دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی

Downloaded from jcb.sanru.ac.ir at 11:26 +0430 on Thursday April 25th 2019

ریزتکثیری درون شیشه ای گیاه دارویی آلوئه ورا (*Aloe vera* L.)

س. گلچوبیان[۱]، غ. ع. رنجبر[۲] و س. ک. کاظمی تبار[۲]

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
۲- دانشیار دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

تاریخ دریافت: ۸۹/۶/۲۲ تاریخ پذیرش: ۹۰/۱۲/۲۱

چکیده

گیاه آلوئه ورا (*Aloe vera* L.) کاربردهای مختلفی در زمینه های صنعتی و بهداشتی دارد. عصاره برگهای این گیاه برای درمان بیماریهای عفونی، زخمها، سوختگیها، حساسیت های پوستی و جلوگیری از ریزش مو کاربرد دارد. تکثیر این گیاه به طور سنتی بوسیله کاشت پاجوش انجام می گیرد. به علت نرعقیم بودن از بذور گیاه آلوئه ورا برای تکثیر استفاده نمی شود زیرا دگرگشنی مانع یکنواختی ژنتیکی گیاه می شود که از مسائل مهم در این گونه است. در همین راستا برای دستیابی به روش تکثیر بهینه آزمایش حاضر به صورت کشت درون شیشه ای در آزمایشگاه اجرا شد و قطعات پاجوش به عنوان ریز نمونه در محیط کشت MS جامد تقویت شده با ساکارز کشت گردید. تیمارهای مورد استفاده در مرحله شاخساری شامل BA (۲ mgl^{-1})، Kin (۱ -۰/۵ mgl^{-1})، (۰/۲ mgl^{-1} و ۰/۵) NAA، (۰/۱ mgl^{-1}) IAA، (۰/۲۵ mgl^{-1}) IBA و (۱ mgl^{-1}) BAP و در مرحله ریشه دهی شامل (۱ -۰/۲ mgl^{-1}) NAA و (۱ mgl^{-1}) IBA بودند. طرح آزمایشات بکار رفته برای هر دو مورد شاخساره و ریشه زایی طرح کاملاً تصادفی بود. نتایج حاصله در مورد تولید شاخساره نشان داد که ترکیب هورمونی تولید شاخساره BA (۲ mgl^{-1}) + Kin (۰/۵ mgl^{-1}) + BA (۲ mgl^{-1}) با میانگین تعداد شاخساره ۱/۳۶ ± ۱۰/۶۶ و ترکیب هورمونی ریشه زایی (۰/۲ mgl^{-1}) NAA با میانگین تعداد ریشه (۱/۱۶ ± ۴/۸) به ترتیب بالاترین نتیجه را تولید کردند.

واژه های کلیدی: آلوئه ورا، پاجوش، محیط MS، ریز ازدیادی، تیمار هورمونی

مقدمه

گیاه آلوئه با نام علمی (*Aloe vera* L.) از خانواده Liliaceae می باشد. این گیاه دائمی دارای ریشه های غده ای منشعب و برگهای گوشتی بوده و به صورت رزت رشد کرده و ساقه حقیقی ندارد. آلوئه ورا بومی مناطق گرمسیری و استوایی است و در ایران در جزایر قشم و خارک به وفور دیده می شود (۳). برگهای این گیاه

Downloaded from jcb.sanru.ac.ir at 11:26 +0430 on Thursday April 25th 2019

حاوی عصاره شفاف، چسبناک و تلخ به نام آلوئیس است و از آن در تهیه لوازم آرایشی، بهداشتی و صنعتی استفاده می شود. این عصاره حاوی ترکیبات و مشتقات مختلفی از جمله ترکیبات آنتراکینونی شامل آلوئین، آلوئه- آمودین و باربالوئین (دارای خاصیت مسهلی)، ترکیبات پروستانوئیدی شامل گاما لینولنیک اسید (اثر بهبود دهندگی زخم ها و سوختگی ها)، مواد معدنی از جمله لاکتات منیزیم (خاصیت ضد حساسیت)، ساکاریدها، آنزیم ها و ویتامین ها می باشد (۲). تکثیر این گیاه به روش سنتی بوسیله جدا کردن پاجوشها از گیاه مادری و کاشت آنها در گلدانهای جداگانه انجام می گیرد. آلوئه ورا در سال ۳ تا ۴ پاجوش تولید می کند برای کشت این گیاه در یک هکتار به ۲۰ تا ۲۴ هزار پاجوش احتیاج است و تهیه این مقدار پاجوش به روش سنتی وقت و هزینه زیادی را می طلبد. از بذر این گیاه بـه علت وجود نرعقیمی و دگرگشنی نمی تـوان استفاده کرد. محققان در طی تحقیقات خود به این نتیجه رسیدند که بهترین روش برای تکثیر این گیاه استفاده از کشت درون شیشه ای می باشد (۴). ناتالی (۵) گزارش داد که نرعقیمی گیاه آلوئه ورا یک سد بزرگ در برابر تکثیر سریع این گیاه است بنابراین ریز ازدیادی روش مناسب برای تکثیر این گیاه محسوب می شود. ابری و استادن (۱) با استفاده از محیط کشت MS و هورمونهای BA به تنهایی و ترکیب دو هورمون BA و NAA بیشترین تعداد شاخه را در محیط حاوی یک میلی گرم در لیتر BA بدست آوردند. در مرحله ریشه دهی بیشترین ریشه را در محیط کشت حاوی ۰/۵ میلی گرم در لیتر هورمون IBA بدست آوردند. لیائو و همکاران (۶) گزارش دادند که در مرحله شاخه دهی از هورمون های BA و NAA در غلظت های مختلف و در مرحله ریشه زایی از هورمون NAA استفاده کردند و بهترین نتیجه شاخه دهی را در محیط حاوی ترکیب هورمونی ۲ میلی گرم در لیتر BA و ۰/۳ میلی گرم در لیتر NAA بدست آوردند و در مرحله ریشه زایی بهترین نتیجه از محیط کشت حاوی ۰/۲ میلی گرم در لیتر NAA حاصل شد. باکشا و همکاران (۳) بهترین نتیجه را در تولید شاخساره از محیط کشت حاوی ۲ میلی گرم در لیتر BA و ۰/۵ میلی گرم در لیتر NAA با میانگین ۱۰/۱ ±۰/۵ شاخساره بدست آوردند برای ریشه دهی از هورمون ۰/۵ میلی گرم در لیتر NAA استفاده کردند که بعد از ۲۸ روز ۹۵ درصد از گیاهان با میانگین ۴/۸ ±۰/۵۳ ریشه دار شدند. احمد و همکاران (۲) در مرحله شاخه دهی بهترین نتیجه را از محیط حاوی ۰/۲ میلی گرم در لیتر NAA ۰/۵ میلی گرم در لیتر + Kin ۲ میلی گرم در لیتر BA با میانگین ۱۵/۳۹ و در مرحله ریشه دهی بهترین نتیجه از محیط کشت حاوی هورمون ۰/۲ میلی گرم در لیتر NAA با میانگین ۶/۷۱ بدست آوردند. چادهوری و موکاندان (۴) بهترین نتیجه را از محیط کشت حاوی ترکیب هورمونی ۲

Downloaded from jcb.sanru.ac.ir at 11:26 +0430 on Thursday April 25th 2019

میلی گرم در لیترIBA، ۰/۲ میلی گرم در لیتر BAP، ۰/۵ میلی گرم در لیتر Kin و ۰/۲ میلی گرم در لیتر NAA با میانگین ۱۱/۲۹ شاخساره بدست آوردند. هدف از تحقیق حاضر بررسی وضعیت تکثیر گیاه آلوئه ورا با استفاده از ترکیبات هورمونی در شـــرایط کشت درون شیشه ای می باشد.

مواد و روشها

پاجوشها را از گیاه مادری جدا (شکل ۱-A) و پس از شستشو در زیر شیر آب به مدت ۳۰ دقیقه، برگها و ریشه ها را جدا کرده و نمونه ها به اتاق کشت انتقال داده شدند. برای ضد عفونی نمونه ها به ترتیب از اتانول ۷۰ درصد به مدت ۳۰ ثانیه، محلول تازه کلرید جیوه ۰/۱ درصد به مدت ۲ دقیقه و سپس محلول هیپوکلریت سدیم ۱۵ درصد به مدت ۵ دقیقه استفاده شد و در نهایت نمونه ها ۵ تا ۶ بار با آب مقطر استریل شسته شدند تا آثار مواد شوینده پاک شود.

نمونه های ضدعفونی شده را به اندازه ۴ تا ۵ میلی متر برش زده (شکل۱- B) و به محیط کشت MS (۷) حاوی ۳ درصد ساکارز و ۰/۷ درصد آگار با pH معادل ۵/۸ منتقل شدند. در مرحله شاخه دهی از ۷ تیمار هورمونی در ۶ تکرار در قالب طرح کاملاً تصادفی استفاده شد و از محیط کشت MS پایه (محیط کشت بدون هورمون) به عنوان شاهد بکار رفت.

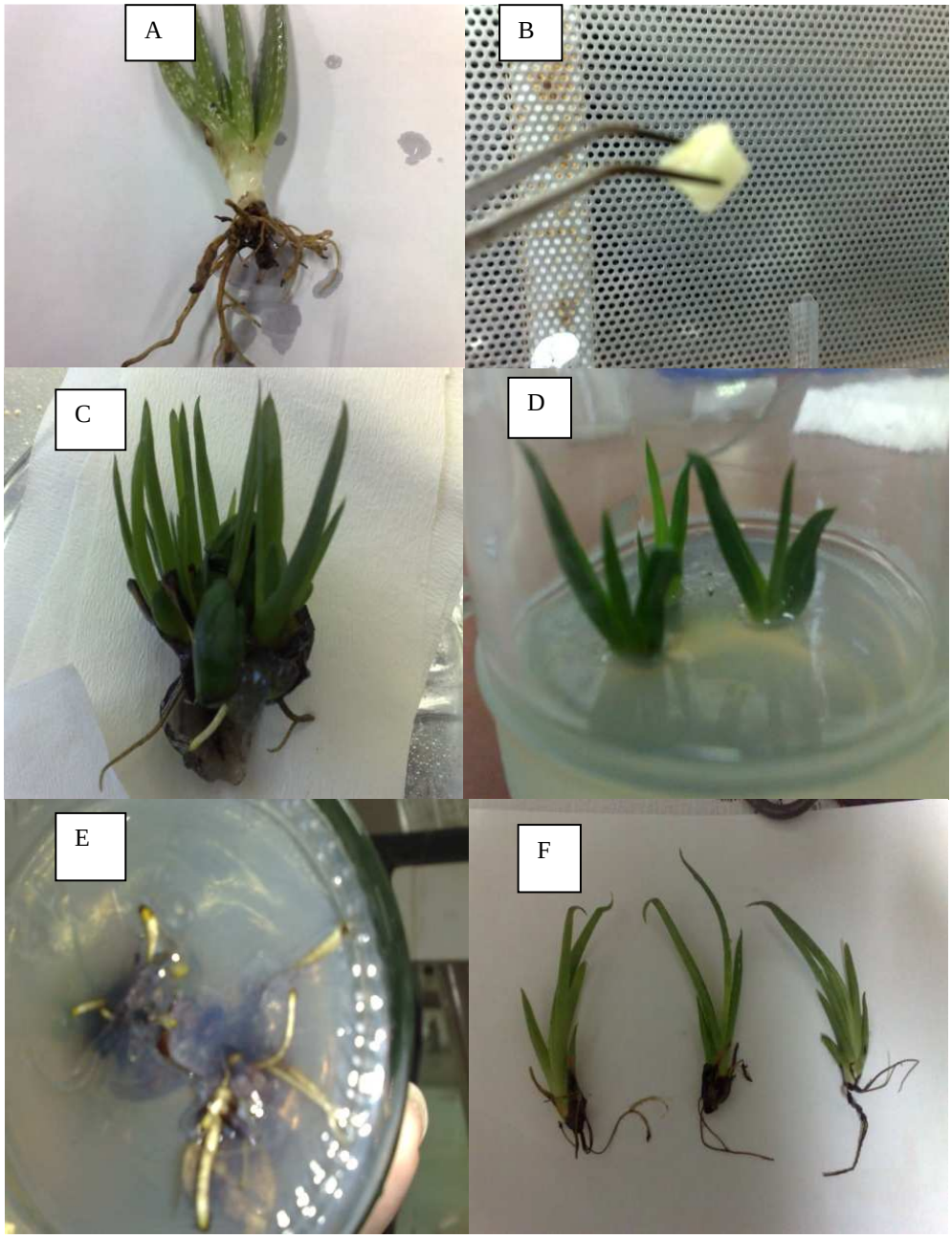
نمونه های کشت شده در انکوباتور در دمای ۲۶ درجه سانتی گراد در ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار داده شدند. نمونه ها هر ماه یکبار بازکشت شدند و در ماه چهارم تعداد شاخه های تولید شده از هر تیمار اندازه گیری و یادداشت شد. شاخساره های تولید شده که در حدود ۲ سانتی متر ارتفاع داشتند (شکل ۱- D) به مرحله ریشه دهی انتقال یافتند.

در مرحله ریشه دهیاز ۳ تیما هورمونی در ۶ تکرار در قالب طرح کاملاً تصادفی استفاده شد. بعد از گذشت ۶۰ روز تعداد ریشه های تولید شده اندازه گیری و یادداشت شد (شکل ۱-E). سپس نتایج بدست آمده در مراحل شاخه دهی و ریشه دهی با استفاده از نرم افزار آماری SAS مورد تجزیه آماری قرار گرفته و با استفاده از روش آزمون چند دامنه ای دانکن مقایسه شدند.

نتایج و بحث

در تجزیه واریانس از نظر اثر تیمارها روی تعداد شاخسارهای تولید شده اختلاف بسیار معنی داری نشان دادند (جدول ۱، P<۰/۰۱). مقایسه میانگین های بدست آمده از هر تیمار در سطح ۵ درصد با استفاده از روش چند دامنه ای دانکن صورت گرفت. در این آزمایش بهترین نتیجه در شاخساره های تولید شده در تیمار ۲ و ۳ به ترتیب با محیط کشت حاوی ترکیب هورمونی (۰/۵ mgl^{-1}) + NAA (۰/۲ mgl^{-1}) + Kin BA (۲ mgl^{-1}) با میانگین ۱/۳۶ ± ۱۰/۶۶ و BA (۲ mgl^{-1}) + NAA (۰/۵ mgl^{-1}) با میانگین (۸/۱۶ ± ۰/۷۵) شاخساره بدست آمد (جدول ۲ و شکل۱-C).

Downloaded from jcb.sanru.ac.ir at 11:26 +0430 on Thursday April 25th 2019



شکل ۱- مراحل مختلف نمونه گیری از پاجوش ها و آماده سازی آنها برای کشت در محیط درون شیشه به همراه وضعیت رشد نمونه ها در محیط کشت های مختلف A: پاجوشهای جدا شده از گیاه مادری، B: نمونه ها بعد از جدا کردن برگها و ریشه ها، C: شاخساره های تولید شده در محیط شاخه دهی، D: شاخه های قرار گرفته در محیط ریشه دهی، E: ریشه ها تولید شده در محیط ریشه دهی، F: گیاهچه های ریشه دار شده.

Downloaded from jcb.sanru.ac.ir at 11:26 +0430 on Thursday April 25th 2019

جدول ۱- تجزیه واریانس تاثیر تیمارها روی تعداد شاخساره های تولید شدهدر گیاه آلوئه ورا

منابع تغییر	درجات آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	F_s
تیمار	۶	۳۱۲/۶۲	۵۲/۱	۴۴/۱**
اشتباه	۳۵	۴۱/۵۰	۱/۱۸	
کل	۴۱	۳۵۴/۱۲		

جدول ۲- بررسی میانگین شاخساره های بدست آمده در هر تیمار به روش دانکن

تیمار	ترکیب هورمونی	میانگین تعداد شاخساره ها
شاهد	بدون هورمون	۰
$T_۱$	BA (2mgl-1)+Kin(0/5)	۶/۶۶±۱/۲۱[b]
$T_۲$	BA (2mgl-1)+Kin(0/5)+NAA(0/2mgl-1)	۱۰/۶۶±۱/۳۶[a]
$T_۳$	BA (2mgl-1)+NAA(0/5mgl-1)	۸/۱۶±۰/۷۵[a]
$T_۴$	Kin (1mgl-1)+IAA(0/1mgl-1)	۴/۸۳±۱/۱۶[c]
$T_۵$	BAP (1mgl-1)+IBA(0/25mgl-1)	۲/۱۶±۱/۱۶[d]
$T_۶$	Kin (1mgl-1)+BAP(1mgl-1)	۴/۱۶±۰/۷۵[c]
$T_۷$	BAP (1mgl-1)+NAA(0/5mgl-1)	۳/۵±۱/۰۴[cd]

میانگین هایی که دارای حروف مشترک هستند فاقد اختلاف معنی دار هستند.

احمد و همکاران (۲) گزارش دادند که بیشترین تعداد شاخساره را با میانگین ۱۵/۳۹ از این ترکیب هورمونی بدست آوردند. این نشان می دهد که تا بهینه سازی شرایط کلیه کشت برای حداکثر تولید شاخساره کارهای تکمیلی زیادی باید انجام شود. آبری و استادن (۱) و ناتالی و همکاران (۵) گزارش دادند که بهترین محیط برای تکثیر آلوئه ورا محیطی است که شامل مقادیری از هورمون BA باشد ولی ممکن است این نتیجه برای گونه های مختلف آلوئه فرق کند. چادهوری و موکاندان (۴) نیز گزارش دادند که BA نقش موثری در تکثیر *Aloe vera* و Aloepolyphylla دارد. احتمال موثر بودن هورمون های تازه تولید شده نسبت به هورمون هایی که در شرایط ضعیف نگهداری می شوند بسیار بالا است و بسیاری از تفاوت های مشاهده شده در نتایج این آزمایش با کارهای سایر محققان ناشی از این امر می باشد، اما در موثر بودن هورمون BA جهت تحریک تولید شاخساره متفق القول هستند.

در تجزیه واریانس از نظر اثر تیمارها روی تعداد ریشه ها تولید شده، تیمارها در سطح ۱ درصد اختلاف معنی داری نشان دادند (جدول ۳) و میانگین های بدست آمده از هرتیمار در سطح ۵ درصد به روش آزمون چند دامنه ای دانکن با هم مقایسه شدند (جدول ۴). بهترین نتیجه در ریشه زایی در محیط کشت حاوی هورمون NAA (۰/۲ mgl^{-1}) با

Downloaded from jcb.sanru.ac.ir at 11:26 +0430 on Thursday April 25th 2019

میانگین تعداد ریشه ۱/۱۶± ۴/۸ حاصل شد (جدول ۴، شکل۱- E). افزایش سطح مصرف NAA از ۰/۲ میلی گرم در لیتر به ۱ میلی گرم در لیتر موجب کاهش شدید در ریشه زایی گردید. این امر نشان می دهد که مصرف NAA با دزهای بالاتر برای ریشه زایی مطلوب نمی باشد ولی لیائو و همکاران (۶) گزارش کردند که بیشترین تعداد ریشه را در محیط کشت حاوی ($۰/۵\ mgl^{-1}$) NAA با میانگین ۵/۲ ریشه بدست آوردند. به نظر می رسد تغییر سطح مصرف هورمون NAA از ۰/۲ میلی گرم در لیتر به ۰/۵ میلی گرم در لیتر احتمال تقویت میزان ریشه دهی در گونه آلوئه ورا را به همراه داشته باشد.

باکشا و همکاران (۳) گزارش دادند که بین ۳ اکسین IBA، NAA و IAA هورمون NAA بهترین اثر را روی ریشه دهی گیاه آلوئه ورا دارد. احمد و همکاران (۲) گزارش دادند که در مرحله ریشه دهی بهترین نتیجه را از محیط کشت حاوی ($۰/۵\ mgl^{-1}$) NAA با میانگین ۶/۷۱ ریشه بدست آوردند. بنابراین تحریک ریشه دهی در شاخساره های آلوئه ورا در هورمون ها و نسبت های مختلف هورنی به صورت مختلفی انجام می شود به طوری که در میان انواع هورمون ها، NAA بهترین نتیجه را در آزمایشات مختلف ارائه داد که با نتایج آزمایش حاضر نیز مطابقت دارد و از نظر مقدار مصرف نیز با افزایش از ۰/۲ میلی گرم در لیتر تا ۰/۵ میلی گرم در لیتر روند افزایشی داشته ولی با افزایش مقدار هورمون از ۰/۵ میلی گرم در لیتر به ۱ میلی گرم در لیتر موجب کاهش در میزان ریشه دهی شاخساره ها می گردد. در نتیجه باز زایی گیاهچه کامل در واقع پس از تولید شاخساره ها در مرحله تولید اندام های هوایی، با استفاده از ادامه کشت در محیط ریشه زایی و تغییرات هورمونی مربوطه اتفاق افتاد. تعداد گیاهچه های سبز حاصله راندمان تولید قابل قبولی را نشان داد (شکل ۱- F). به نظر میرسد یکی از دلایل کاهش در میزان ریشه زایی حاصل از آزمایش حاضر با نتایج آزمایشات محققان دیگر،احتمال تفاوت در سلامت و تازگی هورمون مورد استفاده در آزمایش حاضر و آماده سازی شرایط محیط کشت باشد (۲، ۳ و ۶). احتمال تاثیر روش متفاوت ضدعفونی ریزنمونه ها (استفاده توامان از محلول کلرید جیوه و هیپوکلریت سدیم) مورد استفاده در این آزمایش با آزمایشات انجام شده توسط محققان فوق الذکر (استفاده از ترکیب الکل و محلول کلرید جیوه یا الکل و هیپوکلریتل سدیم) روی مراحل مخلف کالوس دهی و باززایی چندان قوی نمی باشد.

با توجه به ارزش بالای اقتصادی و دارویی گیاه آلوئه ورا ادامه آزمایشات در زمینه تکثیر بهینه آن در شرایط درون شیشه ای توصیه می شود و مطالعه روی موانع هورمونی و تغذیه ای ریزنمونه ها در مراحل مختلف کالزایی و باززایی گیاه و تغییر نسبت های هورمونی قابل توصیه است.

Downloaded from jcb.sanru.ac.ir at 11:26 +0430 on Thursday April 25th 2019

جدول ۳- تجزیه واریانس تاثیر تیمارها روی تعداد ریشه ها در قالب طرح کاملا تصادفی

منابع تغییر	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	F_s
تیمار	۲	۱۲/۲	۶/۱	۷/۰۹**
اشتباه	۱۵	۱۳	۰/۸۶	
کل	۱۷	۲۵/۲		

جدول ۴- بررسی میانگین تعداد ریشه های بدست آمده در هر تیمار به روش دانکن

تیمارها	ترکیبات هورمونی	میانگین تعداد ریشه های تولید شده
۱	NAA (۰/۲mgl-1)	۴/۸±۱/۱۶[a]
۲	NAA (۱mgl-1)	۳/۶±۰/۸۶[ab]
۳	IBA (۱mgl-1)	۲/۸±۰/۷۵[b]

میانگین هایی که دارای حروف مشترک هستند فاقد اختلاف معنی دار هستند.

منابع

1. Abrie, A. and J.V. Staden. 2001.Micropropagation of endangered Aloepolyphylla, Plant Growth Regulation, 33(1): 19-23.
2. Ahmed, S. and A.H. Kabir, M.B. Ahmed, M.A. Razvy and S. Ganesan. 2007. Development of rapid micropropagation method of Aloe vera.Lizvorniznanstveni rad. 24(2): 121-128.
3. Baksha, R. and M.A.A. Jahan, R. Khatun and J.L. Munshi. 2005. Micropropagation of Aloe barbadensis Mill. Throughin vitro culture of shoot tip explants.Plant Tissue Cult and Biotech. 15(2): 121-126.
4. Chaudhuri, S. and U. Mukundan. 2001. *Aloe Vera* L. Micro propagation and Characterization of its gel. Phytomorphology, 51(2): 155-157.
5. Natali, L., I.C. Sanchez and A. Cavallini. 1990. In vitro culture of Aloe barbadensisMill.:Micropropagation from vegetative meristems. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 20(1): 71-74.
6. Liao, Z., M. Chen, F. Tan, X. Sun and K. Tang. 2004. Micro propagation of endangered Chinese aloe. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 76(1): 83-86.

Downloaded from jcb.sanru.ac.ir at 11:26 +0430 on Thursday April 25th 2019

In Vitro Micro Propagation of *Aloe vera* L.

S. Golchoubian[1], Gh. Ranjbar[2] and S.K. Kazemitabar [2]

1- Former M.Sc. Student, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University
2- Associate Professor, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University

Abstract

Aloe vera L. plant have industrial applications in various fields of health. Leaves of *Aloe vera* are used for treating against infectious diseases, wounds, burns, skin allergies and are also used to prevent human hair loss. Propagation of this plant has traditionally done by planting its shoot tips. Since Aloe vera plant is male sterile, it cannot produce fertile seeds for cultivation. Outcrosses will change its genetic uniformity, in which supposed as a very important character in production of this genotype. Today, micro propagation method is extensively used for reproduction of Aloe vera. To provide optimum in vitro propagation method, adventitious shoot explants of this plant were cultured on agar solid MS basal medium supplemented with sucrose. Treatments used in the shooting stage include BA (2 mgl^{-1}), Kin (0.5-1 mgl^{-1}), NAA (0.2-0.5 mgl^{-1}), IAA (0.1 mgl^{-1}), IBA (0.25 mgl^{-1}), BAP (1 mgl^{-1}). Experiment was investigated sing a complete lyrandomized design. Results in shooting stage showed that the combination of BA (2 mgl^{-1})+ Kin (0.5 mgl^{-1})+BA (2 mgl^{-1}) with mean of 10.66±1.36 in shooting stage and NAA (2 mgl^{-1}) by mean of 4.8±1.16 in rooting stage produced the highest outcomes, respectively.

Keywords: *Aloe vera*, Adventitious, MS medium, Micro propagation, Hormonal treatment