی ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۲/۴۷ میلی‌گرم در لیتر Kin ارائه دادند (۲۵). کنتزیوس و میخائیلاکیس (۱۹۹۹) القاء

1- Anthemis 2- Carvacrol 3- α-pinene 4- Gas chromatography 5- Gas chromatography mass spectrometry
6- Cis-chrysanthemyl acetate 7- Camphor 8- Myrcene 9- Sesquiterpene lactones
10-Hydrocarbonicterpenes 11- Triglicic acid 12- Angelic acid 13- Flavonoids 14- Azulenes
15-Apins 16- Luteoside 17- Nobilin 18- 1,10-epoxynobilin
19- 3-dehydronobilin 20- Coumarins 21- Phenolic acids 22- Chamazulene 23-Matricine

کالوس و جنین‌زایی را در محیط کشت MS حاوی ۴/۹۶ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۲/۴۷ میلی‌گرم در لیتر Kin گزارش دادند (۱۵). در مطالعه دیگری تشکیل جوانه‌های نابجا و ایجاد اندام‌های هوایی در ریزنمونه‌های برگ بابونه وحشی در محیط کشت MS حاوی ۰/۱۹ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۲۳ تا ۱ میلی‌گرم در لیتر BA گزارش شده است (۸). صیادی و همکاران (۴۲) اثر غلظت‌های مختلف اکسین را بر القاء کالوس و رشد آن در ریزنمونه‌های مختلف بابونه مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها دریافتند که تیمار۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۱ میلی‌گرم در لیتر Kin بهترین تیمار جهت القاء کالوس بود. گونه‌های مختلف بابونه بوسیله بذر تکثیر شده‌اند اما مقدار متابولیت ثانویه تولید شده کم بوده و تولید آن کارامد نیست (۲) و نیازمند نیروی انسانی و زمان زیادی است. کشت بافت گیاهی اغلب به‌عنوان یک روش مطمئن برای تولید متابولیت‌های ثانویه با ارزش مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۸). بنابراین مطالعه کشت بافت گیاهی جهت اصلاح نباتات و تولید و استخراج متابولیت‌های ثانویه از کشت سوسپانسیون ضروری است.

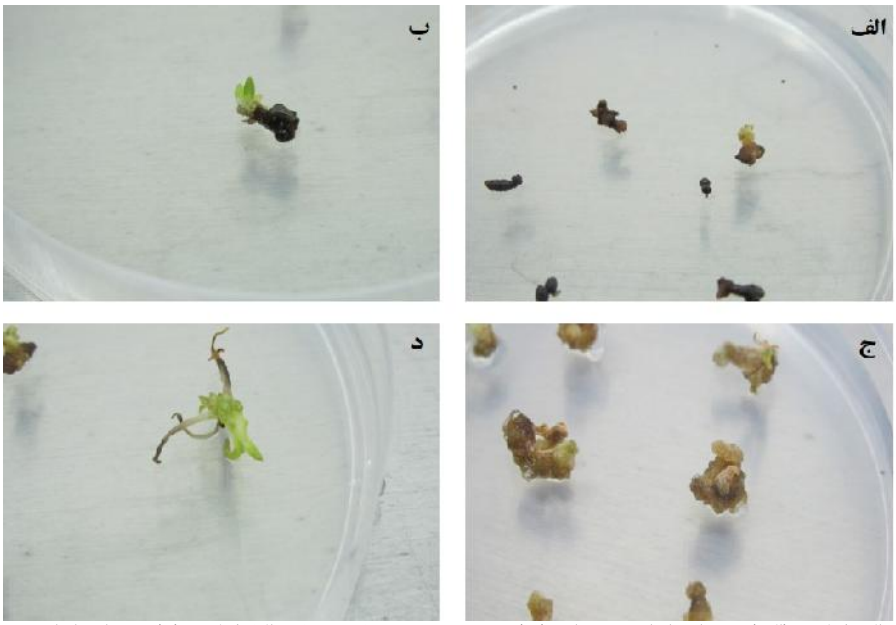
با توجه به اینکه تا کنون مطالعه‌ای بر روی کشت بافت بابونه شفاف (*Anthemis hyalina* DC.) صورت نگرفته است، این تحقیق با هدف بررسی اثر ریزنمونه‌ها و غلظت‌های هورمونی مختلف بر القاء کالوس و باززایی اندام‌های هوایی این گونه برای نخستین بار انجام شده است.

مواد و روش‌ها

بذور بابونه در محلول هیپوکلریت سدیم ۱/۵٪ (وزنی/حجمی) بمدت ۱۵ دقیقه ضدعفونی سطحی شده و سه بار با آب مقطر استریل شستشو داده شد. سپس بذرها به مدت یک هفته در محیط کشت MS پایه و در تاریکی کشت شدند. pH محیط کشت ۵/۸ تنظیم شد و محیط کشت با ۸٪ (وزنی/ حجمی) آگار جامد سازی شد. استریل کردن محیط کشت در دمای ۱۲۱°C بمدت ۱۵ دقیقه صورت گرفت. انتهای بذور با اسکالپل برش داده شده و جنین نابالغ با فشار بر وسط بذر خارج گردید و قسمت هیپوکوتیل آن و همچنین قطعات برگ حاصل از گیاهچه‌های استریل به‌عنوان ریزنمونه مورد استفاده قرار گرفتند. تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی NAA (۱/۵، ۰/۵، ۰/۱، صفر میلی‌گرم در لیتر) و BA (۳، ۱، صفر میلی‌گرم در لیتر) مورد استفاده قرار گرفتند. این تحقیق بصورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار انجام شد. ریزنمونه‌ها در پتری‌دیش‌های استریل حاوی ۲۵ میلی‌لیتر محیط کشت قرار داده شده و پس از مهر و موم با پارافیلم در دمای ۲۵ ±۲°C و فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی (۳۰ μ moles m^{-2} s^{-1}) و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. بعد از ۶-۴ هفته کالوس‌ها واکشت شده و در نهایت تعداد ریزنمونه‌هایی که در آن‌ها القاء کالوس و باززایی رخ داده شمارش گردید. آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS صورت گرفت. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن با احتمال خطای ۰/۰۱ انجام شد.

نتایج و بحث

آغاز القاء کالوس و باززایی اندام‌های هوایی در ریزنمونه جنین نابالغ بترتیب ۱۲ و ۴۸ روز پس از کشت و در تیمار هورمونی ۳ میلی‌گرم در لیتر رخ داد (شکل ۱- الف و ب). این وقایع در ریزنمونه برگ، بترتیب ۱۵ و ۹۰ روز بعد از کشت ریز نمونه‌ها و در تیمار هورمونی ۱ میلی‌گرم در لیتر رخ داد (شکل ۱- ج و د). نتایج به‌دست آمده تأثیر معنی‌دار تمام فاکتورهای اصلی و اثرات متقابل آن‌ها را در سطح ۰/۰۱ روی صفات اندازه‌گیری شده نشان دادند. اندازه کالوس‌ها در تیمارهای مختلف، متفاوت بود. به‌طور کلی رشد کالوس در تیمارهای فاقد سیتوکینین کم بود. بالاترین فراوانی القاء کالوس و باززایی اندام‌های هوایی در غلظت متوسط (۱ میلی‌گرم در لیتر) BA مشاهده شد (جدول ۱). در غلظت متوسط (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) NAA، بالاترین فراوانی القاء کالوس بدست آمد. در هر صورت حضور NAA اثر منفی بر باززایی اندام‌های هوایی داشت. ریز نمونه‌های جنین نابالغ و برگ به ترتیب دارای بیشترین فراوانی باززایی اندام‌های هوایی و القاء کالوس بودند (جدول ۱). در ارتباط با ریزنمونه جنین نابالغ، بالاترین فراوانی القاء کالوس در محیط کشت حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۱ میلی‌گرم در لیتر BA مشاهده شد. بهترین پاسخ از جهت باززایی اندام‌های هوایی در محیط کشت دارای ۱ میلی‌گرم در لیتر BA مشاهده شد (جدول ۲). در ریزنمونه برگ بالاترین فراوانی القاء کالوس در تیمار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۳ میلی‌گرم در لیتر BA بدست آمد. بیشترین باززایی اندام‌های هوایی در ۱ میلی‌گرم در لیتر BA رخ داد (جدول ۲).



شکل ۱- آغاز القاء کالوس (الف) و باززایی اندام‌های هوایی (ب) در ریزنمونه جنین بابونه شفاف. القاء کالوس (ج) و باززایی اندام‌های هوایی (د) در ریز نمونه برگ بابونه شفاف

Figure 1. Initiation of callus induction (a) and shoot regeneration (b) in embryo explant of *Anthemis hyalina* DC. Callus induction (c) and shoot regeneration (d) in leaf explant of *Anthemis hyalina* DC.

جدول ۱- مقایسه میانگین اثرات فاکتورهای اصلی بر تعداد ریزنمونه‌هایی که در آن‌ها القاء کالوس و باززایی رخ داده است

Table 1. Mean comparison of main factors effects on the number of explants with callus induction and regeneration

صفات	NAA (میلی‌گرم در لیتر)				BA (میلی‌گرم در لیتر)			ریزنمونه	
	۰	۰/۱	۰/۵	۱/۵	۰	۱	۳	برگ	جنین
کالوس	۲/۴۲^{d}	۳/۶۷^{c}	۴/۶۳^{a}	۴/۰۴^{b}	۱/۷۸^{b}	۴/۷۵^{a}	۴/۵۳^{a}	۳/۹۸^{a}	۳/۴۰^{b}
باززایی	۱/۵۸^{a}	۰/۰۰^{b}	۰/۰۰^{b}	۰/۰۰^{b}	۰/۰۰^{c}	۰/۷۵^{a}	۰/۴۴^{b}	۰/۱۹^{b}	۰/۶۰^{a}

در هر ستون حروف مشابه عدم تفاوت معنی‌دار را در آزمون چند دامنه ای دانکن با سطح احتمال۰/۰۱ نشان می‌دهد

مطالعاتی در زمینه اندام‌زایی در بسیاری از گونه‌های آنتمیس با استفاده از ریز نمونه‌های مختلف صورت گرفته است (۴). تا کنون هیچ گزارشی در مورد باززایی درون شیشه بابونه شفاف (*Anthemis hyalina* DC.) وجود ندارد. مطالعه حاضر اولین مورد در ارتباط با کشت بافت این گونه با استفاده از ریز نمونه‌های برگ و جنین می‌باشد. در این تحقیق اثر غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد NAA و BA بر روی القاء کالوس و باززایی اندام‌های هوایی مورد مطالعه قرار گرفت. پاسخ کشت‌ها به ترکیب هورمون‌های گیاهی و نوع ریزنمونه مورد استفاده بستگی دارد. القاء کالوس در اکثر تیمارهای هورمونی مشاهده شد. استفاده همزمان هورمون اکسین و سیتوکینن اثر بهتری نسبت به استفاده از اکسین تنها بر روی القاء کالوس داشت. از سوی دیگر هورمون NAA نقش بازدارنده باززایی را داشت. این نتایج با تعدادی از مطالعات قبلی در ارتباط با کشت بافت بابونه مطابقت دارد. ریچلینگ و بیدربک (۳۲) نشان دادند که اگر چه NAA یا 2,4-D معمولاً برای القاء کالوس مورد استفاده قرار می‌گیرند، افزودن کینتین برای رشد کالوس ضروری می‌باشد. پاسامونتی و همکاران (۲۵) سیتوکینین BA (در غلظت ۰/۶ میلی‌گرم در لیتر همراه با ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر NAA) را برای القاء کارامد کالوس از بذور بابونه مورد استفاده قرار دادند. همچنین ریچلینگ و بکر (۳۰) نشان دادند که ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA اثر منفی بر تمایز برگ و ساقه از ریز نمونه دارد. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت‌های NAA و BA بترتیب به ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر، رشد ریزنمونه‌ها و القاء کالوس افزایش یافته اما غلظت‌های بالاتر اثر مثبتی نداشته و حتی باعث کاهش تولید کالوس گردید. این مشاهدات با نتایج مطالعات دیگر نیز تطابق دارد (۳۱،۳۴). در این مطالعه از سیتوکینین BA برای باززایی اندام‌های هوایی در ریز نمونه‌های بابونه شفاف استفاده گردید. این هورمون به‌عنوان یک سیتوکینین مؤثر در باززایی گونه‌های مختلف خانواده چتریان ارزیابی شده است (۵،۱۳،۲۷،۳۸). BA احتمالاً پر کاربردترین و مطمئن‌ترین سیتوکینین برای ریز ازدیادی گیاهان است (۴۰،۴۴،۴۶) و کارایی آن در ریزازدیادی *Anthemis nobilis* با استفاده از کشت جوانه جانبی به اثبات رسیده است (۹). در مطالعه حاضر باززایی اندام‌های هوایی از ریزنمونه‌های برگ و جنین نابالغ بابونه شفاف (*Anthemis hyalina* DC.) مورد بررسی قرار گرفته است که می‌تواند برای تکثیر و تراریخت‌سازی این گیاه دارویی مهم مورد استفاده قرار گرفته و امکان تکثیر سریع کلون‌های انتخابی و افزایش تولید ترکیبات دارویی را با روش‌های مهندسی ژنتیک فراهم نماید.

جدول ۲- مقایسه میانگین اثرات متقابل نوع ریزنمونه و غلظت‌های مختلف هورمون بر القاء کالوس و باززایی ریزنمونه‌ها در بابونه شفاف

Table 2. Mean comparison of interactions between explant type and different concentrations of hormones on callus induction and regeneration of *Anthemis hyalina* DC.

غلظت BA (میلی‌گرم در لیتر)	ریزنمونه	غلظت NAA (میلی‌گرم در لیتر)	میانگین تعداد کالوس	میانگین تعداد نمونه باززایی شده
۰	جنین	۰	۰/۰۰^{d}	۰/۰۰^{c}
		۰/۱	۴/۲۵^{b}	۰/۰۰^{c}
		۰/۵	۴/۰۰^{b}	۰/۰۰^{c}
		۱/۵	۱/۲۵^{d}	۰/۰۰^{c}
	برگ	۰	۰/۰۰^{d}	۰/۰۰^{c}
		۰/۱	۱/۲۵^{d}	۰/۰۰^{c}
		۰/۵	۱/۰۰^{d}	۰/۰۰^{c}
		۱/۵	۲/۵۰^{c}	۰/۰۰^{c}
۱	جنین	۰	۳/۷۵^{b}	۳/۷۵^{a}
		۰/۱	۴/۰۰^{b}	۰/۰۰^{c}
		۰/۵	۶/۰۰^{a}	۰/۰۰^{c}
		۱/۵	۴/۲۵^{b}	۰/۰۰^{c}
	برگ	۰	۴/۲۵^{b}	۲/۲۵^{b}
		۰/۱	۴/۲۵^{b}	۰/۰۰^{c}
		۰/۵	۶/۷۵^{a}	۰/۰۰^{c}
		۱/۵	۴/۷۵^{b}	۰/۰۰^{c}
۳	جنین	۰	۳/۵۰^{c}	۳/۵۰^{a}
		۰/۱	۲/۷۵^{c}	۰/۰۰^{c}
		۰/۵	۲/۲۵^{c}	۰/۰۰^{c}
		۱/۵	۴/۷۵^{b}	۰/۰۰^{c}
	برگ	۰	۳/۰۰^{c}	۰/۰۰^{c}
		۰/۱	۵/۵۰^{a}	۰/۰۰^{c}
		۰/۵	۷/۷۵^{a}	۰/۰۰^{c}
		۱/۵	۶/۷۵^{a}	۰/۰۰^{c}

درهر ستون حروف مشابه عدم تفاوت معنی‌دار را در آزمون چند دامنه‌ای دانکن با سطح احتمال ۰/۰۱ نشان می‌دهد.

منابع

1. Achterrath-Tuckermann, U., R. Kunde, E. Flaskamp, O. Isaac and K. Thiemer. 1980. Pharmacological investigations with compounds of chamomile. V. Investigations on the spasmolytic effect of compounds of chamomile and Kamillosan on the isolated guinea pig ileum. Planta medica, 39: 38-50.
2. Azizi, M. 2006. Study of four improved cultivars of *Matricaria chamomilla* L in climatic condition of Iran. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants. 22: 4.
3. Celik, S., S. Rosselli, A.M. Maggio, R.A. Raccuglia, I. Uysal, W. Kisiel and M. Bruno. 2005. Sesquiterpene lactones from *Anthemis wiedemanniana*. Biochemical systematics and ecology, 33: 952-956.
4. Dasilva, J.A.T. 2004. Anthemideae: advances in tissue culture, genetics and transgenic biotechnology. African Journal of Biotechnology, 2: 547-556.
5. Dalia, E. and R. Moshe. 2004. Micropropagation of *Achillea filipendulina*cv 'Parker'. Plant Cell Tiss Org., 79: 91-93.
6. Della Loggia, R., A. Tubaro, P. Dri, C. Zilli and P. Del Negro. 1986. The role of flavonoids in the anti-inflammatory activity of *Chamomilla recutita*. In Plant Flavonoids in Biology and Medicine, Buffalo, 22-26.
7. Duke, A. 1987. Handbook of medicinal herbs. CRC Press. Boca Raton. 111 pp.
8. 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.
9. Fauconnier, M.L., M. Jaziri, J. Homes, K. Shimomura and M. Marlier. 1996. *Anthemis nobilis* L. (Roman Chamomile): *In vitro* culture, micropropagation, and the production of essential oils. In Medicinal and aromatic plants. 16-37.
10. Fauconnier, M.L., M. Jaziri, M. Marlier, J. Roggemans, J.P. Wathelet, G. Lognay and K. Shimomura. 1993. Essential oil production by (*Anthemis nobilis* L.) tissue culture. Journal of plant physiology, 141: 759-761.
11. Grace, M.H. 2002. Chemical composition and biological activity of the volatiles of *Anthemis melampodina* and *Pluchea dioscoridis*. Phytotherapy Research, 16: 183-185.
12. Hall, I.H., K.H. Lee, C.O. Starnes, Y. Sumida, R.Y. Wu, T.G. Waddell and K.G. Gerhart. 1979. Anti-inflammatory activity of sesquiterpene lactones and related compounds. Journal of Pharmaceutical Sciences, 68: 537-542.
13. Hammatt, N. and P.K. Evans. 1985. The *in vitro* propagation of an endangered species: *Centaurea junoniana* Svent. (Compositae). Journal of horticultural science, 60: 93-97.
14. Issac, O. and G. Kristen. 1980. Alte und neue Wege der Kamillentherapie Die Kamille als Beispiel flir moderne Arzneipflanzen-Forschung. Med. Welt. 31: 1145-1149.
15. Kintzios, S. and A. Michaelakis. 1999. Induction of somatic embryogenesis and *in vitro* flowering from inflorescences of chamomile (*Chamomilla recutita* L.). Plant cell reports, 18: 684-690.
16. Kintzios, S., C. Manos and O. Makri. 1999. Somatic embryogenesis from mature leaves of rose (Rosa sp.). Plant Cell Reports, 18: 467-472.
17. Leung, A.Y. 1980. Encyclopedia of common natural ingredients used in foods, drugs and cosmetics. John Wiley, New York, 110-112 pp.

18. Lipskv, A.K. 1992. Problems of optimization of plant cell culture processes. Journal of biotechnology, 26: 83-97.
19. Martindale, J. and J.E.F. Reynolds. 1982. The extra pharmacopeia 28th edition. The Pharmaceutical Press, London. 688 pp.
20. Masterova, I., Z. Grancaiova, V. Suchy, D. Grancai and K. Ubik. 1993. Phenolic substances in flowers of *Anthemis tinctoria*. Fitoterapia, 64: 277.
21. McKay, D.L. and J.B. Blumberg. 2006. A review of the bioactivity and potential health benefits of peppermint tea (*Mentha piperita* L.). Phytotherapy Research, 20: 619-633.
22. Melegari, M., A. Albasini, P. Pecorari, G. Vampa, M. Rinaldi, T. Rossi and A. Bianchi. 1988. Chemical characteristics and pharmacological properties of the essential oils of *Anthemis nobilis*. Fitoterapia, 59: 449-455.
23. Mozaffarian, V. 1996. A dictionary of Iranian plant names: Latin, English, Persian. Farhang Mo'aser, 59:169.
24. Nirr, B. 2003. Herbs cultivation and their utilization. Asia Pacific Business Press Inc Delhi, 522 pp.
25. Passamonti, F., E. Piccioni, A. Standardi and F. Veronesi. 1997. May. Micropropagation of *Chamomilla recutita* (L.) Rauschert. In Symposium on Plant Biotechnology as a tool for the Exploitation of Mountain Lands. 457: 303-310.
26. Passamonti, F., E. Piccioni, A. Standardi and F. Veronesi. 1998. Micropropagation of *Chamomilla recutita* (L) Rauschert. Acta. Hortic, 457: 303-309.
27. Pratibha, M. and S.K. Datta. 2001. Direct differentiation of shoot buds in leaf segments of white marigold (*Tageteserecta* L.). *In Vitro* Cell Dev, 37: 466-470.
28. Rechinger, K.H. 1980. Anthemis, Achillea, Cichorium, In: Flora Iranica, Compositae, Rechinger, K.H., Hedge, I.C. (eds) Akademische Druck and Verlagsansalt. 57: 45-48.
29. Reddy, K.K., L. Grossman and G.S. Rogers. 2013. Common complementary and alternative therapies with potential use in dermatologic surgery: risks and benefits. Journal of the American Academy of Dermatology, 68: 127-135.
30. Reichling, J. and H. Becker. 1976. Callus culturen von *Matricaria chamomilla*. J. Planta Med, 30: 258-268.
31. Reichling, J., H. Becker, J. Exner and P.D. Dräger. 1979. Verglecichende Untersuchungen verschiedener handelsmuster von *Matricariae flos*. Pharm Z. 124: 1998-2005.
32. Reichling, J. and R. Beiderbeck. 1991. *Chamomilla recutita* (L.) Rauschert (Camomile): *in vitro* culture and the production of secondary metabolites. In Medicinal and Aromatic Plants III. 156-175 pp.
33. Reichling, J., R. Beiderbeck and H. Becker. 1979. Vergleichende Untersuchungen uber sekundare Inhaltsstoffe bei Pflanzentumoren, Blute, Kraut und Wurzel von *Matricaria chamomilla* L. Planta medica, 36: 322-332.
34. Reichling, J., W. Bisson and H. Becker. 1984. Vergleichende Untersuchungen zur Bildung und Akkumulation von etherischem Öl in der intakten Pflanze und in der Calluskultur von *Matricaria chamomilla*. Planta Med. 56: 334-337.
35. Rodriguez, E., G.H.N. Towers and J.C. Mitchell. 1979. Biological activities of sesquiterpene lactones. Phytochemistry, 15: 1573-1580
36. Rossi, T., M. Melegari, A. Bianchi, A. Albasini and G. Vampa. 1988. Sedative, anti-inflammatory and anti-diuretic effects induced in rats by essential oils of varieties of *Anthemis nobilis*: a comparative study. Pharmacological research communications, 20: 71-74.
37. Rovesti, P., U. Boni and G. Patri. 1983. Le Erbe Fabbri SpA, 142-145 pp.
38. Ruffoni, B. and F. Massabo. 1991. Tissue culture in *Gerbera jamesonii* hybrid. Acta Hort. 289: 147-148.
39. Rustaiyan, A., S. Masoudi, L. Ezatpour, E. Danaii, M. Taherkhani and Z. Aghajani. 2011. Composition of the Essential Oils of *Anthemis hyalina* DC. *Achillea Nobilis* L. and *Cichorium intybus* L. Three Asteraceae Herbs Growing Wild in Iran. Journal of Essential Oil Bearing Plants, 14: 472-480.
40. Sadeghian, S., G.A. Ranjbar and S.K. Kazemitabar. 2014. Consideration and Selection of Suitable Hormonal Composition for in vitroShoot Regeneration and Propagation of *Ocimum basilicum* L. Journal of Crop Breeding, 6: 40-48 (In Persian).
41. Sajjadi, S.E. and J. Mehregan. 2006. Volatile constituents of flowers and leaves of *Anthemis hyalina*. Chemistry of natural compounds, 42: 531-533.
42. Saroglou, V., A. Karioti, J. Heilmann, Z. Kypriotakis and H. Skaltsa 2007. Sesquiterpene lactones from *Anthemis melanolepis*. Helvetica chimica acta, 90: 171-175.
43. Savadi, V., A.A. Mehrabi, M. Saidi and K. Nourollahi. 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: 206-211.
44. Stefaan, P., O. Werbrouck and P.C. Debergh. 1994. Applied aspects of plant regeneration. Plant Cell Culture: A Practical Approach. Oxford University Press, 127-145.
45. Uzel, A., A. Guvensen and F. Cetin. 2004. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Anthemis xylopoda* O. Schwarz from Turkey. Journal of ethnopharmacology, 95: 151-154.
46. Zamanifar, M., F. Nazarian and A. Ismaili. 2015. Comparative Study of two Different Cytokinins on Direct Regeneration of Different Sugar beet Explants in Tissue Culture Condition. Journal of Crop Breeding, 8: 203-208 (In Persian).
47. Zargari, A. 1989. Medicinal Plants Vol 3. Tehran University Publications, 117-126 pp.

In vitro Shoot Regeneration of Medicinal Plant *Anthemis hyalina* DC.

Mahmood Valizadeh

Assistant Professor, Department of Agriculture, Payame Noor University
(Corresponding author: valizadeh_mahmood@yahoo.com)
Received: November 13, 2015 Accepted: February 29, 2016

Abstract

Anthemis hyalina DC. is one of the most important herbal medicine plants and is used for anti-allergy and curing skin rashes or acne. To date there is no report for *in vitro* culture of this species and the present study was performed for the first time with the aim of obtaining the optimized treatment for shoot regeneration. In this research the effect of different plant growth regulators NAA (0, 0.1, 0.5, 1.5 mg L^{-1}) and BA (0, 1, 3 mg L^{-1}) on callus induction and shoot regeneration in leaf and immature embryo explants was investigated. This experiment has been carried out as factorial in a completely randomized design with four replications. The results showed the significant effects of all main factors and interactions on measured traits in 0.01 probability level. The highest frequency of shoot regeneration for leaf explant was observed on the medium containing 1 mg L^{-1} BA. In embryo explant the best treatment for shoot regeneration was 3 mg L^{-1} BA.

Keywords: Chamomile, Callus induction, Embryo explant, Shoot regeneration