

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

نسیم زرین‌پنجه^۱، آتنا اولادزاد عباس‌آبادی^۲ و منصور امید^{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

پست الکترونیک: momidi@ut.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۰۴/۱۱

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۱۰/۱۲

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 ریزادیدادی آن تمرکز داشته است ولی جنین‌زایی روشی 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 تغییر یافته بر القای بافت کالوس و جنین‌زایی روشی غیرمستقیم مورد مطالعه قرار گرفت. محیط کشت MS همراه با NAA به میزان 1 mg l^{-1} و ترکیب ویتامینی تغییر یافته شامل 0.4 mg l^{-1} تیامین، 0.5 mg l^{-1} پیریدوکسین، 0.5 mg l^{-1} نیکوتینیک‌اسید و 100 mg l^{-1} میواینوزیتول بهترین محیط کشت جهت کال‌زایی (۱۰۰٪) بودند. به طوری که بیشترین درصد تشکیل جنین‌های روشی (۵۰٪) نیز در محیط کشت MS همراه با BAP به میزان 5 mg l^{-1} و NAA به میزان 0.2 mg l^{-1} و ترکیب ویتامینی تغییر یافته تولید شد. البته ۸۰٪ جنین‌های روشی بدست آمده پس از طی مراحل بالغ‌سازی، تولید گیاهچه و سازگاری در گلخانه زنده ماندند.

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

مقدمه

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

گیاه دارویی صبرزرد با نام علمی *Aloe vera* L. متعلق به خانواده Liliaceae می‌باشد. در شیرابه و ژل برگ‌های این گیاه، ترکیبات مختلفی مانند آلوئین، باربالوئین،

(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 & Omid, 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 به ترتیب و لایه لایه از خارج به داخل جدا شدند و فقط دو برگ انتهایی روی ساقه حفظ گردیدند. سپس نمونه‌ها به ترتیب به مدت ۲۰ 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 به ترتیب به مدت ۳۰ ثانیه در الکل اتانول ۷۰٪ و ۲۰ 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.

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 نرعیمی سیتوپلاسمی (Keijzer & Cresti, 1987) و تکثیر رویشی سنتی که توسط پاجوش‌ها انجام می‌گیرد به دلیل تولید محدود پاجوش (Meyer & Van Staden, 1991)، نمی‌تواند 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 خصوصاً 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 به‌عنوان ریزنمونه در *A. barbadensis* Mill بوده است (Garro-Monge et al., 2008).

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 $20 \pm 23^\circ\text{C}$ 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 روشی 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 تغییر یافته (جدول ۱) و تیمارهای تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی شامل NAA به میزان 1 mg l^{-1} و 0.2 و BAP در غلظت‌های ۱، ۳، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر در سه تکرار و در قالب طرح فاکتوریل کاملاً تصادفی منتقل شد. و تمام کشت‌ها در اتاق رشد تحت شرایط دمایی $20 \pm 23^\circ\text{C}$ و در فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. جنین‌های روشی 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 واگشت به فاصله زمانی یک ماه و رسیدن به طولی حدود ۱۰ cm، از محیط درون شیشه خارج و در آب $20 \pm 25^\circ\text{C}$ 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 ۴۵ روز در شرایط سازگاری یعنی در دمای $20 \pm 30^\circ\text{C}$ ، رطوبت نسبی ۴۰٪ و سایه نگهداری شدند. در پایان گیاهچه‌های سازگار شده به گلخانه انتقال داده شدند.

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 ۲-۱ cm تشکیل شد. شایان ذکر است که در این تحقیق از محیط کشت MS (Murashige & Skoog 1962) به همراه شکر به میزان ۳۰ g/l 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 ۵/۶ تا ۵/۸ تنظیم شد. محیط‌های کشت در اتوکلاو با دمای 121°C 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 روشی، ابتدا با استفاده از محیط کشت MS به همراه 5 mg l^{-1} هورمون BAP تکثیر درون شیشه‌ای انجام گردید. نمونه‌های کشت‌شده در اتاق رشد با دمای $20 \pm 23^\circ\text{C}$ و در فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. عمل واگشت هر ماه یکبار انجام شد. بدین ترتیب 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 تغییر یافته 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 کاملاً تصادفی کشت شدند و جهت کال‌زایی مورد بررسی

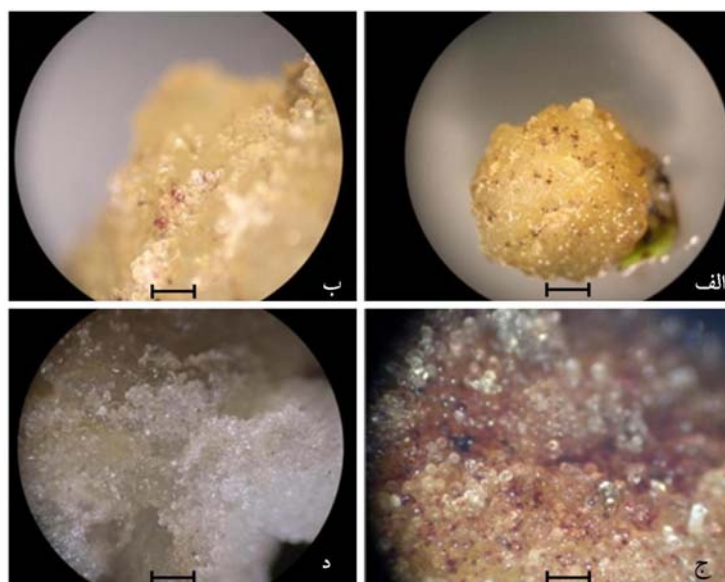
جدول ۱- نوع و غلظت ترکیبات ویتامینی مورد استفاده جهت کالزایی و جنین‌زایی رویشی

ترکیب ویتامینی	تیامین (mg l^{-1})	پیریدوکسین (mg l^{-1})	نیکوتینیک اسید (mg l^{-1})	میواینوزیتول (mg l^{-1})
MS	۰/۱	۰/۵	۰/۵	۱۰۰/۰
LS	۰/۴	۰/۰	۰/۰	۱۰۰/۰
L2	۲/۰	۰/۵	۰/۰	۲۵۰/۰
تغییر یافته	۰/۴	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 واکنش انجام شد. در تمام تیمارهایی که در آنها کالزایی انجام گردید، دو هفته پس از واکنش، 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 تغییر یافته همراه با 1 mg l^{-1} NAA، ترکیب ویتامینی L2 همراه با $2/5 \text{ mg l}^{-1}$ NAA و همینطور ترکیب ویتامینی LS همراه با $2/5 \text{ mg l}^{-1}$ NAA 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 $0/4 \text{ mg l}^{-1}$ تیامین، $0/5 \text{ mg l}^{-1}$ پیریدوکسین، $0/5 \text{ mg l}^{-1}$ اسید نیکوتینیک، $100/0 \text{ mg l}^{-1}$ میواینوزیتول و $1/0 \text{ mg l}^{-1}$ NAA، مقیاس "الف" - $0/5 \text{ cm}$ ، مقیاس "ب" و "د" - $0/25 \text{ cm}$ و مقیاس "ج" - $0/125 \text{ cm}$

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

ترکیب ویتامینی	NAA (mg l^{-1})	مقایسه میانگین درصد تشکیل بافت پینه
تغییر یافته	۱/۰	۱۰۰/۰۰ a \pm ۰/۰
L2	۲/۵	۱۰۰/۰۰ a \pm ۰/۰
LS	۲/۵	۱۰۰/۰۰ a \pm ۰/۰
L2	۲/۰	۹۱/۶۷ ab \pm ۱۴/۴۳
MS	۱/۰	۹۱/۶۷ ab \pm ۱۴/۴۳
LS	۱/۵	۹۱/۶۷ ab \pm ۱۴/۴۳
LS	۲/۰	۹۱/۶۷ ab \pm ۱۴/۴۳
L2	۱/۰	۹۱/۶۷ ab \pm ۱۴/۴۳
L2	۱/۵	۸۳/۳۳ ab \pm ۱۴/۴۳
تغییر یافته	۱/۵	۸۳/۳۳ ab \pm ۱۴/۴۳
تغییر یافته	۲/۰	۷۵/۰۰ ab \pm ۲۵/۰۰
تغییر یافته	۲/۵	۷۵/۰۰ ab \pm ۲۵/۰۰
LS	۱/۰	۶۶/۶۷ b \pm ۱۴/۴۳
MS	۱/۵	۶۶/۶۷ b \pm ۱۴/۴۳
MS	۲/۰	۶۶/۶۷ b \pm ۱۴/۴۳
MS	۲/۵	۶۶/۶۷ b \pm ۱۴/۴۳

*حروف غیر مشابه نشانگر وجود تفاوت معنی دار بین میانگین ها بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪ است.

جنین ها پس از یک ماه بالغ گشتند. بعد از سه بار واکشت به فاصله زمانی یک ماه و رسیدن گیاهچه ها به طول ۱۰ cm، مراحل خارج کردن گیاهچه ها از محیط درون شیشه ای، انتقال به خاک، سازگاری و در نهایت انتقال به گلخانه مطابق آنچه که در بخش مواد و روش ها توضیح داده شده، انجام گردید و ۸۰٪ گیاهان حاصل زنده ماندند (شکل های ۲ و ۳).

اثر متقابل ترکیب های ویتامینی و تنظیم کننده رشد گیاهی در سطح احتمال ۵ درصد معنی دار بودند. به طوری که بهترین تیمار جنین زایی مربوط به ویتامین های تغییر یافته با $۰/۲ \text{ mg l}^{-1}$ NAA و $۵/۰ \text{ mg l}^{-1}$ BAP بود (جدول ۳).

جنین های رویشی بدست آمده از بافت کالوس برای بالغ سازی و تشکیل ساقه و ریشه به محیط کشت یک دوم غلظت نمک های معدنی MS منتقل شدند و ۱۰۰٪

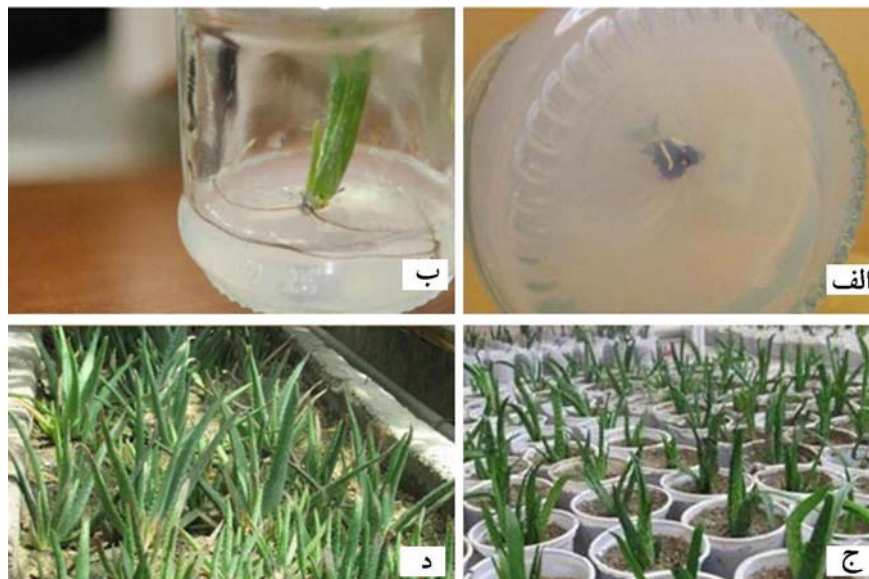
جدول ۳- مقایسه میانگین اثرات متقابل ترکیب ویتامینی و تنظیم‌کننده رشد گیاهی بر درصد جنین‌زایی رویشی

مقایسه میانگین درصد تشکیل جنین بدنی غیر مستقیم	NAA (۰/۲ mgl ⁻¹) + BAP (mg l ⁻¹) (گیاهی)	ترکیب ویتامینی محیط کشت
۵۰/۰۰ a ± ۲۵/۰۰	۵/۰	تغییر یافته
۳۳/۳۳ ab ± ۱۴/۴۳	۵/۰	LS
۲۵/۰۰ ab ± ۲۵/۰۰	۱/۰	L2
۲۵/۰۰ ab ± ۴۳/۳۰	۳/۰	L2
۱۶/۶۶ ab ± ۲۸/۸۶	۱۰/۰	MS
۱۶/۶۶ ab ± ۲۸/۸۶	۳/۰	LS
۱۶/۶۶ ab ± ۲۸/۸۶	۵/۰	L2
۸/۳۳ b ± ۱۴/۴۳	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 ۰/۰۵ است.



شکل ۲- مراحل جنین‌زایی رویشی غیرمستقیم، مقیاس ۱/۰-cm (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

بحث

روی نوع، غلظت و زمان کاربرد تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی متمرکز شده است. به طوری که ترکیبات مختلفی از فیتوهورمون‌ها مانند TDZ, BA, 2iPR, ZR, CPUU, Kin با 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 1 mg l^{-1} و BAP به میزان 2 mg l^{-1} 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، معمولاً 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 1 mg l^{-1} همراه با اکسین NAA به میزان 0.2 mg l^{-1} 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. در صورتی که در کشت بافت گیاهان مختلف از ترکیب‌های ویتامینی متفاوتی استفاده می‌شود. به‌عنوان مثال، جهت

مریستم ناحیه طوقه جهت القای بافت کالوس در این پژوهش مناسب بود. بنابراین بخش‌های انتهایی برگ‌های جوان واقع در نزدیکی مریستم نسبت به سایر قسمت‌های 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 بدست آمده از پایه برگ در این تحقیق، در مرحله بعد باززا نشدند و تنها بافت‌های کالوس بدست آمده از جنین زیگوتی که از لحاظ درصد کال‌زایی چندان رضایت بخش نبودند، باززا شدند (Garro-Monge et al., 2008). در تحقیق حاضر بافت‌های کالوس بدست آمده 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 نرعیسمی سیتوپلاسمی دارد (Keijzer & Cresti, 1987)، آسان‌تر، سری‌تر و از نظر تجاری کاربردی‌تر می‌باشد. نتایج بدست آمده از کال‌زایی و توانایی باززایی بافت‌های کالوس بدست آمده 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، در صورتی که در بیشتر گزارش‌ها وجود اکسین و سیتوکینین با هم برای القا و رشد بافت کالوس لازم بوده است (Abdollahzadeh et al., 2006). در مورد تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر القای جنین‌زایی رویشی، بیشتر مطالعات انجام شده بر

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 نسبت ۱:۱:۲ منتقل شدند (Abdollahzadeh et al., 2006). در پژوهش دیگری که بر روی همین گیاه انجام شد، جهت سازگار کردن از یک روش دو مرحله‌ای استفاده شد و ۱۰۰٪ گیاهچه‌ها برای انتقال به شرایط طبیعی مزرعه زنده ماندند (Mangal et al., 2011). بدین ترتیب که در ابتدا گیاهچه‌های حاصل از باززایی برای مدت ۱۲-۱۰ روز در دمای C ۲۷-۲۵ و رطوبت نسبی ۷۰٪ و نور طبیعی نگهداری شدند و پس از آن به محیطی با دمای C ۳۲±۲، 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 C ۳۰±۲، رطوبت نسبی ۴۰٪ و سایه برای مدت ۴۵ روز انجام 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 به دلیل مساعدتشان در تهیه جدول‌ها و شکل‌ها قدردانی می‌گردد.

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، L2 و LS از ترکیب ویتامینی تغییر یافته‌ای نیز برای اولین بار استفاده شده که شامل $0/4 \text{ mg l}^{-1}$ تیامین، $0/5 \text{ mg l}^{-1}$ پیریدوکسین، $0/5 \text{ mg l}^{-1}$ نیکوتینیک‌اسید و $100/0 \text{ mg l}^{-1}$ 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 تغییر یافته نسبت به MS بیشتر بود، می‌توان نتیجه گرفت که افزایش میزان تیامین (mg l^{-1}) در افزایش کال‌زایی و باززایی در این گیاه مؤثر است. موارد بسیاری در مورد کال‌زایی و باززایی گیاهان مختلف مثلاً کاربرد $0/4 \text{ mg l}^{-1}$ 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

- 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 Omid, 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 Horticulturae, 122: 146-151.
- Tejavathi, D.H., Rajanna, M.D., Sowmya, R. and Gayathamma, K., 2007. Induction of somatic embryos from cultures of *Aloe vera*-cruz Mill. *In Vitro Cellular 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. Regeneration of *Aloe arborescens* via somatic organogenesis from young inflorescences. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 83: 293-301.
- 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 Biochemistry & Biotechnology, 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 regeneration and hyperhydricity in tissue cultured *Aloe polyphylla*. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 99:167-174.
- Ivonova, M. and Van Staden J., 2010. Natural ventilation effectively reduces 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 Biotechnology, 163:860-868.

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

N. Zarinpanjeh¹, A. Oladzad Abbasabadi² 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 -Naphthalene acetic acid (NAA) and N⁶- 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 mg l⁻¹ Thiamine HCl plus 0.5 mg l⁻¹ Pyridoxine HCl plus 0.5 mg l⁻¹ Nicotinic acid plus 100 mg l⁻¹ Myo-Inositol, supplemented with 1.0 mg l⁻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 mg l⁻¹ NAA and 5.0 mg l⁻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.