فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران
جلد ۱۵، شمارهٔ ٤، صفحهٔ ۳٤۸-۳۳٦ (۱۳۸٦)

مطالعه کشت بافت گیاه بومادران هزاربرگ *Achillea millefolium* L.

فیروزه چلبیان[۱]، نوشین راجعیان[۱] و مریم پیوندی[۱]
۱- دانشگاه آزاد واحد تهران شمال، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی، E-mail:Chalabian1969@yahoo.com

چکیده

در این پژوهش، کشت درون شیشه‌ای گیاه بومادران هزاربرگ در محیط کشت پایه MS با استفاده از هورمونهای BA, IAA, Kin, NAA و 2,4-D بررسی شد. از قطعات مختلف گیاه طبیعی و دانه‌رستهای رشد یافته در محیط کشت فاقد هورمون، به‌عنوان جداکشت استفاده گردید. بهترین محیط کشت از بین محیط کشتهای فوق جهت کالزایی، از نظر اندازه و پایداری کالها، محیط کشت دارای NAA ۱ mg/l و Kin ۲ mg/l تشخیص داده شد. مریستم رأسی دانه‌رست در محیط کشت دارای IAA ۱ mg/l و BA ۲ mg/l پس از تشکیل کال، اندامهای هوایی تولید کرد. جداکشت برگ در محیط کشت دارای هورمونهای IAA ۱ mg/l و BA ۲ mg/l و در محیط کشت دارای IAA ۲ mg/l و BA ۱ mg/l بعد از کالزایی اندامهای هوایی را تشکیل داد. مریستم رأسی دانه‌رست در محیط کشت دارای BA ۱ میلی‌گرم در لیتر پس از تشکیل کال، اندامهای هوایی را تشکیل داد که با انتقال آن به محیط کشت دارای IBA به غلظت ۲ mg/l تشکیل ریشه نیز صورت گرفت. بر اساس نتایج بدست آمده، این محیط کشت دارای هورمون جهت تکثیر و تشکیل گیاه کامل از جداکشت مریستم رأسی گیاه بومادران هزاربرگ بهترین محیط نسبت به محیط کشتهای دیگر محسوب می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: بومادران هزاربرگ (*Achillea millefolium* L.)، کشت‌بافت، تکثیر و مریستم.

مقدمه

گیاه بومادران هزاربرگ (*Achillea millefolium* L.) از راسته Asteral، تیره Asteracea جنس بومادران *Achillea* است. این گیاه علفی و پایا، بومی اروپا و آسیاست (Giorgi *et al.*, 2005). انتشار این گونه در ایران در ارتفاعات البرز، دماوند و پلور، گچسر، پل زنگوله و کندوان، آذربایجان، ارومیه و تبریز گزارش شده است. گیاه بومادران هزاربرگ، دارای ساقه‌ای مستقیم است که ارتفاع آن ۵۰-۳۰ سانتیمتر می‌باشد (قهرمان، ۱۳٦۵). برگها شانه‌ای به رنگ سبز تیره بوده و برشهای ظریفی دارند (سعیدی، ۱۳۸۲). این برگها پوشیده از کرکهای روی هم خوابیده و دارای راشی کامل که در قسمت میانه و پایین به یک شکل هستند (قهرمان، ۱۳٦۵). ساقه و دمبرگها با کرکهای ریز و سفیدی پوشیده شده‌اند. در سرتاسر فصل تابستان، گلهای کوچک سفید رنگ و بی‌شماری، به صورت گل‌آذین دیهیم ظاهر می‌شوند (شکل ۱). قسمتهای مورد استفاده گیاه بومادران هزاربرگ، سرشاخه گل‌دار و برگ آن است که طعم تلخ و بوی قوی دارند (زرگری، ۱۳۷۲). به دلیل داشتن ترکیباتی نظیر آلکالوئید، اسانس روغنی، فلاونوئید، تانن و غیره، (Teixeira *et al.*, 2003; Ballabh &Chaurasia 2007) دارای خواص دارویی می‌باشد. این گیاه التیام دهنده زخمها، از بین برنده

سوء هضمهای ناشی از نفخ و بـه علـت دارا بـودن تـانن، برطرف کننده خستگی عمومی و ضـعف قلـب مـی‌باشـد (زرگری،۱۳۷۲). گیاه بومـادران بـه دلیـل داشـتن اسـانس روغنـی دارای خـواص ضـد بـاکتری مـی‌باشـد (Vasinauskiene *et al*., 2006). این گیاه در درمان دیابت (Saad *et al*., 2005)، افـزایش ادرار و انعقـاد خـون (Pieroni & Quave, 2005) اسـتفاده مـی‌شـود. همچنـین به‌عنوان از بین‌برنده درد، ضد تشـنج، قـابض، ملـین و در درمان بواسیر استفاده می‌گردد (Teixeire *et al*., 2003). با توجه به خواص دارویی گیاه بومادران هزاربـرگ، در ایـن تحقیق از جداکشتهای برگ، دمبرگ، مریستم رأسـی گیـاه طبیعی و برگ، دمبرگ، برگ لپه‌ای، مریستم رأسی و ریشه جدا شده از دانه رست‌های رشـد یافتـه در محـیط کشـت پایه MS با تیمارهای مختلف هورمونی جهت کشت‌بافـت و تکثیـر گیـاه بومـادران اسـتفاده شـد. مطالعـه تاریخچـه کشت‌بافت گیاه بومادران نشان داد که کشت‌بافت بومادران هزاربرگ تنها در یک مـورد توسـط Cristina و همکـاران (۱۹۹۱) بر روی هیپوکوتیل بومادران هزاربـرگ در محـیط کشت B5 دارای 2,4-D با غلظت ۱/۵ میلی‌گرم در لیتـر و Kin به میزان ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر صورت گرفته است که نتیجه آن تنها تشکیل کال شکننده بوده است. از این محیط کشت جهت کشتهای سوسپانسـیون سـلولی نیـز اسـتفاده نمودند. شرایط رشد کشتها را در نور یـا تـاریکی دائـم و تغییر عوامـل مختلـف ماننـد محـیط کشـت پایـه، تنظـیم کننده‌های رشد و غلظت قند در نظر گرفتند و تغییر میـزان نیتروژن و عناصر مختلـف را بـر رشـد سـلولی بومـادران هزاربرگ بررسی کردند. شرایط بهینه بدست آمـده توسـط این محققان محیط کشت B5 دارای 2,4-D با غلظـت ۱/۵ میلـی‌گـرم در لیتـر و Kin (۰/۱ میلـی‌گـرم در لیتـر)، NH_4^+ / NO_3^- بـا غلظـت mM ۳۰ و ۲٪ سـاکارز در تاریکی، اعلام شده است که در این شرایط در مـدت ٤۰-۳۵ ساعت، میزان سوسپانسیون سلولی دو برابر شـده بـود. Wawrosch و همکاران (۱۹۹٤) بر روی ریزازدیادی گیـاه *Achillea asplenifolia* تحقیق کردند. آنها از طریق کشت جداکشتهای گره‌ای گیاهان بالغ در محـیط کشـت MS بـا سـیتوکینینهای مختلـف بـه تکثیـر گیـاه *Achillea asplenifolia* دست یافتند. بهترین تکثیر در محیط کشـت دارای هورمـون N-benzyl– 9-(2-tetrahydropyranyl) adenine با غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر حاصل شده اسـت. ساقه‌ها در محیط کشت بدون هورمون به آسانی ریشـه‌دار شدند. Evenor و Reuveni (۲۰۰٤) بر روی ریزازدیـادی *Achillea filipendulina* از طریق مریستم رأسی تحقیـق نمودند. بهترین شرایط کشتی که منجر بـه بـاززایی تعـداد زیادی ساقه گردید، محـیط کشـت نمکـی MS دارای ۳٪ ساکارز و IAA (۱ میلی‌گرم در لیتر) و BA (۲ میلـی‌گـرم در لیتر) تحت ۱٦ ساعت نور فلورسنت بـود. ریشـه‌زایـی گیاه *Achillea filipendulina* پس از سازش با محـیط در مدت کوتاهی بعد از تکثیر در محیط کشت مذکور به طور مؤفقیـت‌آمیـزی صـورت گرفـت. Echeverrigaray و همکاران (۲۰۰۰) بر روی تکثیـر گیـاه *Anthemis nobilis* (گونه نزدیک به بومادران هزاربـرگ) از طریـق کشـت در شیشه جداکشت برگ در محیط کشت MS دارای BA بـا غلظت ٤/۵-۱ میکرومـول و NAA ۱ میکرومـول تحقیـق کردند و به تکثیر ساقه در محیط مورد نظر دسـت یافتنـد، در محیط کشت MS دارای BA ۲/۲۵ میکرومـول و IAA ۰/٦ میکرومول تعداد بیشتری ساقه بدست آمـد و پـس از انتقال به محـیط کشـت MS دارای IBA ۰/۵ میکرومـول ریشه‌زایـی صـورت گرفـت. بـر اسـاس مطالعـه Wildi و

همکاران (۱۹۹۸) بر روی ریزازدیادی *Petasites hybridus* (Asteraceae) باززایی ساقه از جداکشتهای برگ و دمبرگ طی دو مرحله کشت در محیط کشت MS دارای BA با غلظت ۱۷/٦ wm و NAA با غلظت ۰/٥٤wm صورت گرفت. بعد از ۵ هفته، ٤۰٪ از جداکشتهای دمبرگ و ۲۷٪ از جداکشت‌های برگ شاخه ایجاد کردند.

شکل ۱- بومادران هزاربرگ (*Achillea millefolium*)

مواد و روشها

در این بررسی از محیط کشت پایه MS با شش ترکیب هورمونی زیر استفاده شد:

الف: 2,4-D (با غلظتهای ۲، ٤ و ۸ میلی‌گرم در لیتر) و Kin (با غلظتهای ۱، ۲، ٤ و ۸ میلی‌گرم در لیتر)

ب: NAA (با غلظتهای ۱، ۲ و ٤ میلی‌گرم در لیتر) و Kin (با غلظتهای ۱، ۲، ٤ و ۸ میلی‌گرم در لیتر)

ج: IAA (با غلظتهای ۱، ۲، ٤ و ۸ میلی‌گرم در لیتر) و BA (با غلظتهای ۱، ۲ و ٤ میلی‌گرم در لیتر)

د: BA (با غلظتهای ۱، ۲ و ٤ میلی‌گرم در لیتر)

ه: NAA (با غلظتهای ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر)

و: IBA (با غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر)

محیط‌های کشت در اتوکلاو و در فشار ۱/۰۵ کیلوگرم بر سانتیمتر مربع و ۱۳۰ درجه سانتیگراد به مدت ۲۵ دقیقه سترون شدند. پس از سرد شدن محیط تا ٤۰ درجه سانتیگراد، محیط‌ها در زیر دستگاه لامینار ایرفلو کابینت به شیشه‌های سترون مخصوص کشت، منتقل شدند. برای سترون کردن وسایلی مانند پنس، اسکالپل، ظرفهای شیشه‌ای، از آون (oven) با دمای ۲۰۰ درجه سانتیگراد به مدت ۲ ساعت (احسان پور و امینی، ۱۳۸۲؛ حسندخت و ابراهیمی، ۱۳۸۵) و جهت سترون نمودن شیشه‌های مخصوص کشت با درب پلاستیکی (با قابلیت عبور نور) و آب مقطر، از اتوکلاو استفاده شد. بذرهای گیاه بومادران از گلهای مسن تهیه و با هورمون جیبرلین (GA) ۰/۱٦ گرم در لیتر به مدت ۲٤ ساعت تیمار شدند و پس از سترون سازی بر روی محیط کشت MS بدون هورمون کشت شدند. سترون سازی بذرها به روش زیر صورت گرفت: اتانل ۷۰٪ به مدت ۱ دقیقه، هیپوکلریت سدیم ۳٪ به مدت ۲۰ دقیقه و شستشو با آب مقطر سترون به مدت ۲ دقیقه (Saxena *et al.*, 2000). پس از رویش دانه‌رست‌ها، جداکشتهای برگ،

دمبرگ، مریستم رویشی، برگ لپه‌ای و ریشه آنها جهت کشت استفاده گردید. قطعات برگ، دمبرگ و مریستم رویشی گیاه طبیعی به روش زیر سترون سازی و کشت گردید: ۱) شستشو با پاک‌کننده‌های متداول به مدت ۲ دقیقه و شستشو با آب جاری، ۲) قرار دادن در اتانل ۷۰٪ به مدت ۲ دقیقه، ۳) کاربرد هیپوکلریت سدیم ۳۰٪ به مدت ۱۰ دقیقه، ٤) شستشو در آب مقطر سترون به مدت ۲ دقیقه (Saxena *et al.*, 2000). قطعات سترون شده به محیط‌های کشت یاد شده در بالا منتقل و در شرایط بهینه با درجه حرارت ۲۵ درجه سانتیگراد و دوره نوری ۱٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفتند. از هورمونهای NAA با غلظتهای ۱ و۲ میلی‌گرم در لیتر و IBA (ایندول-۳- بوتیریک اسید) با غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر جهت ریشه‌زایی استفاده گردید. از طرح بلوکهای کامل تصادفی با ٤ تکرار و در هر تکرار از ٤ نمونه استفاده شد. جهت بررسی بیشتر و تجزیه و تحلیل آماری نتایج حاصل از کشت‌بافت و اندام‌زایی گیاه بومادران هزاربرگ از نرم افزار SPSS، استفاده گردید. نمودارها به روش Excel رسم شدند.

نتایج

با توجه به شش تیمار هورمونی یاد شده در قسمت مواد و روشها، نتایج حاصل از کشت جداکشتهای مختلف گیاه بومادران هزاربرگ به شرح زیر می‌باشد:

قطعات برگ و دمبرگ در محیط کشت دارای 2,4-D در سه غلظت ۲، ٤ و ۸ میلی‌گرم در لیتر و Kin با غلظت ثابت ۲ میلی‌گرم در لیتر کالزایی کردند، اما کالوسهای تشکیل شده بعد از ٤-۲ روز قهوه‌ای شده، از بین رفتند. جداکشت برگ در محیط کشت دارای NAA ۲ میلی‌گرم در لیتر و Kin ۱ میلی‌گرم در لیتر، بعد از ۱۰ روز کالزایی کرد و کالوسهای قهوه‌ای به مدت طولانی در محیط بدون تغییر باقی ماندند (شکل A-۲) و (شکل ۱۰). جداکشت مریستم رأسی در این محیط بعد از پنج روز کالزایی کرد، اما کالها پس از قهوه‌ای شدن از بین رفتند (شکل B-۲).

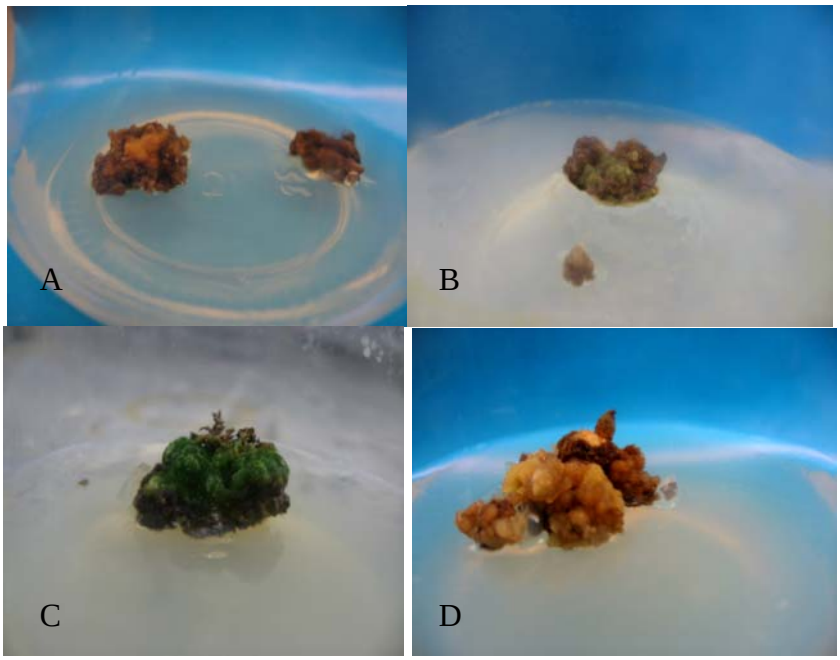
B A

شکل۲- (A) تشکیل کال از جداکشت برگ گیاه بومادران هزاربرگ در محیط کشت دارای NAA ۲ میلی‌گرم در لیتر و Kin ۱ میلی‌گرم در لیتر، (B) تشکیل کال از جداکشت مریستم رأسی، (A و B) با مقیاس ۱

در محیط کشت دارای NAA ۲ میلی‌گرم در لیتر و Kin ۲ میلی‌گرم در لیتر، قطعات برگی بعد از گذشت ۷ روز کالزایی کردند، اما کالها پس از سیاه شدن از بین رفتند (شکل۳) و (شکل ۱۰). قطعات دمبرگی در این محیط کشت واکنشی نشان ندادند (شکل ۱۱). همچنین قطعات برگی و دمبرگ در محیط کشت دارای NAA ۲

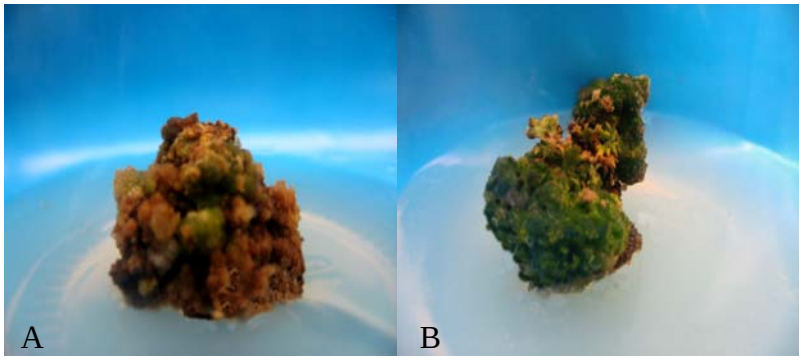
میلی‌گرم در لیتر و Kin ٤ میلی‌گرم در لیتر بدون کالزایی از بین رفتند (شکلهای ۱۰ و ۱۱). در محیط کشت دارای Kin ۲ میلی‌گرم در لیتر و NAA ۱ میلی‌گرم در لیتر، قطعات دمبرگ بعد از ۱۲ روز و قطعات برگ لپه‌ای بعد از ۱۰ روز کالزایی کردند، اما تمام کالها پس از قهوه‌ای شدن بدون تغییر باقی ماندند (شکلهای A-٤ و B-٤) و (شکلهای ۱۰ و ۱۱) از جداکشت برگ، کالوس سبز رنگ و از جداکشت ریشه دانه‌رست، کالوس کرم رنگ ایجاد شد، این کالها نیز به مدت طولانی بدون تغییر باقی ماندند (شکلهای C-٤ و D-٤) و (شکل ۱۲).

شکل۳- تشکیل کال از قطعات برگی، در محیط کشت پایه MS دارای NAA (۲ میلی‌گرم در لیتر) و Kin (۲ میلی‌گرم در لیتر)، (با مقیاس ۱)



شکل ٤- (A) تشکیل کالوس از قطعات دمبرگ گیاه بومادران هزاربرگ، در محیط کشت دارای Kin (۲ میلی‌گرم در لیتر) و NAA (۱ میلی‌گرم در لیتر)، (B) ایجاد کالوس از جداکشت برگ لپه‌ای، (C) ایجاد کالوس از جداکشت برگ، (D) کالزایی از جداکشت ریشه، (A و B) با مقیاس ۱/۲، (C و D) بامقیاس ۱/٤

در محیط کشت دارای Kin (٤ میلی‌گرم در لیتر) و NAA (۲ میلی‌گرم در لیتر)، قطعات ریشه دانه‌رست کالهای بزرگ به رنگ قهوه‌ای و کمی سبز تشکیل دادند (شکل A-۵) و (شکل ۱۲). از قطعات برگی، کالوس سبز رنگی تشکیل شد و بر حجم کالها افزوده شد، اما اندام‌زایی صورت نگرفت و کالها بدون تغییر باقی ماندند (شکل B-۵) و (شکل ۱۰). قطعات دمبرگی در این محیط کشت از بین رفتند (شکل ۱۱).



شکل ۵- (A) تشکیل کالوس از جداکشت ریشه در محیط کشت دارای Kin (٤ میلی‌گرم در لیتر) و NAA (۲ میلی‌گرم در لیتر)، (B) تشکیل کالوس سبز از قطعات برگی گیاه بومادران هزاربرگ، (A و B) با مقیاس ۱/۲

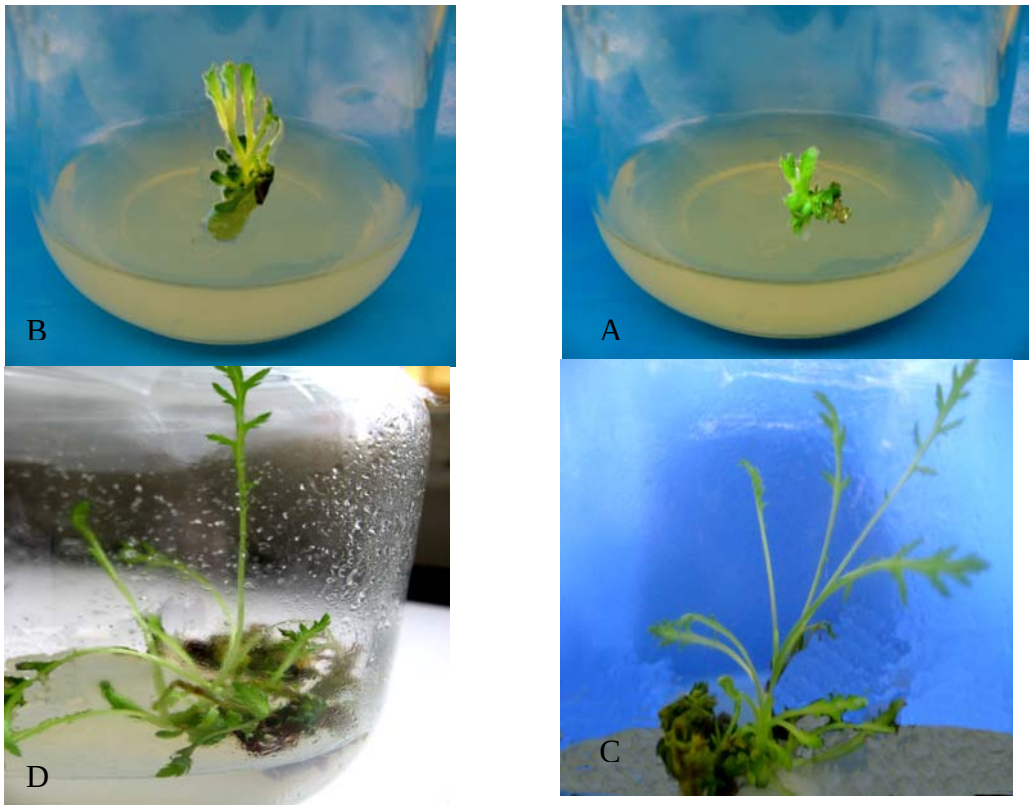
در محیط کشت دارای Kin (۸ میلی‌گرم در لیتر) و NAA (٤ میلی‌گرم در لیتر)، جداکشت ریشه دانه‌رست کالوسهای قهوه‌ای رنگی تشکیل داد که هیچ تغییری در آن مشاهده نشد (شکل A-٦) و (شکل ۱۲). کالهای حاصل از قطعات دمبرگ دانه‌رست در این محیط کشت بعد از قهوه‌ای شدن از بین رفتند (شکل B-٦). در محیط کشت دارای Kin (۱ میلی‌گرم در لیتر) و NAA (۱ میلی‌گرم در لیتر) و نیز در محیط کشت دارای Kin (٤ میلی‌گرم در لیتر) و NAA (٤ میلی‌گرم در لیتر) قطعات برگ و دمبرگ پس از مدت کوتاهی از بین رفتند (شکلهای ۱۰ و ۱۱).

شکل٦- (A) تشکیل کال از جداکشت ریشه گیاه بومادران هزاربرگ در محیط کشت Kin (۸ میلی‌گرم در لیتر) و NAA (٤ میلی‌گرم در لیتر)، (B) تشکیل کال از جداکشت دمبرگ، (A و B) با مقیاس ۱/۲

از جداکشت برگی در محیط کشت دارای IAA (۲ میلی‌گرم در لیتر) و BA (۱ میلی‌گرم در لیتر) بعد از کالزایی، اندام هوایی تشکیل شد (شکل ۷) و (شکل ۱۳).

.

جداکشتهای دمبرگ و مریستم رویشی در این محیط بعد از ۷ روز کالزایی، کردند، اما کالها در نهایت از بین رفتند

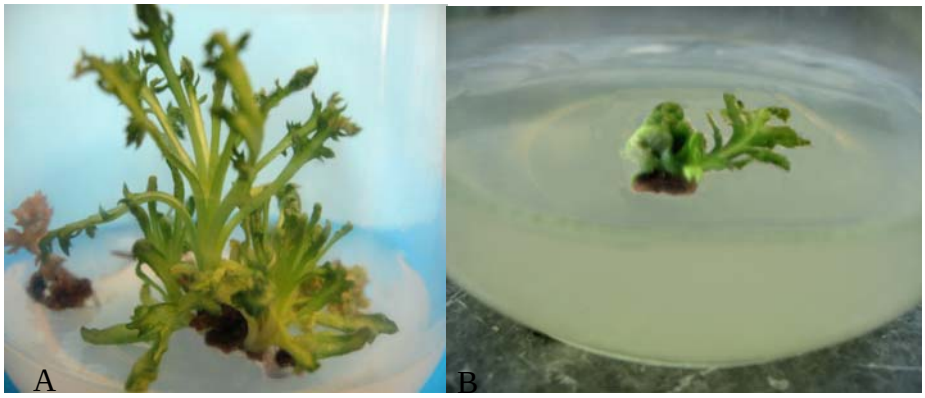


شکل۷- تولید کالوس و باززایی در گیاه بومادران هزاربرگ، (A) تولید کالوس و باززایی از قطعه جداکشت برگ روی محیط کشت دارای IAA با غلظت (۲ میلی‌گرم در لیتر) و BA با غلظت (۱ میلی‌گرم در لیتر)، (B) ۵ هفته پس از کشت، (C) ٤۰ روز پس از کشت، (D) ٤۵ روز پس از کشت، عکسها با مقیاس ۱/۲

در محیط کشت دارای IAA (٤ میلی‌گرم در لیتر) و BA (۲ میلی‌گرم در لیتر) همانند محیط کشت دارای IAA (۸ میلی‌گرم در لیتر) و BA (٤ میلی‌گرم در لیتر)، جداکشتهای برگ و دمبرگ بعد از کالزایی از بین رفتند (شکل ۱۳).

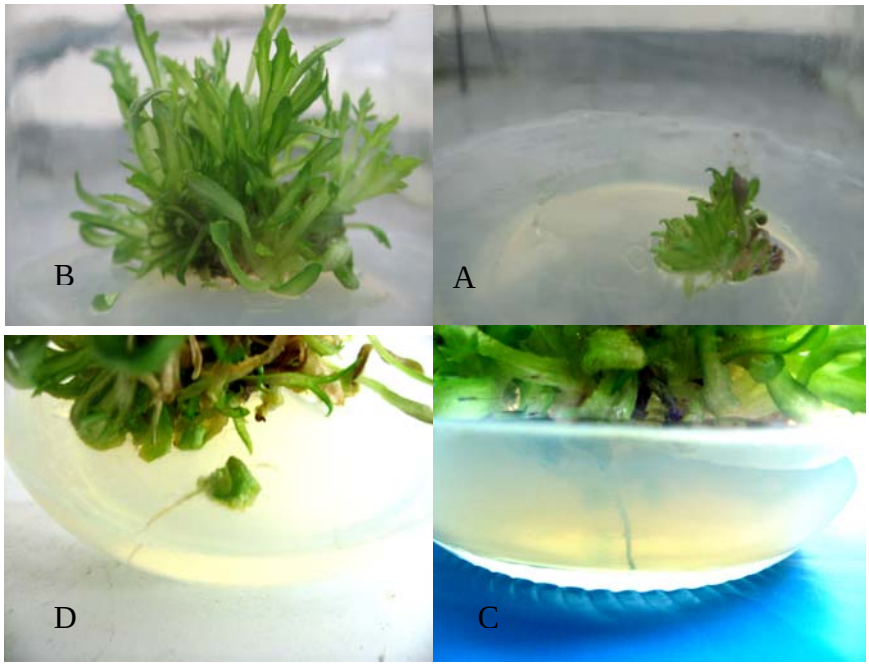
مریستم رویشی و قطعات برگی دانه‌رست در محیط کشت دارای IAA (۱ میلی‌گرم در لیتر) و BA (۲ میلی‌گرم در لیتر) بعد از کالزایی، اندام هوایی تشکیل دادند (شکلهای A-۸ و B-۸) و (شکلهای ۱۳ و ۱٤)

جداکشت مریستم رأسی دانه‌رست در محیط کشت دارای BA (۱ میلی‌گرم در لیتر) پس از کالزایی اندامهای هوایی تشکیل داد (شکل A-۹). اندامهای هوایی پس از چند روز گسترش یافتند (شکل B-۹). اندامهای هوایی تشکیل شده به محیط کشتهای دارای NAA با غلظت



شکل ۸- (A) تشکیل کال و باززایی از جداکشت مریستم رأسی گیاه بومادران هزاربرگ در محیط کشت دارای IAA (۱ میلی‌گرم در لیتر) و BA (۲ میلی‌گرم در لیتر)، (B) تشکیل برگ از جداکشت برگ، عکسها با مقیاس ۱/۲

(۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) و محیط کشت دارای IBA (۲ میلی‌گرم در لیتر) جهت تشکیل ریشه منتقل شدند. تنها در محیط کشت IBA ریشه‌زایی صورت گرفت (شکلهای C-۹ و D-۹) و (شکل ١٤). کلیه نتایج فوق در جدولهای ۱ و ۲ مشخص گردیده است.



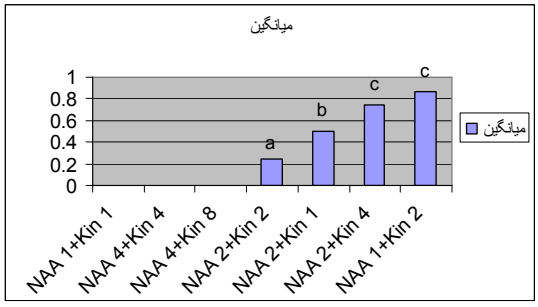
شکل ۹- (A) تشکیل کالوس و باززایی جداکشت مریستم رأسی گیاه بومادران هزاربرگ، در محیط کشت دارای BA (۱ میلی‌گرم در لیتر)، (B) گسترش اندامهای هوایی، (C) ریشه‌زایی پس از انتقال به محیط کشت دارای IBA (۲ میلی‌گرم در لیتر)، (D) ریشه‌زایی از برگ، مقیاس عکسها ۱/۲

جدول ۱- نتایج حاصل از کشت قطعات اندامهای گیاه *Achillea millefolium* L.، در محیط کشت پایه MS دارای غلظتهای مختلفی از NAA و Kin، برحسب mgl^{-1}

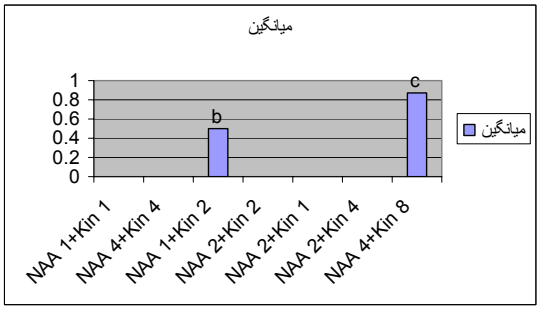
اندام‌زایی	پایداری کالوس	رنگ کالوس	رشد کالوس	جداکشت	نوع تیمار
–	+	قهوه‌ای روشن	++	برگ	NAA ۲ + Kin ۱
–	–	قهوه‌ای	+	مریستم رأسی	
–	–	–	–	برگ و دمبرگ	NAA۱ + Kin ۱
–	–	سیاه	++	برگ	NAA۲ + Kin ۲
–	–	–	–	دمبرگ	
–	–	–	–	برگ و دمبرگ	NAA ٤ + Kin٤
–	++	قهوه‌ای	++	دمبرگ	NAA ۱ + Kin ۲
–	++	قهوه‌ای روشن	+	برگ لپه‌ای	
–	+++++	سبز	++++	برگ	
–	+++++	کرم	+++++	ریشه	
–	+++++	سبز	++++	برگ	NAA ۲ + Kin ٤
–	+++++	قهوه‌ای روشن	+++++	ریشه	
–	–	–	–	دمبرگ	
–	+++	قهوه‌ای	+++	ریشه	NAA ٤ + Kin ۸
–	+++	قهوه‌ای	+++	دمبرگ	

جدول ۲- نتایج حاصل از کشت قطعات اندامهای گیاه *Achillea millefolium* L. در محیط کشت پایه MS دارای غلظتهای مختلفی از IAA و BA، بر حسب mgl^{-1}

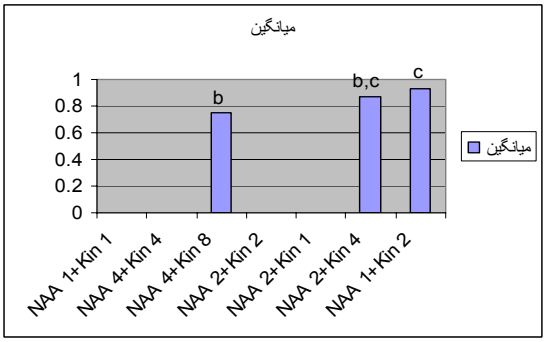
اندام‌زایی	پایداری کالوس	رنگ کالوس	رشد کالوس	جداکشت	نوع تیمار
–	–	سیاه	+	دمبرگ	IAA ۲ + BA۱
–	–	سیاه	+	مریستم رأسی	
اندام هوایی	++++	قهوه‌ای	++++	برگ	
–	–	سیاه	+	برگ و دمبرگ	IAA ٤ + BA۲
–	–	–	–	برگ و دمبرگ	IAA ۸ + BA٤
برگ	+++	قهوه‌ای	++	برگ	IAA۱ + BA۲
اندام هوایی	+++++	قهوه‌ای	++++	مریستم رأسی	
اندام هوایی	+++++	قهوه‌ای	+++++	مریستم رأسی	BA۱



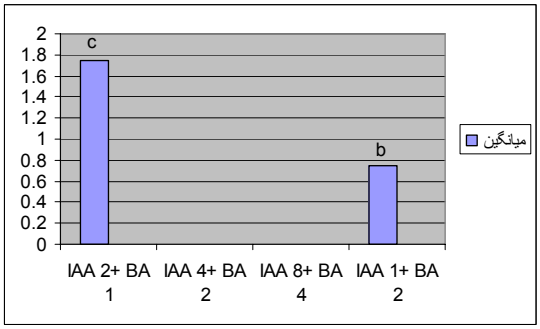
شکل ۱۰- اثر ترکیبات NAA و Kin بر کالزایی جدا کشت برگ



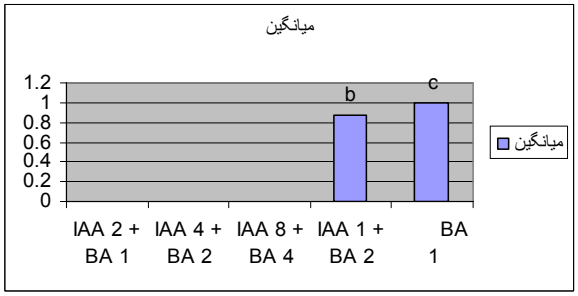
شکل ۱۱- اثر ترکیبات NAA و Kin بر کالزایی جدا کشت برگ



شکل ۱۲- اثر ترکیبات NAA و Kin بر کالزایی جداکشت ریشه



شکل ۱۳- اثر ترکیبات IAA و BA بر اندامزایی جداکشت ریشه



شکل ١٤- اثر ترکیبات IAA و BA بر اندامزایی از جداکشت مریستم رأسی

بر اساس نتایج آماری، بهترین محیط جهت کالزایی، محیط کشت دارای NAA (۱ میلی‌گرم در لیتر) و Kin (۲ میلی‌گرم در لیتر) تشخیص داده شد. مریستم رأسی در محیط کشت MS دارای IAA (۱ میلی‌گرم در لیتر) و BA (۲ میلی‌گرم در لیتر) و محیط کشت دارای BA (۱ میلی‌گرم در لیتر) و جداکشت برگ در محیط کشت MS دارای IAA (۲ میلی‌گرم در لیتر) و BA (۱ میلی‌گرم در لیتر) اندامهای هوایی تشکیل دادند. از بین محیط کشتهای یادشده، محیط کشت MS دارای BA (۱ میلی‌گرم در لیتر) با تشکیل بیشترین تعداد اندامهای هوایی از مریستم رأسی

بهترین محیط کشت محسوب شد. مناسبترین محیط کشت جهت ریشه‌زایی محیط کشت MS دارای IBA با غلظت (۲ میلی‌گرم در لیتر) بود.

بحث

کاربرد Kin و NAA با غلظتهای یکسان ۱، ۲ و ٤ میلی‌گرم در لیتر اثر چندانی بر کالزایی از بافتهای مختلف نداشت. در استفاده از NAA با غلظت دو برابر Kin کالزایی ضعیف بود. با کاربرد Kin با غلظتهای دو برابر نسبت به NAA بهترین کالزایی حاصل شد. در محیط کشت دارای 2,4-D و Kin تمام جداکشتها از بین رفتند. تعداد اندامهای هوایی حاصل از کشت مریستم رویشی در محیط کشت دارای BA (۱ میلی‌گرم در لیتر) بیشتر از محیط دارای هورمونهای BA با IAA بود. Cristina و همکاران (۱۹۹۱) شرایط رشد گیاه *Achillea millefolium* را در محیط کشت B5 بررسی کردند. آنها هیپوکوتیل این گیاه را در محیط کشت B5 دارای 2,4-D با غلظت ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر و Kin (۰/۱ میلی‌گرم در لیتر) کشت دادند، که نتیجه آن تنها تشکیل کال شکننده بود. Wawrosch و همکاران (۱۹۹٤) با مطالعه بر روی ریزازدیادی گیاه *Achillea asplenifolia* از طریق باززایی ساقه از جداکشتهای گره‌ای بهترین تکثیر را از هورمون N-benzyl – 9-(2-tetrahydropyranyl) adenine با غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر به دست آوردند. ریزازدیادی گیاه بومادران هزاربرگ از طریق جداکشت مریستم رأسی در محیط کشت MS دارای BA (۱ میلی‌گرم در لیتر) نتیجه مثبت داشته و با نتیجه فوق همسویی دارد. بر اساس مطالعه Evenor و Reuveni (۲۰۰٤) بر روی ریزازدیادی *Achillea filipendulina* بهترین باززایی ساقه از محیط کشت نمکی MS دارای ۳٪ ساکارز و IAA (۱ میلی‌گرم در لیتر) و BA (۲ میلی‌گرم در لیتر) تحت ۱٦ ساعت نور فلورسنت بود. در این تحقیق نیز کشت‌بافت گیاه بومادران هزاربرگ در محیط کشت دارای IAA و BA تحت دوره نوری ۱٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی صورت گرفت که با نتیجه فوق همسویی دارد. Echeverrigaray و همکاران (۲۰۰۰) از کشت در شیشه جداکشت برگ گیاه *Anthemis nobilis* (گونه نزدیک به بومادران هزاربرگ) در محیط کشت MS دارای BA با غلظت ۱-٤/۵ µM و NAA با غلظت ۱ µM تعداد زیادی اندام هوایی بدست آوردند، انتقال نمونه‌های حاصل به محیط کشت دارای BA ۲/۲۵ µM و IAA ۰/٦ µM به تشکیل تعداد بیشتری اندام هوایی منجر شد، نمونه‌ها با انتقال به محیط کشت دارای IBA ۰/۵ µM ریشه‌زایی کردند. در کشت‌بافت گیاه بومادران هزاربرگ جهت تکثیر از BA و IAA و جهت ریشه‌زایی از IBA استفاده شد که با نتایج فوق همسویی دارد. بر اساس مطالعه Wildi و همکاران (۱۹۹۸) بر روی ریزازدیادی *Petasites hybridus* باززایی ساقه از جداکشتهای برگ و دمبرگ طی دو مرحله کشت در محیط کشت MS دارای BA با غلظت ۱۷/٦ wm و NAA با غلظت ۰/٥٤ wm صورت گرفت، که با نتایج کشت‌بافت گیاه بومادران هزاربرگ به دلیل استفاده از سیتوکینین و اکسین همسویی دارد. به دنبال بررسیهای انجام شده بر روی گیاهان دو گروه از تبار *Anthemideae* حضور هورمون IAA به عنوان اکسین و BA به‌عنوان سیتوکینین ضروری‌ترین تنظیم کننده‌های رشد برای این گیاهان می‌باشد، ولی در هر گروه از این گیاهان مقادیر کاربردی آنها متفاوت است. در پایان مطابق با آزمایشهای انجام شده می‌توان چنین نتیجه گرفت که

تشکیل کالوس در محیط‌های کشت MS دارای Kin دو برابر NAA به‌ویژه از جداکشتهای برگ و ریشه بهتر و ماندگارتر از بقیه محیط‌های کشت دارای این دو هورمون است. برای تولید اندامهای هوایی از جداکشت برگ و از مریستم رأسی، کاربرد IAA و BA در محیط کشت MS ضروری است. جهت ایجاد اندامهای هوایی از مریستم رأسی حضور هورمون BA در محیط کشت MS و برای تشکیل ریشه، انتقال آن به محیط کشت MS دارای IBA لازم است.

منابع مورد استفاده

احسان پور، ع.ا. و امینی، ف.، ۱۳۸۲. کشت سلول و بافت گیاهی. انتشارات جهاد دانشگاهی واحد. اصفهان، اصفهان، ۱۸۱ صفحه.

سعیدی، ح. (جود، و.، کمپبل، ک.، کلوگ، ا.، استیونس، پ.)، ۱۳۸۲. سیستماتیک گیاهی. انتشارات جهاد دانشگاهی واحد صنعتی اصفهان.

حسندخت، م.ر. و ابراهیمی، ر.، ۱۳۸۵. مبانی کشت‌بافت گیاهی. انتشارات مرز دانش، تهران، ۳۲۸ صفحه.

زرگری، ع.، ۱۳۷۲. گیاهان دارویی. جلد سوم، انتشارات دانشگاه تهران، تهران، ۹۲۵ صفحه.

قهرمان، ا.، ۱۳٦۵. فلور رنگی. انتشارات مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، بخش گیاه‌شناسی.

Ballabh, B. and Chaurasia, P.O., 2007. Herbal products from high altitude plants of Ladakh Himalaya. Current Science, 92: 1664–1666.

Cristina, A., Figueiredo, S., Salomé, M. and Pais, S., 1991. *Achillea millefolium* (yarrow) cell suspension cultures: Establishment and growth conditions. Journal of Biotechnology Letters, 13: 63 – 68.

Echeverrigaray, S., Fracaro, F., Andrade, L.B., Biasio, S. and Atti-Serafini, L., 2000. *In vitro* shoot regeneration from leaf explants of Roman Chamomile. Journal of Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 60: 1-4.

Evenor, D. and Reuveni, M., 2004. Micropropagation of *Achillea filipendulina.* Journal of Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 79:91-93.

Giorgi, A., Bonani, M., Tateo, F. and Cocucci, M., 2005. Yarrow (*Achillea millefolium* L.) Growth at Different Altitudes in Central Italian Alps: Biomass Yield, Oil content and Quality. Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants, 11: 47–58.

Pieroni, A. and Quave, C.L., 2005. Traditional pharmacopoeias and medicines among Albanians and Italians in southern Italy: A comparison. Journal of Ethnopharmacology, 101: 258–270.

Saad, B., Azaizeh, H. and Said, O., 2005. Tradition and Perspectives of Arab Herbal Medicine: A Review, 1-5.

Saxena, P., Murch, S., Krishnaraj, S. and slimmon, T., 2000. Micropropagation and production of phytopharmaceutical plants. PharmCast.com, internet for pharmaceutical and Biotec Communities.

Teixeira, R., Camparoto, M., Mantovani, M. and vicentini, V., 2003. Assessment of two medicinal plants, *Psidium guajava* L. and *Achillea millefolium* L., in *in vitro* and *in vivo* assays. Genetics and Molecular Biology, 26(4): 551- 555.

Vasinauskiene, M., Radusiene, J., Zitikaite, I. and Surviliene, E., 2006. Antibacterial activities of essential oils from aromatic and medicinal plants against growth of phytopathogenic bacteria. Agronomy research 4(special issue), 437-440.

Wawrosch, C., Kopp, B., and Kubelka, W., 1994. *In vitro* propagation of *Achillea asplenifolia* VENT. through multiple shoot regeneration. Journal of Plant Cell Report, 14: 161-164.

Wildi, E., Schaffner, W. and Berger, K., 1998. *In vitro* propagation of Petasites hybridus (Asteraceae) from leaf and petiole explants and from inflorescence buds. Journal of Plant Cell Report, 18: 336- 340.

Study of tissue culture of *Achillea millefolium* L.

F. Chalabian[1], N. Rajeian[1] and M. Peyvandi[1]

1- Islamic Azad University Iran, North Tehran branch, Biology department, Tehran, E-mail: Chalabian1969@yahoo.com

Abstract

In this research, *in vitro* culture of *Achillea millefolium* L. was investigated with different hormones such as IAA, BA, NAA, Kin and 2,4-D. Different parts of natural plant and seedlings grown on hormone free medium were used as explants. The best medium for callogenesis was a medium supplemented with 1 mgl^{-1} NAA and 2 mgl^{-1} Kin. Apical meristem of seedling in medium supplemented with 1 mgl^{-1} IAA and 2 mgl^{-1} BA produced shoots after forming callus. Leaf explant in medium supplemented with 1 mgl^{-1} IAA and 2 mgl^{-1} BA and medium supplemented with 2 mgl^{-1} IAA and 1mgl^{-1} BA formed calli and then shoot. Apical meristem of seedling in medium supplemented with 1mgl^{-1} BA formed shoots which produced roots upon transferring to a medium supplemented with 2 mgl^{-1} IBA. Thus, this medium was the best intance for propagation and regeneration than the other media.

Key words: *Achillea millefolium*, tissue culture, propagation and meristem.