بسم الله الرحمن الرحيم

پایان‌نامه‌ی حاضر، حاصل پژوهش‌های نگارنده در دوره‌ی کارشناسی ارشد رشته‌ی مهندسی کشاورزی گرایش اصلاح نباتات است که در بهمن ماه سال ۱۳۹۲ در دانشکده‌ی کشاورزی دانشگاه یاسوج به راهنمایی جناب آقای دکتر اسد معصومی‌اصل و مشاوره‌ی جناب آقای دکتر مسعود دهداری از آن دفاع شده است و کلیه‌ی حقوق مادی و معنوی آن متعلق به دانشگاه یاسوج است.

دانشکده کشاورزی

گروه زراعت واصلاح نباتات

پایان نامه‌ی کارشناسی ارشد رشته اصلاح نباتات

ریزازدیادی و پینه‌زایی گیاه دارویی بابونه

(*Matricaria chamomilla* L.)

استاد راهنما:

دکتر اسد معصومی‌اصل

استاد مشاور:

دکتر مسعود دهداری

پژوهشگر:

آمنه آریایی‌نژاد

بهمن ماه ۱۳۹۲

ریزازدیادی و پینه‌زایی گیاه دارویی بابونه (*Matricaria chamomilla* L.)

به وسیله‌ی:

آمنه آریایی‌نژاد

پایان نامه ارائه شده به تحصیلات تکمیلی دانشگاه به عنوان بخشی از فعالیت‌های تحصیلی لازم برای اخذ درجه‌ی کارشناسی ارشد

در رشته‌ی:

اصلاح نباتات

در تاریخ ۱۳۹۲/۱۱/۳۰ توسط هیات داوران زیر بررسی و با درجه عالی به تصویب نهایی رسید:

۱- استاد راهنما: دکتر اسد معصومی‌اصل با مرتبه‌ی علمی استادیار امضاء
۲- استاد مشاور: دکتر مسعود دهداری با مرتبه‌ی علمی استادیار امضاء
۳- استاد داور داخل گروه: دکتر رضا امیری فهلیانی با مرتبه‌ی علمی استادیار امضاء
۴- استاد داور خارج از گروه: دکتر هوشنگ فرجی با مرتبه‌ی علمی استادیار امضاء
۵- نماینده تحصیلا ت تکمیلی دانشگاه: دکتر سهراب الوانی نژاد با مرتبه‌ی علمی استادیار امضاء

بهمن ماه ۱۳۹۲

سپاسگزاری

با سپاس از درگاه یگانه خداوندی که در پرتو نگاه سخاوتمندانه‌اش، در گذران مسیر دانش هماره بهره‌مندی از سایه‌ی سراسر مهر پدر و مادر، شکیبایی و مهربانی همسر و شاگردی در آستان استادان گران‌مایه را بر من ارزانی داشت. اکنون که این رساله به پایان آمده است، برخود فرض می‌دانم از استاد ارجمند جناب آقای دکتر اسد معصومی‌اصل و استاد گرانقدر جناب آقای دکتر مسعود دهداری که به ترتیب راهنمایی و مشاوره این پژوهش را بر عهده داشتند تقدیر و تشکر نمایم.

نام : آمنه **نام خانوادگی: آریایی‌نژاد**
مقطع تحصیلی : کارشناسی ارشد رشته و گرایش: مهندسی کشاورزی- اصلاح نباتات
استاد راهنما : دکتر اسد معصومی‌اصل **تاریخ دفاع: ۱۳۹۲/۱۱/۳۰**

ریزازدیادی و پینه‌زایی گیاه دارویی بابونه (*Matricaria chamomilla* L.)

چکیده:

بابونه آلمانی (*Matricaria chamomilla* L.) و بابونه شیرازی (*Matricaria recutita* L.) از مهم‌ترین گیاهان دارویی خانواده کاسنی می‌باشند که در صنایع داروسازی، بهداشتی، آرایشی و غذایی استفاده می‌شوند. ریزازدیادی درون‌شیشه‌ای گیاهان، پتانسیل بالایی جهت تولید داروهای گیاهی و با کیفیت بالا، احیاء و حفظ گیاه، ایجاد تنوع سوماکلونی، تکثیر به صورت صنعتی، تولید متابولیت‌های ثانویه باارزش و افزایش مواد موثره دارد. این تحقیق در قالب ۷ آزمایش در سال‌های۹۲-۱۳۹۱ در آزمایشگاه مرکزی دانشکده کشاورزی دانشگاه یاسوج به اجرا درآمد. کلیه آزمایش‌ها به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. آزمایش اول، به منظور تعیین بهترین تیمار ضدعفونی بذر با استفاده از اتانول ۷۰٪ و هیپوکلریت سدیم ۳٪ در پنج مدت زمان مختلف صورت پذیرفت. در آزمایش دوم، تعیین بهترین محیط کشت جهت جوانه‌زنی بذور با استفاده از تنظیم‌کننده رشد گیاهی NAA (۰، ۰/۰۰۲۵، ۰/۰۱ و ۰/۰۲ میلی‌گرم در لیتر) بررسی گردید. در آزمایش سوم، اثر غلظت‌های متفاوت تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی شامل BAP، 2-ip، زآتین هر کدام در سه سطح (۰/۵، ۱، ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر)، کینتین (۲، ۲/۵، ۳ میلی‌گرم در لیتر) و NAA (۰/۱، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) بر روی باززایی مستقیم دو رقم بابونه مطالعه شد. در آزمایش چهارم، تعیین مناسب‌ترین غلظت هورمونی جهت ریشه‌زایی گیاهچه‌های حاصل از باززایی مستقیم با استفاده از تنظیم‌کننده رشد گیاهی IBA (۰، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) بررسی شد. در آزمایش پنجم، اثر غلظت‌های متفاوت تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی شامل 2,4-D (۶، ۱۸ میکرومولار)، NAA (۴، ۲۲، ۲۵، ۲۶ میکرومولار)، کینتین (۲، ۶، ۱۲ میکرومولار) و BAP (۲، ۶، ۱۲ میکرومولار) بر روی باززایی غیرمستقیم مطالعه شد. آزمایش ششم، مطالعه تعیین بهترین ترکیب هورمونی جهت شاخساره‌زایی از پینه با استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی BAP و کینتین هر کدام در سه سطح (۱، ۲ و ۳ میلی‌گرم در لیتر) انجام پذیرفت و در نهایت در آزمایش هفتم، تعیین مناسب‌ترین غلظت هورمونی جهت ریشه‌زایی گیاهچه‌های حاصل از باززایی غیرمستقیم با استفاده از تنظیم‌کننده رشد گیاهی IBA (۰، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱ و۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) مطالعه شد.

نتایج نشان داد که استفاده از اتانول ۷۰٪ به مدت ۱۰ دقیقه و هیپوکلریت سدیم ۳٪ به مدت ۱۵ دقیقه بهترین تیمار جهت ضدعفونی بابونه شیرازی می‌باشد و بابونه آلمانی با اتانول ۷۰٪ به مدت ۵ دقیقه و هیپوکلریت سدیم ۳٪ به مدت ۱۲ دقیقه ضدعفونی گردید. بیشترین درصد جوانه‌زنی بذور در رقم بابونه آلمانی (۱۰۰٪) و بابونه شیرازی (۸۷/۵٪) درمحیط کشت فاقد هورمون مشاهده شد. از بین چهار

ریزنمونه برگ، ساقه (فاقد و دارای گره) و لپه، ریزنمونه لپه و ساقه دارای گره پاسخ مناسبی به باززایی مستقیم نشان دادند. همچنین از بین ارقام و ترکیبات هورمونی مورد استفاده، رقم بابونه شیرازی با ترکیب هورمونی ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر 2-ip به همراه ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA در محیط کشت MS کامل، بهترین رقم و ترکیب هورمونی جهت باززایی مستقیم بود. در مرحله ریشه‌زایی نیز تیمار هورمونی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA برترین تیمار جهت ریشه‌زایی گیاهچه‌های حاصل از باززایی مستقیم بود. برای باززایی غیرمستقیم، در رقم بابونه آلمانی ریزنمونه برگ و در رقم بابونه شیرازی ریزنمونه ساقه پاسخ بهتری به باززایی غیرمستقیم نشان دادند. از بین ۱۳ ترکیب هورمونی مورد استفاده نیز ترکیب هورمونی شامل ۱۸ میکرومول 2,4-D و ۶ میکرومول کینتین مناسب‌ترین تیمار جهت باززایی غیرمستقیم برای هر دو رقم بود. از لحاظ درصد پینه‌زایی، برترین رقم و ریزنمونه به ترتیب رقم بابونه آلمانی و ریزنمونه برگ بود. از بین دو نوع تنظیم‌کننده رشد گیاهیBAP و کینتین برای هر دو رقم، BAP به میزان ۳ میلی‌گرم در لیتر جهت باززایی شاخساره از پینه مناسب بود. در مرحله ریشه‌زایی نیز تیمار هورمونی ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA برترین تیمار جهت ریشه‌زایی گیاهچه‌های حاصل از باززایی غیرمستقیم جهت هر دو رقم بود. به طورکلی، بر اساس نتایج حاصله، بابونه پاسخ مناسبی به کشت درون‌شیشه‌ای نشان داد.

کلمات کلیدی: بابونه، ریزازدیادی، پینه‌زایی، ریزنمونه، تنظیم‌کننده رشد گیاهی

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه

مقدمه..... ۱

فصل دوم: مروری بر منابع

۲-۱- اصلاح گیاهان دارویی..... ۳

۲-۲- خصوصیات گیاه دارویی بابونه ۴

۲-۲-۱- خاستگاه و پراکنش ۴

۲-۲-۲- گیاهشناسی ۴

۲-۲-۲-۱- ریشه ۵

۲-۲-۲-۲- ساقه ۵

۲-۲-۲-۳- برگ ۵

۲-۲-۲-۴- گل و میوه ۵

۲-۲-۳- شرایط رشد ۶

۲-۲-۴- ترکیب‌های موجود در اسانس بابونه ۶

۲-۲-۵- رشد و نیازهای اکولوژیکی بابونه ۶

۲-۲-۶- زمان گلدهی و برداشت گل ۷

۲-۲-۷- زمان برداشت بذر ۷

۲-۳- گیاهان دارویی و زیست‌فناوری ۸

۲-۴- کشت بافت ۹

۲-۵- کاربردهای کشت بافت در اصلاح نباتات ۱۰

۲-۶- انواع کشت بافت ۱۰

۲-۷- محیط کشت و اجزای آن ۱۱

۲-۷-۱- نمک‌های غیرآلی ۱۱

۲-۷-۲- تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی ۱۲

۲-۷-۳- اکسین‌ها ۱۳
۲-۷-۳-۱- انواع اکسین‌ها ۱۴
۲-۷-۳-۲- اثرات اکسین‌ها ۱۴
۲-۷-۳-۳- جذب و سوخت و ساز اکسین‌ها ۱۵
۲-۷-۴- سیتوکینین‌ها ۱۵
۲-۷-۴-۱- انواع سیتوکینین‌ها ۱۶
۲-۷-۴-۲- اثرات سیتوکینین‌ها ۱۶
۲-۷-۴-۳- جذب و سوخت و ساز سیتوکینین‌ها ۱۷
۲-۷-۵- ویتامین‌ها ۱۷
۲-۷-۶- قندها ۱۷
۲-۷-۷- هگزیتول‌ها ۱۷
۲-۷-۸- مواد ژله‌کننده ۱۷
۲-۷-۹- pH محیط کشت ۱۸
۲-۷-۱۰- حلال‌های انواع تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی ۱۸
۲-۸- ریزنمونه ۱۸
۲-۹- پینه‌زایی ۱۹
۲-۱۰- باززایی ۲۰
۲-۱۱- اهمیت ریزازدیادی گیاهان ۲۰
۲-۱۲- مراحل ریزازدیادی ۲۱
۲-۱۳- مطالعات کشت بافتی انجام شده در بابونه و سایر گیاهان دارویی ۲۱
۲-۱۴- جمع‌بندی ۲۳

فصل سوم: مواد و روش‌ها

۳-۱- مواد گیاهی ۲۵
۳-۲- مراحل ضدعفونی ۲۵
۳-۲-۱- ضدعفونی اتاق کشت ۲۵
۳-۲-۲- ضدعفونی وسایل کشت ۲۵
۳-۲-۳- ضدعفونی بذور ۲۶
۳-۳- تهیه محیط کشت ۲۶
۳-۳-۱- تهیه محلول‌های ذخیره ۲۶

۳-۴- تنظیم‌کننده‌های گیاهی مورد استفاده ۲۷
۳-۵- نحوه کشت ریزنمونه‌ها ۲۸
۳-۶- آزمایش‌ها ۲۸
۳-۶-۱- آزمایش اول: تعیین بهترین تیمار ضدعفونی بذر ۲۸
۳-۶-۲- آزمایش دوم: تعیین بهترین محیط کشت به منظور جوانه‌زنی بذور ۲۹
۳-۶-۳- آزمایش سوم: تعیین بهترین ترکیب هورمونی و بهترین ریزنمونه جهت باززایی مستقیم ۲۹
۳-۶-۴- آزمایش چهارم: تعیین مناسب‌ترین غلظت هورمونی جهت ریشه‌زایی گیاهچه‌های حاصل از باززایی مستقیم ۳۱
۳-۶-۵- آزمایش پنجم: تعیین بهترین ترکیب هورمونی جهت پینه‌زایی و باززایی غیرمستقیم ۳۱
۳-۶-۶- آزمایش ششم: تعیین بهترین ترکیب هورمونی جهت شاخساره‌زایی از پینه ۳۲
۳-۶-۷- آزمایش هفتم: تعیین مناسب‌ترین غلظت هورمونی جهت ریشه‌زایی گیاهچه‌های حاصل از باززایی غیرمستقیم بابونه ۳۲
۳-۷- تجزیه‌های آماری ۳۳

فصل چهارم: نتایج و بحث

۴-۱- تعیین بهترین تیمار ضدعفونی ۳۴
۴-۲- تعیین بهترین محیط کشت به منظور جوانه‌زنی بذور ۳۵
۴-۳- باززایی مستقیم بابونه ۳۷
۴-۳-۱- تعیین مناسب‌ترین غلظت تنظیم‌کننده رشد گیاهی جهت شاخساره‌زایی در باززایی مستقیم بابونه ۳۷
۴-۳-۲- تعیین مناسب‌ترین غلظت تنظیم‌کننده رشد گیاهی جهت ریشه‌زایی شاخساره‌های حاصل از باززایی مستقیم بابونه ۵۰
۴=۴- باززایی غیرمستقیم بابونه ۵۲
۴-۴-۱- تعیین بهترین ترکیب هورمونی و بهترین ریزنمونه جهت پینه‌زایی بابونه‌های آلمانی و شیرازی ۵۲
۴-۴-۲- تعیین بهترین ترکیب هورمونی جهت باززایی شاخساره از پینه ۶۰
۴-۴-۳- تعیین مناسب‌ترین غلظت تنظیم‌کننده رشد گیاهی جهت ریشه‌زایی گیاهچه‌های حاصل از باززایی غیرمستقیم بابونه ۶۲
۴-۵- انتقال گیاهچه‌های باززایی شده به گلدان ۶۵
۴-۶- نتیجه گیری کلی ۶۶
۴-۷- پیشنهادها ۶۷
منابع ۶۸

فهرست جدول‌ها

عنوان و شماره **صفحه**

جدول۲-۱: حلال مناسب و طریقه سترون‌سازی برخی از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاه..... ۱۹
جدول ۳-۱: دسته‌بندی ترکیبات محیط کشت MS جهت تهیه محلول‌های ذخیره (استوک)..... ۲۷
جدول ۴-۱: نتایج حاصل از تیمارهای ضدعفونی بذور بابونه شیرازی..... ۳۵
جدول ۴-۲: نتایج حاصل از تجزیه واریانس برای صفت درصد جوانه‌زنی در دو رقم بابونه ۳۶
جدول ۴-۳: مقایسه میانگین اثر غلظت‌های مختلف NAA برای صفت جوانه‌زنی دو رقم بابونه..... ۳۶
جدول ۴-۴: نتایج حاصل از تجزیه واریانس برای صفات درصد شاخساره‌زایی و ریشه‌زایی دو رقم بابونه با ریزنمونه برگ، ساقه (دارای و فاقد گره) و کوتیلدون..... ۳۷
جدول ۴-۵: مقایسه میانگین برهم‌کنش ریزنمونه و ترکیب هورمونی برای صفت درصد شاخساره‌زایی و درصد ریشه‌زایی در باززایی مستقیم دو رقم بابونه ۳۸
جدول۴-۶: نتایج حاصل از تجزیه واریانس صفات شاخساره در باززایی مستقیم بابونه با ریزنمونه ساقه دارای گره و کوتیلدون..... ۴۱
جدول ۴-۷: مقایسه میانگین برهم‌کنش سه‌گانه رقم، ریزنمونه، ترکیب هورمونی برای صفات شاخساره در باززایی مستقیم بابونه با ریزنمونه ساقه دارای گره و کوتیلدون..... ۴۲
جدول ۴-۸: نتایج حاصل از تجزیه واریانس صفات ریشه در باززایی مستقیم بابونه با ریزنمونه ساقه دارای گره و کوتیلدون..... ۴۶
جدول ۴-۹: مقایسه میانگین برهم‌کنش سه‌گانه رقم، ریزنمونه، ترکیب هورمونی برای صفات ریشه در باززایی مستقیم بابونه با ریزنمونه ساقه دارای گره و کوتیلدون..... ۴۶
جدول ۴-۱۰: نتایج حاصل از تجزیه واریانس اثر غلظت‌های مختلف IBA بر روی صفات ریشه‌زایی در باززایی مستقیم بابونه..... ۵۱
جدول۴-۱۱: مقایسه میانگین اثر هورمون IBA برای صفات ریشه‌زایی در باززایی مستقیم بابونه..... ۵۱
جدول ۴-۱۲: نتایج حاصل از تجزیه واریانس صفات مورد ارزیابی در پینه‌زایی بابونه ۵۳
جدول ۴-۱۳: مقایسه میانگین برهم‌کنش سه‌گانه رقم، ریزنمونه، ترکیب هورمونی برای صفات وزن خشک پینه و درصد ریشه‌زایی در پینه‌زایی بابونه..... ۵۴
جدول ۴-۱۴: نتایج حاصل از تجزیه واریانس اثر غلظت‌های مختلف BAP و کینتین بر روی صفات شاخساره‌زایی در باززایی غیرمستقیم بابونه..... ۶۱
جدول ۴-۱۵: مقایسه میانگین اثر تنظیم‌کننده رشد گیاهی BAP و کینتین برای صفات شاخساره‌زایی در باززایی غیرمستقیم بابونه..... ۶۱
جدول ۴-۱۶: نتایج حاصل از تجزیه واریانس اثر غلظت‌های مختلف IBA بر روی صفات ریشه‌زایی در باززایی غیرمستقیم بابونه..... ۶۳
جدول ۴-۱۷: مقایسه میانگین اثر هورمون IBA برای صفات ریشه‌زایی در باززایی غیرمستقیم بابونه..... ۶۴
جدول ۴-۱۸: مقایسه میانگین اثر رقم برای صفات ریشه در باززایی غیرمستقیم بابونه..... ۶۴
جدول۴-۱۹: مقایسه میانگین اثر ریزنمونه برای صفات ریشه در باززایی غیرمستقیم بابونه..... ۶۴

فهرست نمودارها

عنوان و شماره **صفحه**

نمودار ۴-۱: مقایسه میانگین برهم‌کنش ریزنمونه و ترکیب هورمونی برای صفت درصد شاخساره‌زایی در باززایی مستقیم بابونه با ریزنمونه ساقه دارای گره و کوتیلدون.....۴۴
نمودار ۴-۲: مقایسه میانگین برهم‌کنش ریزنمونه و ترکیب هورمونی برای صفت وزن خشک ریشه در باززایی مستقیم بابونه با ریزنمونه ساقه دارای گره و کوتیلدون ۴۸
نمودار۴ -۳: مقایسه میانگین اثر ترکیب‌های مختلف هورمونی برای صفت درصد پینه‌زایی.....۵۶
نمودار ۴-۴: مقایسه میانگین اثر ترکیب‌های مختلف هورمونی برای صفت حجم پینه ۵۷
نمودار ۴-۵: مقایسه میانگین اثرات اصلی رقم و ریزنمونه برای صفت درصد پینه‌زایی.....۵۷
نمودار ۴-۶: مقایسه میانگین اثر متقابل رقم و ترکیب هورمونی برای صفت وزن تر پینه در بابونه آلمانی ۵۸
نمودار ۴-۷: مقایسه میانگین اثر متقابل رقم و ترکیب هورمونی برای صفت وزن تر پینه در بابونه شیرازی.....۵۸
نمودار ۴-۸: مقایسه میانگین اثر متقابل رقم و ترکیب هورمونی برای صفت درصد شاخساره‌زایی در بابونه آلمانی.....۵۹
نمودار ۴-۹: مقایسه میانگین اثر متقابل رقم و ترکیب هورمونی برای صفت درصد شاخساره‌زایی در بابونه شیرازی.....۵۹
نمودار ۴-۱۰: مقایسه میانگین اثر اصلی رقم برای صفت شاخساره‌زایی در پینه‌زایی بابونه.....۶۰

فهرست شکل‌ها

عنوان و شماره **صفحه**

شکل ۲-۱: اثر نسبت‌های مختلف اکسین وسیتوکینین بر روی رشد و اندام‌زایی ۱۵
شکل ۳-۱: شکل عدم وجود جوانه جانبی در ریزنمونه ساقه بدون جوانه جانبی توسط دستگاه بینوکولار.....۳۳
شکل ۴-۱: گیاهچه‌های حاصل از باززایی مستقیم در محیط هورمورنی ۱/۵ میلی گرم در لیتر 2-ip
و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA در هر دو رقم بابونه آلمانی و شیرازی.....۴۵
شکل ۴-۲: گلدهی گیاهچه‌های حاصل از باززایی مستقیم بابونه در محیط کشت حاوی سیتوکینین 2-ip
۴-۳: مراحل باززایی مستقیم در بابونه: الف)ریزنمونه (لپه) مستقر شده پس از ۱۰ روز.....۴۸
شکل ۴-۳: ب)گیاهچه باززایی شده.....۴۹
شکل ۴-۳: ریشه‌های گیاهچه باززایی شده.....۴۹
شکل ۴-۳: گیاهچه منتقل شده به گلدان ۴۹
شکل ۴-۳: گیاه سازگار شده.....۴۹
شکل ۴-۴: الف و ب) انواع مختلف گیاهچه کامل باززایی شده در محیط کشت حاوی
سیتوکینین2-ip ۴۹
شکل ۴-۴: ب) انواع مختلف ریشه مربوط به گیاهچه کامل باززایی شده در محیط کشت حاوی
سیتوکینین2-ip ۵۰
شکل ۴-۵: الف و ب)به ترتیب پینه‌های تولید شده از ریزنمونه ساقه و برگ.....۵۳
شکل ۴-۶: الف و ب) به ترتیب پینه‌های سبز رنگ و آغاز تولید گیاهچه.....۶۲
شکل ۴-۶: ب و ج) گیاهچه‌های حاصل از پینه‌زایی ۶۲
شکل ۴-۷: ریشه‌زایی در گیاهچه‌های حاصل از باززایی غیرمستقیم ۶۵
شکل ۴-۸: مراحل انتقال گیاهچه‌های حاصل از باززایی غیرمستقیم به گلدان و سازگاری با شرایط طبیعی ۶۵

فصل اول

مقدمه

بابونه (*Matricaria chamomilla* L.) از قدیمی‌ترین گیاهان دارویی شناخته شده توسط انسان است. مردم مصر و یونان باستان از خواص دارویی آن مطلع بوده و برای درمان بعضی بیماری‌ها از این گیاه استفاده می‌کرده‌اند. از مواد موثره گل‌های بابونه داروهای ضدتورّم، داروهایی برای معالجه دل درد، نفخ شکم و زخم‌های پوستی تهیه می‌شود. در اکثر کشورهای غربی از دم‌کرده گل‌های بابونه به عنوان اشتها آور و هضم‌کننده غذا استفاده می‌شود. اسانس گل‌های این گیاه اثر ضدمیکروبی دارد و از آن در صنایع داروسازی، بهداشتی و آرایشی و غذایی استفاده می‌شود (فولادی و همکاران، ۱۳۹۰ ؛ نجف‌پور نوایی، ۱۳۸۶). در طب آلمان، فرآورده‌های بابونه انتخاب اول جهت درمان حساسیت‌های پوستی کودکان می‌باشد (میرحیدر، ۱۳۹۰). کشت این گیاه در مقیاس وسیع از ۲۰ سال پیش در اغلب کشورهای غربی آغاز شده‌است. در حال حاضر نیاز صنایع مختلف به گل‌های بابونه در دنیا حدود چهار هزار تن گل خشک است. کشورهای عمده تولید کننده بابونه عبارتند از : مجارستان، روسیه، آرژانتین، آلمان، چک، اسلواک، فنلاند، مصر و اخیراً هندوستان (سالامون[1]، ۱۹۹۲).

فنون کشت بافت گیاهی به ابزار قدرتمندی در زیست‌شناسی گیاهی تبدیل شده‌است. این روش در گیاهان دارویی به طرف تولید متابولیت‌های ثانویه خاص، انتقال ژن، حفاظت ژرم پلاسم یا توسعه ریزازدیادی گیاه سوق داده شده‌است (روت[2] و همکاران، ۲۰۰۰). در واقع، کشت بافت گیاهی یکی از مهم‌ترین روش‌ها در راستای تولید صنعتی متابولیت‌های ثانویه است و به طور کلی استفاده از این روش در تولید برخی ترکیبات دارویی طبیعی می‌تواند سود اقتصادی بالایی را به همراه داشته باشد (حبیبی خانیانی و همکاران، ۱۳۸۴).

از هر بخش گیاه نظیر نوک شاخساره، جوانه برگ، سلول‌های مزوفیل، اپیدرم، کامبیوم، بساک و دانه گرده می‌توان برای تولید پینه و کشت سوسپانسیون سلولی استفاده کرد. رشد و تقسیم سلولی این بافت‌ها در یک محیط مناسب منجر به تولید توده تمایزنیافته‌ای از سلول‌ها به نام پینه می‌شود که در

---

[1]-*Salamon*
[2]-*Rout*

یک محیط مناسب تمایززایی شده و اجسام شبه‌جنین تولید می‌کنند. غلظت‌های هورمون‌های مختلف درونی بخش‌های مختلف گیاهی در پینه‌زایی گیاهان موثر شناخته شده‌است (شریفی و همکاران،۱۳۸۹). در گونه‌های مختلف گیاه، امکان تولید پینه و پس از آن رشد مجدد در یک محیط کشت جدید وجود دارد (باقری و صفاری، ۱۳۸۸). علاوه بر مواد تنظیم کننده رشد، عوامل متعدد دیگری نیز چون ژنوتیپ، ترکیب محیط کشت و عوامل فیزیکی موثر (نور، درجه حرارت و ...) نیز در رشد و تشکیل پینه اهمیت دارند (شریفی و همکاران،۱۳۸۹).

ریزازدیادی به عنوان ابزاری کارآمد برای تکثیر رویشی گیاهان، با هدف تکثیر سریع و همچنین بقای نسل گونه‌های نادر و در حال انقراض است. به کمک این روش می‌توان در مدت زمانی کوتاه و فارغ از محدودیت‌های فصلی، به تعداد زیادی گیاه دست یافت که چنین سرعت تکثیر و یکنواختی گیاهان را در هیچ یک از روش‌های تکثیر رویشی در شرایط طبیعی نمی‌توان انتظار داشت. اغلب هدف نهایی از هر نوع کشت سلولی، باززایی گیاهان موردنظر است. باززایی به دو صورت مستقیم و غیرمستقیم صورت می‌گیرد. در روش باززایی مستقیم ابتدا بافت‌های مریستمی کشت شده و سپس اندام‌زایی[1] مستقیم (شاخساره‌زایی و ریشه‌زایی) صورت می‌گیرد. در این نوع کشت، شاخساره‌های فراوانی از بافت ریزنمونه بدون واسطه پینه تولید می‌شود (باقری و صفاری، ۱۳۸۸). در روش باززایی غیرمستقیم، عموماً تولید گیاهان با واسطه پینه صورت می‌گیرد، یعنی ابتدا بافت ریزنمونه وادار به تشکیل پینه می‌گردد و سپس اندام‌زایی صورت می‌گیرد (شریفی و همکاران، ۱۳۸۹).

به دلیل اهمیت گیاه دارویی بابونه، در پژوهش حاضر پینه‌زایی و باززایی دو رقم بابونه شامل بابونه آلمانی و بابونه شیرازی مورد بررسی قرار گرفت. بدون تردید استفاده از تکنیک‌های کشت‌بافت (پینه‌زایی و ریزازدیادی) در این گیاه دارویی می‌تواند گام موثری در جهت احیاء و حفظ آن، ایجاد تنوع سوماکلونی، تکثیر به صورت صنعتی، تولید متابولیت‌های ثانویه باارزش و افزایش مواد موثره از طریق کشت سلولی باشد.

اهداف این پژوهش بدین شرح بودند:

۱- تعیین نحوه پینه‌زایی در بابونه‌های انتخابی

۲- تعیین بهترین محیط کشت جهت پینه‌زایی در بابونه‌های انتخابی

۳- تعیین بهترین محیط کشت جهت ریزازدیادی در بابونه‌های انتخابی

و فرضیه‌های پژوهش عبارت بودند از:

۱- در شرایط کشت درون شیشه‌ای می‌توان از گیاه دارویی بابونه پینه تهیه نمود.

۲- واکنش توده‌های انتخابی به ریزازدیادی متفاوت خواهد بود.

۳- محیط کشت‌های مختلف برای تکثیر ارقام بابونه با هم متفاوت هستند.

۴- دستورالعمل مناسب جهت ریزازدیادی بابونه با سایر گیاهان فرق دارد.

---

[1]-*Organogenesis*

فصل دوم: مروری بر منابع

۲-۱- اصلاح گیاهان دارویی

گیاهان از مهم‌ترین منابع درمانی محسوب می‌شوند و مردم دنیا هنوز در طب سنتی از گیاهان دارویی برای درمان استفاده می‌نمایند. گیاهان همچنین منبع بسیاری از درمان‌های جدید نیز می‌باشند. تقریباً یک چهارم داروهای تولید شده حاوی عصاره‌های گیاهی یا ترکیباتی هستند که از مواد گیاهی به دست آمده‌اند و یا براساس ترکیبات گیاهی مدل‌سازی شده‌اند (حسنلو و همکاران، ۱۳۸۷).

اگرچه کاشت گیاهان دارویی به هزاران سال پیش باز می‌گردد، ولی باید گفت که در مورد اصلاح آن‌ها تاکنون پیشرفت قابل ملاحظه‌ای صورت نگرفته است و درحال حاضر، تعداد ارقام مفید به دست آمده بر اثر اصلاح گیاهان دارویی اندک است. هدف از اصلاح گیاهان دارویی، افزایش کمیت و کیفیت آن دسته از مواد مؤثره در این گیاهان است که در صنایع دارویی از اهمیت خاصی برخوردار هستند. در سال‌های اخیر، توجه خاصی از جانب سازمان‌های مختلف درکشورهای جهان در ارتباط با اصلاح این گیاهان صورت گرفته است (صالحی جوزانی، ۱۳۸۷).

ریزازدیادی درون شیشه‌ای گیاهان، پتانسیل بالایی جهت تولید داروهای گیاهی و با کیفیت بالا را فراهم کرده است. ریزازدیادی فواید زیادی نسبت به روش‌های سنتی ازدیاد رویشی که محدودیت‌هایی را باید تحمل کند، دارا می‌باشد. در ریزازدیادی میزان تکثیر به طور چشمگیری افزایش می‌یابد، همچنین امکان تولید مواد گیاهی عاری از بیمارگر را فراهم می‌سازد (تریپاتی[1] و تریپاتی، ۲۰۰۳). روش‌های زیست‌فناوری مانند کشت بافت، همچنین امکان باززایی و تولید گیاهان با خصوصیات شبه‌والدی و نیز برخی خصوصیات مفید ناشی از تنوع سوماکلونال که درروش‌های کشت سنتی امکان‌پذیر نمی‌باشد، را فراهم می‌سازد (لارکین و اسکوکرافت[2]، ۱۹۸۱).

فاکتورهای متعددی بر موفقیت تکثیر درون‌شیشه‌ای گیاهان دارویی تأثیر می‌گذارند که از مهم‌ترین این فاکتورها، اثرات تنظیم‌کننده‌های رشد نظیر نوع و غلظت اکسین و سیتوکینین بر روی تشکیل شاخساره گیاهان دارویی مختلف می‌باشد (شاسانی[3] و همکاران، ۱۹۹۸). برای بیشتر گیاهان دارویی، تحقیقات اولیه

---

[1]-*Tripathi*
[2]- *Larkin and Scowcraft*
[3]- *shasany*

اغلب در زمینه فیتوشیمی و کشاورزی بوده است. در فیتوشیمی، گیاهان دارویی با توجه به ترکیبات فعال از نظر زیستی، دسته بندی می‌شوند که بر تجزیه و تحلیل‌های ساختاری این ترکیبات استوار است.
پژوهش‌های کشاورزی روی گیاهان دارویی نیز روی توسعه ظرفیت آن‌ها برای رشد بهینه در هنگام کشت انجام می‌شود. این پژوهش‌ها بیشتر در مواقعی صورت می‌گیرد که گیاه دارویی بومی برداشت می‌شود و شرایط برای رشد در هنگام کشت بهینه نشده است و از طرفی برداشت بی‌رویه گیاهان دارویی در رویشگاه‌های طبیعی امری نادرست بوده و موجبات کاهش تنوع زیستی و کاهش تنوع در کیفیت گیاهان دارویی شده و پیامدهای فجیعی را به دنبال دارد. مطالعه در زمینه فیزیولوژی گیاهی و پژوهش‌های پایه‌ای نیز روی شناخت گیاهان دارویی بسیار ضروری است (صالحی جوزانی، ۱۳۸۷).
برخی از اهداف کشت بافت گیاهان دارویی عبارتند از:
- ریزازدیادی و تکثیر ارقام همگن گیاهان دارویی به منظور حفظ ارقام پرمحصول
- القای پینه و بهینه‌سازی کشت‌های سوسپانسیون سلولی گیاهان دارویی برای تولید متابولیت‌های ثانویه
- ریزازدیادی گیاهان دارویی با تاکید بر گونه‌های انحصاری و در خطر انقراض
- انتقال ژن‌های موثر در مسیر بیوسنتز ترکیبات طبیعی و مطالعه بیان آنها در اندام یا گیاهان دارویی باززایی شده تراریخت (مهندسی متابولیک)
- کشت اندام‌های گیاهی و تهیه گیاهان عاری از ویروس (کشت مریستم)
- تهیه دستورالعمل‌های مناسب برای تکثیر گیاهان دارویی و معطر
- کشت دانه گرده و پرچم به منظور تولید گیاهان دارویی هاپلوئید و دابل هاپلوئید در جهت دستیابی به اهداف اصلاحی آنها
- بررسی پدیده تنوع سوماکلونی و بهره‌گیری از آن جهت ایجاد واریته‌های مطلوب

۲-۲- خصوصیات گیاه دارویی بابونه

۲-۲-۱- خاستگاه و پراکنش

بابونه از گیاهان بومی منطقه مدیترانه بوده ولی منشأ آن را آسیای صغیر گزارش کرده‌اند. این گیاه امروزه پراکندگی وسیعی در اروپا، آسیای غربی، آفریقای شمالی، آمریکای شمالی و جنوبی و استرالیا پیدا کرده‌است. در ایران نیز گونه‌های مختلف جنس ماتریکاریا در نقاط مختلف کشور رشد می‌کنند ولی جنس و گونه ماتریکاریا کامومیل، در منطقه غرب لرستان بین خرم‌آباد و دورود، شمال غربی اندیمشک، در خوزستان، صالح آباد هفتگل، شوشتر، شیراز، ایرانشهر و اطراف تهران یافت می‌شود. تولید زراعی این محصول نیز در کشور عمدتاً در استان‌های اصفهان، کهگیلویه و بویراحمد، گلستان و همدان انجام می‌گیرد. بابونه گیاهی است همه‌جایی و تقریباً در تمام نقاط جهان به صورت خودرو می‌روید. بابونه دارای واریته‌های دیپلوئید (2n=۱۸) و تتراپلوئید (2n=۳۶) است. واریته‌های دیپلوئید دارای رشد کوتاه‌تر و ارتفاع بوته کمتری نسبت به واریته‌های تتراپلوئید هستند. امروزه نوع تتراپلوئید اصلاح شده، بیشترین مقدار مواد موثره را در خود دارد (رحیمی کلامرودی، ۱۳۸۰).

۲-۲-۲-گیاهشناسی

بابونه از گیاهان تیره کاسنی (گل‌ستاره‌ای) و گیاهی علفی و یک‌ساله است. این گیاه سرمای زمستان را تحمل می‌کند. بابونه در عرض جغرافیایی ۶۳ تا ۶۴ درجه شمالی در سطوح وسیعی می‌روید (امیدبیگی، ۱۳۹۰).

۲-۲-۲-۱- ریشه

ریشه بابونه مخروطی شکل وکم و بیش سطحی است. ریشه در اواخر دوره رویش از انشعاب‌های فراوانی برخوردار می‌گردد (دژنابادی، ۱۳۸۰).

۲-۲-۲-۲- ساقه

ساقه استوانه‌ای شکل است. ارتفاع ساقه متفاوت است و به شرایط اقلیمی محل رویش گیاه بستگی دارد و بین ۵۰ تا ۸۰ سانتی‌متر است. در زمین‌های شور ساقه کوتاه و به صورت خوابیده روی زمین قرار می‌گیرد (امیدبیگی، ۱۳۹۰).

۲-۲-۲-۳- برگ

برگ‌ها منقسم، باریک، کشیده و نیزه‌ای شکل است. برگ‌ها صاف و فاقد کرک هستند و به صورت متناوب نسبت به یکدیگر روی ساقه قرار می‌گیرند (امیدبیگی، ۱۳۹۰).

۲-۲-۲-۴- گل و میوه

مراحل نمو گیاه بابونه به طور کلی به سه مرحله تقسیم می‌شود:

- مراحل آغاز شدن گلدهی (گلچه‌های لوله‌ای هنوز بسته هستند)
- مرحله‌ای که بیش از ۱۳ و کمتر از ۳۴ گلچه لوله‌ای باز شده‌اند
- مرحله‌ای که گل‌ها شروع به پیر شدن می‌کنند و بیش از ۳۴ گل لوله‌ای باز هستند (رحیمی کلامرودی، ۱۳۸۰).

گل‌ها در انتهای ساقه‌های اصلی و فرعی ظاهر می‌شوند. قسمت میانی گل‌ها که مجموعه‌ای از گلچه‌های لوله‌ای زرد رنگ است در اوایل رویش، نیمه کروی است و با نمو کامل گل‌ها وباز شدن آن‌ها گلچه‌های لوله‌ای کم و بیش مخروطی شکل (به شکل کله قند) می‌شوند. قطر گل‌های بابونه متفاوت و بین ۱/۵ تا ۳ سانتی‌متر است. گل‌های بابونه مانند سایر گل‌های گیاهان تیره کاسنی دارای دو نوع گلچه زبانه‌ای و لوله‌ای می‌باشند. گلچه‌های زبانه‌ای سفید رنگ هستند و تعداد آن‌ها متفاوت و بین ۱۲ تا ۱۸ عدد است. این گلچه‌ها از نظر جنسی ماده می‌باشند. گلچه‌های لوله‌ای زرد رنگ هستند. این گلچه‌ها دوجنسی می‌باشند که پس از بازشدن استوانه‌ای شکل می‌شوند. میوه فندقه به طول ۱ تا ۱/۵ میلی‌متر، خاکستری رنگ یا زرد روشن است. میوه از دو قسمت تشکیل شده‌است، یک قسمت شامل دانه (بذر) است که ۲۰ تا ۲۵ درصد میوه را تشکیل می‌دهد و قسمت دیگر همان گلچه لوله‌ای خشک شده‌است که ۷۵ تا ۸۰ درصد بقیه طول میوه را تشکیل می‌دهد. وزن هزار دانه آن ۰/۰۲ تا ۰/۰۳ گرم است (زرگری، ۱۳۹۰).

۲-۲-۳- شرایط رشد

شرایط اقلیمی نقش عمده‌ای در رشد، نمو و حتی شکل بابونه دارد. چنانچه بابونه در زمین‌های شور و غیرحاصلخیز بروید، گیاهانی بسیارکوتاه (به ارتفاع ۵ سانتی‌متر) با گل‌های کوچک و ظریف تولید می‌کند. پس از انتقال همان گیاه به شرایط اقلیمی مناسب، گیاه به رشد و نمو طبیعی خود دست می‌یابد که نشان‌دهنده تاثیر شرایط اقلیمی بر رویش بابونه است (امیدبیگی، ۱۳۹۰؛ دژنابادی، ۱۳۸۰). تحقیقات انجام شده در ایران و سایر کشورها نشان می‌دهد که نه تنها بین گونه‌های مختلف بابونه، بلکه بین افراد یک گونه که در شرایط اقلیمی متفاوت می‌رویند نیز، از نظر کمیت و کیفیت مواد موثره تفاوت‌های بسیار زیادی وجود دارد. از این‌رو بابونه را از نظر تیپ‌های شیمیایی می‌توان به گروه‌های مختلفی طبقه‌بندی کرد. در این رابطه بعضی از آن‌ها از مقدار زیادی کامازولن[۱] برخوردار هستند در حالی که برخی دیگر فاقد آن می‌باشند (امیدبیگی، ۱۳۹۰).

۲-۲-۴- ترکیب‌های موجود در اسانس بابونه

مقدار اسانس گل‌های بابونه متفاوت بوده و به شرایط اقلیمی محل رویش گیاه بستگی داشته و بین ۰/۴ تا ۱/۵ درصد است. ۱۲ تا ۲۰ درصد اسانس را کامازولن (که نقش موثری در معالجه‌ی تورم دارد) تشکیل می‌دهد. کامازولن یک سزکویی‌ترپن است که از ماده پیش‌ساز "پروکامازولن" (ماتریسین)[۲] تحت تاثیر درجه حرارت به وجود می‌آید. از ترکیب‌های مهم دیگر اسانس بابونه می‌توان "بیسابلول"[۳]، "اکسیدبیسابلول"[۴] و"فارنزن"[۵] را نام برد (نوری و همکاران، ۱۳۹۱؛ فرهودی و مکی‌زاده تفتی، ۱۳۹۱).

۲-۲-۵- نیازهای اکولوژیکی بابونه

بذر بابونه در دمای ۶ تا ۷ درجه سانتی‌گراد جوانه می‌زند ولی درجه حرارت مطلوب برای جوانه‌زنی ۲۰ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد است. بذر بابونه برای رویش احتیاج به نور دارد. بذرها ۶ تا ۸ روز پس از کشت سبز می‌شوند. رشد اولیه این گیاه کند و بطئی است و برگ‌های طوقه‌ای شکل تشکیل می‌شوند. اوایل بهار رشد سریعی دارند و شاخساره‌های متعددی تولید می‌کنند. رشد و نمو بابونه در دمای روزانه بین ۱۹ تا ۲۱ درجه سانتی‌گراد به خوبی انجام می‌گیرد ولی بیشترین مقدار اسانس در درجه حرارت بین ۲۰ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد در گل‌ها ساخته و ذخیره می‌شود. این گیاه در طول رویش به نور کافی نیازمند است. به طوری که بابونه از مرحله تشکیل غنچه تا کامل شدن گل‌ها به مقادیر زیادی نور محتاج است. گیاهانی که در سایه کشت می‌شوند، مقادیر بسیار کمی اسانس و کامازولن خواهند داشت (امیدبیگی، ۱۳۹۰).

نوع خاک نقش عمده‌ای در گلدهی بابونه دارد. چنانچه بابونه در خاک‌های سبک شنی کشت شود، ۵ تا ۸ روز زودتر از گیاهانی که در خاک‌های سنگین رسی کاشته شده‌اند، به گل می‌رود. خاک‌های

---

[1]-*Chamazulen*
[2]-*Matricin*
[3]-*Bisabolo*l
[4]-*Bisabolol oxide*
[5]-*Pharensene*

سبک شنی همراه با مقادیر فراوان ترکیب‌های آهکی خاک‌های بسیار مناسبی برای کشت بابونه است. تحقیقات نشان می‌دهد که بابونه را می‌توان در خاک‌های قلیایی با pH ۹ تا ۹/۲ کشت کرد. بابونه گیاهی نسبتاً متحمل به شوری است. اگر این گیاه در مناطق شور کشت شود، ریشه قادر است ۱۰ میلی‌گرم نمک در هر گرم ریشه ذخیره نماید. کشت بابونه در مناطق شور سبب کاهش عملکرد گل در مقایسه با گیاهان کشت شده در زمین‌های غیرشور می‌شود (حاج سیدهادی، ۱۳۸۲).

تحقیقات نوری و همکاران (۱۳۹۱) بر روی تاثیر شوری آب و خاک بر عملکرد گل، ترکیبات محلول و کیفیت اسانس بابونه شیرازی (*Matricaria recutita* L.) نشان داده‌است که این گیاه نسبتاً متحمل به شوری، علاوه بر بهبود وضعیت خاک‌های شور، می‌تواند از عملکرد کمی و کیفی خوبی در این خاک‌ها برخوردار گردد.

بابونه قادر به تحمل خشکی است ولی در مرحله رویش بذر و همچنین در مرحله تشکیل ساقه به مقادیر مناسبی آب نیاز دارد. تحقیقات نشان می‌دهد که آبیاری گیاهان در مرحله رشد، عملکرد گل را به‌طور قابل‌توجهی افزایش می‌دهد (زرگری، ۱۳۶۸؛ امیدبیگی، ۱۳۹۰).

۲-۲-۶- زمان گلدهی و برداشت گل

زمان گلدهی بابونه متفاوت است و به رقم و شرایط اقلیمی محل رویش آن بستگی دارد. گیاهان خودرو در مقایسه با گیاهان کشت شده، زودتر به گل می‌نشینند. به طوری که در انواع خودرو، اولین گل‌ها در اواخر فروردین ظاهر می‌شوند. در انواع زراعی، گلدهی با تاخیر همراه است و اولین گل‌ها، در اردیبهشت ماه پدیدار می‌شوند. تمام گل‌ها در مدت ۱۰ تا ۱۶ روز ظاهر می‌شوند. زمان مناسب برای برداشت گل، هنگامی است که گل‌ها باز شده باشند. برداشت به موقع گل‌ها بسیار مهم است و نقش موثری در کمیت و کیفیت اسانس آن داشته به طوری که عدم برداشت به موقع سبب کاهش کیفیت مواد موثره خواهد گردید (امیدبیگی، ۱۳۹۰).

پس از برداشت گل‌ها، چنانچه شرایط اقلیمی مناسب باشد گیاهان دوباره به گل می‌روند. تحقیقات انجام شده در ایران نشان می‌دهد که گیاهان دو و یا حتی سه مرتبه پس از برداشت مجدداً به گل می‌نشینند (زرگری، ۱۳۶۸).

میوه‌ها به طور غیریکنواخت می‌رسند. وقتی میوه‌ها می‌رسند قسمت فوقانی مخروطی شکل و دندانه‌دار می‌شود، میوه‌های قسمت پایین گیاه شروع به رسیدن می‌کنند و به تدریج به طرف بالا کامل می‌شوند. بذرها پس از رسیدن از گیاه جدا و به اطراف ریزش می‌کنند (حاج سیدهادی، ۱۳۸۲).

۲-۲-۷- زمان برداشت بذر

زمان مناسب برای برداشت بذر هنگامی است که گلچه‌های زبانه‌ای از حالت افقی خارج شده و به صورت عمودی (به طرف پایین) درآیند. در این مرحله رنگ گلچه‌های لوله‌ای، قهوه‌ای تیره می‌شود. جمع‌آوری بذر زودتر از زمان مذکور مناسب نیست زیرا قوه نامیه رویشی بذرها به شدت کاهش می‌یابد. چنانچه بذرها با تاخیر برداشت شوند، عملکرد بذر به شدت کاهش می‌یابد. زیرا با کوچک‌ترین ضربه یا وزش باد بذرها به اطراف ریزش می‌کنند. پس از برداشت بذر، آن‌ها را باید تمیز و در مکان