Archive of SID

بررسی اثر تنظیم کننده‌های مختلف رشد بر استقرار ریزنمونه‌های گیاه دارویی صبرزرد (*Aloe barbadensis* Mill.)

امیر بهزاد برزگر[1]، *مرضیه شفیعی حاجی آباد[2]، محمود عبدی[3]

۱. عضو هیئت علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کاشمر (دانشجوی دکتری اکولوژی گیاهان زراعی- دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان)

۲. کارشناس ارشدعلوم باغبانی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کاشمر

۳. کارشناس گیاهان دارویی، کارشناس آزمایشگاه دانشگاه آزاد اسلامی واحد کاشمر

چکیده

گیاه دارویی صبرزرد با نام علمی *Aloe barbadensis* Mill. یکی از گیاهان دارویی مهم متعلق به تیره Liliaceae به شمار می‌رودکه امروزه در سطح وسیع از طریق کشت درون شیشه‌ای تکثیر می‌گردد. با توجه به اهمیت مرحله استقرار در کشت درون شیشه‌ای، این تحقیق نیز به منظور تعیین بهترین محیط کشت جهت استقرار ریزنمونه‌های گیاه دارویی آلوئه‌ورا صورت گرفت. ابتدا میزان باززایی دو نوع ریزنمونه جوانه‌های جانبی و جوانه‌های انتهایی بر روی ۸ محیط کشت مختلف بررسی شد و جوانه انتهایی به عنوان بهترین نوع ریزنمونه انتخاب شد. سپس به منظور تعیین مناسب‌ترین محیط کشت آزمایشی به صورت فاکتوریل با دو عامل اکسین در چهار سطح (۱ میلی‌گرم در لیتر IAA، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IAA، ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA) و سیتوکینین در دو سطح (BA و کینتین هر کدام به میزان ۱ میلی‌گرم در لیتر) در قالب طرح پایه کاملا تصادفی در ۳ تکرار انجام شد. بعد از گذشت ۳۵ روز بیشترین میزان باززایی در محیط کشت دارای ۱ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IAA با تولید ٦ شاخساره ۲/۳ سانتیمتری بدست آمد که این نتایج نسبت به سایر مطالعات انجام شده، میزان و سرعت پرآوری بالاتری را نشان می‌دهد. از آنجایی که در مرحله استقرار کشت درون شیشه‌ای تعداد بیشتر ریزنمونه با اندازه کوچک مورد توجه است این بررسی روشی مناسب را جهت استقرار ریزنمونه‌های آلوئه ورا پیشنهاد می‌کند.

کلمات کلیدی: آلوئه ورا، کشت درون شیشه‌ای، باززایی، نوک شاخساره، BA، IAA

مقدمه

گیاه دارویی صبرزرد یا آلوئه ورا با نام علمی *Aloe barbadensis* Mill یا *Aloe vera* متعلق به تیره Liliaceae است. آلوئه گیاهی گوشتی و چند ساله بوده و ساقه آن به صورت روزت[1] است (Ahmed et al., 2007). شناخت آلوئه توسط بشر به ۲۲۰۰ سال قبل از میلاد مسیح در دوران سومری‌ها در شهر نیپور[2] برمی‌گردد (Meyer and Staden, 1991)، اما استخراج و بهره‌برداری از ژل آلوئه به صورت تجاری در پنجاه سال اخیر توسعه یافته است (Paez et al., 2000).

[1] Rosette

[2] Nippur

*email:marzeih_shafiee@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

ژل یا موسیلاژ که از بخش گوشتی برگ به دست می‌آید دارای ترکیبات متفاوتی در مقایسه با عصاره تلخ استخراج شده از پوسته برگ است (Atherton, 1998; Reynolds and Dweck, 1999; Albany et al., 2006). ژل آلوئه حاوی ۹۹ درصد آب با pH معادل ٤/٥ بوده و دارای پلی‌ساکاریدهایی است که قسمت عمده آنها را نوعی پلی‌ساکارید بنام گلوکومانان[1] تشکیل می‌دهد (Joshi, 1998). خاصیت مرطوب کننده‌ای که ژل آلوئه دارد به خاطر وجود ترکیب گلوکومانان است (Atherton, 1998). ژل آلوئه دارای خواص و فعالیت‌های بیولوژیکی و فیزیولوژیکی متنوع از جمله قابلیت ترمیم سوختگی‌های پوستی، صدمات ناشی از بریدگی، ضدسرطان، بازدارندگی در مقابل رشد برخی باکتری‌ها و قارچ‌ها، اثر ضدالتهاب و تورم به خاطر ترکیب اسید سالیسیلیک در ژل، اثر بازدارندگی علیه سنتز پروستاگلاندین[2] (عامل تورم)، اثر بازدارندگی روی فعالیت ویروس ایدز بوسیله ترکیب اسمانان[3] و قندهای تقویت کننده سیستم ایمنی بدن، درمان سوختگی‌های ناشی از سرما[4] و کاهش سطح کلسترول خون می‌باشد (Hamilton, 1998; Ahmed et al., Anshoo et Albany et al., 2006; 2007; Paez et al., 2000 al., 2005).

عمده روش تکثیر آلوئه، از طریق پاجوش[5] است. اما این روش کند بوده و تعداد محدودی گیاه در سال تولید می‌کند لذا از پاجوش بیشتر جهت تکثیر و کشت آلوئه در سطوح کوچک استفاده می‌شود، و در سطوح گسترده و وسیع، استفاده از سیستم کشت بافت ضروری است (Mukherjee and RoyChowdhury, 2008; Meyer and Staden, 1991).

کشت درون شیشه‌ای آلوئه در ایران از سابقه چندان طولانی برخوردار نیست و اغلب گزارش‌های منتشر شده به چند سال اخیر مربوط می‌شود. استفاده از قسمت‌های مختلف به عنوان ریزنمونه در کشت درون شیشه‌ای آلوئه گزارش شده است. Gui و همکاران (۱۹۹۰) و Roy and Sarkar (۱۹۹۱) از ریزنمونه‌های جوانه جانبی[6] برای کشت درون شیشه‌ای آلوئه استفاده کردند.

طبق گزارش Castorena و همکاران (۱۹۸۸) تولید کالوس[7] و باززایی گیاهچه از پینه‌ها درگونه *A. barbadensis* بسیار مشکل است. ریزازدیادی آلوئه از طریق کشت نوک ساقه[8] مقدور بوده و گزارش‌هایی در این رابطه موجود است (Hosseini and Parsa, 2007; Fattahi et al., 2004;).

در اکثر آزمایش‌های صورت گرفته بر روی کشت درون شیشه‌ای آلوئه، از محیط پایه (Murashige and Skoog, 1962) MS همراه با غلظت‌های مختلف تنظیم کننده‌های رشد گیاهی استفاده شده است (Velcheva et al., 2005; Natali et al., 1990; Roy and Sarkar, 1991; Meyer and Staden, 1991; Hirimburegama and Gamage. 1995; Zhou et al., 1999; Hashemabadi and Kaviani, 2008; Hosseini and Parsa, 2007; Fattahi et al., 2004).

Natali و همکاران (۱۹۹۰) جهت بررسی میزان پرآوری از ترکیب 2,4-D[9] در ترکیب با هر یک از سایتوکینین‌ها مانند کینیتین[10] و یا BAP[11] استفاده نمود. آنها محیط حاوی ۱/۱ میکرومول 2,4-D به اضافه ۲/۳ میکرومول کینتین را به عنوان مناسب‌ترین محیط کشت پرآوری معرفی نموده و محیط‌های حاوی غلظت‌های کاهش یافته‌ای از 2,4-D و کینتین و BAP را در سطوح پایین‌تری از میزان پرآوری یافتند.

Meyer and Staden (۱۹۹۱) سایتوکینین‌هایی مثل BA یا TDZ[12] را به عنوان تنظیم کننده رشد انحصاری، جهت مشاهده عکس‌العمل ریزنمونه‌ها در محیط کشت پایه مورد استفاده و بررسی قرار دادند. در این آزمایش، جوانه جانبی باززایی نداشت و ریزنمونه‌ها تولید ترشحات قهوه‌ای نموده و بتدریج از بین رفتند آنها طی گزارشی بیان داشتند که افزودن

[1] Glucomannan
[2] Prostaglandin
[3] Acemanan
[4] Frost pit
[5] Off-set

[6] Auxiliary bud
[7] Callus
[8] Shoot tip
[9] 2,4-dichlorophenoxy acetic acid
[10] Kinetin
[11] Benzyl amino purine
[12] Thidiazuron (TDZ)

www.SID.ir

Archive of SID

۱ میلی‌گرم در لیتر کینتین، BA یا TDZ به محیط پایه همراه با ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA[1]، نه‌تنها رشد جوانه‌های محوری را تسریع نمی‌کند بلکه افزایشی در تشکیل جوانه نیز نخواهد داشت.

Zhou و همکاران (۱۹۹۹) طی آزمایشی بهترین محیط را جهت تحریک رشد جوانه‌ها، محیط کشت MS تهیه شده با BA به میزان ۳ میلی‌گرم در لیتر معرفی نمودند.

Abrie and Staden (۲۰۰۱) گیاهچه‌های درون شیشه‌ای گیاه *Aloe polyphylla* را روی محیط کشت‌هایی با غلظت‌های مختلف BA به تنهایی و یا در ترکیب با IBA کشت کردند. بیشترین پرآوری در محیط کشت دارای ۱ میلی‌گرم در لیتر BA بدست آمد. آنها بر نقش موثر BA بر افزایش باززایی و پرآوری در گیاه آلوئه تاکید کردند.

Velcheva و همکاران (۲۰۰۵) در باززایی *Aloe arborescens* از طریق اندام زایی سوماتیکی[2] ترکیبات متفاوتی از تنظیم‌کننده‌های رشد سیتوکینین و اکسین مورد آزمایش قرار دادند و بالاترین درصد باززایی را در محیط کشت دارای هورمون BA با غلظت ۱۹/٦ میکرومول بدست آوردند.

Ahmed و همکاران (۲۰۰۷) ریزنمونه‌های نوک شاخساره را در محیط کشت‌های دارای غلظت‌های مختلف BA و کینتین به تنهایی و یا به صورت ترکیبی با کینتین و NAA[3] کشت کرده و بهترین محیط کشت جهت ریزازدیادی آلوئه را محیط کشت دارای ۲ میلی‌گرم در لیتر BA، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر کینتین و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA معرفی کردند.

Hashemabadi and Kaviani (۲۰۰۸) غلظت‌های مختلف BA و NAA را در کشت درون شیشه ای آلوئه مورد آزمایش قرار دادند و بعد از ۸ هفته بیشترین پرآوری در محیط کشت دارای ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA بدست آوردند.

در کشت درون شیشه ای آلوئه ورا یکی از مراحل مهم و موثر در ریزازدیادی موفق مرحله انتقال به محیط درون شیشه‌ای یا استقرار است که نوع ریزنمونه تاثیر زیادی در این مرحله دارد. لذا این تحقیق به منظور تعیین بهترین نوع ریزنمونه و نیز برترین محیط کشت در مرحله استقرار ریزنمونه‌های آلوئه‌ورا صورت گرفت و با توجه به نتایج بدست آمده پروتکل جدیدی با سرعت و میزان تکثیر بالاتر برای استقرار ریزنمونه‌های گیاه دارویی آلوئه ورا معرفی شده است.

مواد و روش‌ها

گلدان‌های گیاه دارویی صبرزرد از یک مزرعه تولید آلوئه واقع در شهرستان بندرعباس خریداری و به دانشگاه آزاد اسلامی واحد کاشمر منتقل شد. این گلدان ها به مدت یک ماه برای سازگاری با محیط جدید در آزمایشگاه نگهداری شدند. ریزنمونه‌های مورد نیاز این آزمایش از گیاهانی به ارتفاع متوسط ۱۰ تا ۱۵ سانتی‌متر تهیه شد. همه برگ‌ها از محل طوقه گیاه جدا شدند و نوک ساقه‌ها همراه با دو برگ جوان میانی به طول تقریبی ۱/۵ تا ۲ سانتی‌متر از ساقه جدا و درآب جاری به طور کامل شستشو داده شد و به اتاقک استریل منتقل شدند. در اتاقک استریل، ساقه‌های آلوئه در محلول ۲۰ درصد شوینده تجاری وایتکس (محتوی ۵/۲۵ درصد هیپوکلریت سدیم خالص) به مدت ۱۵ دقیقه غوطه‌ور شدند. سپس نمونه‌ها ۳ بار با آب مقطر استریل شده به ترتیب به مدت ۲، ۳ و ۵ دقیقه شستشو داده شد.

این تحقیق در دو بخش طراحی شده و بررسی‌های آماری در دو بخش به صورت مجزا صورت گرفت:

در بخش اول میزان باززایی دو نوع ریزنمونه مختلف (انتهایی و جانبی) بر روی ۸ محیط کشت مختلف بررسی شد. این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملا تصادفی با ۹ تکرار شامل ۹ لوله آزمایش با دو فاکتور شامل نوع ریزنمونه در دو سطح و نوع محیط کشت در ۸ سطح بود. ابتدا دو نوع ریزنمونه مختلف شامل: – ریزنمونه‌های جوانه انتهایی که در حقیقت متشکل از مریستم

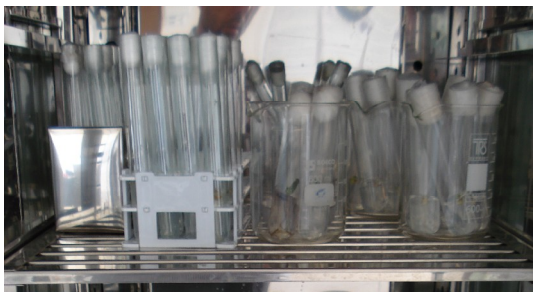
[1] Indol butiric acid (IBA)
[2] Somatic organogenesis
[3] α-Naphthalene acetic acid (NAA)

www.SID.ir

Archive of SID

انتهایی همراه با یک یا دو برگ جوان اولیه به طول ۳ تا ٤ میلی‌متر بوده و - ریزنمونه جوانه‌های جانبی که بخشی از ساقه (حدود ۵ میلیمتر پایین‌تر از جوانه انتهایی) گیاه به طول ۳ تا ۵ میلیمتر بودند، جدا سازی شدند. محیط کشت‌های مورد استفاده از نوع محیط کشت پایه MS همراه با ۳ درصد ساکارز بود که با ۲ گرم در لیتر ژلرایت به حالت جامد درآمد. pH محیط کشت در ۵/۸ تنظیم گردید. جهت کنترل پدیده قهوه‌ای شدن محیط در اثر ترشحات قاعده ریزنمونه، بعد از اتوکلاو کردن، مقدار ۱ میلی‌گرم در لیتر اسید اسکوربیک به محیط افزوده شد. لوله‌های آزمایش حاوی ریزنمونه در دمای۱ ± ۲٦ درجه سانتی‌گراد و ١٦ ساعت روشنایی (۲۰۰۰ لوکس) و ۸ ساعت تاریکی در اتاقک کشت نگهداری شدند. با توجه به اینکه بعد از گذشت ۳۰ روز هیچ‌یک از ریزنمونه‌های جوانه جانبی علایم باززایی را نشان نداده و از بین رفتند لذا بخش اول تحقیق که شامل تعیین مناسب‌ترین نوع ریزنمونه که بیشترین میزان باززایی را داشته باشد بود؛ طی هفته چهارم اتمام یافت و ریزنمونه‌های جوانه جانبی از دور آزمایش خارج شدند.

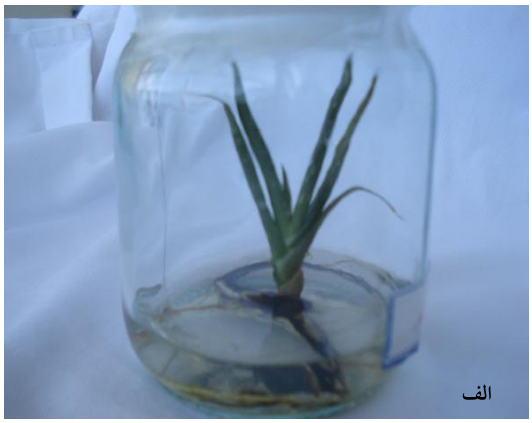
در بخش دوم، بعد از گذشت ۳۵ روز اثر محیط کشت بر تعداد و طول شاخساره باززایی و تولید شده از ریزنمونه‌های جوانه انتهایی به صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملا تصادفی با ۹ تکرار بررسی شد. ۲ عامل شامل اکسین در چهار سطح (۱ میلی‌گرم در لیتر IAA، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IAA، ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA) و سایتوکینین در دو سطح (BA و کینتین هر کدام به میزان ۱ میلی‌گرم در لیتر) بود.



شکل ۱: لوله‌های آزمایش حاوی محیط کشت‌های به کار رفته در مرحله استقرار ریزنمونه‌های درون شیشه‌ای آلوئه ورا

گیاهان تولید شده در محیط کشت بدون تنظیم کننده رشد در شیشه‌های کشت ریشه دار شده (شکل ۲ الف) و در گلدان‌های حاوی پیت/ پرلیت و خاکبرگ به محیط بیرون سازگار شدند (شکل ۲ ب). درصد بقاء گیاهان سازگار شده ۹۵ درصد بود.

داده‌های آزمون ابتدا با استفاده از نرم‌افزار MSTAT-C مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. مقایسه میانگین‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۱ درصد بر روی داده‌های اصلی انجام شد.



شکل ۲:

الف) گیاهچه‌های درون شیشه‌ای آلوئه ورا در محیط کشت بدون هورمون ریشه دار شدند

ب) گیاهان ریشه‌دار شده در گلدان‌های حاوی پیت/ پرلیت و خاکبرگ به محیط بیرون سازگار شدند

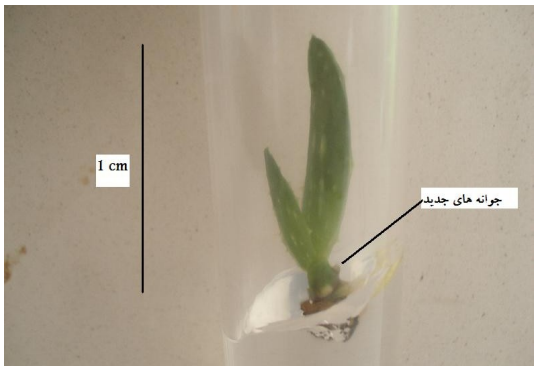
نتایج

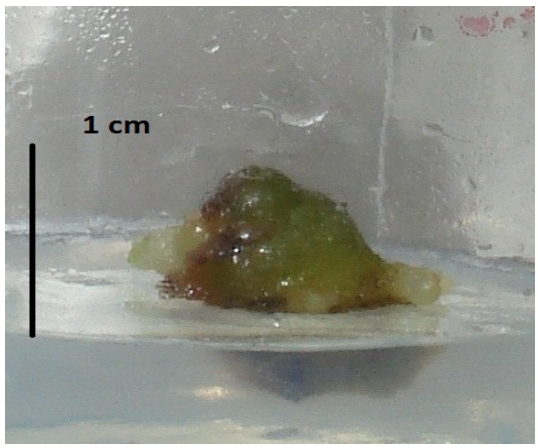
۱) بررسی اثر نوع ریزنمونه و محیط کشت بر میزان باززایی در مرحله استقرار کشت درون شیشه‌ای آلوئه ورا

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج تجزیه واریانس نشان دادند که اثر نوع ریزنمونه بر باززایی ریزنمونه ها در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بوده اما نوع محیط کشت بر باززایی تاثیر معنی داری نداشته است. تمامی ریزنمونه‌های جوانه انتهایی در محیط‌های کشت متورم شده و بعد از حدود ۲ هفته به رنگ سبز در آمده و اولین علایم باززایی را نشان دادند (شکل ۳ الف)، اما ریزنمونه‌های جوانه جانبی هیچ علایم باززایی را نشان ندادند و بعد از ٤ هفته قهوه‌ای شده و از بین رفتند (شکل ۳ ب).





شکل ۳:

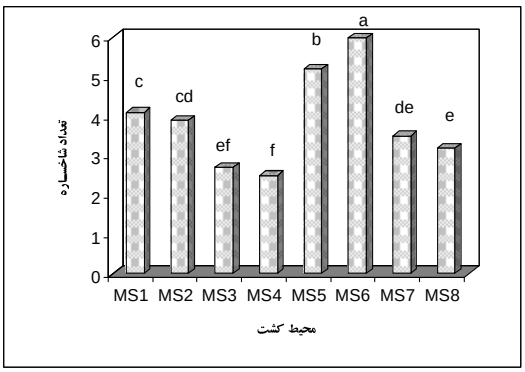
الف) ریزنمونه‌های جوانه انتهایی. نقاط مریستمی متورم شده که شاخساره‌های جدید را شکل می‌دهند در شکل مشاهده می‌شود(۲ هفته بعد از شروع آزمایش در محیط کشت MS5 دارای ۱ میلی‌گرم در لیتر IAA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA)

ب) ریزنمونه‌های جوانه کناری (۲ هفته بعد از شروع آزمایش در محیط کشت MS5 دارای ۱ میلی‌گرم در لیتر IAA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA)

۲) بررسی اثر تیمارهای مختلف اکسینی و سایتوکینینی بر تعداد و طول شاخساره تولید شده از ریزنمونه‌های جوانه انتهایی در مرحله استقرار کشت درون شیشه‌ای آلوئه ورا

نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که اثرات ساده و متقابل تنظیم کننده‌های رشد بر تعداد شاخساره در سطح احتمال ۱ درصد معنی دار بود.

در مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن در مورد اثرات متقابل تنظیم کننده‌های رشد اکسین و سایتوکینین مشاهده می‌شود که محیط‌های مختلف در شش گروه آماری قرار گرفتند (شکل ٤). بیشترین تعداد شاخساره (٦ عدد) در محیط کشت MS_6 دارای ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IAA و ۱ میلی‌گرم در لیتر BA مشاهده شد. محیط کشت MS_5 با ۱ میلی‌گرم در لیتر IAA و ۱ میلی‌گرم در لیتر BA در گروه b قرار گرفت. کمترین تعداد شاخساره در محیط کشت MS_8 (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۱ میلی‌گرم در لیتر BA) بدست آمد.



شکل ٤: تعداد میانگین شاخساره تولید شده بر روی محیط کشت MS دارای غلظت‌های مختلف تنظیم کننده رشد در کشت درون شیشه‌ای آلوئه ورا

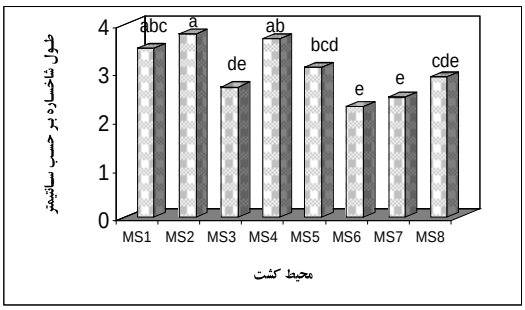
(† میانگین‌های دارای حروف مشابه در سطح احتمال ۱ درصد با هم تفاوت معنی دار ندارند)

اثر تیمارهای مختلف هورمونی بر طول شاخساره نیز در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود. در مقایسه میانگین‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن مشاهده شد که محیط‌های مختلف کشت در ٦ گروه آماری قرار گرفتند (شکل ۵). طویل‌ترین گیاهچه‌ها در محیط کشت MS_2 (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IAA و ۱ میلی‌گرم در لیتر کینتین) با طول میانگین ۳/۸ سانتیمتر

www.SID.ir

Archive of SID

مشاهده شد (گروه a) و محیط کشت‌های MS_1 (۱ میلی‌گرم در لیتر IAA و ۱ میلی‌گرم در لیتر کینتین) و MS_4 (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۱ میلی‌گرم در لیتر کینتین) با طول میانگین ۳/۵ و ۳/۷ سانتیمتر از نظر آماری با آن تفاوتی نداشتند. کوتاه‌ترین شاخساره‌ها در محیط کشت‌های MS_6 (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IAA و ۱ میلی‌گرم در لیتر BA) و MS_7 (۱ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۱ میلی‌گرم در لیتر BA) با طول میانگین ۳/۳ و ۲/۵ سانتیمتر مشاهد شد (گروه e) و محیط کشت MS_8 (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۱ میلی‌گرم در لیتر BA) با طول میانگین ۲/۹ از نظر آماری تفاوتی با آنها نداشت.



شکل ۵: طول میانگین شاخساره‌های تولید شده بر روی محیط کشت MS دارای غلظت‌های مختلف تنظیم کننده رشد در کشت درون شیشه‌ای آلوئه ورا

(† میانگین‌های دارای حروف مشابه در سطح احتمال ۱ درصد با هم تفاوت معنی دار ندارند)

از آنجایی که در منابع مختلف استفاده از انواع متفاوت اکسین‌ها و سایتوکینین‌ها در ترکیب با هم گزارش شده است به منظور مقایسه و تعیین بهترین نوع سایتوکینین در ترکیب با هر یک از انواع و غلظت‌های اکسین به کار رفته مقایسه میانگین با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در این خصوص صورت گرفت (جدول ۱). همانطور که در جدول مشاهده می‌شود در کلیه تیمارها تنظیم‌کننده رشد BA نسبت به کینتین باعث تولید تعداد شاخساره بیشتری شده است. نوع سایتوکینین فقط در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر بر طول شاخساره معنی‌دار بوده و طول شاخساره‌ها در حضور کینتین بیشتر بوده است (۳/۸۰ سانتیمتر).

جدول ۱: اثر نوع سایتوکینین در ترکیب با هر یک از غلظت‌های متفاوت اکسین‌های بر صفات اندازه‌گیری شده

اکسین Auxin	سایتوکینین Cytokinin	تعداد شاخساره Shoot number	طول شاخساره Shoot height (cm)
IAA: 1 mgl^{-1}	Kinitin: 1 mgl^{-1}	4.13 [b]	3.46 [a]
	BA: 1 mgl^{-1}	5.23 [a]	3.13 [a]
IAA: 0.5 mgl^{-1}	Kinitin: 1 mgl^{-1}	3.90 [b]	3.80 [a]
	BA: 1 mgl^{-1}	5.96 [a]	2.33 [b]
IBA: 1 mgl^{-1}	Kinitin: 1 mgl^{-1}	2.73 [b]	2.66 [a]
	BA: 1 mgl^{-1}	3.46 [a]	2.50 [a]
IBA: 0.5 mgl^{-1}	Kinitin: 1 mgl^{-1}	2.53 [b]	3.70 [a]
	BA: 1 mgl^{-1}	3.16 [a]	2.90 [a]

در هر گروه اعداد دارای حروف مشابه هستند در سطح احتمال ۱ درصد با هم تفاوت معنی دار ندارند

بحث

نتایج بدست آمده از این تحقیق در مورد باززایی جوانه‌های جانبی با نتایج Gui و همکاران (۱۹۹۰) که موفق شدند با کشت قطعات ساقه آلوئه در حضور زآتین تولید گیاهچه نمایند و Roy and Sarkar (۱۹۹۱) که از ریزنمونه‌های جوانه کناری استفاده کرده و در حضور ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر کینتین تولید پینه نمودند، مطابقت ندارد و این تفاوت می‌تواند به علت استفاده از تنظیم کننده‌های رشد قوی توسط این محققان باشد. با توجه به تولید مستقیم شاخساره از کشت ریزنمونه های نوک شاخساره یا جوانه راسی، لذا تولید بافت پینه در کشت درون شیشه ای آلوئه ورا هدف نیست لذا استفاده از تنظیم کننده‌های محرک بافت پینه چون امکان جهش بدنی[1] وجود دارد(وصال و باقری، ۱۳۸۲) و در ضمن باززایی از بافت پینه در آلوئه معمولاً به سختی صورت می‌گیرد (Castorena et al., 1988) در اولویت نیست و در مقیاس تجاری هرگز توصیه نمی‌شود. هر چند این محققان نیز بر باززایی بهتر جوانه‌های انتهایی نسبت به جانبی تاکید داشتند.

Fattahi و همکاران (۲۰۰٤) در تطابق با نتایج بدست آمده از این تحقیق گزارش دادند که ریزنمونه‌های جوانه جانبی در محیط‌های رشد پرآوری نشان ندادند. بسیاری از

[1] Somatic mutation

www.SID.ir

Archive of SID

محققان دیگر نیز کشت درون شیشه‌ای موفق ریزنمونه‌های جوانه انتهایی را گزارش کرده‌اند (Velcheva et al,. 2005; Natali et al. 1990; Roy and Sarkar, 1991; Meyer and Staden, 1991; Hirimburegama and Gamage, 1995; Zhou, et al., 1999; Hashemabadi and Kaviani, 2008; Hosseini and Parsa, 2007). بنابراین به نظر می‌رسد جوانه انتهایی مناسب‌ترین ریزنمونه جهت تکثیر درون شیشه‌ای گیاه آلوئه باشد.

در کشت درون شیشه‌ای از تنظیم‌کننده‌های رشد برای تسریع در رشد استفاده می‌شود (نوری قنبلانی، ۱۳۷۱). به عنوان یک قاعده کلی برای انجام هر چه بهتر رشد، اکسین یا سیتوکنین و یا هر دو با هم به محیط کشت افزوده می‌شوند (وصال و باقری، ۱۳۸۲). در کشت درون شیشه‌ای آلوئه ورا نیز بسیار از محققان بر وجود یک اکسین در کنار سایتوکینین برای پرآوری ریزنمونه‌ها تاکید کردند (Campestriniet al., 2006; Velcheva et al., 2005) اما نسبت مناسب سایتوکینین به اکسین به نوع گونه آلوئه بستگی دارد (Hashemabadi and Kaviani, 2008). در این آزمایش نیز نقش موثر تنظیم کننده‌های رشد گیاهی بر پاسخ ریزنمونه‌ها مشخص شد (جدول ۱).

در مورد اثر تنظیم کننده‌های رشد بر تعداد شاخساره تولید شده از هر ریزنمونه در مغایرت با نتایج این مطالعه Fattahi و همکاران (۲۰۰٤) کینتین را به عنوان بهترین سایتوکینین معرفی کرده و محیط کشت دارای ۱ میلی‌گرم در لیتر IAA و ۱ میلی‌گرم در لیتر کینتین را با تولید ۱۰/۳۳ ریزنمونه بهترین محیط جهت پرآوری شناختند. هرچند تعداد شاخساره بدست آمده توسط آنها بیشتر از این تحقیق به نظر می‌رسد ولی اندازه‌گیری‌های آنها مربوط به ٦۰ روز بعد از شروع آزمایش بوده است در صورتیکه گزارش این تحقیق مربوط به ۳۵ روز بعد کشت است. از آنجا که در محیط کشت‌های به کار برده شده توسط این محققان تولید ریشه شده بود و وجود ریشه در محیط‌های پرآوری مناسب نیست، به نظر می‌رسد استفاده از BA در ترکیب با IAA در محیط پرآوری مناسب‌تر باشد و توصیه می‌شود کینتین در محیط طویل شدن شاخ و برگ[1] و ریشه‌زایی[2] مورد استفاده قرار گیرد.

Meyer and Staden (۱۹۹۱) نیز BA و در کل سایتوکینین‌ها را در کشت درون شیشه‌ای آلوئه ناموفق دانسته و حتی آنها را سمی شناختند و فقط محیط‌های دارای اکسین را برای کشت درون شیشه‌ای آلوئه مناسب معرفی کردند. گزارشات این محققین توسط هیچ محقق دیگر تایید نشده است و احتمالاً نتایج بدست آمده در آزمایشات آنها به شدت وابسته به ژنوتیپ ریزنمونه‌های به کاربرده شده و یا روش کشت آنها می‌باشد. علاوه بر آن نیاز بافت‌های مختلف به این تنظیم کننده‌های رشد متفاوت بوده و محتوای هورمون‌های درونی ریزنمونه[3] و سن ریزنمونه عامل مهمی در تعیین میزان و نوع تنظیم‌کننده رشد به کار رفته در محیط است و بر نوع پاسخ ریزنمونه اثر زیادی دارد (Hosseini and Parsa, 2007) بنابراین یکی از دلایل تفاوت نتایج بدست آمده می‌تواند مربوط به سن گیاهان مادری که ریزنمونه‌ها از آنها گرفته شده، باشد.

براساس نتایج بدست آمده می‌توان گفت در این تحقیق نیز اکسین‌ها نقش تحریک جوانه‌های جانبی را به عهده داشته و سایتوکینین‌ها اثر چیرگی انتهایی را بر روی جوانه‌های جانبی کاهش داده باعث انتقال بیشتر قند و مواد معدنی به سمت آنها شده و موجب رشد و نمو آنها می‌شوند (Arteca, 1995) و چون سیتوکنین‌ها عموماً در کشت درون شیشه‌ای باعث تورم بافت‌ها، القاء نمو جوانه‌های جانبی،کاهش چیرگی انتهایی و نیز تولید جوانه‌های نابجا و شاخساره‌های جدید می‌شوند (نوری قنبلانی، ۱۳۷۱، وصال و باقری، ۱۳۸۲)، از طرف دیگر آنها نقش مهمی در کنترل مخازن و توزیع عناصر غذایی بر عهده داشته و باعث انتقال محلول‌های غذایی از سایر قسمت‌های گیاه به محل وجود سیتوکنین‌ها می‌شوند (Feito et al., 2001)، در نتیجه در ریزنمونه‌های مریستمی

[1] Elongation
[2] Rooting
[3] Explant

www.SID.ir

Archive of SID

مثل نوک شاخساره نیز سیتوکنین‌ها باعث تحریک تشکیل شاخساره نابجا و شاخساره جانبی می‌شوند (Sujatha et al., 1998) و بیشترین تعداد شاخساره در محیط‌های MS_5 و MS_6 تولید شده است از آنجا که سایتوکینین موجود در این محیط کشت‌ها BA بوده است به نظر می‌رسد در کشت درون شیشه‌ای آلوئه ورا BA نقش موثرتری نسبت به کینتین در تولید شاخساره بیشتر داشته باشد و به طور مشابه ه نظر می‌رسد IAA نسبت به IBA باعث تحریک بیشتر سلول‌های مریستمی به سمت تولید شاخساره می‌شود. در بسیاری از گیاهان دیگر نیز نقش موثر سیتوکنین‌ها مخصوصاً BA در تشکیل شاخساره نابجا به اثبات رسیده است (شفیعی و همکاران، ۱۳۸۷؛ Sujatha et al., 1998).

نتایج حاصل از این آزمایش با نتایج Zhou و همکاران (۱۹۹۹)؛ Hirimburegama and Gamage، (۱۹۹۵)؛ Abrie and Staden (۲۰۰۱) و Velcheva و همکاران (۲۰۰۵) که BA را بهترین سایتوکینین در کشت درون شیشه‌ای آلوئه ورا معرفی کردند مطابقت دارد. Debiasi و همکاران (۲۰۰۷) نیز تنظیم کننده‌های رشد BA و IAA را برای کشت درون شیشه‌ای آلوئه ورا مناسب دانستند.

گزارشی مبنی بر ارزیابی طول شاخساره در مرحله استقرار ریزنمونه‌های درون شیشه‌ای آلوئه وجود ندارد. اما به طور کلی می‌توان گفت اکسین‌ها در غلظت بالا باعث تورم بافت‌ها، طویل شدن و رشد سلول، تقسیم سلولی، تشکیل کالوس، تشکیل ریشه‌های نابجا و ممانعت از تشکیل شاخه‌های نابجا و جانبی می‌شوند و غلظت‌های بالای سایتوکینین‌ها بر افزایش طول سلول‌ها و در نتیجه برگ‌ها و شاخساره‌ها اثرات بازدارنده دارند (Arteca, 1995). هرچند برای طویل شدن سلول‌ها و در نتیجه گیاه وجود یک اکسین ضروری به نظر می‌رسد (Sujatha and Reddy, 1998)، اما در حقیقت تعادل هورمونی ایجاد شده در پاسخ سلول ها موثر است بطوریکه وقتی نسبت سایتوکینین به اکسین بیشتر باشد فرآیند باززایی به سمت تولید شاخساره پیش می‌رود و در حالت عکس افزایش طول اندام ها و نیز تولید ریشه مشاهده می‌شود (باقری و صفاری، ۱۳۷٦، وصال و باقری، ۱۳۸۲). در مورد گیاه آلوئه نیز نسبت بین دو نوع تنظیم کننده رشد است که پاسخ ریزنمونه را در جهت افزایش تعدا شاخساره جدید و یا افزایش طول شاخساره‌ها تعیین می‌کند (Hosseini and Parsa 2007).

در این تحقیق مشاهده شد که اثر نوع سایتوکینین بر طول شاخساره فقط در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA معنی‌دار بوده است که در این تیمار کینتین با ۲/٦٦ سانتیمتر باعث افزایش طول بیشتری در ریزنمونه‌ها نسبت به BA با ۲/۵ سانتیمتر شده است در سایر تیمارها هرچند اثر نوع سایتوکینین بر طول شاخساره از نظر آماری معنی دار نشده است اما مشاهده می‌شود طول شاخساره در تیمارهای دارای کینتین بیشتر از BA بوده است (جدول ۱). بر این اساس به طور کلی می‌توان گفت که تنظیم کننده رشد کینتین در تعادل با غلظت‌های اکسین ریزنمونه‌ها را در جهت افزایش طول سلول ها و در نتیجه افزایش طول شاخساره‌ها پیش برده است و از آنجاییکه یکی از اثرات بارز و شناخته شده غلظت‌های بالای سیتوکنین‌ها در محیط کشت کاهش طول شاخساره می‌باشد (Arteca, 1995) و در این تحقیق در همه تیمارها BA باعث تولید شاخساره بیشتری شده است بنابراین می‌توان گفت BA در کنار IAA نقش محرک خود در نقاط مریستمی ریزنمونه را در جهت افزایش تعداد سلول‌های مریستمی برای تولید جوانه و شاخساره جدید ایفا می‌کند. لذا مشاهده می‌شود که کوتاه‌ترین شاخساره‌ها در محیط کشت‌های MS_6، MS_7 و MS_8 بوجود آمده‌اند. به نظر می‌رسد کینتین در ترکیب با IBA بیشتر باعث افزایش طول سلول‌ها و در نتیجه شاخساره‌های تولیدی می‌شوند.

نتیجه‌گیری نهایی

براساس نتایج این تحقیق می‌توان گفت بهترین محل برای تهیه ریزنمونه در کشت درون شیشه‌ای گیاه آلوئه ورا نوک شاخساره است. علاوه براین نوع و غلظت اکسین و سایتوکینین به کار رفته در محیط رشد بر پاسخ ریزنمونه‌های آلوئه تاثیر زیادی دارد و تنظیم کننده رشد BA در ترکیب با

www.SID.ir

Archive of SID

IAA نسبت به کینتبن در پـرآوری و تعـداد بیـشتر شاخـساره نقش مهم‌تری بـه عهـده دارد و از آنجاییکـه در کـشت درون شیشه‌ای در مراحل اسـتقرار و پـرآوری تولیـد تعـداد بیـشتر ریزنمونه با اندازه کوچک مورد توجه است. لذا محیط کـشت دارای ۱ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IAA با تولید ٦ شاخـساره (گـروه a)، ۲/۳ سـانتیمتری (گـروه e) بـه عنوان بهترین محیط جهت استقرار ریزنمونـه‌هـای آلوئـه ورا توصیه می‌شود. با توجه به سـرعت و میـزان پـرآوری بـالاتر بدست آمده در این تحقیق (٦ شاخـساره در عـرض ۳۵ روز) نسبت به سایر گزارشات موجود در این زمینه تحقیقات بیشتر با غلظت‌های تغییر یافته از تنظیم کننده‌های رشد BA و IAA قابل توصیه است.

منابع

باقری، ع.، و صـفاری، م. (۱۳۷٦) مبـانی کـشت بافـت‌هـای گیاهی. دانشگاه فردوسی مشهد، ٤٠٦ صفحه.

شفیعی حاجی آباد، م.، حمیداوغلی، ی.، فتـوحی قزوینـی، ر.، و فتاحی مقدم، ج. (۱۳۸۷) اثر محیط‌هـای مختلـف رشد بر پرآوری ریزنمونه‌های شاخساره سرخس بوستونی *Nephrolepis exaltata* Schott cv. Bostoniensis، مجله علمی پژوهشی علوم و فنون باغبانی ایران، جلد۹، شماره ۲. صفحه ۱۳۹ تا ۱۵۲.

نوری قنبلانی، ق. (۱۳۷۱) تجربیاتی در زمینه کشت بافت‌های گیاهی، انتشارات دانشگاه تبریز، ۲۵۰ صفحه.

وصال. س.، و باقری، ع. (۱۳۸۲) عملیات کشت بافـت‌هـای گیاهی، ترجمـه، انتـشارات آسـتان قـدس رضـوی، ۲۰۰ صفحه.

Abrie, A., and Staden, J.V. (2001). Micropropagation of endangered Aloe Polyphylla. Plant Growth Regulation. 33 (1): 19-23.

Aggarwal, D., and Barna, KS., (2004) Tissue culture propagation of elite plant of *Aloe vera* linn. Indian Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology. 13 (1): 77-79.

Ahmed, S., Kabir, A.H., Ahmed, M.B., Razvy, M.A., and Ganesan, S. (2007) Development of rapid microprppagation method of *Aloe vera* L. Sjemenarstvo 24: 121-128.

Albany, N., Vilchez, J., Leon de Sierralta, S., Molinay, M., and Chacin1, P., (2006) A methodology for the *in vitro* propagation of *Aloe vera* L. Rev. Fac. Agron. (LUZ)., 23: 211-219.

Anshoo, G., S., Singh S., Kulkarni, A., Pant, S., and Vijayaraghavan, R. (2005) Protective effect of *Aloe vera* L. gel against sulphur mustard-induced systemic toxicity and skin lesions. Indian Journal of Pharmacology. 6: 23-29.

Arteca, R.N. (1995) Plant Growth Regulators, Substances Principles and Applications, Chapman and Hall, New York. PP: 332.

Atherton, P. (1998) *Aloe vera* revisited. British Journal of Phytotherapy. 4(4): 176-183.

Campestrini, L.H., Kuhnen, S., Lemos, P.M.M., Bach D.B., Dias, P.F., and Maraschin, M. (2006) Cloning protocol of *Aloe vera* as a study-case for tailor-mades biotechnology to small farmers. J. Technol. Manag. Innov. 1:76-79.

Castorena, I., Natali, L., and Cavallini, A. (1988) *In vitro* culture of *Aloe barbadensis* Mill. morphogenetic ability and nuclear DNA content. Plant Science, Irish Repablic. 55:1, 53-59.

Chaudhuri, S., and Mukundan, U. (2001) *Aloe Vera* L. - Micropropagation and Characterization of its gel. Phytomorphology. 51 (2): 155-157.

Debiasi, C., Silva, C.G., Pescador, R. (2007) Micropropagation of *Aloe vera* L., Rev. Bras. PIant. Med. Botucatu. 9: 36-43.

Fattahi, M.J., Oghli, Y.H., and Ghazvini, R.F. (2004) Introduction of the most suitable culture media for micropropagation of a medicinal plant aloe (*Aloe barbadensis* Mill.). Iran. J. Hortic. Technol. Sci. 5: 71-80.

Feito, I., Gonzalez, A., Luz Centeno, M., Fernandez, B., and Rodriguez, A. (2001) Transport and distribution of benzyl adenine in *Actinidia deliciosa* explants cultured in liquid and solid media, Plant Physiol. Biochem. 39: 909- 916. 36

Gui, Y.L., Xu, T.Y., Gu, S.R., Liu, S.Q., Zhang, Z., Sun, G.D., and Zhang, Q. (1990) Studies on stem tissue culture and organogensis of *Aloe vera*. Acta Botanica. 32 (8): 606-610.

www.SID.ir

Archive of SID

Hamilton, R. (1998) Strengths and limitation of *Aloe vera*. American Jornal of Natural Medicine. 5(10): 30-33.

Hashemabadi, D., and Kaviani, B. (2008) Rapid micro-propagation of *Aloe vera* L. via shoot multiplication. African Journal of Biotechnology. 7 (12): 1899-1902.

Hosseini, R., and Parsa M. (2007) Micropropagation of *Aloe vera* L. grown in South Iran. Pakistan Journal of Biological Sciences. 10 (7): 1134-1137.

Joshi, S.P. (1998) Chemical constituents and biological activity of *Aloe barbadensis*: a review. Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences. 20: 768-773.

Meyer, H.J., and J.V., Staden, (1991) Rapid *in vitro* propagation of *Aloe barbadensis* Mill. Plant cell, tissue and organ culture. 26 (3): 167-171.

Mukherjee, A., and RoyChowdhury, B. (2008) The *In Vitro* Propagation of *Aloe vera* sp. TIG Research Journal. 1 (2): 116-119.

Murashige, T., and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tabacco tissue cultures. Physiol. Plant. 115: 493-497

Natali, L., Sanchez, I.C., and Cavallini, A. (1990) *In vitro* culture of *Aloe barbadensis* Mill. micropropagation from vegetative meristems. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 20: 71-74.

Paez, A., Gebre, G.M., Gonzales, M.E., and Tschslinski, T.J. (2000) Growth, soluble carbohydrates and aloin concentration of *Aloe vera* plants exposed to tree iradiance levels environmental and experimental botany levels. Environmental and Experimental Botany 44: 133-139.

Reynolds, T., and Dweck, A.C. (1999) *Aloe vera* leaf gel: a review update. Journal of Ethnopharmacology. 68: 33-37.

Roy, S.C., and Sarkar, A. (1991) *In vitro* regeneration and micropropagation of *Aloe vera* L. Scientia Horticultural. 47 (1-2): 107-113.

Sujatha, M., and Reddy, T.R. (1998) Differential cytokinin effects on the stimulation of *in vitro* shoot proliferation from meristematic of caster (*Ricinus communis* L.), Plant Cell Report. 17: 561-566.

Velcheva M., Faltin Z., Vardi A., Eshdat Y., and Peral, A. (2005) Regeneration of *Aloe arborescens* via organogenesis from young inflorescences. Plant Cell, Tissue Organ Culture. 83: 293-301.

Zhou, G.Y., HongFeng, D., Min, S.W., Lei, C., Zhou, G.Y., Ding, H.F., Shi, W.M., and Cheng, L. (1999) Fast asexual propagation of *Aloe vera*. Acta horticulturae scinica. 26 (6): 410-411.

www.SID.ir

Journal on Plant Science Researches, Serial 16, Fourth year, Number 4, Winter 2010
Archive of SID

Study of effects of different plant growth regulators on explant's establishment of *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Mill.)

Barzgar, A.B[1]., [*]Shafiee HajiAbad, M[2]., Abdy, M[3].

1. Scientific member of Islamic Azad University- Kashmar branch
2. Instructor of Islamic Azad University- Kashmar branch (Coresponder)
3. Lab assistant of Azad University- Kashmar branch.

Abstract

Aloe (*Aloe barbadensis* Mill) is one of the most important medicinal plants belonging to Liliaceae family that nowadays is propagated by *in vitro* culture in high-scale propagation. Because of the impotance of the establishment stage in *in vito* culture of this plant, this study was conducted to investigate the best media culture for *Aloe* explants establishment. First, the prolifration rate of two kind of explants (Shoot tips and auxiliary buds) were evaluated on 8 media cultures and shoot tips selected as the best explants. Then, in order to determine the best media culture an experiment was conducted in factorail design with two factors: auxins in four levels (1 mgl^{-1} IAA, 0.5 mgl^{-1}IAA, 1 mgl^{-1}IBA, 0.5 mgl^{-1}IBA) and cytokinins in two levels (BA and Kinetin at 1 mgl^{-1}) in a complete randomised design with 3 replications. After 35 days the highest rate of prolifration earned on the media contained 0.5 mgl^{-1} IAA and 1 mgl^{-1} BA with 6.0 shoots per explant and 2.3 cm length, that is higher and faster than other related reports. Since on the stablishment stage of *in vitro* culture regnaration of the highest shoot number per explant with small size has considerable attention, this protocol suggestes an appropriate method for establishment of *Aloe* explants.

Key words: *Aloe vera*, *in vitro* culture, shoot proliferation, shoot tip, IAA, BA

*email:marzeih_shafiee@yahoo.com

www.SID.ir