جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد
مجله علوم و فنون باغبانی ایران جلد ۵ شماره ۲ صفحه های ۷۱ تا ۸۰ (۱۳۸۳)

**مقاله کامل**

# معرفی مناسب‌ترین محیط‌های کشت برای ریزافزایی گیاه دارویی صبرزرد[1]

(*Aloe barbadensis* Mill.)

# INTRODUCTION OF THE MOST SUITABLE CULTURE MEDIA FOR MICROPROPAGATION OF A MEDICINAL PLANT ALOE (*ALOE BARBADENSIS* MILL.)

جواد فتاحی مقدم، یوسف‌حمید اوغلی و رضا فتوحی قزوینی[2]

## چکیده

عصاره و ژل تولید شده از گیاه دارویی صبرزرد[3] دارای ترکیبات مؤثره فراوانی است و به صورت گسترده‌ای در صنایع داروسازی و لوازم آرایشی ـ بهداشتی کاربرد دارد. افزایش صبر زرد با روش‌های سنتی (پاجوش) به کندی صورت می‌گیرد، در نتیجه امکان تولید انبوه گیاهچه برای کشت همزمان در سطوح گسترده وجود ندارد. استفاده از سیستم کشت بافت برای ریزافزایی این گیاه، قابلیت تولید تعداد زیادی گیاهچه در مدت زمان کوتاه را دارد. با این هدف، آزمایش‌های مقدماتی روی امکان ریزافزایی و همچنین شناخت جنبه‌های مختلف افزایش این گیاه در شرایط درون شیشه‌ای با به کارگیری ۲۰ نوع تیمار تنظیم کننده رشد انجام شد. پس از گذشت ٦٠ روز، متغیرهای تعداد افزونه، شدت قهوه‌ای شدن محیط کشت، زمان شروع باززایی و واکنش رشدی گیاه به محیط کشت‌های مختلف ثبت و مورد ارزیابی قرار گرفت. در این آزمایش، ۸ تیمار تنظیم کننده رشد با متوسط تولید ۵/۳۳ تا ۱۰/٦٧ افزونه به ازاء هر ریزنمونه و همچنین شدت قهوه‌ای شدن ۱/٦٧ تا ۳ (در حدود قهوه‌ای تا قهوه ای متوسط) به عنوان محیط کشت‌های برتر انتخاب شدند. شروع باززایی در تیمارهای برتر ۱۵ تا ۲۰ روز پس از کشت بود. بر اساس نتایج بدست آمده، این ۸ محیط کشت در مراحل استقرار و زیرکشت ریزنمونه‌ها برای برآورد پتانسیل پرآوری قابل استفاده است.

**واژه‌های کلیدی**: ریزافزایی، صبرزرد، محیط کشت‌های اولیه.

## مقدمه

گیاه دارویی صبرزرد مشهور به آلوئه ورا با نام علمی *Aloe barbadensis* Mill. از تیره Aloaceae است. آلوئه گیاهی گوشتی و چند ساله با الگوی رشد روزت[4] و سازگار در نواحی نیمه گرمسیری است (۱). شواهد تاریخی نشان از مصرف برگ‌های آلوئه به عنوان ماده‌ای شیرابه‌ای در حدود ۲۲۰۰ سال پیش از میلاد می‌دهد و به تقریب ٤٠٠ سال پیش از میلاد، گیاه آلوئه و فرآورده‌های آن به آسیا صادر می‌شده است.

اولین گزارش مبنی بر مصرف آلوئه به عنوان یک داروی مسهل در ایران، مربوط به الکیندی[5]، فیلسوف و طبیب عرب (۷۰۰ تا ۸۰۰ پس از میلاد) است (۸).

در پنجاه ساله اخیر، عصاره و ژل تولید شده از برگ آلوئه به دلیل ویژگی‌ها و فعالیت‌های زیست شناختی و

---

۱- تاریخ دریافت: ۸۳/۱/۱۸ تاریخ پذیرش: ۸۳/۹/۱۹

۲- به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد, استادیار و دانشیار گروه علوم باغبانی دانشکده کشاورزی, دانشگاه گیلان, رشت, جمهوری اسلامی ایران.

۳- *Aloe barbadensis* Mill. ٤- Rosette ٥- Al-Kindi

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد


فیزیولوژیکی متنوع همچون توانایی ترمیم سوختگی‌های پوست و زخم‌های ناشی از بریدگی، اثر نگهدارنده روی پوست در برابر اشعه‌های مضر، مرطوب کننده و افزایش دهنده ویژگی کشسانی پوست، ضد التهاب و تورم و ویژگی های بسیار دیگر به طور گسترده‌ای در صنایع داروسازی و آرایشی- بهداشتی استفاده می‌شود (۱۲).

برای تولید تجاری گیاهچه و یا افزایش عملکرد برگ از راه افزایش سطح زیر کشت، روش‌هایی مورد نیاز است تا بتوان در مدت زمان کوتاه، تعداد زیادی گیاهچه تولید نمود. در افزایش صبرزرد با بذر به دلیل پدیده نرسترونی و دگرگشنی، افزایش گوناگونی ژنتیکی قابل توجهی در نتاج دیده می‌شود (۷). افزایش رویشی صبرزرد، بیشتر به روش پاجوش است ولی به علت کندی این روش در تولید گیاهچه، بیشتر در سطوح کشت کوچک قابل استفاده است. با توجه به دلایل فوق, استفاده از کشت بافت برای تولید انبوه گیاهچه آلوئه در مدت زمان کوتاه ضروری به نظر می‌رسد.

در زمینه ریزافزایی این گیاه در شرایط درون شیشه‌ای گزارش‌های اندکی آن هم مربوط به سایر کشورها موجود است. در ایران گزارش منتشر شده‌ای مبنی بر افزایش آلوئه به روش کشت بافت وجود ندارد. در کشت درون شیشه‌ای آلوئه، باززایی گیاه از پینه[۱] بسیار مشکل است (۲) اما در مقابل ریزافزایی بدون انگیزش پینه، با استفاده از کشت نوک شاخساره به راحتی صورت می‌گیرد (۲, ۳, ٦, ۱۱). گروئن والد و همکاران[۲] در سال ۱۹۷۹ از بخش‌های دیگر گیاه مانند برگ، قطعه های ساقه و بافت‌های ریشه و میوه، ریزافزایی گونه‌ای از جنس آلوئه به نام *Aloe pretoriensis* را مورد بررسی قرار دادند (٤). ناتالی و همکاران[۳] (۱۱) پس از انجام آزمایش‌های مقدماتی روی محیط‌های مختلف، محیط‌های برتر را بر اساس توانایی تولید شاخساره برگزیده و مورد بررسی قرار دادند. در آزمایش های ایشان, محیط کشت دارای ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر ۲، ٤- دی کلرو فنوکسی استیک اسید (2, 4-D)[٤] به همراه ۰/٥ میلی‌گرم در لیتر کینتین[٥] به عنوان برترین محیط کشت پرآوری, معرفی شد. گزارش‌های مختلف حاکی از اثر جلوگیری کننده 2, 4-D از اندام‌زایی و تولید پینه بدون توانایی ریخت‌زایی است (۹, ۱۱). اما زمانی که 2,4-D همراه با بنزیل آمینو پیورین (BAP)[٦] به کار برده شد، قهوه‌ای شدن محیط و تشکیل پینه کاهش یافت (۲, ۱۱). میر و اشتادن[۷] (۹) در حالتی که از سایتوکینین‌هایی مثل بنزیل آدنین (BA)[۸] یا تیدیازورون (TDZ)[۹] به تنهایی در محیط استفاده کردند مشاهده نمودند که ریزنمونه‌ها به تدریج قهوه‌ای شده و از بین رفتند. اما ژو و همکاران[۱۰] (۱۵) خلاف این حالت را مشاهده نموده و طی آزمایشی، بیشترین پرآوری را با ۳ میلی‌گرم در لیتر BA بدست آوردند. از سوی دیگر میر و استادن (۹) دریافتند که افزودن ۱ میلی‌گرم در لیتر ایندول بوتیریک اسید (IBA)[۱۱] به چنین محیط‌هایی (حاوی تنها سایتوکینین)، رشد و نمو جوانه‌های محوری را به دنبال دارد. هیریمبرگاما و گاماژ[۱۲] (٦) نیز بیشترین میزان پرآوری را با روش کشت نوک شاخساره و همچنین جوانه‌های محوری روی محیط موراشیگی و اسکوگ (MS)[۱۳] تکمیل شده با ۰/۱۸ میلی‌گرم در لیتر ایندول استیک اسید (IAA)[۱٤] و ۲/۲۵ میلی‌گرم در لیتر BA بدست آوردند.

تمام گزارش‌های موجود حاکی از بررسی کشت نوک شاخساره در شرایط درون شیشه‌ای و اثر ترکیب‌های مختلفی از تنظیم‌کننده‌های رشد، روی میزان پرآوری در آن است. با این وجود، بر اساس منابع در دسترس،

---

۱- Callus
۲- Groenewald *et al.*
۳- Natali *et al.*
٤- 2,4-dichlorophenoxyacetic acid
٥- Kinetin
٦- $N^6$-benzylamino purine
۷- Meyer and Staden
۸- Benzyl adenin
۹- Thidiazuron
۱۰- Zhou *et al.*
۱۱- Indolebutyric acid
۱۲- Hirimburegama and Gamage
۱۳- Murashige and Skoog
۱٤- Indoleacetic acid

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد


روی و سارکار[۱] ریزنمونه‌های مورد استفاده خود را از بافت ساقه زیرزمینی صبرزرد تهیه نمودند (۱۳). همچنین گوی و همکاران[۲] (۵) با کشت قطعه های ساقه صبرزرد، تولید پینه نموده و سپس در محیط باززایی تولید گیاهچه نمودند در حالی که کاستورنا و همکاران[۳] (۲) گزارش نمودند که تولید پینه از راه کشت برگ و سپس باززایی گیاه از پینه در صبرزرد بسیار مشکل است. به دلیل وجود گزارش‌های گوناگون و حتی گاهی متناقض، این آزمایش با هدف بررسی طیف به نسبت وسیعی از محیط‌های کشت روی واکنش رشدی و پرآوری ریزنمونه‌های مختلف و در پایان انتخاب محیط‌های برتر, انجام شد.

## مواد و روش‌ها

ریزنمونه‌های مورد نیاز این آزمایش از گیاهان گلدانی صبرزرد ورا به ارتفاع ۱۵ تا ۲۰ سانتی‌متر که در شرایط گلخانه‌ای نگهداری شده بودند، تهیه شد. هرگیاه از محل طوقه جدا و به آزمایشگاه کشت بافت انتقال یافت. پس از شستشوی اولیه، برگ ها به ترتیب و لایه لایه از خارج به داخل بدون آسیب به ساقه کوتاه روزتی و جوانه‌های موجود روی گره‌ها جدا گردید. در طول کار ترشح های خارج شده از محل برش برگ‌ها با آب شستشو داده می‌شد. نوک شاخه‌ها همراه با حفظ بخش پایینی دو برگ انتهایی به همراه ۱/۵ تا ۲ سانتی‌متر از ساقه جدا و در آب جاری به طور کامل شستشو داده شد. در اتاقک سترون، ساقه‌های صبرزرد در محلول ۲۰ ٪ ماده سفید کننده (دارای ۵/۲۵ درصد هیپوکلریت سدیم[٤]) به مدت ۱۵ دقیقه غوطه‌ور شدند. سپس ریزنمونه‌ها ۳ بار با آب مقطر گندزدایی شده به ترتیب به مدت ۳،۵ و ۲ دقیقه شستشو داده شدند. ریزنمونه‌های مورد نظر در زیر بینوکولار و از ۳ بخش گیاه تهیه گردیدند:

۱- تهیه ریزنمونه نوک شاخساره به طول ۲ تا ۳ میلی‌متر که شامل مریستم انتهایی، همراه یا بدون برگ اولیه بود.

۲- جوانه‌های محوری که به شکل برجستگی‌های شفافی روی گره‌ها واقع بودند. این جوانه‌ها با دو برش به شکل V از سطح ساقه به آرامی جدا گردیدند.

۳- ریزنمونه گره با ضخامت ۲ میلی‌متر از محل گره‌ها و با برش عرضی تهیه شد.

ریزنمونه‌های تهیه شده روی ۷۰ میلی‌لیترمحیط کشت پایه MS (۱۰) همراه با ۳ ٪ سوکروز ۸ گرم در لیتر و آگار در pH=۵/۸ و غلظت‌های مختلفی از تنظیم‌کننده‌های رشد (جدول۱) کشت گردیدند. در این آزمون با هدف استقرار ریزنمونه گندزدایی شده در محیط کشت، آزمایش مناسب بودن آمیخته غذایی برای برآورد میزان ماندگاری و پرآوری ریزنمونه، تعداد ۲۰ تیمار هورمونی با انواع و غلظت‌های مختلف (جدول۱) در ۳ تکرار (ظرف) که هر تکرار یا ظرف شامل ۳ ریزنمونه بود مورد استفاده قرار گرفت.

کشت‌ها در دمای ۱±۲٦ درجه سانتی‌گراد و ۱٦ ساعت روشنایی (۲۰۰۰ لوکس) و ۸ ساعت تاریکی در اتاقک کشت قرار داده شدند. هر ۲۰ روز یک بار ریزنمونه‌ها روی همان محیط کشت ولی تازه, زیر کشت[٥] شدند. در طول ٦۰ روز پس از کشت ریزنمونه‌ها، ویژگی های زمان شروع باززایی، تعداد افزونه تولیدی، شدت قهوه‌ای شدن محیط و بافت ریزنمونه و نحوه رشد عمومی ریزنمونه ارزیابی و ثبت گردیدند.

اندازه گیری متغیر تعداد افزونه به صورت خارج کردن افزونه‌ها در پایان دوره آزمایش و شمارش هر تکرار به طور جداگانه انجام شد. برای برآورد میزان قهوه‌ای شدن محیط کشت، از روش شماره دهی استفاده شد.

---

۱- Roy and Sarkar ۲- Gui *et al.* ۳- Castorena *et al.* ٤- Sodium hypochlorite
٥- Subculture

بدین ترتیب که نبودن ترشح های قهوه‌ای در محیط با شماره ۱، کمی قهوه‌ای شدن با شماره ۲، قهوه‌ای شدن متوسط با شماره ۳ و قهوه‌ای شدن زیاد با شماره ٤ مشخص شد. پیش از هرگونه تجزیه آماری، روی داده‌های بدست آمده از آزمایش، آزمون نرمال انجام شد که داده‌های مربوط به ویژگی های اندازه‌گیری شده از توزیع نرمال پیروی می‌کردند. تجزیه اختلاف ها و آزمون دانکن با استفاده از نرم‌افزار آماری MSTATC انجام شد.

## نتایج و بحث

در این پژوهش, ریزنمونه‌های تهیه شده از نوع مقطع عرضی گره و جوانه‌های جانبی روی گره‌ها در تمامی تیمارهای اعمال شده، هیچگونه نشانه ها رشد رویشی و باززایی نشان ندادند. بافت ریزنمونه‌های جوانه جانبی در تمامی محیط‌های کشت در طول دوره ٦٠ روزه آزمایش به صورت سفید، شفاف و خفته[1] باقی ماندند. اما ریزنمونه‌های گره به تدریج از پایین و اطراف به سمت مرکز نمونه شروع به قهوه‌ای شدن نمودند و در پایان ریزنمونه‌ها از بین رفتند. این نتایج متفاوت با نتایج سایر پژوهشگران بود (٥, ١٣). در این رابطه گوی و همکاران (٥) موفق شدند با کشت قطعه‌های ساقه صبرزرد در حضور زآتین تولید گیاهچه نمایند. روی و سارکار (١٣) در پژوهشی همراه کشت ریزنمونه جوانه محوری، از جوانه‌های واقع روی ساقه زیر زمینی صبرزرد نیز برای کشت استفاده نمودند و در حضور ١ میلی‌گرم در لیتر 2, 4- D و ٠/٢ میلی‌گرم در لیتر کینتین تولید پینه نمودند.

با توجه به این که این پژوهشگران ریزنمونه‌های مورد نیاز خود را از گیاهان رشد یافته در شرایط مزرعه تهیه کرده بودند به نظر می‌رسد، توانایی باززایی جوانه‌های محوری و گره رابطه مستقیمی با سن و ارتفاع گیاه مادری داشته باشد. در گیاهان مادری بالغ به مراتب نقاط مریستمی تکامل یافته‌تری روی گره‌ها وجود دارد. علاوه بر این گیاهان رشد یافته در شرایط مزرعه‌ای دارای بافت سفت‌تر (کربوهیدرات بیشتر) نسبت به گیاهان رشد یافته در گلخانه هستند و جوانه‌ها از توان رشد بیشتری برخوردار هستند.

ریزنمونه‌های نوک شاخساره واکنش بهتری نسبت به دو نوع دیگر ریزنمونه داشته و در هفته اول پس از کشت، آثار رشد و فعالیت، هرچند خیلی کند را نشان دادند. نتایج به دست آمده از تجزیه اختلاف های داده‌ها نشان داد که اثر تیمارهای مختلف روی میزان باززایی و شدت ترشح های قهوه‌ای در سطح احتمال ٠/٠٠١، بسیار معنی‌دار است و در نتیجه اثر تیمارها با هم تفاوت داشت که به طور جداگانه روی هر یک از ویژگی های اندازه‌گیری شده مورد بحث و بررسی قرار می‌گیرد.

### الف- اثر محیط کشت‌های مختلف روی تعداد افزونه

با توجه به نتایج به دست آمده از مقایسه میانگین های بدست آمده با آزمون دانکن در سطح احتمال ٠/٠٥ (جدول ١)، محیط کشت‌های $M_9$, $M_5$ و $M_{19}$ به ترتیب با میانگین تولید ١٠/٣٣، ٩/٦٧ و ١٠/٦٧ افزونه به ازای هر ریزنمونه در بالاترین سطح قرار داشته و در سطحی پایین‌تر محیط کشت‌های $M_4$, $M_6$, $M_8$, $M_{11}$ و $M_{14}$ با متوسط تولید افزونه به ترتیب ٥/٣٣، ٤/٣٣، ٥/٣٣، ٧ و ٦/٣٣ به ازای هر ریزنمونه قرار داشتند. در این آزمایش، کمترین میزان پرآوری مربوط به محیط کشت‌های حاوی 2, 4- D (٠/٦٧) بود.

محیط کشت‌هایی که دارای تنها اکسین و بدون هر نوع سایتوکینین ($M_1$، $M_2$ و $M_3$) بودند تعداد افزونه کمتری نیز تولید نمودند (شکل٢). این نتایج مطابق با نتایج میر و اشتادن (٩) بود که با افزودن سایتوکینین‌ها به محیط حاوی یک اکسین، باعث تشکیل جوانه‌های نابجا و جانبی شدند. افزون براین, ریزنمونه‌ها در این محیط‌ها،

---

١- Dormant

رشد ضعیفی داشتند و به ویژه برگ ها در حضور IAA و IBA کوچک، سبز تیره و در انتها آجری رنگ بودند. پایین ریزنمونه‌ها در محیط دارای NAA به نسبت حجیم و برجسته بود که به احتمال به دلیل اثرهای پایدار و قوی این تنظیم کننده رشد بود.

محیط‌های کشت $M_7$، $M_{12}$ و $M_{13}$ از نظر تعداد افزونه (به ترتیب با میانگین ۲/۳۳، ۲و ۳/۳۳ افزونه) تفاوت معنی‌داری با هم نداشتند. با توجه به جدول شماره ۲، این محیط‌ها به ترتیب دارای اکسین‌های IAA، IBA و NAA به میزان ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر همراه با کینتین به میزان ۱ میلی‌گرم در لیتر هستند. به نظر می‌رسد کاهش نسبت اکسین به سایتوکینین از ۱:۱ به ۱: ۰/۵، اثر قابل توجهی در کاهش میزان تولید افزونه و باززایی داشته است.

اکسین‌ها نقش تحریک جوانه‌های جانبی را بر عهده داشته و کینتین اثر چیرگی انتهایی بر جوانه‌های جانبی را کاهش داده و موجب رشد و نمو آن ها می‌شود (١٤). بدیهی است با کاهش نسبت اکسین به سایتوکینین، میزان وسرعت آغازش جوانه‌های جانبی نیز کاهش می‌یابد. به همین دلیل بر اساس جدول شماره ۲، زمان شروع باززایی در این محیط‌ها طولانی و بین ۲۵ تا ۳۰ روزپس از کشت بود.

در این پژوهش اثر غلظت‌های مختلفی از 2, 4-D همراه با کینتین و یا BA (جدول ۱) روی باززایی ریزنمونه‌های نوک شاخساره نیز مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج بدست آمده، میزان باززایی در این محیط‌ها (M15، M16 و M17) در پایین ترین سطح (به ترتیب با میانگین ۱/۳۳، ۰/٦٧ و ۱ افزونه) بود. در ۱۳ روز اول پس از کشت، پایین ریزنمونه‌ها حجیم شده و تولید اندام‌های ضخیم و ریشه مانند نمود (شکل ٤). بیشتر مواد غذایی جذب شده توسط گیاه، به مصرف چنین اندام هایی رسیده و در مقابل باززایی جوانه‌ها و رشد برگ‌ها کاهش یافت، به طوری که برگ ها به رنگ قرمز آجری تغییر رنگ دادند. ریشه‌های غیر طبیعی دارای رنگ قهوه‌ای تیره، ولی بدون ترشح های قهوه‌ای در محیط بودند. نتایج فوق با نتایج ناتالی و همکاران (۱۱) مبنی بر تشکیل اندام‌های ترد حجیم بدون توانایی ریخت‌زایی همسو است. همچنین میر و اشتادن (۹) دریافتند که ریزنمونه های کشت شده در محیط دارای 2, 4- D در سطح داخلی و بالای محیط تولید پینه قهوه‌ای نموده و هیچگونه جوانه‌ای در این شرایط کشت بوجود نیامد. با اینکه ناتالی و همکاران در آزمایش‌های خود با افزودن غلظت‌های مختلفی از کینتین به محیط کشت همراه با 2, 4- D این گیاه را ریزافزایی نمودند ولی در این آزمایش، استفاده از هر دو تنظیم کننده رشد 2,4-D و کینتین تاثیری در میزان باززایی و افزایش رشد ریزنمونه‌ها نداشت.

نتیجه به نسبت مطلوبی در استفاده از تنظیم کننده رشد IAA (۱ میلی‌گرم در لیتر) همراه با کینتین (۱ میلی‌گرم در لیتر) با تولید متوسط ۱۰/۳۳ افزونه بدست آمد (شکل‌های ٥ و٦). میر و اشتادن (۹) بیشترین جوانه‌های جانبی را روی محیط کشت دارای IBA در ترکیب با کینتین نسبت به ترکیب IAA یا NAA همراه با کینتین در محیط کشت به دست آورند (۹). در حالی که در این آزمایش تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای IBA با کینتین ($M_{11}$) و یا NAA با کینتین ($M_{14}$) وجود نداشت. تنها نوعی تفاوت ظاهری در رشد گیاه مشاهده شد مبنی بر اینکه، برگ‌ها در حضور IBA سبز رنگ و شاداب، اما در حضور NAA برگ‌ها به رنگ سبز روشن و نوک تیز بودند. همچنین درپایین ریزنمونه، ریشه‌های ضخیم و غیر طبیعی تشکیل شد که به نظر می‌رسد به دلیل فعالیت زیاد اکسین NAA باشد (شکل۳).

جدول ۱- مقایسه میانگین اثر محیط‌های مختلف کشت روی ویژگی های اندازه‌گیری شده.

Table 1. Comparison of the means of effects of different culture media on measured characteristics.

| تیمار<br>Treatment | غلظت و نوع تنظیم کننده رشد<br>Concentration and type of growth regulator | زمان باززایی<br>(روز بعد از کشت)<br>Regeneration time<br>(days after culture) | میانگین تعدادافزونه<br>(میانگین ± SD)<br>Mean number of propagule (Mean± SD) | میانگین شدت قهوه‌ای شدن<br>(میانگین ± SD)<br>Mean of browning rate (Mean± SD) |
|---|---|---|---|---|
| $M_1$ | MS + 1 mg $L^{-1}$ IAA | 30 | 1.67± 0.58 hi † | 1.33 ± 0.58 |
| $M_2$ | MS + 1 mg $L^{-1}$ IBA | 30 | 3.67 ± 0.58 ef | 1.00 ± 0.00 d |
| $M_3$ | MS + 1 mg $L^{-1}$ NAA | 25 | 2.33 ± 0.58 fgh | 1.00 ± 0.00 d |
| $M_4$ | MS + 1 mg $L^{-1}$ IAA + 0.5 mg $L^{-1}$ Kinetin | 20 | 5.33 ± 0.58 cd | 1.00 ± 1.15 cd |
| $M_5$ | MS + 1 mg $L^{-1}$ IAA+ 1 mg $L^{-1}$ Kinetin | 17 | 10.33 ± 0.58 a | 1.67 ± 0.58 cd |
| $M_6$ | MS + 1 mg $L^{-1}$ l IAA+ 1.5 mg $L^{-1}$ Kinetin | 17 | 4.33 ± 0.58 de | 3.00 ± 0.00 b |
| $M_7$ | MS + 1 mg $L^{-1}$ IAA+ 0.5 mg $L^{-1}$ Kinetin | 30 | 2.33 ± 0.58 fgh | 1.67 ± 0.58 cd |
| $M_8$ | MS + 1 mg $L^{-1}$ IAA+ 0.5 mg $L^{-1}$ Kinetin + 1 mg $L^{-1}$ l BA | 15 | 5.33 ± 0.58 cd | 2.33 ± 0.58 bc |
| $M_9$ | MS + 1 mg $L^{-1}$ IBA+ 0.5 1 mg $L^{-1}$ Kinetin + 1 mg $L^{-1}$ BA | 20 | 9.67 ± 0.58 a | 1.67 ± 0.58 cd |
| $M_{10}$ | MS + 1 mg $L^{-1}$ IBA + 1 mg $L^{-1}$ BA | 25 | 3.33 ± 0.58 cd | 4.00 ± 0.00 a |

| تیمار<br>Treatment | غلظت و نوع تنظیم کننده رشد<br>Consentration and type of growth regulator | زمان باززایی<br>(روز بعد از کشت)<br>Regeneration time<br>(days after culture) | میانگین تعدادافزونه<br>(SD ± میانگین)<br>Mean number of propagule(Mean±SD) | میانگین شدت قهوه‌ای<br>(SD ± شدن میانگین)<br>Mean of browning rate<br>(Mean± SD) |
|---|---|---|---|---|
| $M_{11}$ | MS + 1 mg $L^{-1}$ IBA + 1 mg $L^{-1}$ Kinetin | 20 | 7.00 ± 1.00 b | 1 ± 0 d |
| $M_{12}$ | MS + 0.5 mg $L^{-1}$ IBA + 1 mg $L^{-1}$ Kinetin | 30 | 2.00 ± 1.00 ghi | 1 ± 0 d |
| $M_{13}$ | MS + 0.5 mg $L^{-1}$ NAA + 1 mg $L^{-1}$ Kinetin | 25 | 3.33 ± 0.58 efg | 4 ± 0 a |
| $M_{14}$ | MS + 1 mg $L^{-1}$ NAA + 1 mg $L^{-1}$ Kinetin | 20 | 6.33 ± 1.53 bc | 3 ± 1 b |
| $M_{15}$ | MS + 0.25 mg $L^{-1}$ 2,4 –D + 0.5 mg $L^{-1}$ Kinetin | 19 | 1.33 ± 0.58 hi | 1 ± 1 d |
| $M_{16}$ | MS + 0.25 mg $L^{-1}$ 2,4 –D + 1 mg $L^{-1}$ Kinetin | 40 | 0.67 ± 0.58 i | 1 ± 0 d |
| $M_{17}$ | MS + 0.25 mg $L^{-1}$ 2,4 –D + 1 mg $L^{-1}$ BA | 35 | 1.00 ± 1.00 hi | 1 ± 0 d |
| $M_{18}$ | MS + 5 mg $L^{-1}$ IBA+ 0.05 mg $L^{-1}$ BA + 80 mg $L^{-1}$ Adenine sulfate | 20 | 4.00 ± 0.00 de | 1 ± 0 d |
| $M_{19}$ | MS + 10 mg $L^{-1}$ IBA+ 0.1 mg $L^{-1}$ BA + 160 mg $L^{-1}$ Adenine sulfate | 15 | 10.67 ± 1.15 a | 1 ± 0 d |
| $M_{20}$ | MS + 15 mg $L^{-1}$ IBA + 0.2 mg $L^{-1}$ BA + 240 mg $L^{-1}$ Adenine sulfate | 15 | 9.67 ± 0.58 a | 1 ± 0 d |

ادامه جدول ۱:

† In each column means having the same letters are not significantly different at 5% level of probablity using DMRT.

† در هر ستون اعدادی که دارای حروف مشابه هستند در سطح احتمال ۰/۰۵ آزمون دانکن تفاوت معنی‌داری ندارند

محیط کشت های $M_4$، $M_5$، $M_6$، $M_8$، $M_9$، $M_{11}$، $M_{14}$ و $M_{19}$ (جدول ۱) با میانگین ۵/۳۳ تا ۱۰/۶۷ افزونه به ازای هر ریزنمونه به عنوان محیط‌های برتر در آزمایش‌های مقدماتی شناخته شدند. به جز محیط $M_4$ که به دلیل کاهش غلظت کینتین به نصف (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر)، ۳۰ روز پس از کشت شروع به باززایی نمود، سایر محیط‌های برتر بین ۱۵ تا ۲۰ روز پس از کشت شروع به باززایی نمودند. میر و اشتادن (۹) دریافتند، در صورتی که به محیط دارای ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA، از هر یک از تنظیم کننده‌های رشد کینتین و BA و یا TDZ به میزان ۱ میلی‌گرم در لیتر افزوده شود تاثیری در افزایش تولید افزونه ندارد در حالی که در این آزمایش با افزایش BA و کینتین به میزان ۱ میلی‌گرم در لیتر ($M_9$) میزان پرآوری از ۳/۳۳ به ۹/۶۷ افزونه افزایش یافت. این حالت در محیط $M_{19}$ نیز قابل مشاهده است. آدنین سولفات (۱۶۰ میلی‌گرم در لیتر) ویژگی هایی شبه سایتوکنینی داشته و وقتی همراه با IBA (۱۰ میلی‌گرم در لیتر) و BA (۰/۱ میلی‌گرم در لیتر) بکار برده شد، میانگین تولید افزونه نیز در سطح بالایی (۱۰/۶۷) بود. این نتیجه با نتایج چادهوری و ماکیوندان[۱] (۳) همسو است. با دو برابر نمودن غلظت این هورمون‌ها ($M_{20}$) با اینکه تولید افزونه در کلاس a واقع است (متوسط ۹/۶۷ افزونه) ولی تفاوت معنی‌داری با محیط پیشین ندارد. بنابراین محیط $M_{19}$ به دلیل اینکه با مصرف مقدار کمتری از تنظیم کننده‌های رشد در کلاس a قرار داشت به عنوان محیط برتر در کشت‌های اولیه انتخاب گردید.

**ب- اثر محیط کشت‌های مختلف روی شدت قهوه‌ای شدن محیط**

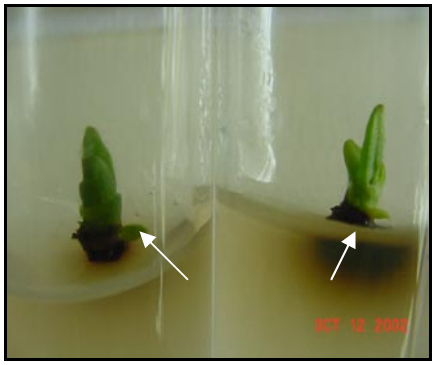
با توجه به نتایج بدست آمده از مقایسه میانگین شدت قهوه‌ای شدن محیط، مشخص شد که بیشتر محیط‌های کشت مورد استفاده در سطح احتمال ۰/۰۵ اختلاف معنی‌داری با هم نداشته و بدون ترشح های قهوه‌ای در محیط کشت بودند. تیمارهایی که به عنوان محیط کشت‌های برتر انتخاب شدند بیشتر، دامنه قهوه‌ای شدن بین ۱/۶۷ تا ۳ (در حدود قهوه‌ای تا قهوه‌ای شدن متوسط) را نشان دادند.

این نتایج نزدیک به نتایج ناتالی و همکاران (۱۱) مبنی بر قهوه‌ای شدن شدید محیط کشت در حضور کینتین است. همچنین میر واشتادن (۹) طی گزارشی بیان نمودند که درمحیط کشت‌های اولیه، زمانی که از سایتوکینین‌هایی مثل BA یا TDZ به عنوان تنظیم کننده رشد انحصاری استفاده شد، نمونه‌ها ترشح های قهوه‌ای تولید کرده و از بین رفتند.

به احتمال دلیل کاهش ترشح های قهوه‌ای در محیط کشت‌های این آزمایش، وجود یک اکسین در کنار سایتوکنین‌هاست. زیرا اکسین‌ها تا حدودی نقش ضداکسین کنندگی داشته و از اکسید شدن ترکیب های فنولی جلوگیری می کنند (۱۱). کینتین در تقابل با مواد فنلی محیط و یا تحریک گیاه به ساخت و ترشح این مواد، نقش مؤثری در ایجاد پدیده قهوه‌ای شدن دارد. افزون بر این, زخم پایین ریزنمونه نیز تولید ترشح های قهوه‌ای در محیط می‌نماید. روی و سارکار (۱۳) به منظور کاهش مواد فنولی و در نتیجه کاهش شدت قهوه ای شدن محیط، از ضداکسید کننده پلی‌وپنیل‌پیرولیدین[۲] (PVP) به میزان ۱ گرم در لیتر استفاده نمودند. با توجه به نتایج فوق، استفاده از ضد اکسید کننده‌ها مانند اسکوربیک اسید و یا PVP در مراحل زیرکشت برای کنترل ترشح های قهوه‌ای محیط توصیه می‌گردد.

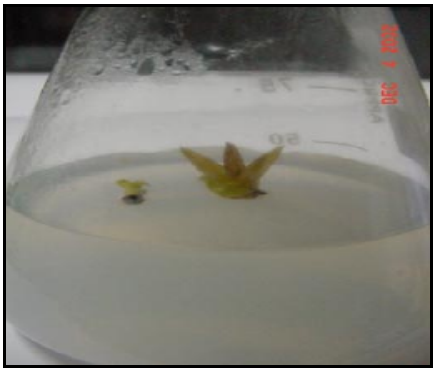
---

۱- Chaudhuri and Mukundan ۲- Polyvinyl pyrolidine



شکل ۱- شروع باززایی.

Fig. 1. Start of regenertion.

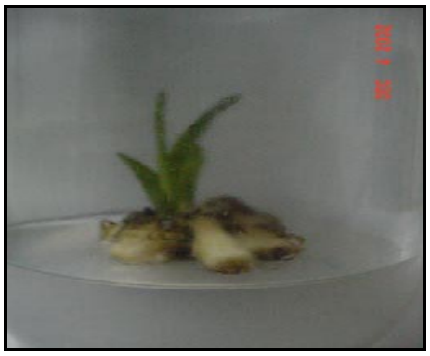


شکل ۲- عدم باززایی در محیط حاوی تنها IBA.

Fig.2. No regenertion in the medium with only IBA.

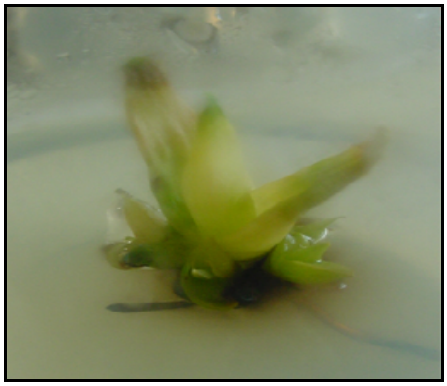
شکل ۳- حجیم شدن قاعده ریزنمونه در حضور NAA.

Fig. 3. Enlargement of the base of explant in the presence of NAA.



شکل ٤- اندام حجیم ریشه مانند در حضور 2,4-D.

Fig. 4. Enlarged leaf-like organ in the presence of 2,4-D.



شکل ٥- باززایی در تیمار با IAA و کینتین (هر کدام ۱ میلی‌گرم در لیتر).

Fig. 5. Regenertion in the treatment of IAA and kinetin (each 1 mg $L^{-1}$)

شکل ٦- میزان پرآوری در تیمار IAA و کینتین (هر کدام ۱ میلی‌گرم در لیتر) ٦٠ روز پس از کشت.

Fig. 6. The rate of proliferation in the treatment of IAA and kinetin (each 1 mg $L^{-1}$) 60 days after culture.

## REFERENCES منابع


۱- رضایی، م. ب.، ک. جایمند و و. مظفریان. ۱۳۷۵. شناخت گیاه صبرزرد و ترکیب‌های دارویی و شیمیایی آن. موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع.

2. Castorena, I. L. Natali and A. Cavallini. 1988. *In vitro* culture of *Aloe barbadensis* Mill. morphogenetic ability and nuclear DNA content. Plant Sci. Irish Republic 55:53-59.
3. Chaudhuri, S. and U. Mukundan. 2001. *Aloe vera* L. micropropagation and characterization of its gel. Phytomorphology 5:155-157.
4. Groenewald, E.G., A. Koeleman and D.C.J. Wessels. 1979. The use of tissue culture in the propagation and possible hybridization of Aloes and related plants. Aloe 17:37-40.
5. Gui, Y.L., T.Y. Xu, S.R. Gu, S.Q. Liu, Z. Zhang, G.D. Sun and Q. Zhang. 1990. Studies on stem tissue culture and organogensis of *Aloe vera*. Acta Bot. 32:606-610.
6. Hirimburegama, K. and N. Gamage. 1995. *In vitro* multiplication of *Aloe vera* meristem tips for mass propagation. J. Hort. Sci. 27:15-18.
7. Keijzer, C.J. and M. Cresti. 1987. A comparison of anther tissue developmental in male strile *Aloe vera* and male fertile *Aloe ciliaris*. Annal. Bot. 59:533-542.
8. Kemper, K.J. and V. Chio. 1999. Aloe (*Aloe vera*). Longwood Herbal Task Force. Retrived from http://www.mcp.edu/herbal/default.htm
9. Meyer, H.J. and J.V. Staden. 1991. Rapid *in vitro* propagation of *Aloe barbadensis* Mill. Plant Cell Tissue Organ Cult. 26:167-171.
10. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assay with tobacco tissue culture. Physio. Plant. 15:473-479.
11. Natali, L., I.C. Sanchez and A. Cavalini. 1990. *In vitro* culture of *Aloe barbadensis* Mill. Micropropagation from vegetative meristems. Plant Cell Tissue Organ Cult. 20:71-74.
12. Reynolds, T. and A.C. Dweck. 1999. *Aloe vera* leaf gel: a review update. J. Ethnopharmacol. Adv.18:91-120.
13. Roy, S.C. and A. Sarkar. 1991. *In vitro* regeneration and micropropagation of *Aloe vera* L. Sci. Hort. 47:107-113.
14. Trigiano, R.N. and J.G. Dennis. 1999. Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises. CRC Press. Boca Raton, Washington, D.C., WA, U.S.A.
15. Zhou, G.Y., D. HongFeng, S.W. Min, C. Lei, G.Y. Zhou, H.F. Ding, W.M. Shi and L. Cheng. 1999. Fast asexual propagation of *Aloe vera*. Acta Hort. 26:410-411.