

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

امیر بهزاد برزگر<sup>۱</sup>، \*مرضیه شفیعی حاجی آباد<sup>۲</sup>، محمود عبدی<sup>۳</sup>

۱. عضو هیئت علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کاشمر (دانشجوی دکتری اکولوژی گیاهان زراعی - دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان)
۲. کارشناس ارشد علوم باغبانی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کاشمر
۳. کارشناس گیاهان دارویی، کارشناس آزمایشگاه دانشگاه آزاد اسلامی واحد کاشمر

### چکیده

گیاه دارویی صبرزد با نام علمی *Aloe barbadensis* Mill. یکی از گیاهان دارویی مهم متعلق به تیره Liliaceae به شمار می‌رود که 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 IAA، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA) و سیتوکینین در دو سطح (BA و کیتین هر کدام به میزان ۱ میلی‌گرم در لیتر) در قالب طرح پایه کاملاً 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 ۶ 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 آلوئه‌ورا پیشنهاد می‌کند.

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

### مقدمه

توسط بشر به ۲۲۰۰ سال قبل از میلاد مسیح در دوران سومری‌ها در شهر نیپور<sup>۲</sup> برمی‌گردد (Meyer and Staden, 1991)، اما استخراج و بهره‌برداری از ژل آلوئه‌ورا به صورت تجاری در پنجاه سال اخیر توسعه یافته است (Paez et al., 2000).

گیاه دارویی صبرزد یا آلوئه‌ورا با نام علمی *Aloe barbadensis* Mill یا *Aloe vera* متعلق به تیره Liliaceae است. آلوئه‌ورا گیاهی گوشتی و چند ساله بوده و ساقه آن به صورت روزت<sup>۱</sup> است (Ahmed et al., 2007). شناخت آلوئه‌ورا

<sup>2</sup> Nippur

<sup>1</sup> Rosette

است. Gui و همکاران (۱۹۹۰) و Roy and Sarkar (۱۹۹۱) از ریزنمونه‌های جوانه جانبی<sup>۶</sup> برای کشت درون شیشه‌ای آلوئه استفاده کردند.

طبق گزارش Castorena و همکاران (۱۹۸۸) تولید کالوس<sup>۷</sup> و باززایی گیاهچه از پینه‌ها درگونه *A. barbadensis* بسیار مشکل است. ریزازدیادی آلوئه از طریق کشت نوک ساقه<sup>۸</sup> 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 تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی استفاده شده است (Velcheva et al., 2005; Natali et al., 1990; Roy and Sarkar, 1991; Meyer and Staden, 1991; Hirimburgama 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<sup>۹</sup> در ترکیب با هر یک از سایتوکینین‌ها مانند کینتین<sup>۱۰</sup> و یا BAP<sup>۱۱</sup> 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<sup>۱۲</sup> را به عنوان تنظیم‌کننده 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

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 ۴/۵ بوده و دارای پلی‌ساکاریدهایی است که قسمت عمده آنها را نوعی پلی‌ساکارید بنام گلوکومانان<sup>۱</sup> تشکیل می‌دهد (Joshi, 1998). خاصیت مرطوب‌کننده‌ای 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<sup>۲</sup> (عامل تورم)، اثر بازدارندگی روی فعالیت ویروس ایدز بوسیله ترکیب اسمانان<sup>۳</sup> و قندهای تقویت‌کننده سیستم ایمنی بدن، درمان سوختگی‌های ناشی از سرما<sup>۴</sup> و کاهش سطح کلسترول خون می‌باشد (Hamilton, 1998; Ahmed et al., 2006; 2007; Paez et al., 2000; Anshoo et al., 2005).

عمده روش تکثیر آلوئه، از طریق پاجوش<sup>۵</sup> 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

<sup>6</sup> Auxiliary bud

<sup>7</sup> Callus

<sup>8</sup> Shoot tip

<sup>9</sup> 2,4-dichlorophenoxy acetic acid

<sup>10</sup> Kinetin

<sup>11</sup> Benzyl amino purine

<sup>12</sup> Thidiazuron (TDZ)

<sup>1</sup> Glucomannan

<sup>2</sup> Prostaglandin

<sup>3</sup> Acemanan

<sup>4</sup> Frost pit

<sup>5</sup> Off-set

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 گلدان‌ها 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 در آب جاری به طور کامل شستشو داده شد و به اتافک استریل منتقل شدند. در اتافک 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 کاملاً 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

۱ میلی‌گرم در لیتر کیتین، BA یا TDZ به محیط پایه همراه با ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA<sup>۱</sup>، 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<sup>۲</sup> 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 ۱۹/۶ میکرومول بدست آوردند.

Ahmed و همکاران (۲۰۰۷) ریزنمونه‌های نوک شاخساره را در محیط کشت‌های دارای غلظت‌های مختلف BA و کیتین به تنهایی و یا به صورت ترکیبی با کیتین و NAA<sup>۳</sup> کشت کرده و بهترین محیط کشت جهت ریزازدیادی آلوئه را محیط کشت دارای ۲ میلی‌گرم در لیتر BA، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر کیتین 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.

<sup>۱</sup> Indol butiric acid (IBA)

<sup>۲</sup> Somatic organogenesis

<sup>۳</sup>  $\alpha$ -Naphthalene acetic acid (NAA)

گیاهان تولید شده در محیط کشت بدون تنظیم‌کننده 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 بقای 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

انتهایی همراه با یک یا دو برگ جوان اولیه به طول ۳ تا ۴ 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 دمای  $1 \pm 26$  درجه سانتی‌گراد و ۱۶ 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.

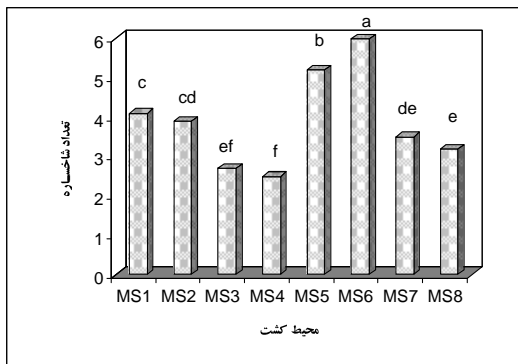
در بخش دوم، بعد از گذشت ۳۵ روز اثر محیط کشت بر تعداد و طول شاخساره باززایی و تولید شده از ریزنمونه‌های جوانه انتهایی به صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با ۹ تکرار بررسی شد. ۲ عامل شامل اکسین در چهار سطح (۱ میلی‌گرم در لیتر IAA، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IAA، ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA، ۰/۵ میلی‌گرم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

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 آلوده و 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 ۴). بیشترین تعداد شاخساره (۶ عدد) در محیط کشت MS<sub>6</sub> دارای ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IAA و ۱ میلی‌گرم در لیتر BA مشاهده شد. محیط کشت MS<sub>5</sub> با ۱ میلی‌گرم در لیتر IAA و ۱ میلی‌گرم در لیتر BA در گروه b قرار گرفت. کمترین تعداد شاخساره در محیط کشت MS<sub>8</sub> (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۱ میلی‌گرم در لیتر BA) بدست آمد.

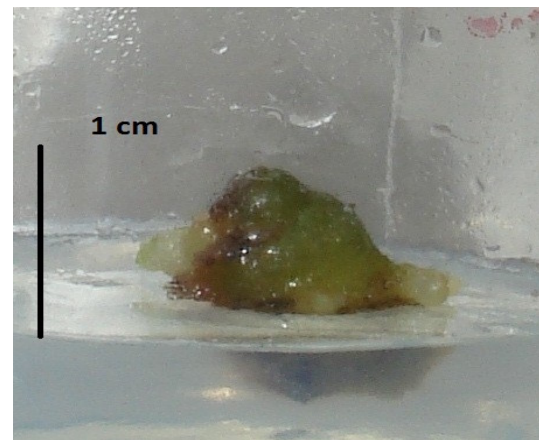
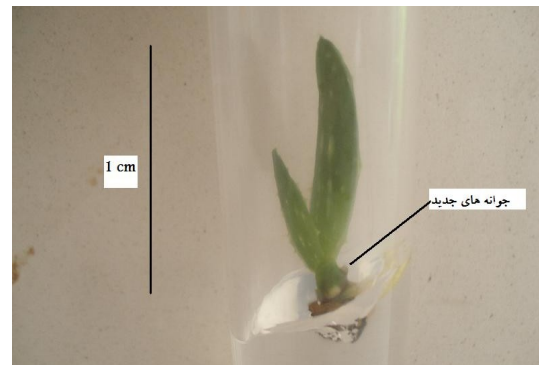


شکل ۴: تعداد میانگین شاخساره تولید شده بر روی محیط کشت MS دارای غلظت‌های مختلف تنظیم کننده رشد در کشت درون شیشه‌ای آلوده و

۴) 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 معنی دار بود. در مقایسه میانگین‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن مشاهده شد که محیط‌های مختلف کشت در ۶ گروه آماری قرار گرفتند (شکل ۵). طول‌ترین گیاهچه‌ها در محیط کشت MS<sub>2</sub> (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IAA و ۱ میلی‌گرم در لیتر کینتین) با طول میانگین ۳/۸ سانتیمتر

نتایج تجزیه واریانس نشان دادند که اثر نوع ریزنمونه بر باززایی ریزنمونه‌ها در سطح احتمال ۱ درصد معنی دار 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 علائم باززایی را نشان دادند (شکل ۳ الف)، اما ریزنمونه‌های جوانه جانبی هیچ علائم باززایی را نشان ندادند و بعد از ۴ هفته قهوه‌ای شده و از بین رفتند (شکل ۳ ب).



شکل ۳:

الف) ریزنمونه‌های جوانه انتهایی. نقاط مرستمی متورم شده که شاخساره‌های جدید را شکل می‌دهند در شکل مشاهده می‌شود (۲ هفته بعد از شروع آزمایش در محیط کشت MS<sub>5</sub> 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 MS<sub>5</sub> دارای ۱ میلی‌گرم در لیتر IAA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA)

جدول ۱: اثر نوع سایتوکینین در ترکیب با هر یک از غلظت‌های

متفاوت اکسین‌های بر صفات اندازه‌گیری شده

اکسین	سایتوکینین	تعداد شاخساره	طول شاخساره
Auxin	Cytokinin	Shoot number	Shoot height (cm)
IAA: 1 mg <sup>l</sup> <sup>-1</sup>	Kinitin: 1 mg <sup>l</sup> <sup>-1</sup>	4.13 <sup>b</sup>	3.46 <sup>a</sup>
	BA: 1 mg <sup>l</sup> <sup>-1</sup>	5.23 <sup>a</sup>	3.13 <sup>a</sup>
IAA: 0.5 mg <sup>l</sup> <sup>-1</sup>	Kinitin: 1 mg <sup>l</sup> <sup>-1</sup>	3.90 <sup>b</sup>	3.80 <sup>a</sup>
	BA: 1 mg <sup>l</sup> <sup>-1</sup>	5.96 <sup>a</sup>	2.33 <sup>b</sup>
IBA: 1 mg <sup>l</sup> <sup>-1</sup>	Kinitin: 1 mg <sup>l</sup> <sup>-1</sup>	2.73 <sup>b</sup>	2.66 <sup>a</sup>
	BA: 1 mg <sup>l</sup> <sup>-1</sup>	3.46 <sup>a</sup>	2.50 <sup>a</sup>
IBA: 0.5 mg <sup>l</sup> <sup>-1</sup>	Kinitin: 1 mg <sup>l</sup> <sup>-1</sup>	2.53 <sup>b</sup>	3.70 <sup>a</sup>
	BA: 1 mg <sup>l</sup> <sup>-1</sup>	3.16 <sup>a</sup>	2.90 <sup>a</sup>

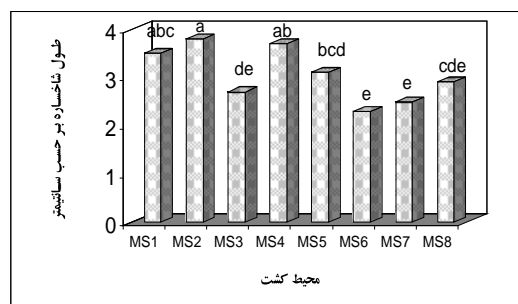
در هر گروه اعداد دارای حروف مشابه هستند در سطح احتمال ۱ درصد با هم تفاوت معنی دار ندارند

### 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 4-D، 2 و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر کیتین تولید پینه نمودند، مطابقت ندارد و این تفاوت می‌تواند به علت استفاده از تنظیم‌کننده‌های 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 تنظیم‌کننده‌های محرک بافت پینه چون امکان جهش بدنی<sup>۱</sup> 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 (۲۰۰۴) در تطابق با نتایج بدست آمده از این تحقیق گزارش دادند که ریزنمونه‌های جوانه جانبی در محیط‌های رشد پرآوری نشان ندادند. بسیاری از

مشاهده شد (گروه a) و محیط کشت‌های MS<sub>1</sub> (۱ میلی‌گرم در لیتر IAA و ۱ میلی‌گرم در لیتر کیتین) و MS<sub>4</sub> (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۱ میلی‌گرم در لیتر کیتین) با طول میانگین ۳/۷ و ۳/۵ سانتیمتر از نظر آماری با آن تفاوتی نداشتند. کوتاه‌ترین شاخساره‌ها در محیط کشت‌های MS<sub>6</sub> (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IAA و ۱ میلی‌گرم در لیتر BA) و MS<sub>7</sub> (۱ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۱ میلی‌گرم در لیتر BA) با طول میانگین ۳/۳ و ۲/۵ سانتیمتر مشاهده شد (گروه e) و محیط کشت MS<sub>8</sub> (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 تنظیم‌کننده 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 کیتین 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 کیتین بیشتر بوده است (۳/۸۰ سانتیمتر).

<sup>1</sup> Somatic mutation

طویل شدن شاخ و برگ<sup>۱</sup> و ریشه‌زایی<sup>۲</sup> 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 کار برده 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<sup>۳</sup> و سن ریزنمونه عامل مهمی در تعیین میزان و نوع تنظیم کننده 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 سایتوکینین‌ها 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 سایتوکینین‌ها می‌شوند (Feito et al., 2001)، در نتیجه در ریزنمونه‌های مریستمی

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 تنظیم کننده‌های رشد برای تسریع در رشد استفاده می‌شود (نوری قنبلانی، ۱۳۷۱). به عنوان یک قاعده کلی برای انجام هر چه بهتر رشد، اکسین یا سایتوکینین 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 (۲۰۰۴) 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 ۶۰ 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

<sup>1</sup> Elongation

<sup>2</sup> Rooting

<sup>3</sup> Explant

می‌شود (باقری و صفاری، ۱۳۷۶، وصال و باقری، ۱۳۸۲). در مورد گیاه آلوئه نیز نسبت بین دو نوع تنظیم‌کننده رشد است که پاسخ ریزنمونه را در جهت افزایش تعداد 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 کیتین با ۲/۶۶ 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 معنی‌دار نشده است اما مشاهده می‌شود طول شاخساره در تیمارهای دارای کیتین بیشتر از BA بوده است (جدول ۱). بر این اساس به طور کلی می‌توان گفت که تنظیم‌کننده رشد کیتین در تعادل با غلظت‌های اکسین ریزنمونه‌ها را در جهت افزایش طول سلول‌ها و در نتیجه افزایش طول شاخساره‌ها پیش برده است و از آنجاییکه یکی از اثرات بارز و شناخته شده غلظت‌های بالای سایتوکینین‌ها 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 مرستمی ریزنمونه را در جهت افزایش تعداد سلول‌های مرستمی برای تولید جوانه و شاخساره جدید ایفا می‌کند. لذا مشاهده می‌شود که کوتاه‌ترین شاخساره‌ها در محیط کشت‌های MS<sub>6</sub>، MS<sub>7</sub> و MS<sub>8</sub> بوجود آمده‌اند. به نظر می‌رسد کیتین 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 بر این نوع و غلظت اکسین و سایتوکینین به کار رفته در محیط رشد بر پاسخ ریزنمونه‌های آلوئه تاثیر زیادی دارد و تنظیم‌کننده رشد BA در ترکیب با

مثل نوک شاخساره نیز سایتوکینین‌ها باعث تحریک تشکیل شاخساره نابجا و شاخساره جانبی می‌شوند (Sujatha et al., 1998) و بیشترین تعداد شاخساره در محیط‌های MS<sub>5</sub> و MS<sub>6</sub> 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 کیتین در تولید شاخساره بیشتر داشته باشد و به طور مشابه نظر می‌رسد IAA نسبت به IBA باعث تحریک بیشتر سلول‌های مرستمی به سمت تولید شاخساره می‌شود. در بسیاری از گیاهان دیگر نیز نقش موثر سایتوکینین‌ها 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 تنظیم‌کننده‌های 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، طول 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 طول 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 سلول‌ها موثر است بطوریکه وقتی نسبت سایتوکینین به اکسین بیشتر باشد فرآیند باززایی به سمت تولید شاخساره پیش می‌رود و در حالت عکس افزایش طول اندام‌ها و نیز تولید ریشه مشاهده



micropropagation method of *Aloe vera* L. Sjemnarstvo 24: 121-128.

**Albany, N., Vilchez, J., Leon de Sierralta, S., Molinay, M., and Chacin, 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 Republic. 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. Plant. 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 organogenesis of *Aloe vera*. Acta Botanica. 32 (8): 606-610.

IAA نسبت به کیتینن در پرآوری و تعداد بیشتر شاخساره نقش مهم‌تری به عهده دارد و از آنجاییکه در کشت درون شیشه‌ای در مراحل استقرار و پرآوری تولید تعداد بیشتر ریزنمونه با اندازه کوچک مورد توجه است. لذا محیط کشت دارای ۱ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IAA با تولید ۶ شاخساره (گروه a)، ۲/۳ سانتیمتری (گروه e) به عنوان بهترین محیط جهت استقرار ریزنمونه‌های آلوئه ورا توصیه می‌شود. با توجه به سرعت و میزان پرآوری بالاتر بدست آمده در این تحقیق (۶ شاخساره در عرض ۳۵ روز) نسبت به سایر گزارشات موجود در این زمینه تحقیقات بیشتر با غلظت‌های تغییر یافته از تنظیم‌کننده‌های رشد BA و IAA قابل توصیه است.

#### منابع

باقری، ع.، و صفاری، م. (۱۳۷۶) مبانی کشت بافت‌های گیاهی. دانشگاه فردوسی مشهد، ۴۰۶ صفحه.

شفیعی حاجی آباد، م.، حمیداوغلی، ی.، فتوحی قزوینی، ر.، و فتاحی مقدم، ج. (۱۳۸۷) اثر محیط‌های مختلف رشد بر پرآوری ریزنمونه‌های شاخساره سرخس بوستونی *Nephrolepis exaltata* Schott cv. Bostoniensis مجله علمی پژوهشی علوم و فنون باغبانی ایران، جلد ۹، 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 بافت‌های گیاهی، ترجمه، انتشارات آستان قدس رضوی، 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, K.S., (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

- Paez, A., Gebre, G.M., Gonzales, M.E., and Tschlinski, T.J. (2000)** Growth, soluble carbohydrates and aloin concentration of *Aloe vera* plants exposed to tree irradiance 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 castor (*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.
- Hamilton, R. (1998)** Strengths and limitation of *Aloe vera*. *American Journal 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 tobacco 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.

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

Barzgar, A.B<sup>1</sup>., \*Shafiee HajiAbad, M<sup>2</sup>., Abdy, M<sup>3</sup>.

1. Scientific member of Islamic Azad University- Kashmar branch
2. Instructor of Islamic Azad University- Kashmar branch (Corresponder)
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 importance of the establishment stage in *in vitro* culture of this plant, this study was conducted to investigate the best media culture for *Aloe* explants establishment. First, the proliferation 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 factorial design with two factors: auxins in four levels (1 mg l<sup>-1</sup> IAA, 0.5 mg l<sup>-1</sup> IAA, 1 mg l<sup>-1</sup> IBA, 0.5 mg l<sup>-1</sup> IBA) and cytokinins in two levels (BA and Kinetin at 1 mg l<sup>-1</sup>) in a complete randomised design with 3 replications. After 35 days the highest rate of proliferation earned on the media contained 0.5 mg l<sup>-1</sup> IAA and 1 mg l<sup>-1</sup> BA with 6.0 shoots per explant and 2.3 cm length, that is higher and faster than other related reports. Since on the establishment stage of *in vitro* culture regeneration of the highest shoot number per explant with small size has considerable attention, this protocol suggests an appropriate method for establishment of *Aloe* explants.

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