Research Article

DOI: 10.22092/ijrfpbgr.2026.373457.1500

Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research
Vol. 34, No. 1, Page 57-69 (2026)

Investigating the Effect of Zinc Oxide Nanoparticles (ZnO NPs) on *in vitro* Regeneration of Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.)

Saba Eslami[1]*, Arman HaghNazari[2] and Ali Amarlou[3]

[1]*Corresponding author: M.Sc. graduate in Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran. Email: eslamisabaa@znu.ac.ir
[2] PhD. graduate, Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran
[3] Assoc. Prof., Institute of Modern Biological Technologies, University of Zanjan, Zanjan, Iran

Received: 2026/07/07 Revised: 2026/08/24 Accepted: 2026/08/31

Abstract

Background and Objectives: German chamomile is a medicinal plant belonging to the Asteraceae family, holding a distinguished place in the pharmaceutical, food, and cosmetic industries due to its valuable bioactive compounds, including flavonoids, coumarins, and phenolic acids. Conventional propagation methods for this plant are insufficient for the mass production of uniform plant material due to genetic heterogeneity, strong dependence on climatic conditions, and the risk of disease transmission; therefore, in vitro culture is proposed as a reliable alternative approach. Zinc oxide nanoparticles, owing to the key role of zinc in enzymatic activities and hormonal regulation in plants, possess high potential for improving tissue regeneration; however, sufficient information regarding their effect on German chamomile is lacking. This study was conducted to investigate the effect of different concentrations of zinc oxide nanoparticles, alone and in combination with benzyladenine (BA), on the in vitro regeneration of this plant.

Materials and Methods: German chamomile seeds were surface-sterilized with 5% sodium hypochlorite for five minutes, followed by 70% ethanol for one minute, and after rinsing with sterile water, were cultured on MS medium at pH 5.8. After one month, young leaves approximately 5 mm in size were excised as explants and cultured on MS medium containing 2 mg/L 2,4-D and 3% sucrose for callus induction, in the dark, for one month. To evaluate the effect of treatments on regeneration, concentrations of 0, 1, and 2 mg/L benzyladenine (BA) and 0, 10, and 20 mg/L zinc oxide nanoparticles were applied separately and in combination, in a factorial experiment based on a completely randomized design (CRD) with three replications. Regeneration percentage, root length, root number, and shoot length were measured. All analyses were performed in R software using the Agricolae package.

Results: Analysis of variance results showed that the main effects of BA and ZnO nanoparticles were significant for most traits studied, and the interaction effect of these two factors was observed only on root length. The highest regeneration percentage was obtained in the treatment with 1 mg/L BA combined with 20 mg/L ZnO (83.33%), which did not differ significantly from the treatment with 2 mg/L BA combined with 20 mg/L ZnO (80.66%), while the lowest regeneration percentage was recorded in the control treatment (without BA and without ZnO) at 33.21%; the notable increase in regeneration in the treatment without BA combined with 20 mg/L

Copyright: © 2026 by the authors. This is an open access, peer-reviewed article published by Research Institute of Forests and Rangelands (http://ijrfpbgr.areeo.ac.ir//) and distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

ZnO (73%) indicated the independent role of ZnO in improving this trait. The highest mean root length was observed in the treatment without BA combined with 20 mg/L ZnO (13.6 cm), and root length decreased markedly with increasing BA concentration in the presence of 20 mg/L ZnO. In contrast, the highest root number was recorded in the treatment with 2 mg/L BA combined with 20 mg/L ZnO, indicating an opposing effect of BA on root length and root number. The highest shoot length was obtained in the treatment with 1 mg/L BA combined with 10 mg/L ZnO (4.26 cm). Overall, a ZnO concentration of 20 mg/L was the main factor stimulating regeneration and rooting, and its combination with 1 mg/L BA provided the best balance between high regeneration and root quality, whereas a ZnO concentration of 10 mg/L combined with BA was more effective for shoot elongation.

Conclusion: It was concluded that the combination of 1 mg/L BA and 20 mg/L zinc oxide nanoparticles created a suitable balance between regeneration percentage, root number, and shoot growth, and could be proposed as a baseline protocol for in vitro regeneration of German chamomile. Nevertheless, further optimization and evaluation of the response of different genotypes are necessary in future studies.

Keywords: German chamomile, zinc oxide nanoparticles, *in vitro* regeneration, benzyladenine, tissue culture

بررسی تأثیر نانوذرات اکسید روی (ZnO NPs) بر باززایی درون‌شیشه‌ای بابونه آلمانی (*Matricaria chamomilla* L.)

صبا اسلامی[۱*]، آرمان حق‌نظری[۲] و علی عمارلو[۳]

۱*- نویسنده مسئول، دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد، بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران

پست‌الکترونیک: eslamisabaa@znu.ac.ir

۲- دانش‌آموخته دکتری، بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران

۳- دانشیار، پژوهشکده فناوری‌های نوین زیستی دانشگاه زنجان، زنجان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۵/۰۴/۱۶ تاریخ اصلاح نهایی: ۱۴۰۵/۰۶/۰۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۵/۰۶/۰۹

چکیده:

سابقه و هدف: بابونه آلمانی (*Matricaria chamomilla* L.) گیاهی دارویی از تیره کاسنیان است که به‌دلیل دارا بودن ترکیبات زیست‌فعال ارزشمند مانند فلاونوئیدها، کومارین‌ها و اسیدهای فنولی، جایگاه ویژه‌ای در صنایع دارویی، غذایی و آرایشی-بهداشتی دارد. روش‌های متداول تکثیر این گیاه به‌دلیل ناهمگنی ژنتیکی، وابستگی شدید به شرایط اقلیمی و خطر انتقال بیماری، برای تولید انبوه مواد گیاهی یکنواخت کافی نیستند؛ ازاین‌رو کشت درون‌شیشه‌ای به‌عنوان راهکاری مطمئن مطرح است. نانوذرات اکسید روی (ZnO) به‌دلیل نقش کلیدی روی، در فعالیت‌های آنزیمی و تنظیم هورمونی گیاهان، ظرفیت بالایی برای بهبود باززایی بافت دارند، اما اطلاعات کافی درباره اثر آنها بر بابونه آلمانی وجود ندارد. این پژوهش با هدف بررسی اثر غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسید روی، به‌تنهایی و در ترکیب با بنزیل‌آدنین (BA)، بر باززایی درون‌شیشه‌ای این گیاه انجام شد.

مواد و روش‌ها: بذرهای بابونه آلمانی با هیپوکلریت سدیم ۵ درصد به‌مدت پنج دقیقه و بعد اتانول ۷۰ درصد به‌مدت یک دقیقه ضدعفونی و پس از شست‌وشو با آب استریل، روی محیط کشت MS با pH برابر ۵/۸ کشت شدند. پس از یک ماه، برگ‌های جوان حدود ۵ میلی‌متر به‌عنوان ریزنمونه جدا و برای القای کالوس به محیط MS حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر 2.4.D و ۳ درصد ساکارز، منتقل شدند و به مدت یک ماه در تاریکی نگهداری شدند تا کالوس تشکیل شوند. پس از این مرحله، کالوس‌ها، برای باززایی در محیط MS حاوی غلظت‌های ۰، ۱ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر هورمون بنزیل‌آدنین (BA) و غلظت‌های ۰، ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات اکسید روی، به‌صورت جداگانه و ترکیبی، در قالب آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی (CRD) با سه تکرار کشت شدند. صفات درصد باززایی، طول ریشه، تعداد ریشه و طول شاخساره اندازه‌گیری شدند. کلیه تحلیل‌ها در نرم‌افزار R با استفاده از بسته Agricolae انجام شد.

نتایج: نتایج تجزیه واریانس نشان داد اثر اصلی هورمون BA و نانوذرات ZnO بر بیشتر صفات مورد بررسی معنی‌دار بود و اثر متقابل این دو عامل تنها بر طول ریشه مشاهده شد. بیشترین درصد باززایی (۸۳/۳۳ درصد) در تیمار ۱ میلی‌گرم بر لیتر BA همراه با ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر ZnO به‌دست آمد که با تیمار ۲ میلی‌گرم بر لیتر BA همراه با ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر ZnO (۸۰/۶۶ درصد) تفاوت معنی‌داری نداشت، در حالی که کمترین درصد باززایی در تیمار شاهد (بدون BA و بدون ZnO) با ۳۳/۲۱ درصد ثبت شد؛ افزایش قابل‌توجه باززایی در تیمار بدون BA همراه با ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر ZnO (۷۳ درصد) نشان‌دهنده نقش مستقل نانوذرات ZnO در بهبود این صفت بود. بیشترین میانگین طول ریشه در تیمار بدون BA همراه با ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر ZnO (۱۳/۶ سانتی‌متر) مشاهده شد و با افزایش غلظت BA در حضور ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر ZnO، طول ریشه به‌طور محسوسی کاهش یافت. در حالی که بیشترین تعداد ریشه در تیمار ۲ میلی‌گرم بر لیتر BA همراه با ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر ZnO ثبت شد که بیانگر اثر متضاد BA بر طول و تعداد ریشه است. بیشترین طول ساقه نیز در تیمار ۱ میلی‌گرم بر لیتر BA همراه با ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر ZnO (۴/۲۶ سانتی‌متر) به‌دست آمد. در مجموع،

غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر ZnO عامل اصلی تحریک باززایی و ریشه‌زایی بود و ترکیب آن با ۱ میلی‌گرم بر لیتر BA بهترین تعادل بین باززایی بالا و کیفیت ریشه را فراهم کرد، در حالی که غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر ZnO همراه با BA برای رشد طولی ساقه مؤثرتر بود. **نتیجه‌گیری:** نتایج نشان داد ترکیب ۱ میلی‌گرم بر لیتر BA و ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات ZnO تعادل مناسبی بین درصد باززایی، تعداد ریشه و رشد اندام هوایی ایجاد می‌کند و می‌تواند به‌عنوان شیوه‌نامه پایه برای باززایی درون‌شیشه‌ای بابونه آلمانی پیشنهاد شود. با این حال، بهینه‌سازی بیشتر و بررسی پاسخ ژنوتیپ‌های مختلف در پژوهش‌های آینده ضروریست.

واژه‌های کلیدی: بابونه آلمانی، نانوذرات اکسید روی، باززایی، بنزیل‌آدنین، کشت بافت

مقدمه

بابونه آلمانی (*Matricaria chamomilla*) که از اعضای خانواده بزرگ کاسنیان (*Asteraceae*) به‌شمار می‌رود، به دلیل دارا بودن مقدار قابل توجهی از ترکیبات زیست‌فعال مانند فلاونوئیدها، کومارین‌ها و اسیدهای فنولی، جایگاه ویژه‌ای در صنایع دارویی، غذایی و آرایشی-بهداشتی دارد (Srivastava *et al*., 2010). در طب سنتی، این گیاه به عنوان عاملی ضدالتهابی، آنتی‌اکسیدانی، ضدمیکروبی و آرام‌بخش شناخته می‌شود. با این حال، روش‌های متداول تکثیر این گیاه (از طریق بذر یا تکثیر رویشی) برای تأمین مواد گیاهی یکنواخت مورد نیاز صنعت کافی نیستند. مشکلاتی مانند ناهمگنی ژنتیکی، وابستگی شدید به شرایط اقلیمی و خطر انتقال بیماری‌ها، همواره به عنوان موانعی در مسیر تولید این گیاه مطرح بوده‌اند (Rout *et al*., 2000).

در چنین شرایطی، تکنیک‌های کشت درون‌شیشه‌ای امکان مناسبی برای تکثیر سریع و تولید انبوه کلون‌های سالم فراهم می‌کنند. ریزازدیادی در شرایط *in vitro*، چه از طریق اندام‌زایی و چه از طریق جنین‌زایی، فرایندی بسیار حساس است که به عوامل مختلفی ازجمله ژنوتیپ گیاه، نوع ریزنمونه، تعادل هورمونی در محیط کشت و شرایط فیزیکی مانند دما و نور وابسته است (Ikeuchi *et al*., 2016; George *et al*., 2008). برای القای کالوس و مدیریت رشد اندام‌ها، ایجاد تعادل مناسب میان اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها (مانند BAP یا کینتین) ضرورتی اساسی به‌شمار می‌آید. با این حال، حتی در شرایط بهینه نیز گاهی میزان باززایی بافت یا تراکم تشکیل شاخه‌ها به سطح مطلوب نمی‌رسد؛ موضوعی که نیاز به استفاده از رویکردهای نوین را برجسته می‌کند.

در سال‌های اخیر، فناوری نانو به عنوان یکی از رویکردهای نوآورانه وارد عرصه علوم زیستی شده است. نانوذرات فلزی به دلیل ابعاد بسیار کوچک در مقیاس نانو و نسبت بالای سطح به حجم، توانایی قابل توجهی در تأثیرگذاری بر فرایندهای فیزیولوژیک و بیوشیمیایی گیاهان دارند (Rai *et al*., 2012). در میان انواع مختلف نانوذرات، نانوذرات اکسید روی (ZnO NPs) به دلیل نقش کلیدی عنصر روی، در فعالیت‌های آنزیمی، تنظیم متابولیسم هورمونی و حفظ پایداری ساختاری غشاها و پروتئین‌ها مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته‌اند (Broadley *et al*., 2007; Alloway, 2008). شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد نانوذرات اکسید روی می‌توانند فرآیندهای حیاتی در گیاهان مانند جوانه‌زنی، رشد رویشی، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و جذب عناصر غذایی را بهبود ببخشند (Dimkpa *et al*., 2017). همچنین در برخی مطالعات گزارش شده است که این ذرات می‌توانند القای کالوس و باززایی بافت در گونه‌های مختلف گیاهی را تسهیل کنند (Alharby *et al*., 2016). به نظر می‌رسد این اثر از طریق افزایش فراهمی یون‌های روی، تحریک آنزیم‌های مرتبط با تقسیم سلولی و تنظیم تعادل هورمونی در گیاهان رخ می‌دهد (Tripathi *et al*., 2017). در زمینه بهینه‌سازی شیوه‌نامه‌های باززایی درون‌شیشه‌ای بابونه آلمانی، مطالعات نشان داده‌اند که بازدهی اندام‌زایی و شاخساره‌زایی وابستگی شدیدی به نوع ریزنمونه و تعادل تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی در محیط کشت دارد؛ به‌طوری‌که استفاده از ریزنمونه‌های ساقه دارای گره و کوتیلدون در محیط

کشت پایه MS با ترکیب بهینه‌ای از سیتوکینین‌ها و اکسین‌ها، دستیابی به درصد بالایی از باززایی مستقیم را امکان‌پذیر می‌سازد (Masoumi-Asl et al., 2015). بر این اساس، فراهم‌سازی شرایط تغذیه‌ای و هورمونی بهینه می‌تواند به عنوان یک عامل تعیین‌کننده، کارایی تکثیر درون‌شیشه‌ای و پاسخ‌های مورفوژنتیک این گیاه دارویی را به‌طور چشمگیری ارتقا دهد. با وجود اهمیت پاسخ ویژه این گیاه به تنظیم‌کننده‌های رشد، اطلاعات مربوط به تأثیر نانوذرات اکسید روی بر بهبود باززایی بافت در این گیاه همچنان محدود است. ازاین‌رو، این پژوهش با هدف بررسی اثر غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسید روی بر باززایی بافت در شرایط کشت درون‌شیشه‌ای طراحی و اجرا شد.

مواد و روش‌ها

به‌منظور دستیابی به گیاهچه‌های استریل و مناسب برای کشت درون‌شیشه‌ای، بذرهای بابونه آلمانی (جمع‌آوری شده از شهرستان تالش استان گیلان) ابتدا تحت فرآیند ضدعفونی سطحی قرار گرفتند. آنگاه برای این منظور، بذرها به مدت ۵ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۵ درصد تیمار و پس از آن یک مرتبه با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. در ادامه، بذرها به مدت ۱ دقیقه در محلول اتانول ۷۰ درصد قرار گرفتند تا فرآیند سترون‌سازی تکمیل شود. سپس برای حذف باقی‌مانده مواد ضدعفونی‌کننده، دو بار با آب مقطر استریل شسته شدند. بذرهای استریل‌شده در محیط کشت موراشیگ و اسکوگ (Murashige & Skoog.,1962) (MS) با pH تنظیم‌شده روی ۵/۸ کشت گردیدند و در شرایط کنترل‌شده قفسه نوری با نور ۴۰۰۰ لوکس در دمای ۲ ± ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از گذشت یک ماه و استقرار کامل گیاهچه‌ها، از برگ‌های جوان آن‌ها ریزنمونه‌هایی با طول تقریبی ۵ میلی‌متر تهیه شد. ریزنمونه‌های حاصل به‌منظور القای کالوس در محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر هورمون ۲،۴-دی‌کلروفنوکسی‌استیک اسید (2,4-D)، سه درصد ساکارز و با pH برابر ۵/۸ کشت شدند. کشت‌ها به مدت یک ماه در شرایط تاریکی نگهداری شدند تا کالوس‌های مورد نظر تشکیل شوند. پس از این مدت، کالوس‌های دارای رشد مناسب و ظرفیت باززایی انتخاب شده به محیط باززایی منتقل گردیدند. در این مرحله، کالوس‌ها در محیط MS حاوی غلظت‌های مختلف هورمون بنزیل‌آدنین-6) (Benzyladenine، (BA) در سه سطح صفر، ۱ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر و نانوذرات اکسید روی (ZnO NPs)، (با ساختار کروی و اندازه ۲۰-۲۵ نانومتر شرکت ARMINANO) در سه سطح صفر، ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر، به‌صورت جداگانه و ترکیبی کشت شدند تا اثر متقابل این دو عامل بر باززایی بافت مورد بررسی قرار گیرد. استفاده از هورمون BA در این آزمایش به دلیل پایداری بالای این هورمون در برابر نور و دما بود. همچنین برای افزودن نانوذرات ZnO به محیط، محلول آن به مدت ۳ دقیقه ورتکس شد و قبل از انجام اتوکلاو به محیط اضافه گردید.

این تحقیق در قالب آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی (CRD) با سه تکرار (هر تکرار شامل چهار کالوس) اجرا شد؛ فاکتور اول شامل غلظت‌های مختلف هورمون BA و فاکتور دوم شامل غلظت‌های مختلف نانوذرات ZnO بود. به‌منظور ارزیابی همزمان پاسخ صفات اندازه‌گیری شده و جلوگیری از افزایش خطای نوع اول، ابتدا تجزیه واریانس چندمتغیره (MANOVA) براساس آماره لامبدای ویلکس (Wilks Lambda) برای بررسی اثر کلی BA، نانوذرات ZnO و اثر متقابل آن‌ها انجام شد. در ادامه، تجزیه واریانس دوطرفه (ANOVA) به‌صورت مجزا برای هر صفت انجام گردید. پیش از انجام ANOVA و MANOVA، مفروضات آزمون شامل نرمال بودن داده‌ها با آزمون شاپیرو ویلک (Shapiro-Wilk) و همگنی واریانس‌ها با آزمون لوین (Levenes test) ارزیابی گردید. مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد. تمامی تجزیه‌های آماری با بهره‌گیری از نرم‌افزار آماری R نسخه ۴،۶،۰ و بسته Agricolae انجام شد.

نتایج

نتایج تجزیه واریانس چندمتغیره براساس آماره لامبدای ویلکز (جدول ۱) نشان داد که هر سه منبع تغییر یعنی اثر هورمون

بنزیل آدنین، اثر نانوذرات اکسید روی و اثر متقابل این دو عامل بر مجموعه صفات باززایی تأثیر معنی‌داری داشته‌اند. مقدار لامبدای ویلکز برای اثر بنزیل آدنین برابر ۰/۱۵۹ به دست آمد که در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد. همین آماره برای نانوذرات اکسید روی مقدار بسیار پایین‌تری برابر ۰/۰۱۵ نشان داد که باز هم در سطح یک درصد معنی‌دار بود. اثر متقابل نیز با لامبدای ویلکز ۰/۱۷۷ در سطح پنج درصد معنی‌دار گردید. این نتایج نشان می‌دهند که نانوذرات اکسید روی به تنهایی تأثیر معنی‌داری بر الگوی کلی صفات باززایی داشته است. علاوه بر این، بنزیل آدنین و ترکیب آن با نانوذرات نیز نقش قابل توجهی بر مجموعه صفات داشته‌اند. به همین دلیل، ادامه تحلیل با تجزیه واریانس تک‌متغیره برای هر صفت به صورت جداگانه منطقی به نظر می‌رسید.

جدول ۱- تجزیه واریانس چندمتغیره (MANOVA) براساس آماره لامبدای ویلکز برای بررسی اثر ساده و متقابل هورمون بنزیل آدنین (BA) و نانوذرات اکسید روی (ZnO) بر مجموعه صفات باززایی بابونه آلمانی

Table 1. Multivariate analysis of variance (MANOVA) using the Wilks' Lambda statistic to assess the effects of BA, ZnO nanoparticles, and their interaction on regeneration traits of *Matricaria chamomilla*.

SOV	df	Wilks λ	Approx. F	Hypothesis df	Error df
Benzyladenine (BA)	2	0.159	5.67**	8	30
Zinc Oxide (ZnO)	2	0.015	26.9**	8	30
BA×ZnO	4	0.177	2.21*	16	46.5

*و **: بیانگر معنادار بودن آماره F (لامبدای ویلکز) به ترتیب در سطوح احتمال ۱ و ۵ درصد است.

*, **, Wilks' Lambda F-values are significant at the P < 0.05 and P < 0.01 probability levels, respectively.

تجزیه واریانس تک‌متغیره برای هر صفت انجام شد و اثر معنی‌دار متفاوتی ظاهر گردید (جدول ۲). اثر بنزیل آدنین بر درصد باززایی، طول ریشه و طول اندام هوایی در سطح یک درصد معنی‌دار بود، ولی بر تعداد ریشه تأثیر معنی‌داری نداشت. اما نانوذرات اکسید روی تقریباً بر همه صفات اثر قوی نشان داد. درصد باززایی، طول ریشه و تعداد ریشه تحت تأثیر این نانوذرات در سطح یک درصد و طول اندام هوایی در سطح پنج درصد معنی‌دار قرار گرفت. اثر متقابل بنزیل آدنین و نانوذرات اکسید روی تنها بر صفت طول ریشه معنی‌دار شد و بر سایر صفات اثر متقابل قابل توجهی مشاهده نگردید. این موضوع نشان می‌دهد که رشد طولی ریشه حساس‌ترین صفت به ترکیب همزمان این دو عامل بوده است.

جدول ۲- تجزیه واریانس اثرات ساده و متقابل هورمون بنزیل آدنین و نانوذرات اکسید روی بر ویژگی‌های باززایی گیاه بابونه آلمانی

Table 2. Analysis of variance of the main effects and interaction effects of Benzyladenine (BA) hormone and Zinc Oxide (ZnO) nanoparticles on the regeneration traits of *Matricaria chamomilla*.

SOV	df	MS			
		Regeneration	Root length	Roots number	shoot length
Benzyladenine (BA)	2	502**	18.37**	10.04	5.68**
Zinc Oxide (ZnO)	2	6162**	100.59**	169.04**	3.03*
BA×ZnO	4	95.0	15.48**	0.70	0.39
Error	18	54	1.96	4.41	0.51

**و *: به‌ترتیب در سطوح احتمال ۱ و ۵ درصد معنادار هستند. **, * significantly at 1% and 5% of probability levels, respectively

مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن (جدول ۳) جزئیات بیشتری را روشن کرد. در صفت درصد باززایی، تیمار بدون هورمون و بدون نانوذره (شاهد) تنها ۲۱/۳۳ درصد باززایی داشت که پایین‌ترین مقدار در بین همه تیمارها بود. با افزایش غلظت نانوذرات اکسید روی به ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر، درصد باززایی در غیاب بنزیل آدنین به ۴۹/۳۳ درصد رسید و وقتی

غلظت نانوذرات به ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر افزایش یافت، این مقدار به ۷۳ درصد جهش پیدا کرد. این روند نشان می‌دهد که نانوذرات اکسید روی حتی بدون حضور هورمون بنزیل آدنین قادرند فرآیند باززایی را به‌طور چشمگیری تحریک کنند. وقتی بنزیل آدنین در سطح یک میلی‌گرم بر لیتر استفاده شد، درصد باززایی در ترکیب با ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذره به بالاترین مقدار، یعنی ۸۳/۳۳ درصد رسید. تیمار دو میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آدنین همراه با ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذره نیز ۸۰/۶۶ درصد باززایی ایجاد کرد و این دو تیمار از نظر آماری در یک گروه قرار گرفتند. بنابراین به نظر می‌رسد غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات اکسید روی در کنار سطوح یک یا دو میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آدنین بهترین نتیجه را از نظر درصد باززایی به همراه داشته است.



شکل ۱- ریشه‌دهی باززایه‌های بابونه آلمانی در غلظت‌های مختلف نانوذرات ZnO، a: محیط شاهد (بدون نانوذره)؛ b: محیط حاوی ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذره و c: محیط حاوی ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذره

Figure 1- Rooting of Chamomile regenerants at different concentrations of ZnO nanoparticles: a: control medium (without nanoparticles); b: medium containing 10 mg/L nanoparticles; c: medium containing 20 mg/L nanoparticles.

در مورد میانگین طول ریشه‌ها نیز الگوی جالبی مشاهده شد. بیشترین میانگین طول ریشه‌ها برابر ۱۳/۶ سانتی‌متر در تیمار بدون بنزیل آدنین با ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذره ثبت گردید. این مقدار به‌طور معنی‌داری از همه تیمارهای دیگر بالاتر بود. تیمار یک میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آدنین همراه با ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذره نیز ۱۱ سانتی‌متر طول ریشه نشان داد. جالب اینجاست که وقتی بنزیل آدنین در سطح دو میلی‌گرم بر لیتر استفاده شد، میانگین طول ریشه حتی با حضور ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذره به ۶ سانتی‌متر کاهش یافت. این موضوع نشان می‌دهد که غلظت بالاتر بنزیل آدنین ممکن است تا حدی اثر مثبت نانوذرات بر رشد طولی ریشه را تعدیل کند. میانگین تعداد ریشه روند متفاوتی داشت. بیشترین میانگین تعداد ریشه برابر ۱۲/۳ عدد در ترکیب دو میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آدنین همراه با ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذره به دست آمد. تیمار یک میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آدنین با همان غلظت نانوذره نیز میانگین ۱۱/۶ ریشه تولید کرد. این اعداد نشان می‌دهند که حضور همزمان بنزیل آدنین و نانوذرات اکسید روی در غلظت‌های بالاتر، تعداد ریشه را به‌طور مؤثری افزایش می‌دهد.

میانگین طول اندام هوایی نیز تحت تأثیر تیمارها قرار گرفت. بیشترین مقدار این صفت برابر ۴/۲۶ سانتی‌متر در تیمار یک میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آدنین همراه با ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذره مشاهده شد. تیمارهای حاوی بنزیل آدنین به‌طورکلی طول اندام هوایی بالاتری نسبت به تیمارهای بدون هورمون نشان دادند. به نظر می‌رسد بنزیل آدنین نقش اصلی را در تحریک رشد طولی ساقه ایفا می‌کند، در حالی که نانوذرات اکسید روی بیشتر بر صفات ریشه‌ای تأثیرگذار بوده‌اند.

در مجموع، نتایج این آزمایش نشان داد که نانوذرات اکسید روی به تنهایی و به‌ویژه در غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر قادر است درصد باززایی و رشد ریشه را به‌طور قابل توجهی بهبود ببخشد. ترکیب ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات اکسید روی با بنزیل آدنین در سطوح یک یا دو میلی‌گرم بر لیتر، نتیجه بهتری از نظر درصد باززایی و میانگین تعداد ریشه به همراه داشته است. با این حال، برای دستیابی به تعادل مناسب بین رشد ریشه و اندام هوایی، انتخاب دقیق غلظت‌ها اهمیت دارد. این یافته‌ها می‌تواند در بهینه‌سازی شیوه‌های باززایی درون‌شیشه‌ای بابونه آلمانی مورد استفاده قرار گیرد و نشان‌دهنده ظرفیت نانوذرات اکسید روی به عنوان یک افزودنی مؤثر در محیط‌های کشت بافت است.

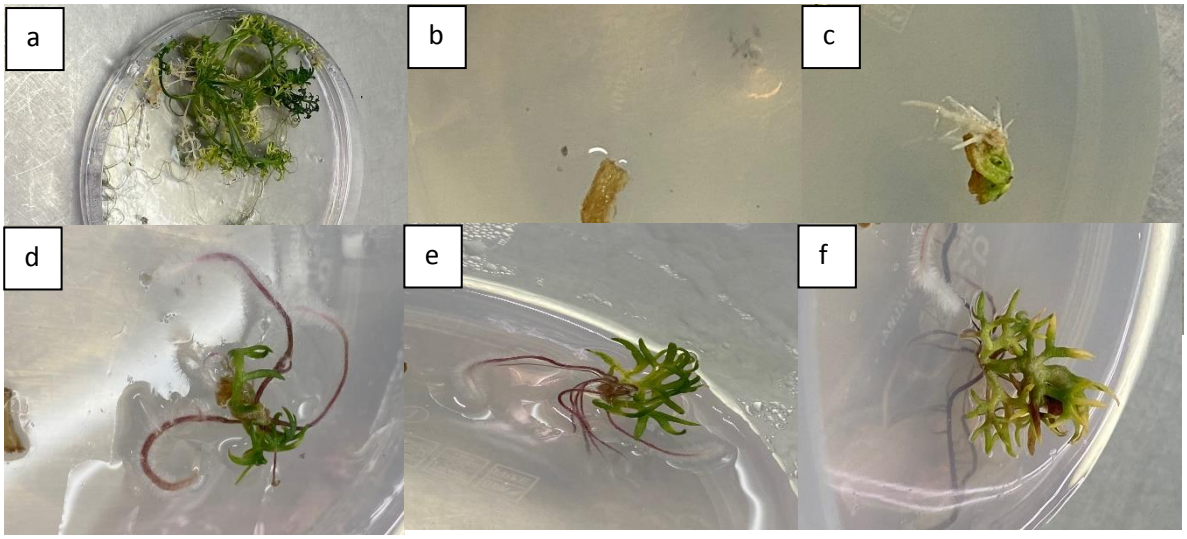
جدول ۳- مقایسه میانگین اثر متقابل بنزیل آدنین و نانوذرات اکسید روی صفات درصد باززایی، طول ریشه، تعداد ریشه و طول اندام هوایی در بابونه آلمانی

Table 3. Mean of ZnO nanoparticles and Benzyladenine Interaction effects of on regeneration percentage, root length, root number, and shoot length in Chamomile

Benzyladenine (mg/l)	ZnO (mg/l)	Regeneration (%)	Root length (cm)	roots number (per plantlet)	shoot length (cm)
0	0	21.33 e	3.00 e	1.60 f	1.33 c
0	10	49.33 c	6.60 c	6.30 de	2.73 b
0	20	73.00 ab	13.60 a	11.00 abc	3.16 ab
1	0	25.33 de	3.60 de	2.60 ef	3.33 ab
1	10	71.66 ab	7.30 c	7.60 cd	4.26 a
1	20	83.33 a	11.00 b	11.60 ab	3.93 ab
2	0	36.66 d	4.00 de	4.60 def	3.30 ab
2	10	67.00 b	5.30 cde	8.30 bcd	3.96 ab
2	20	80.66 a	6.00 cd	12.30 a	3.90 ab

میانگین‌هایی که در هر ستون دارای حرف یکسان هستند، براساس آزمون چنددامنه‌ای دانکن، در سطح احتمال $P<0.05$ تفاوت معناداری با یکدیگر ندارند.

Means with the same letter in each column are not significantly different ($P < 0.05$) based on Duncan's Multiple Range Test



شکل ۲- بابونه آلمانی در مراحل مختلف کشت: **a**: گیاهچه استفاده شده به‌عنوان ریزنمونه، **b**: کالوس گیاه بابونه، **c**: شروع ریشه‌دهی کالوس، **d**: گیاهچه بعد از گذشت ۳ هفته، **e**: گیاهچه بعد از ۴ هفته و **f**: گیاهچه کامل در مرحله انجام آنالیز

Figure 2- Chamomile at different stages of culture: a: explant used as the explant source; b: chamomile plant callus; c: initiation of rooting in callus; d: seedling after 3 weeks; e: seedling after 4 weeks; f: seedlings at the analysis stage.

بحث

نتایج این پژوهش نشان داد که نانوذرات ZnO تأثیر گسترده‌تری بر الگوی کلی صفات باززایی درون‌شیشه‌ای بابونه آلمانی نسبت به BA دارند و مقدار لامبدای ویلکز برای اثر نانوذرات، در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود که این موضوع نشان می‌دهد که نانوذرات ZnO نه‌تنها به‌صورت مستقل، بلکه احتمالاً از طریق تعامل با مسیرهای هورمونی داخل بافت بر پاسخ‌های مورفوژنیک اثرگذار هستند. با این حال، در تجزیه واریانس تک‌متغیره، اثر متقابل BA در نانوذرات ZnO تنها بر صفت طول ریشه معنی‌دار شد. این تفاوت بین تحلیل چندمتغیره و تک‌متغیره نشان می‌دهد که برخی از اثرهای متقابل پیچیده هورمون–نانوذره ممکن است در سطح همبستگی بین صفات پنهان بمانند و تنها از طریق رویکرد چندمتغیره قابل شناسایی باشند. Zafar و همکاران (۲۰۱۶) در خردل سیاه مشاهده کردند که نانوذرات ZnO در غلظت‌های پایین می‌توانند القای ریشه و ظهور ساقه را در ریزنمونه‌های ساقه برگ‌دار تحت تأثیر قرار دهند، در حالی که اثر آنها در سطح تک‌صفتی و چندصفتی متفاوت بود.

یکی از یافته‌های قابل توجه این پژوهش، دستیابی به ۷۳ درصد باززایی در تیمار بدون BA و حاوی ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات ZnO بود که حتی از تیمار ۲ میلی‌گرم بر لیتر BA بدون نانوذره نیز بیشتر بود و بیشترین طول ریشه نیز در همین تیمار مشاهده شد. این بهبود همزمان درصد باززایی و رشد ریشه‌ای بدون نیاز به سیتوکینین خارجی، احتمالاً با نقش کلیدی عنصر روی به عنوان کوفاکتور ضروری در آنزیم‌ها و ساختار پروتئین‌های انگشت روی (Zinc fingers) که فاکتورهای رونویسی مهم در تنظیم بیان ژن و نمو گیاهی هستند، مرتبط است (Ciftci-Yilmaz & Mittler, 2008). علاوه بر این، روی نقش مهمی در فعالیت آنزیم‌های مسیر بیوسنتز اسید آمینه تریپتوفان دارد که خود پیش‌ماده اصلی در مسیر بیوسنتز اکسین‌های درون‌زا مانند IAA به‌شمار می‌رود (Zhao, 2010)، بنابراین، رهاسازی تدریجی یون Zn از نانوذرات احتمالاً به‌طور غیرمستقیم سطح اکسین داخلی بافت را تعدیل کرده و منجر به تحریک ریشه‌زایی شده است. Zafar و همکاران (۲۰۱۶) گزارش کردند که غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات ZnO باعث ظهور ساقه و تولید ریشه‌های سفید

نازک با تارهای ریشه‌ای ضخیم در برگ‌های خردل سیاه شد و پیشنهاد کردند که نانوذرات ZnO می‌توانند از ریزنمونه‌های کشت‌شده روی محیط مناسب، ریشه القا کنند که این ریشه‌ها می‌توانند برای تولید متابولیت‌های ثانویه ارزشمند مورد استفاده قرار بگیرند. شباهت غلظت مؤثر (۱۰ تا ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر) بین دو مطالعه نشان می‌دهد که نانوذرات ZnO در محدوده غلظتی متوسط می‌توانند به عنوان یک القاگر مورفوژنتیک عمل کنند، هرچند شدت این پاسخ ممکن است به نوع گونه و شرایط کشت وابسته باشد.

هنگامی که BA به محیط کشت اضافه شد، میانگین طول ریشه به‌طور قابل توجهی کاهش یافت و در تیمار ۲ میلی‌گرم بر لیتر BA همراه با ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذره، طول ریشه به ۶ سانتی‌متر رسید. این کاهش شدید احتمالاً ناشی از اولویت‌بندی در تخصیص منابع کربوهیدرات به سمت رشد اندام هوایی به دلیل غلظت بالای سیتوکینین خارجی و نیز اثر متقابل و منفی هورمون BA با فرایند طویل شدن سلول‌های ریشه تحت تأثیر یون Zn است؛ زیرا سیتوکینین‌ها عموماً اثر بازدارندگی بر طویل شدن سلول‌های ریشه دارند. Dahajipour Heidarabadi و همکاران (۲۰۲۶) نیز گزارش کردند که نانوذرات ZnO در غلظت‌های پایین (۰/۰۱۶ تا ۰/۱۴ میلی‌گرم بر لیتر) طول ریشه را در *Melissa officinalis* به‌طور چشمگیری (۳ تا ۵ برابر) افزایش داد، در حالی که درصد جوانه‌زنی کاهش یافت. این یافته‌ها نشان داد که پاسخ به نانوذرات ZnO وابسته به گونه و غلظت است و ممکن است در حضور هورمون‌های رشد، الگوی تخصیص رشد بین اندام‌های هوایی و زمینی تغییر کند، اما این سازوکار به صورت مستقیم در این پژوهش آزمون نشده است.

میانگین تعداد ریشه در تیمار ۲ میلی‌گرم بر لیتر BA همراه با ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذره به ۱۲/۳ عدد رسید که بیشترین مقدار در بین تمام تیمارها بود. افزایش تعداد ریشه‌ها در حضور همزمان سیتوکینین و نانوذره ممکن است ناشی از تعامل مثبت غلظت‌های خاص نانوذرات ZnO با اکسین‌های درون‌زا برای القای پری‌سیکل (Pericycle) و شروع ریشه‌های جانبی باشد، در حالی که خود هورمون BA به تنهایی اثر چندانی بر این صفت نداشته است. Ghareb و همکاران (۲۰۲۴) نشان دادند که افزودن ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات ZnO به محیط کشت *Eriobotrya japonica* باعث افزایش تعداد و طول ساقه شد و درصد القای رشد را به ۱۰۰ درصد رساند. آنان گزارش کردند که نانوذرات ZnO می‌تواند با تنظیم‌کننده‌های رشد مانند BA و Kinetin تعامل داشته باشد و نتیجه باززایی را بهبود ببخشد. این مقایسه تنها در حد نشان دادن امکان تعامل نانوذرات ZnO با تنظیم‌کننده‌های رشد قابل طرح است و نباید به‌عنوان یک قاعده عمومی در همه گونه‌ها تلقی شود.

بالاترین درصد باززایی (۸۳/۳۳ درصد) در ترکیب ۱ میلی‌گرم بر لیتر BA و ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات ZnO به دست آمد، در حالی که میانگین طول ساقه در تیمار ۱ میلی‌گرم بر لیتر BA همراه با ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذره به حداکثر مقدار خود (۴/۲۶ سانتی‌متر) رسید. این الگو نشان داد که غلظت بهینه نانوذرات ZnO برای هر صفت می‌تواند متفاوت باشد. Zafar و همکاران (۲۰۱۶) دریافتند که غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات ZnO برای القای ریشه و ظهور ساقه مناسب بود، در حالی که غلظت‌های بالاتر (۵۰۰ تا ۱۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) باعث مهار جوانه‌زنی و رشد شد. Dahajipour Heidarabadi و همکاران (۲۰۲۶) نیز تأکید کردند که غلظت‌های بسیار پایین نانوذرات ZnO می‌تواند رشد و تولید متابولیت‌های ثانویه را در گیاه خردل سیاه بهبود ببخشد، در حالی که غلظت‌های بالاتر ممکن است اثرهای متفاوتی داشته باشند. بر این اساس، پاسخ دوز–وابسته نانوذرات ZnO در این پژوهش نیز مشاهده شده است، اما دامنه بهینه آن برای هر صفت و هر گونه باید جداگانه تعیین شود.

از نظر آماری، اثر نانوذرات ZnO بر درصد باززایی، میانگین طول ریشه و میانگین تعداد ریشه در سطح یک درصد معنی‌دار بود، در حالی که اثر BA بر میانگین تعداد ریشه معنی‌دار نشد. این تفاوت نشان می‌دهد که نانوذرات ZnO در این سامانه تأثیر پررنگ‌تری بر صفات ریشه‌ای داشته‌اند، در حالی که BA بیشتر بر صفات مرتبط با اندام هوایی اثرگذار

بوده است؛ با این حال، این برداشت باید در چارچوب داده‌های همین آزمایش تفسیر شود و به‌عنوان نتیجه‌ای عمومی تلقی نشود. Ghareb و همکاران (۲۰۲۴) گزارش کردند که نانوذرات ZnO به‌طور مستقل و بدون نیاز به تغییر در غلظت BA، تعداد و طول ساقه را در *Eriobotrya japonica* افزایش داد.

یکی از سازوکارهای کلیدی مطرح در پاسخ گیاه به نانوذرات، تحریک سیستم سیگنال‌دهی سلولی از طریق القای تنش‌های کنترل‌شده است. رهاسازی تدریجی یون‌های روی و تماس فیزیکی نانوذرات با غشای سلولی می‌تواند منجر به القای یک تنش اکسیداتیو ملایم و انفجار موقت گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) شود. این افزایش کنترل‌شده ROS در سلول، به عنوان یک پیام‌رسان ثانویه در شبکه انتقال پیام هورمونی عمل کرده و با تحت تأثیر قرار دادن بیان ژن‌های مرتبط با مورفوژنز، مسیرهای تمایز سلولی و باززایی را فعال می‌کند؛ روندی که با یافته‌های این پژوهش مبنی بر بهبود درصد باززایی و طول ریشه در تیمار حاوی ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذره ZnO (حتی بدون حضور سیتوکینین خارجی) همخوانی دارد. در تأیید این فرضیه، Marslin و همکاران (۲۰۱۷) نشان دادند که نانوذرات قادرند از طریق ایجاد چنین انفجار اکسیداتیوی، مسیرهای بیوسنتزی و متابولیسم ثانویه را بازآرایی کنند. علاوه بر این، Berni و همکاران (۲۰۱۹) تأکید کردند که ROS و تنش ناشی از عناصر فلزی می‌توانند ویژگی‌های ساختاری دیواره سلولی و به دنبال آن پلاستیسیته رشد سلول را تغییر دهند. این فرایند پلاستیسیته دیواره در کنار تحریک تقسیم سلولی، می‌تواند تبیین‌کننده تمایز سریع‌تر ریشه‌ها در مواجهه با نانوذرات باشد.

با این حال، پاسخ گیاه به نانوذرات ZnO فراتر از یک پاسخ تنشی ساده است و باید در چارچوب نقش تغذیه‌ای روی نیز تفسیر شود؛ زیرا نانوذرات اکسید روی در محیط کشت به عنوان یک منبع آهسته‌رهش برای روی عمل می‌کنند. همان‌طور که Alloway (۲۰۰۸) و Broadley (۲۰۰۷) نشان دادند، روی نقشی حیاتی در پایداری غشا، سنتز پروتئین‌ها و فعالیت آنزیم‌های کلیدی گیاه دارد. آزادسازی تدریجی این عنصر از نانوذرات، جریان متابولیکی سلول را به سمت بهینه‌سازی مصرف کربوهیدرات‌ها سوق می‌دهد. این پدیده بهبود تغذیه‌ای مشابه با یافته‌های Dimkpa و همکاران (۲۰۱۷) است که در آن استفاده از نانوذرات اکسید روی منجر به بارگذاری کارآمدتر مواد مغذی در دانه و بهبود بنیه فیزیولوژیک گیاه شد.

تحلیل مقایسه‌ای واکنش‌های مورفوژنیک در مطالعات مختلف نشان می‌دهد که تعادل میان تحریک اکسیداتیو ملایم و تأمین تغذیه‌ای روی، پاسخ نهایی ریزنمونه را در کشت بافت تعیین می‌کند. برای نمونه، Alharby و همکاران (۲۰۱۶) گزارش کردند که نانوذرات ZnO می‌توانند القای کالوس و باززایی گوجه‌فرنگی را حتی تحت شرایط بازدارنده تنش شوری تسهیل کنند؛ این موضوع نشان‌دهنده توانایی نانوذره در تقویت سیستم‌های دفاعی و سازگاری سلول است. در شرایط عدم تنش محیطی نیز، پاسخ‌های مورفوژنیک و متابولیکی به شدت تحت تأثیر هم‌افزایی نانوذره با هورمون‌های داخلی یا اعمال شرایط محیطی قرار می‌گیرند. برای نمونه، Javed و همکاران (۲۰۱۸) در کشت کالوس استویا *Stevia* و Shehzad و همکاران (۲۰۲۱) در کالوس *Silybum marianum* نشان دادند که ترکیب نانوذرات فلزی با محرک‌های فیزیکی مانند رژیم‌های نوری مختلف، ظرفیت تولید متابولیت‌های ثانویه (مانند سیلیمارین) و شاخص‌های رشد را به‌طور معنی‌داری تغییر می‌دهد. این سازگاری و تحریک‌پذیری بالا، ناشی از انعطاف‌پذیری مسیرهای بیوسنتزی در مواجهه با نانوذرات سنتزشده به روش‌های مختلف است؛ به‌طوری‌که حتی Tarroum و همکاران (۲۰۲۳) دریافتند استفاده از نانوذرات ZnO سنتزشده با روش‌های زیستی به دلیل سازگاری زیستی بالاتر و سمیت کمتر، کارایی القای مسیرهای ثانویه را در کالوس *Caesalpinia pulcherrima* بهبود می‌بخشد. Zafar و همکاران (۲۰۱۶) نشان دادند که نانوذرات ZnO در غلظت‌های بالا (۵۰۰ تا ۱۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) جوانه‌زنی و رشد گیاهچه خردل سیاه را مهار کرد، در حالی که غلظت‌های پایین (۱ تا ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر) القای ریشه و ساقه را بهبود بخشید. Dahajipour

Heidarabadi و همکاران (۲۰۲۶) نیز مشاهده کردند که غلظت‌های بسیار پایین نانوذرات ZnO رشد و تولید متابولیت را در *Melissa officinalis* افزایش داد. این الگوها در این پژوهش نیز دیده شد: غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر برای طول ساقه و غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر برای درصد باززایی و تعداد ریشه مناسب‌تر بود. Kurczyńska و همکاران (۲۰۲۱) و Rivero-Montejo و همکاران (۲۰۲۱) نیز تأکید کردند که نانوذرات می‌توانند با توجه به غلظت، نقش محرک یا بازدارنده داشته باشند.

از نظر کاربردی در اصلاح و ژنتیک گیاهی، توسعه این شیوه‌نامه کارآمد تک‌مرحله‌ای باززایی و ریشه‌زایی می‌تواند نقش مهمی در تکثیر سریع کلونال ژنوتیپ‌های برتر و حفظ پایداری همسانی ژنتیکی بدون خطر جهش‌های ناخواسته ناشی از غلظت‌های بالای هورمون ایفا کند. همچنین، استقرار چنین سیستمی پیش‌نیاز اساسی برای انتقال ژن و مهندسی ژنتیک، تولید گیاهان عاری از ویروس و نگهداری ذخایر توارثی بابونه آلمانی در بانک‌های ژن درون‌شیشه‌ای است.

با این حال، این پژوهش با محدودیت‌هایی روبرو بوده است؛ ازجمله استفاده از تنها یک ژنوتیپ خاص بابونه آلمانی که تعمیم‌پذیری نتایج به سایر توده‌ها را با محدودیت مواجه می‌کند. همچنین عدم ارزیابی پایداری ژنتیکی گیاهچه‌های باززاشده با نشانگرهای مولکولی، عدم سنجش غلظت و جذب واقعی عنصر روی در بافت‌های گیاهی، عدم اندازه‌گیری شاخص‌های بیوشیمیایی حساس (مانند فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در پاسخ به تنش اکسیداتیو ملایم ناشی از نانوذره) و عدم پیگیری رفتار، بقا و صفات فیزیولوژیکی گیاهچه‌ها پس از انتقال به شرایط گلخانه‌ای از دیگر محدودیت‌های این تحقیق به‌شمار می‌روند.

در مجموع، ترکیب ۱ میلی‌گرم بر لیتر BA و ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر ZnO NPs تعادل مناسبی بین درصد باززایی، تعداد ریشه و رشد اندام هوایی ایجاد کرد و به‌عنوان شیوه‌نامه پایه برای باززایی درون‌شیشه‌ای بابونه آلمانی پیشنهاد شد. با این حال، بهینه‌سازی بیشتر و بررسی پاسخ ژنوتیپ‌های مختلف در پژوهش‌های آینده ضروریست.

References

Alharby, H. F., Metwali, E. M. R., Fuller, M. P., & Aldhebiani, A. Y. 2016. Impact of application of zinc oxide nanoparticles on callus induction and plant regeneration in tomato under salt stress. *Archives of Biological Sciences*, *68*(4), 723–735. DOI:10.2298/ABS151105017A

Alloway, B. J. 2008. *Zinc in soils and crop nutrition* (2nd ed.). International Zinc Association (IZA) and International Fertilizer Industry Association (IFA). Brussels, Belgium and Paris, France

Berni, R., Luyckx, M., Xu, X., Legay, S., Sergeant, K., Hausman, J.-F., Lutts, S., Cai, G., & Guerriero, G. 2019. Reactive oxygen species and heavy metal stress in plants: Impact on the cell wall and secondary metabolism. *Environmental and Experimental Botany*, 161, 98–106. https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.10.017

Broadley, M. R., White, P. J., Hammond, J. P., Zelko, I., & Lux, A. 2007. Zinc in plants. *New Phytologist*, *173*(4), 677–702. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.01996.x

Ciftci-Yilmaz, S., & Mittler, R. 2008. The zinc finger network of plants. Cellular and Molecular Life Sciences, 65(7–8), 1150–1160. https://doi.org/10.1007/s00018-007-7473-4

Dahajipour Heidarabadi, M., Ghasemi, M., & Ghasemi, Y. 2026. Effect of ZnO NPs on germination, seedling growth and secondary metabolites of *Melissa officinalis* L. in in vitro culture. *Plant Production and Genetics*, *7*(1), 93–108. https://doi.org/10.22034/PLANT.2001.145333.1195

Dimkpa, C. O., White, J. C., Elmer, W. H., & Gardea-Torresdey, J. 2017. Nanoparticles and ionic Zn promote nutrient loading of sorghum grain under low NPK fertilization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *65*(39), 8552–8559. https://doi.org/10.1021/jf3021724

Ghareb, H. E., Ibrahim, S. D., & Abd El-Kafie, O. M. 2024. In vitro propagation and assessment of genetic stability in *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl. as affected by zinc oxide nanoparticles (ZnO-NPs). *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*. https://doi.org/10.1007/s11627-024-10502-4

George, E. F., Hall, M. A., & De Klerk, G. J. 2008. *Plant propagation by tissue culture* (3rd ed.). Dordrecht, Netherlands: Springer.

Ikeuchi, M., Ogawa, Y., Iwase, A., & Sugimoto, K. 2016. Plant regeneration: Cellular origins and molecular mechanisms. *Development*, *143*(9), 1442–1451. https://doi.org/10.1242/dev.134668

Javed, R., Yucesan, B., Zia, M., & Gurel, E. 2018. Elicitation of secondary metabolites in callus cultures of *Stevia rebaudiana* Bertoni grown under ZnO and CuO nanoparticle stress. *Sugar Tech, 20*(2), 194–201. DOI:10.1007/s12355-017-0539-1

Kurczyńska, E., Godel-Jędrychowska, K., Sala, K., & Milewska-Hendel, A. 2021. Nanoparticles—plant interaction: What we know, where we are? *Applied Sciences, 11*, 5473. doi.org/10.3390/app11125473

Marslin, G., Sheeba, C. J., & Franklin, G. 2017. Nanoparticles alter secondary metabolism in plants via a ROS burst. *Frontiers in Plant Science, 8*, 832. doi.org/10.3389/fpls.2017.00832

Masoumi-Asl, A., Ariaeinejad, S., & Dehdari, M. 2015. Assessment of direct regeneration in German and Shirazi chamomiles (*Matricaria chamomilla* L. and *Matricaria recutita* L.) under in vitro conditions. *Journal of Horticultural Science*, 29(4), 548–557. https://doi.org/10.22067/jhorts4.v29i4.32417

Murashige, T., & Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497. doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x

Rai, M., Deshmukh, S. D., Ingle, A. P., & Gade, A. K. 2012. Silver nanoparticles: The powerful nanoweapon against multidrug-resistant bacteria. *Journal of Applied Microbiology, 112*(5), 841–852. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05253.x

Rivero-Montejo, S. D. J., Vargas-Hernandez, M., & Torres-Pacheco, I. 2021. Nanoparticles as novel elicitors to improve bioactive compounds in plants. *Agriculture, 11*(2), 134. doi.org/10.3390/agriculture11020134

Rout, G. R., Samantaray, S., & Das, P. 2000. In vitro manipulation and propagation of medicinal plants. *Biotechnology Advances, 24*(6), 531–560. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.07.001

Shehzad, M. A., Khan, M. A., Ali, A., Mohammad, S., Noureldeen, A., Darwish, H., & Khan, R. S. 2021. Interactive effects of zinc oxide nanoparticles and different light regimes on growth and silymarin biosynthesis in callus cultures of *Silybum marianum* L. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology, 49*(1), 523–535. DOI: 10.1080/21691401.2021.1946069

Srivastava, J. K., Shankar, E., & Gupta, S. 2010. Chamomile: A herbal medicine of the past with a bright future. *Molecular Medicine Reports, 3*(6), 895–901. https://doi.org/10.3892/mmr.2010.377

Tarroum, M., Alfarraj, N. S., Al-Qurainy, F., Al-Hashimi, A., Khan, S., Nadeem, M., & Shaikhaldein, H. O. 2023. Improving the production of secondary metabolites via the application of biogenic zinc oxide nanoparticles in the calli of *Delonix elata*: A potential medicinal plant. *Metabolites, 13*(8), 905. doi.org/10.3390/metabo13080905

Tripathi, D. K., Singh, S., Singh, S., Pandey, R., Singh, V. P., Sharma, N. C., & Prasad, S. M. 2017. An overview of manufactured nanoparticles in plants: Uptake, translocation, accumulation and phytotoxicity. *Plant Physiology and Biochemistry, 110*, 2–12. doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.07.030

Zafar, H., Ali, A., Ali, J. S., Haq, I. U., & Zia, M. 2016. Effect of ZnO nanoparticles on *Brassica nigra* seedlings and stem explants: Growth, antioxidants, and secondary metabolites. *Frontiers in Plant Science, 7*, 535. Doi.org/10.3389/fpls.2016.00535

Zhao, Y. 2010. Auxin biosynthesis and its role in plant development. Annual Review of Plant Biology, 61, 49–64. doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112308