دو فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران
جلد ۲۰، شمارهٔ ۲، صفحهٔ ۱۹۱-۱۸۱ (۱۳۹۱)

تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی و ترکیبات ویتامینی بر کال‌زایی، جنین‌زایی رویشی و تولید گیاهچه در گیاه دارویی صبرزرد (*Aloe vera* L.)

نسیم زرین‌پنجه[۱]، آتنا اولادزاد عباس‌آبادی[۲] و منصور امیدی*[۳]

۱- کارشناس ارشد، اصلاح نباتات، گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، کرج
۲- کارشناس ارشد، اصلاح نباتات، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان
۳*- نویسنده مسئول مکاتبات، استاد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، کرج
پست‌الکترونیک: momidi@ut.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۱۰/۱۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۰٤/۱۱

چکیده

صبرزرد با نام علمی *Aloe vera* L. یکی از گیاهان ارزشمند در صنایع دارویی، آرایشی - بهداشتی و غذایی محسوب می‌شود. با توجه به نیاز روزافزون به این گیاه، بیشتر تحقیقات انجام‌شده در زمینه کشت بافت بر تکثیر درون شیشه‌ای و ریزادیادی آن تمرکز داشته است ولی جنین‌زایی رویشی نه تنها به‌عنوان روشی مناسب در تکثیر انبوه، بلکه به‌عنوان شیوه‌ای مطمئن و کارآمد در تولید بذرهای مصنوعی و متابولیت‌های ثانویه، از نگاه محققان دور مانده است. در تحقیق حاضر اثر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی شامل نفتالین استیک‌اسید (NAA) و بنزیل آمینوپورین (BAP) و ترکیب ویتامینی محیط‌های کشت MS، LS، L2 و ترکیب ویتامینی تغییریافته بر القای بافت کالوس و جنین‌زایی رویشی غیرمستقیم مورد مطالعه قرار گرفت. محیط کشت MS همراه با NAA به میزان mgl^{-1} ۱ و ترکیب ویتامینی تغییریافته شامل mgl^{-1} ۰/٤ تیامین، mgl^{-1} ۰/۵ پیریدوکسین، mgl^{-1} ۰/۵ نیکوتینیک‌اسید و mgl^{-1} ۱۰۰ میواینوزیتول بهترین محیط کشت جهت کال‌زایی(۱۰۰٪) بودند. به‌طوری‌که بیشترین درصد تشکیل جنین‌های رویشی (۵۰٪) نیز در محیط کشت MS همراه با BAP به میزان mgl^{-1} ۵ و NAA به میزان mgl^{-1} ۰/۲ و ترکیب ویتامینی تغییریافته تولید شد. البته ۸۰٪ جنین‌های رویشی بدست‌آمده پس از طی مراحل بالغ‌سازی، تولید گیاهچه و سازگاری در گلخانه زنده ماندند.

واژه‌های کلیدی: صبرزرد، کال‌زایی، جنین‌زایی رویشی، سیتوکینین، ویتامین.

مقدمه

گیاه دارویی صبرزرد با نام علمی *Aloe vera* L. متعلق به خانواده Liliaceace می‌باشد. در شیرابه و ژل برگ‌های این گیاه، ترکیبات مختلفی مانند آلوئین، باربالوئین، پلی‌ساکارید، گلیکوپروتئین و ساپونین وجود دارد که در درمان بیماریهای مختلفی مانند یبوست، عفونت‌های معده‌ای و روده‌ای، بیماریهای پوستی، عفونت‌های دهان و لثه کاربرد فراوان دارد و گیاه صبرزرد را برای صنایع

Archive of SID
www.SID.ir

دارویی، آرایشی– بهداشتی و غذایی بسیار ارزشمند نموده است. با توجه به اهمیت و نیاز روزافزون به گیاه دارویی صبرزرد و اینکه تکثیر جنسی به دلیل نرعقیمی سیتوپلاسمی (Keijzer & Cresti, 1987) و تکثیر رویشی سنتی که توسط پاجوش‌ها انجام می‌گیرد به دلیل تولید معدود پاجوش (Meyer & Van Staden,1991)، نمی‌توانند پاسخگوی نیاز بازار باشند، بنابراین نیاز به انجام مطالعات گسترده بر روی کشت بافت این گیاه احساس می‌شود. اصلاح برخی خصوصیات ارزشمند مانند مورفولوژی گیاه در خصوص واریته‌های زینتی، مقاومت در برابر عوامل تنش‌زا و خصوصا تولید متابولیت‌های ثانویه از طریق روش‌های رویشی سنتی امکان‌پذیر نمی‌باشد (Velcheva *et al*., 2005). بنابراین بیشتر تحقیقات انجام‌شده در زمینه کشت بافت گیاه دارویی صبرزرد بر ریزازدیادی و تکثیر سریع درون شیشه‌ای این گیاه متمرکز بوده است (Aggarwal & Barna, 2004; Baksha *et al*., 2005; Mukherjee & Roychowdhury, 2008; Singh & Sood, 2009; Ivonova & Van Staden, 2009 and 2010). تحقیقاتی نیز در زمینه باززایی از طریق اندام‌زایی انجام شده و اثر عوامل مختلف به خصوص نوع ریزنمونه، نوع و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی از طریق کشت مریستم ساقه، مریستم ریشه، بساک، پایه برگ حاصل از نشاهای جوان، گل‌های جوان، ساقه‌های زیرزمینی، ساقه‌های جوان حاصل از کشت درون شیشه‌ای و قطعات برگ مورد بررسی قرار گرفته است (Abdollahzadeh *et al*., 2006; Garro-Monge *et al*., 2008). در زمینه باززایی از طریق جنین‌زایی رویشی غیرمستقیم، تنها مورد گزارش شده مربوط به استفاده از دانه بعنوان ریزنمونه در *A. barbadensis* Mill بوده است Garro-Monge *et al*., (2008). با توجه به اهمیت کال‌زایی و جنین‌زایی رویشی در برنامه‌های اصلاحی مانند جداسازی پروتوپلاست، کشت سوسپانسیون، بهره‌گیری از تنوع سوماکلنی، تولید مقادیر زیادی از بافت جنین‌زای یکسان برای پژوهش‌های رشدی، تولید گیاه باززا شده در مقیاس تجاری، تولید بذرهای مصنوعی، تولید متابولیت‌های ثانویه، بررسی تراریختی و انتخاب جهش یافته‌ها در سطح آزمایشگاهی (Sayed-Tabatabaei & Omidi, 2009)، تحقیق حاضر با هدف القای جنین‌زایی رویشی غیرمستقیم از طوقه گیاه صبرزرد، برای اولین بار طراحی و اجرا گردید.

مواد و روش‌ها

تعدادی گیاه صبرزرد سالم و عاری از هر گونه بیماری از گلخانه تحقیقاتی پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی ایران، انتخاب شد و پاجوش‌های گیاهان برگزیده با دقت و بدون اینکه به گیاه مادری صدمه‌ای وارد شود، جدا شدند و به آزمایشگاه منتقل گردیدند. پاجوش‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در آب جاری شستشو شدند. سپس برگ‌ها به‌ترتیب و لایه لایه از خارج به داخل جدا شدند و فقط دو برگ انتهایی روی ساقه حفظ گردیدند. سپس نمونه‌ها به‌ترتیب به مدت۲۰ دقیقه در بنومیل ۱٪ و ۱ دقیقه در ساولن ۱٪ همراه با تکان دادن ملایم قارچ‌کشی و ضدعفونی شدند. آنگاه، سه بار با آب مقطر شستشو شدند. مراحل آخری ضدعفونی در زیر هود لامینار و هنگام کشت ریزنمونه‌ها بر روی محیط کشت انجام گردید. نمونه‌ها بهترتیب به مدت ۳۰ ثانیه در الکل اتانول ۷۰٪ و۲۰ دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۲/۵٪ همراه با دو قطره محلول توین ۲۰ ضدعفونی شدند و در نهایت سه بار با آب مقطر سترون سازی شده شستشو شدند.

Archive of SID

www.SID.ir

به‌منظور جداسازی ریزنمونه، غلاف قاعده برگ‌ها از ساقه لایه لایه برداشته شد تا اینکه نوک مریستم ساقه همراه با برگ اولیه مشخص گردید. نمونه در این مرحله از یک ساقه به طول cm ۲-۱ تشکیل شد. شایان ذکر است که در این تحقیق از محیط کشت MS (Murashige & skoog 1962) به همراه شکر به میزان g/l ۳۰ و آگار به میزان ۷g/l، به‌عنوان محیط کشت پایه استفاده شد. البته pH تمام محیط‌های کشت با کمک NaOH و HCl یک نرمال بین ۵/٦ تا ۵/۸ تنظیم شد. محیط‌های کشت در اتوکلاو با دمای ^{o}C ۱۲۱ و فشار ۱/۲ اتمسفر برای مدت ۲۰ دقیقه سترون شدند. به‌منظور بدست‌آوردن تعداد کافی ریزنمونه سترون از گیاهچه‌های هم سن برای انجام آزمایش‌های جنین‌زایی رویشی، ابتدا با استفاده از محیط کشت MS به همراه mgl^{-1} ۵ هورمون BAP تکثیر درون‌شیشه‌ای انجام گردید. نمونه‌های کشت‌شده در اتاق رشد با دمای ^{o}C ۲۳±۲ و در فتوپریود ۱٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. عمل واکشت هر ماه یکبار انجام شد. بدین‌ترتیب نمونه‌های گیاهی سه ماهه برای ادامه آزمایش بدست آمدند. برای تهیه ریزنمونه برای القای بافت کالوس، از ناحیه طوقه گیاهان حاصل از تکثیر درون شیشه‌ای، ریزنمونه‌هایی به طول تقریبی ۱۰-۸ میلی‌متر تهیه شد و در محیط کشت MS همراه با تیمار ترکیب ویتامینی در چهار سطح ویتامین‌های محیط کشت MS، ویتامین‌های LS (Linsmaier & Skoog 1965)، ویتامین‌های L2 (Phillips & Collins 1979) و ویتامین‌های تغییریافته و همچنین تیمار NAA به‌عنوان تنظیم‌کننده رشد گیاهی در غلظت‌های ۱، ۱/۵، ۲ و ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر با سه تکرار در قالب طرح فاکتوریل کاملا تصادفی کشت شدند و جهت کال‌زایی مورد بررسی قرار گرفتند. نوع و غلظت ویتامین‌های موجود در هر یک از ترکیبات ویتامینی در جدول ۱ نشان داده شده است. سپس تمام کشت‌ها در اتاق رشد تحت شرایط دمایی ^{o}C ۲۳±۲ و در تاریکی نگهداری شدند. یک ماه پس از انتقال ریزنمونه‌ها به محیط کشت کال‌زایی، بافت کالوس بدست آمد. بافت‌های کالوس برای بررسی القاء جنین‌زایی رویشی غیرمستقیم به محیط کشت‌های مختلف شامل محیط کشت MS همراه با تیمارهای ترکیب ویتامینی در چهار سطح ویتامین‌های محیط کشت MS، ویتامین‌های L2، ویتامین‌های LS و ویتامین‌های تغییریافته (جدول ۱) و تیمارهای تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی شامل NAA به میزان mgl^{-1} ۰/۲ و BAP در غلظت‌های ۱، ۳، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر در سه تکرار و در قالب طرح فاکتوریل کاملا تصادفی منتقل شد. و تمام کشت‌ها در اتاق رشد تحت شرایط دمایی ^{o}C ۲۳±۲ و در فتوپریود ۱٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. جنین‌های رویشی بدست‌آمده در محیط کشت MS با یک دوم غلظت نمک‌های معدنی بدون تنظیم‌کننده رشد گیاهی، جهت بلوغ جنین انتقال یافتند. جنین‌های بالغ پس از سه بار واکشت به فاصله زمانی یک ماه و رسیدن به طولی حدود cm ۱۰، از محیط درون شیشه خارج و در آب ^{o}C ۲۵±۲ باقیمانده‌های آگار از گیاهچه‌ها جدا شدند. سپس در محلول ۱٪ بنومیل به مدت ۵ دقیقه برای جلوگیری از آلودگی‌های قارچی نگهداری شدند. آنگاه گیاهچه‌ها در لیوان‌های پلاستیکی محتوی مخلوط ۱:۱ ماسه و خاک مزرعه کاشته و به مدت ٤۵ روز درشرایط سازگاری یعنی در دمای ^{o}C ۳۰±۲، رطوبت نسبی ٤۰٪ و سایه نگهداری شدند. در پایان گیاهچه‌های سازگار شده به گلخانه انتقال داده شدند.

Archive of SID

www.SID.ir

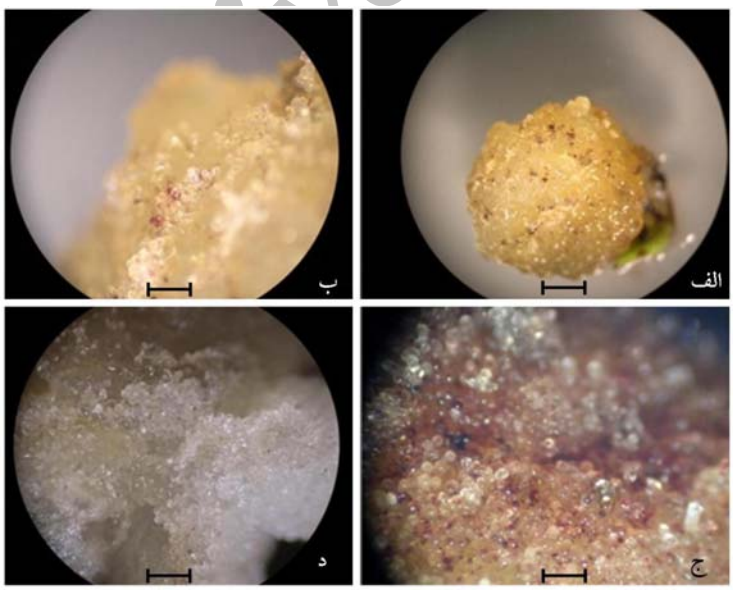
جدول ۱- نوع و غلظت ترکیبات ویتامینی مورد استفاده جهت کال‌زایی و جنین‌زایی رویشی

ترکیب ویتامینی	تیامین (mgl^{-1})	پیریدوکسین (mgl^{-1})	نیکوتینیک‌اسید (mgl^{-1})	میواینوزیتول (mgl^{-1})
MS	۰/۱	۰/۵	۰/۵	۱۰۰/۰
LS	۰/٤	۰/۰	۰/۰	۱۰۰/۰
L2	۲/۰	۰/۵	۰/۰	۲۵۰/۰
تغییر یافته	۰/٤	۰/۵	۰/۵	۱۰۰/۰

نتایج

از یک هفته پس از انتقال ریزنمونه‌ها به محیط کال‌زایی، تشکیل بافت کالوس روی ریزنمونه‌ها آغاز شد و پس از دو هفته واکشت انجام شد. در تمام تیمارهایی که در آنها کال‌زایی انجام گردید، دو هفته پس از واکشت، بافت‌های کالوس نرم تا فشرده، گرانوله، خاویاری شکل و سفید تا شیری رنگ با رگه‌های قرمز مشاهده شدند که آماده انتقال به محیط کشت باززایی بودند (شکل ۱).

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های مربوط به درصد کال‌زایی نشان داد که اثر ترکیب ویتامینی و همینطور اثر متقابل ترکیب ویتامینی و تنظیم‌کننده رشد گیاهی در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار می‌باشد. تیمارهای ترکیب ویتامینی تغییریافته همراه با NAA ۱ mgl^{-1}، ترکیب ویتامینی L2 همراه با NAA ۲/۵ mgl^{-1} و همینطور ترکیب ویتامینی LS همراه با NAA ۲/۵ mgl^{-1} بیشترین تأثیر را بر تشکیل بافت کالوس داشتند (جدول ۲).



شکل ۱- نمونه‌هایی از بافت کالوس حاصل از تیمار محیط کشت MS همراه با ترکیب ویتامینی شامل ۰/٤ mgl^{-1} تیامین، ۰/۵ mgl^{-1} پیریدوکسین، ۰/۵ mgl^{-1} اسید نیکوتینیک، ۱۰۰/۰ mgl^{-1} میواینوزیتول و ۱/۰ mgl^{-1} NAA، مقیاس "الف" – ۰/۵ cm، مقیاس "ب" و "د" – ۰/۲۵ cm و مقیاس "ج" – ۰/۱۲۵ cm

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۲- مقایسه میانگین اثرات متقابل ترکیب ویتامینی و تنظیم‌کننده رشد گیاهی بر درصد کالزایی

مقایسه میانگین درصد تشکیل بافت پینه	NAA (mgl^{-1})	ترکیب ویتامینی
۱۰۰/۰۰ a ±۰/۰	۱/۰	تغییریافته
۱۰۰/۰۰ a ±۰/۰	۲/۵	L2
۱۰۰/۰۰ a ±۰/۰	۲/۵	LS
۹۱/٦۷ ab ± ۱٤/٤۳	۲/۰	L2
۹۱/٦۷ ab ± ۱٤/٤۳	۱/۰	MS
۹۱/٦۷ ab ± ۱٤/٤۳	۱/۵	LS
۹۱/٦۷ ab ± ۱٤/٤۳	۲/۰	LS
۹۱/٦۷ ab ± ۱٤/٤۳	۱/۰	L2
۸۳/۳۳ ab ± ۱٤/٤۳	۱/۵	L2
۸۳/۳۳ ab ± ۱٤/٤۳	۱/۵	تغییریافته
۷۵/۰۰ ab ± ۲۵/۰۰	۲/۰	تغییریافته
۷۵/۰۰ ab ± ۲۵/۰۰	۲/۵	تغییریافته
٦٦/٦۷ b ± ۱٤/٤۳	۱/۰	LS
٦٦/٦۷ b ± ۱٤/٤۳	۱/۵	MS
٦٦/٦۷ b ± ۱٤/٤۳	۲/۰	MS
٦٦/٦۷ b ± ۱٤/٤۳	۲/۵	MS

*حروف غیرمشابه نشانگر وجود تفاوت معنی‌دار بین میانگین‌ها بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪ است.

اثر متقابل ترکیب‌های ویتامینی و تنظیم‌کننده رشد گیاهی در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بودند. به‌طوری‌که بهترین تیمار جنین‌زایی مربوط به ویتامین‌های تغییریافته با NAA ۰/۲ mgl^{-1} و BAP ۵/۰ mgl^{-1} بود (جدول ۳).

جنین‌های رویشی بدست‌آمده از بافت کالوس برای بالغ‌سازی و تشکیل ساقه و ریشه به محیط کشت یک دوم غلظت نمک‌های معدنی MS منتقل شدند و ۱۰۰٪ جنین‌ها پس از یک ماه بالغ گشتند. بعد از سه بار واکشت به فاصله زمانی یک ماه و رسیدن گیاهچه‌ها به طول ۱۰ cm، مراحل خارج کردن گیاهچه‌ها از محیط درون شیشه‌ای، انتقال به خاک، سازگاری و در نهایت انتقال به گلخانه مطابق آنچه که در بخش مواد و روش‌ها توضیح داده شده، انجام گردید و ۸۰ ٪ گیاهان حاصل زنده ماندند (شکل‌های ۲ و۳).

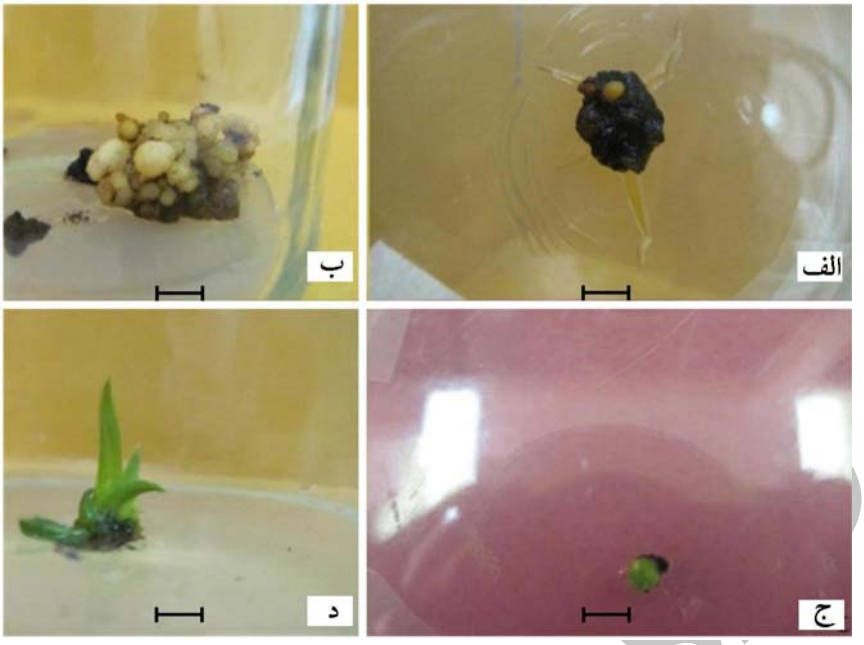
www.SID.ir

جدول ۳- مقایسه میانگین اثرات متقابل ترکیب ویتامینی و تنظیم‌کننده رشد گیاهی بر درصد جنین‌زایی رویشی

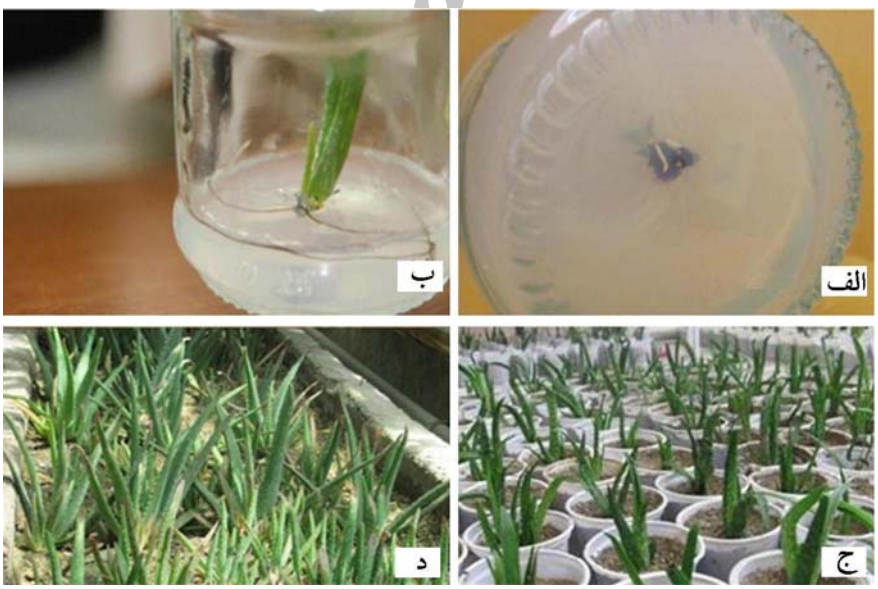
مقایسه میانگین درصد تشکیل جنین بدنی غیر مستقیم	BAP (۰/۲ mgl^{-1}) + NAA (mgl^{-1}) (گیاهی)	ترکیب ویتامینی محیط کشت
۵۰/۰۰ a ±۲۵/۰۰	۵/۰	تغییر یافته
۳۳/۳۳ ab ±۱٤/٤۳	۵/۰	LS
۲۵/۰۰ ab ±۲۵/۰۰	۱/۰	L2
۲۵/۰۰ ab ± ٤۳/۳۰	۳/۰	L2
۱٦/٦٦ ab ±۲۸/۸٦	۱۰/۰	MS
۱٦/٦٦ ab ±۲۸/۸٦	۳/۰	LS
۱٦/٦٦ ab ±۲۸/۸٦	۵/۰	L2
۸/۳۳ b ± ۱٤/٤۳	۱۰/۰	LS
۰/۰۰	۱/۰	LS
۰/۰۰	۳/۰	MS
۰/۰۰	۱/۰	MS
۰/۰۰	۱۰/۰	L2
۰/۰۰	۱/۰	تغییر یافته
۰/۰۰	۳/۰	تغییر یافته
۰۰/۰	۵/۰	MS
۰/۰۰	۱۰/۰	تغییر یافته

*حروف غیرمشابه نشانگر وجود تفاوت معنی‌دار بین میانگین‌ها بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪ است.

www.SID.ir



شکل ۲- مراحل جنین‌زایی رویشی غیرمستقیم، مقیاس cm-۱/۰.الف) تشکیل جنین رویشی بر روی بافت کالوس، ب) ازدیاد جنین‌زایی رویشی، ج) بلوغ جنین به صورت تشکیل ساقه و د) افزایش طول ساقه



شکل ۳- مراحل بالغ‌سازی و سازگاری گیاهچه‌های حاصل از جنین‌زایی رویشی: الف) بلوغ جنین رویشی به صورت تشکیل ریشه، ب) افزایش طول ریشه، ج) انتقال گیاهچه‌ها به گلدان‌های پلاستیکی و نگهداری در شرایط سازگاری و د) انتقال گیاهچه‌ها به گلخانه

www.SID.ir

بحث

مریستم ناحیه طوقه جهت القای بافت کالوس در این پژوهش مناسب بود. بنابراین بخش‌های انتهایی برگ‌های جوان واقع در نزدیکی مریستم نسبت به سایرقسمت‌های برگ انگیزش بهتری برای کالوس نشان دادند (Abdollahzadeh *et al*., 2006). همچنین در تحقیق دیگری نیز، بهترین ریزنمونه جهت القای بافت کالوس، به لحاظ درصد کال‌زایی پایه برگ بود. گرچه بافت‌های کالوس بدست‌آمده از پایه برگ در این تحقیق، در مرحله بعد باززا نشدند و تنها بافت‌های کالوس بدست‌آمده از جنین زیگوتی که از لحاظ درصد کال‌زایی چندان رضایت بخش نبودند، باززا شدند (Garro-Monge *et al*., 2008). در تحقیق حاضر بافت‌های کالوس بدست‌آمده از ریزنمونه طوقه توانایی باززایی داشتند و در مراحل بعد با انتقال آنها به محیط جنین‌زایی رویشی، جنین رویشی تشکیل شد. شایان ذکر است که استفاده از ریزنمونه طوقه نسبت به جنین زیگوتی به دلیل اینکه گیاه دارویی صبرزرد دوره رشد طولانی و همینطور نرعقیمی سیتوپلاسمی دارد (Keijzer & Cresti, 1987)، آسان‌تر، سری‌تر و از نظر تجاری کاربردی‌تر می‌باشد. نتایج بدست‌آمده از کال‌زایی و توانایی باززایی بافت‌های کالوس بدست‌آمده نسبت به اندام‌های نابالغ و بافت‌های مریستمی حاوی سلول‌ها تمایز نیافته‌اند، و برای ریخت‌زایی مناسبترند (Hoquem & Mansfield, 2004). در این پژوهش کاربرد اکسین NAA به تنهایی باعث انگیزش بافت کالوس شد، درصورتی‌که در بیشتر گزارش‌ها وجود اکسین و سیتوکینین با هم برای القا و رشد بافت کالوس لازم بوده‌است (Abdollahzadeh *et al*., 2006). در مورد تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر القای جنین‌زایی رویشی، بیشتر مطالعات انجام شده بر روی نوع، غلظت و زمان کاربرد تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی متمرکز شده است. به‌طوری‌که ترکیبات مختلفی از فیتوهورمون‌ها مانند TDZ، BA، 2iPR، ZR، CPUU، Kinبا و یا بدون ancymidol برای جنین‌زایی رویشی *Aloe arborescens* استفاده شده است. باززایی مؤثر ساقه‌ها زمانی بدست آمد که از محیط کشت MS همراه با BA یا TDZ استفاده گردید. محیط کشت MS با ۱۹/۶ و ۲۲/۲ میکرومولار BA و ۳/۹۲ میکرومولار ancymidol باززایی را تحریک کرد و باعث شد که ۸۳/۳ ٪ ریزنمونه‌ها باززا شوند (Velcheva *et al*., 2005). در آزمایش دیگری مشخص شد که کاربرد محیط کشت MS همراه با 2,4-D به میزان mgl^{-1} و BAP به میزان mgl^{-1} ۲ بهترین نتیجه را جهت القای باززایی از طریق جنین‌زایی رویشی غیرمستقیم دربرداشت (Garro-Monge *et al*., 2008). در بیشتر مطالعات انجام شده بر روی گونه‌های مختلف گیاهی، کاربرد اکسین‌ها به تنهایی و یا در ترکیب با سیتوکینین‌ها، معمولا باعث القای جنین‌زایی رویشی شده است (Jimenez, 2005). در بین اکسین‌ها، 2,4-D و در بین سیتوکینین‌ها BAP و بعد از آن Kinetin بیشتر از همه کاربرد دارند (Jimenez, 2005). تحقیق حاضر نیز مؤید این مطلب می‌باشد و مشخص شده که کاربرد سیتوکینین BAP به میزان mgl^{-1} ۵ همراه بااکسین NAA به میزان mgl^{-1} ۰/۲ بیشترین تأثیر را بر درصد جنین‌زایی رویشی داشت. اما گزارشی در مورد اثر نوع و غلظت ترکیبات ویتامینی در محیط کشت بافت آن گزارش نشده است. برای کشت بافت گیاه دارویی صبرزرد از ترکیب ویتامینی موجود در محیط کشت MS استفاده شده است. درصورتی‌که در کشت بافت گیاهان مختلف از ترکیب‌های ویتامینی متفاوتی استفاده می‌شود. به‌عنوان‌مثال، جهت

Archive of SID

www.SID.ir

جنین‌زایی بدنی غیرمستقیم در (Tejavathi *et al*., 2007) *Ageve vera-cruz* Mill از ترکیب ویتامینی L2 و جهت باززایی *Euphorbia tirucalli* (Uchida *et al*., 2004) از ترکیب ویتامینی LS استفاده شده است. در این تحقیق برای اولین بار اثر ترکیب ویتامینی در کنار ترکیب هورمونی بر روی کال‌زایی و باززایی گیاه دارویی صبرزرد مورد مطالعه قرار گرفت. علاوه بر ترکیب ویتامینی MS، L2و LS از ترکیب ویتامینی تغییریافته‌ای نیز برای اولین بار استفاده شده که شامل ۰/٤ mgl^{-1} تیامین، ۰/۵ mgl^{-1} پیریدوکسین، ۰/۵ mgl^{-1} نیکوتینیک‌اسید و ۱۰۰/۰ mgl^{-1} میواینوزیتول بود. این ترکیب با ۱۰۰٪ کال‌زایی و ۵۰٪ جنین‌زایی رویشی غیرمستقیم مطلوب‌ترین ترکیب ویتامینی در گیاه صبرزرد بود. از آنجا که میزان تیامین موجود در ترکیب ویتامینی تغییریافته نسبت به MS بیشتر بود، می‌توان نتیجه گرفت که افزایش میزان تیامین (mgl^{-1} ۰/٤) در افزایش کال‌زایی و باززایی در این گیاه مؤثر است. موارد بسیاری در مورد کال‌زایی و باززایی گیاهان مختلف مثلا کاربرد ۰/٤ mgl^{-1} جهت باززایی در *Helichrysum italicum* گزارش شده است که میزان تیامین به‌کاررفته در محیط کشت بیشتر از ترکیب ویتامینی MS بوده است (Perrini *et al*., 2009). در این پژوهش انتقال جنین‌های رویشی ایجاد شده به محیط کشت MS با یک دوم غلظت نمک‌های معدنی بدون هیچ‌گونه تنظیم‌کننده رشد گیاهی سبب بالغ‌سازی جنین‌های بدنی با تشکیل ساقه و سپس ریشه شده است. در تحقیق دیگری نیز که بر روی همین گیاه صورت گرفته، جهت بالغ‌سازی جنین‌های رویشی غیرمستقیم از همین محیط استفاده شد (Garro-Monge *et al*., 2008). گیاهچه‌ها بعد از خارج شدن از محیط درون شیشه‌ای به گلدان‌های حاوی مخلوط ۱:۱ ماسه و خاک مزرعه منتقل شدند. در تحقیق دیگری جهت کاشت گیاهچه‌های صبرزرد حاصل از باززایی، پس از سه هفته نگهداری در پرلیت به آمیخته خاکی دارای خاک‌برگ، سیلت و ماسه به نسبت۱:۱:۲ منتقل شدند (Abdollahzadeh *et al*., 2006). در پژوهش دیگری که بر روی همین گیاه انجام شد، جهت سازگارکردن از یک روش دو مرحله‌ای استفاده شد و ۱۰۰٪ گیاهچه‌ها برای انتقال به شرایط طبیعی مزرعه زنده ماندند (Mangal *et al*., 2011). بدین‌ترتیب که در ابتدا گیاهچه‌های حاصل از باززایی برای مدت ۱۲-۱۰ روز در دمای ۲۷°C-۲۵ و رطوبت نسبی ۷۰٪ و نور طبیعی نگهداری شدند و پس از آن به محیطی با دمای ۳۲ ±۲° C، رطوبت نسبی ۳۰٪ و نور طبیعی منتقل شدند. در این تحقیق پس از خارج کردن گیاهچه‌های حاصل از محیط درون شیشه‌ای و انتقال آنها به گلدان، مرحله سازگاری گیاهچه‌ها با محیط خارج از شیشه، به تدریج و با نگهداری آنها در دمای ۳۰±۲° C، رطوبت نسبی ٤۰٪ و سایه برای مدت ٤۵ روزانجام شد. بدین ترتیب ۸۰٪ گیاهچه‌ها زنده ماندند که به گلخانه انتقال یافتند. امید است نتایج بدست‌آمده از این پژوهش، در برنامه‌های اصلاحی *Aloe vera* L. در آینده‌ای نه چندان دور مورد استفاده محققان قرار گیرد.

سپاسگزاری

این پژوهش با همکاری آزمایشگاه بیوتکنولوژی پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی انجام شد. بدین‌وسیله از مسئولین پژوهشکده و از آقایان رضا شهبازی و امیررضا زارع به‌دلیل مساعدتشان در تهیه جدول‌ها و شکل‌ها قدردانی می‌گردد.

Archive of SID

www.SID.ir

منابع مورد استفاده

- Abdollahzadeh, N., Daneshvar, M.H., and Moallemi, N., 2006. *In vitro* callus induction and plantlet regeneration of Aloe (*Aloe vera* L.). Journal of Horticultural Science and Technology, 7:77-92.
- Aggarwal, D. and Barna, K.S., 2004.Tissue culture propagation of elite plant of *Aloe Vera* Linn. Plant Biochemestry & Biotechnolog, 13: 77-79.
- Baksha, R., Jahan, M.A.A., Khatun, R. and Munshi, J.L., 2005. Micropropagation of *Aloe barbadensis* Mill through *in vitro* culture of shoot tip explants. Plant Tissue Culture & Biotechnology, 15:121-126.
- Garro-Monge, G., Gottica-Arias, A.M. and Valdez-Melara, M., 2008. Somatic embryogenesis, plant regeneration and acemannan detection in *Aloe*. Agronomia Costarricense, 32:41-52.
- Hoquem, D. and Mansfield, J.W., 2004. Effect of genotype and explant age on callus induction and subsequent plant regeneration from root-derived callus of Indica rice genotypes. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 78:217-223.
- Ivonova, M. and Van Staden J., 2009. Nitrogen source, concentration, and NH4+:NO3- ratio influence shoot regenaration and hyperhydricity in tissue cultureed *Aloe polyphylla*. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 99:167-174.
- Ivonova, M. and Van Staden J., 2010. Natural ventilation effectively reuces hyperhydricity in shoot culture of *Aloe polyphylla Schonland ex Phillans*. Plant Growth Regulation, 60:143-150.
- Jimenez, V.M., 2005. Involvement of plant hormones and plant growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis. Plant Growth Regulation, 47: 91-110.
- Keijzer, C.J. and Cresti, M., 1987. A comparison of anther tissue development in male sterile *Aloe vera* and male fertile *Aloe ciliaris*. Annals of Botany, 59:533-542.
- Linsmaier, E.M. and Skoog, F., 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 18:100-127.
- Mangal, S., Rathore, J., Chikara N. and Shekhawat S., 2011. Plantlet regeneration from callus cultures of selected genotype of *Aloe vera* L. -An ancient plant for modern herbal industries. Applied Biochemistry and Biotecnology, 163:860-868.
- Meyer, H.J. and Van Staden, J., 1991. Rapid *in vitro* propagation of *Aloe barbadensis* Mill. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 26:167-171.
- Mukherjee, A. and Roychowdhury, B., 2008. The *in vitro* propagation of *Aloe vera sp.* Techno India Group Research Journal, 1:116-119.
- Murashige, T. and Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays
- with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15:473-497.
- Perrini, R., Alba, V., Ruta, C., Morone-forunato I., Blanco, A. and Montemurro, C., 2009. An evaluation of a new approach to the regeneration of *Helichrysum italicum* (Roth) G.DON. and the molecular characterization of the variation among sets of differently derived regenerants. Cellular and Molecular Biology Letters, 14:377-394.
- Phillips, G.C. and Collins, G.B., 1979. *In vitro* tissue culture of selected legumes and plant regeneration from callus of red clover. Crop Science, 19:59-64.
- Sayed-Tabatabaei, B.E., and Omidi, M., 2009. Plant cell and tissue culture. University of Tehran Press, 368pp.
- Singh, B. and Sood, N., 2009. Significance of explants preparation and sizing in *Aloe vera* L. - A highly efficient method for in vitro multiple shoot induction. Scientia Horiculturae, 122: 146-151.
- Tejavathi, D.H., Rajanna, M.D., Sowmya, R. and Gayathramma, K., 2007. Induction of somatic embryos from cultures of *Ageve vera*-cruz Mill. *In Vitro* Cellullar Developmental Biology-Plant, 43:423-428.
- Uchida. H., Nakayachi, O., Otani, M., Kajikawa. M., Kohzu, Y., Yamato, K., Fukuzawa, H., Shimada, T. and ohyama, K., 2004. Plant regeneration from internode explants of *Euphorbia tirucalli*. Plant Biotechnology, 21:397-399.
- Velcheva, M., Faltin, Z., Vardi, A., Eshdat,Y. and Perl, A., 2005. Regenation of *Aloe arborescens* via somatic organogenesis from young inflorescences. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 83: 293-301.

Archive of SID

www.SID.ir

Effects of plant growth regulators and vitamin combinations on callus induction, somatic embryogenesis and plantlet production of *Aloe vera* L.

N. Zarinpanjeh[1], A. Oladzad Abbasabadi [2] and M. Omidi[*3]

1-M.Sc., Department of Agronomy and Plant Breeding, University of Tehran, Karaj, I.R.Iran
2- M.Sc., Industrial University of Isfahan, Isfahan, I.R.Iran
3[*]-Corresponding author, Prof., Department of Agronomy and Plant Breeding, University of Tehran, Karaj, I.R.Iran, Email: momidi@ut.ac.ir

Received: 01.01.2012 Accepted: 01.07.2012

Abstract

Aloe Vera L. is one of the medicinal plants with different uses in pharmaceutical, cosmetic and food industries. According to increasing demand for the plant species, the most studies of tissue culture have been focused on micropropagation. But somatic embryogenesis as an appropriate way for large scale propagation, production of synthetic seeds and production of secondary metabolites have been ignored. The effect of plant growth regulators including α-Naphtalene acetic acid (NAA) and N^6- Benzyladenin (BAP) and vitamin combinations including MS, LS, L2 and modified vitamin were studied, in this work. MS medium with modified vitamin including 0.4 mgl^{-1} Thiamine HCl plus 0.5 mgl^{-1} Prydoxine HCl plus 0.5 mgl^{-1} Nicotinic acid plus100 mgl^{-1} Myo-Inositol, supplemented with1.0 mgl^{-1}NAA induced 100% callus induction. The most indirect somatic embryogenesis (50%) was induced by applying MS culture medium with modified vitamin supplemented with 0.2 mgl^{1} NAA and 5.0 mgl^{1} BAP. Eighty percent of plantlet regenerated from somatic embryos was survived after maturation, plantlet production, and acclimatization.

Key words: *Aloe Vera* L., Callus induction, Somatic embryogenesis, Plant growth regulator, Vitamin combination.

Archive of SID

www.SID.ir