

ریز ازدیادی گیاه آلوئه ورا و تاثیر طول موج های مختلف نوری در رشد و میزان کلروفیل آن

پایان نامه کارشناسی رشته زیست شناسی

BIHE

استاد راهنما: دکتر نعیم خاضعی

گردآورنده: آرمین اکبری

چکیده.....	۱
۱-۱ مقدمه.....	۴
۱-۱-۱ اهداف.....	۶
۲-۱ گیاه آلوئه ورا (ALOE VERA).....	۸
۲-۲ گیاه شناسی تیره لیلیاسه (LILIACEAE).....	۹
۲-۳ گیاه شناسی و پراکنش گیاه آلوئه ورا.....	۱۰
۲-۴ طبقه بندی جنس آلوئه.....	۱۱
۲-۵ ترکیبات شیمیایی و خواص درمانی آلوئه ورا.....	۱۲
۲-۶ روش تکثیر گیاه آلوئه ورا.....	۱۵
۲-۶-۱ تکثیر رویشی یا غیر جنسی.....	۱۵
۲-۶-۲ تکثیر جنسی.....	۱۵
۲-۷ تکثیر از طریق کشت بافت گیاهی.....	۱۵
۲-۷-۱ تاریخچه و مبانی کشت بافت.....	۱۵
۲-۸ تنظیم کننده های رشد.....	۱۷
۲-۸-۱ تنظیم کننده های رشد اکسینی.....	۱۷
۲-۸-۲ تنظیم کننده های رشد سایتوکینینی.....	۱۹
۲-۹ مروری بر تحقیقات انجام شده.....	۲۰
۳-۱ گیاه تحت بررسی.....	۲۵
۳-۲ روش ضد عفونی.....	۲۵
۳-۲-۱ ضد عفونی وسایل آزمایشگاهی.....	۲۶

۳-۳	تهیه محیط کشت.....	۲۷
۳-۳-۱	تهیه محلول های ذخیره.....	۲۸
۳-۳-۱-۱	محلول ذخیره عناصر پر مصرف.....	۲۸
۳-۳-۱-۲	محلول ذخیره عناصر کم مصرف.....	۲۹
۳-۳-۱-۳	محلول ذخیره آهن.....	۲۹
۳-۳-۱-۴	محلول ذخیره عناصر کم مصرف مس و کبالت.....	۲۹
۳-۳-۱-۵	محلول ذخیره ویتامین ها.....	۳۰
۳-۳-۱-۶	محلول ذخیره هورمون های رشد.....	۳۰
۳-۳-۲	محیط کشت جوانه زایی.....	۳۰
۳-۴	مراحل کشت بافت.....	۳۱
۳-۵	شرایط اتاقک رشد.....	۳۱
۳-۵-۱	دیوهای ساطع کننده نور (LED).....	۳۲
۳-۵-۱-۱	ماده نوع n.....	۳۲
۳-۵-۱-۲	ماده نوع P.....	۳۳
۳-۵-۲	ساختار فیزیکی LED.....	۳۳
۳-۶	تعیین مقدار کلروفیل A و B.....	۳۴
۳-۷	انتقال به خاک و سازگاری گیاهچه ها.....	۳۶
۳-۷-۱	شرایط اتاق سازگاری.....	۳۶
۴-۱	بررسی نمونه های مختلف جهت کشت بافت.....	۳۹
۴-۲	بررسی محیط کشت از لحاظ میزان آلودگی و تغییرات رنگی محیط کشت.....	۴۰
۴-۳	بررسی انتخاب ظرف مناسب محیط کشت.....	۴۱
۴-۴	بررسی نمونه های قرار داده شده در زیر نورهای مختلف.....	۴۲
۴-۵	بررسی ریخت شناسی نمونه های کشت داده شده.....	۴۵

۴-۶	نتایج حاصل از طیف نور سنجی.....	۵۴
۴-۷	انتقال به خاک و سازگاری.....	۶۳
۵-۱	انتخاب نمونه های مناسب.....	۶۵
۵-۲	آلودگی های محیط کشت.....	۶۷
۵-۳	قهوه ای شدن.....	۶۸
۵-۴	هورمون های رشد.....	۶۹
۵-۵	تاثیر نورهای مختلف بر روی ریخت شناسی نمونه ها.....	۶۹
۵-۶	سازگاری.....	۷۱
۵-۷	پیشنهادهات.....	۷۳
	فهرست منابع.....	۷۵

فهرست شکل ها

- شکل ۱ نمونه ای از جنس آلوئه و محل رشد ساقه واجد گل ۸
- شکل ۲ نمونه ای از گل جنس آلوئه ۸
- شکل ۳ *ALOE SAPONARIA* ۱۱
- شکل ۴ *ALOE SUCCOTRINE* ۱۱
- شکل ۵ *ALOE FEROX* ۲۱۲
- شکل ۶ آرایش اتم ناخالص آرسنیک با اتم های ژرمانیم در ماده نوع N ۳۲
- شکل ۷ آرایش اتم ناخالص بور با اتم های سیلیکون در ماده نوع P ۳۳
- شکل ۸ تصویری از یک ساختمان فیزیکی قطعه LED ۳۳
- شکل ۹ قهوه ای شدن محیط کشت ۴۰
- شکل ۱۰ نمونه ای با تعداد حلقه های کم ۴۴
- شکل ۱۱ محل قرار گیری حلقه ها توسط فلش نشان داده شده است ۴۴
- شکل ۱۲ مراحل رشد نمونه زیر نور آبی ۴۵
- شکل ۱۳ مراحل رشد نمونه زیر نور قرمز ۴۶
- شکل ۱۴ مراحل رشد نمونه زیر نور قرمز + آبی ۴۷
- شکل ۱۵ مراحل رشد نمونه زیر نور سفید ۴۸
- شکل ۱۶ مراحل رشد نمونه زیر نور آبی ۴۹
- شکل ۱۷ مراحل رشد نمونه زیر نور قرمز ۵۰
- شکل ۱۸ مراحل رشد نمونه زیر نور قرمز + آبی ۵۱
- شکل ۱۹ مراحل رشد نمونه زیر نور سفید ۵۲
- شکل ۲۰ به ترتیب از سمت چپ بالا، بافت زیر نور قرمز، بافت زیر نور سفید، بافت زیر نور قرمز + آبی و بافت زیر نور آبی ۵۳
- شکل ۲۱ نمودار پراکندگی غلظت کلروفیل A در هر مرتبه از آزمایش ۵۶
- شکل ۲۲ نمودار پراکندگی غلظت کلروفیل B در هر مرتبه از آزمایش ۵۷
- شکل ۲۳ نمودار پراکندگی غلظت مجموع کلروفیل های A و B در هر آزمایش ۵۸

شکل ۲۴ نمونه ای با دو تاسه حلقه برگ در زیر جوانه راسی و بدنبال آن رشد جوانه ها از اطراف جوانه راسی ۶۶

شکل ۲۵ نمونه ای با حلقه های برگ بسیار کم (عکس از مولف) ۶۶

فهرست جداول

- جدول ۱ ترکیبات موجود در ژل گیاه آلوئه ورا ۱۳
- جدول ۲ غلظت نمک های تشکیل دهنده محلول های ذخیره ای و محلول اصلی محیط کشت ۲۸
- جدول ۳ خصوصیات و ویژگی های فیزیکی انواع مختلف LED ۳۴
- جدول ۴ خلاصه ای از اطلاعات حاصل از مشاهدات ۴۴
- جدول ۵ آمارهای توصیفی بدست آمده از نمونه ها ۵۴
- جدول ۶ نتایج حاصل از آنالیز واریانس نمونه ها ۵۹
- جدول ۷ آزمون Tukey HSD ۶۰
- جدول ۸ معنی دار بودن میزان کلروفیل A در نمونه هایی که در زیر نور قرمز + آبی و آبی قرار گرفته بودند ۶۱
- جدول ۹ معنی دار بودن میزان کلروفیل B در نمونه هایی که در زیر نور قرمز + آبی و آبی قرار گرفته بودند ۶۲
- جدول ۱۰ معنی دار بودن میزان کلروفیل A + B در نمونه هایی که در زیر نور قرمز + آبی و آبی قرار گرفته بودند ۶۲
- جدول ۱۱ مقایسه ای از میزان غلظت کلروفیل ها در نمونه های مختلف ۶۳

چکیده

هدف اصلی از تحقیق حاضر، مقایسه تغییرات رشد ریز نمونه های مختلف گیاه آلوئه ورا (*Aloe vera*) در زیر نور های مختلف LED با استفاده از تکنیک کشت بافت گیاهی می باشد. در این تحقیق چهار اتاقک رشد با نورهای سفید، آبی، قرمز و قرمز + آبی تعبیه گردید. مراحل کلی آزمایش شامل (۱) ضد عفونی سطحی ریزنمونه ها (۲) کشت ریزنمونه ها در محیط واجد هورمون های جوانه زایی + ریشه زایی (۳) انتقال گیاهچه های ریشه دار به خاک و قرار دادن آن ها در اتاق سازگاری، بودند.

پس از آزمایش ریزنمونه های مختلف نظیر ریشه، برگ و جوانه راسی، جوانه راسی به عنوان بهترین بافت گیاهی مورد استفاده انتخاب گردید. جوانه های راسی پس از جداسازی از گیاهان آلوئه ورا به مدت ۴۵ دقیقه زیر آب روان شستشو شدند. سپس در زیر هود لامینار جوانه های راسی درون محلول ۲٪ از هیپوکلریت سدیم (NaClO) به مدت ۱۰ دقیقه غوطه ور شده و پس از ۳ مرتبه شستشو با آب دوبار تقطیر، به مدت ۲-۳ دقیقه درون اتانول ۷۰٪ قرار داده می شدند. در پایان پس از ۳-۴ دقیقه غوطه ور بودن جوانه های راسی درون محلول ۰,۱٪ کلرید جیوه (II) با آب دوبار تقطیر ۳ مرتبه شستشو شدند.

پس از قرار دادن جوانه های راسی در درون محیط کشت MS که همراه با هورمون های BA و NAA با ترتیب غلظت های ۱ mg/l و ۰,۵ mg/l بودند محیط ها در اتاقک های رشد قرار داده شدند.

جوانه های راسی مورد استفاده، برخی واجد حلقه های متعددی در قاعده جوانه راسی و برخی نیز فاقد این حلقه ها بودند. مقایسه نحوه رشد جوانه های راسی در زیر نورهای مختلف، اختلاف قابل توجهی را از لحاظ رشد جوانه ها و ریشه ها در هیچ یک از نمونه ها نشان ندادند و تنها تغییری که به صورت ظاهری قابل تشخیص بود رنگ سبز تیره جوانه های رشد یافته

زیر نور قرمز+ آبی در مقایسه با نورهای آبی، قرمز و سفید بود. به همین منظور جهت مقایسه علمی، آزمایش طیف نورسنجی کلروفیل انجام شد تا با قطعیت در مورد آن اظهار نظر گردد. بدنبال صحت نتایج حاصل از طیف نورسنجی به کمک آنالیز واریانس و متعاقب آن آزمون Tukey پس از سنجش غلظت کلروفیل های a و b، مقدار کلروفیل a در نمونه های زیر نور قرمز+ آبی به میزان 0.2638 mg و نمونه های زیر نور آبی 0.2626 mg به ازای هر گرم بافت تازه گیاه آلوئه ورا بودند.

مقدار غلظت کلروفیل b نیز در نمونه های زیر نور آبی و قرمز+ آبی نسبت به نمونه های زیر نور قرمز و سفید افزایش نشان دادند و مقادیر آن ها به ترتیب 0.1856 mg و 0.1555 mg به ازای هر گرم بافت تازه گیاه آلوئه ورا بودند.

گیاهچه های ریشه دار شده نیز پس از انتقال به خاک در اتاق سازگاری پس از ۳-۴ روز دچار اضمحلال شدند و در نتیجه هیچ یک از نمونه ها نتوانستند در محیط خاک سازگار گردند. با توجه به نتایج بدست آمده از آزمایش حاضر، هیچ گونه تغییری در نحوه رشد نمونه ها زیر نورهای مختلف دیده نشد و تنها غلظت کلروفیل های a و b تحت تاثیر نورهای قرمز+ آبی و آبی قرار گرفتند.

کلمات کلیدی: گیاه آلوئه ورا، کشت بافت، ریزنمونه، هورمون های رشد، LED، کلروفیل،

سازگاری

فصل اول

مقدمه

از دیر باز مردمان تمدن های گوناگون از قبیل مصریان، آشوریان، یونانیان و رومیان به خواص شفا بخش و دارویی گیاهان گوناگون آگاهی داشتند و جهت درمان بیماری ها، جراحات و آسیب ها از گیاهان دارویی استفاده می کردند.

به مرور و با گذشت زمان پیشرفت علوم طبیعی سبب گردید تا دانشمندان با آزمایشات پیاپی و مکرر بطور قطع در مورد خواص دارویی گیاهان مختلف اظهار نظر کنند. یکی از این گونه گیاهان که از گذشته تا به حال مورد توجه قرار داشته گیاه آلوئه ورا است. این گیاه واجد برگ های گوشتی و خاردار است و تمام خواص دارویی و درمانی این گیاه نیز منسوب به ژل های درون همین برگ ها قرار گرفته است. با پیشرفت صنعت داروسازی، آرایشی و بهداشتی تقاضا جهت استفاده از این گیاه رو به فزونی گذاشته است و همین امر باعث شده است که این گیاه در معرض خطر نابودی قرار گیرد. بنابراین برای داشتن مقادیر کافی از ژل این گیاه انبوهی از این گیاه باید همواره در دسترس باشد. یکی از مشکلاتی که موجب می گردد با افزایش سطح تقاضا، این گیاه در خطر نابودی قرار گیرد پایین بودن سرعت رشد این گیاه می باشد و پایه های جدید این گیاه به کندی جایگزین گیاه اصلی می گردند. همچنین در طول سال تنها ۳-۴ جوانه در گیاه مادری ایجاد می گردد. عدم توانایی تکثیر رویشی جهت ایجاد پایه های فراوان از دیگر عوامل کاهش تولید گیاه آلوئه ورا می باشد. بنابراین به منظور رسیدن به اهداف تجاری و سطح تقاضا باید به دنبال راهکارهای دیگر بود.

تکنیک کشت بافت گیاهی، یکی از این روش های موثر در حفظ و ازدیاد گونه های گیاهی می باشد که در موسسات تحقیقاتی دنیا تقریباً در مورد اکثر گونه های مختلف گیاهی انجام می شود. به کمک این روش می توان ژنوم گونه های در حال انقراض و گونه هایی را که از نظر دارویی ارزشمند هستند، حفظ نمود ضمن آنکه به سطح بالایی از تولید گونه های گوناگون گیاهی نیز دست یافت و با صادرات آن ها به درآمدزایی و ایجاد اشتغال کمک کرد.

بکارگیری این فناوری در آزمایشگاه زیست شناسی موسسه آموزش عالی علمی نیز مدتی است آغاز شده است و در دو پژوهش گذشته بررسی و مطالعه نحوه حفظ و ازدیاد یکی از گونه های بومی گیاهی ایران که جزو ثروت ملی محسوب می گردد بنام سوسن چلچراغ (*Lilium ledebouri, Baker*) مورد توجه قرار گرفته است. [۱, ۲]

در حال حاضر تحقیقات گوناگونی بر روی گیاه آلوئه ورا با استفاده از تکنیک کشت بافت گیاهی انجام می گردد. در تمامی این تحقیقات، دستیابی به محیط کشت مناسب از لحاظ میزان غلظت هورمون های جوانه زایی و ریشه زایی هدف اصلی پژوهش ها است و عوامل دیگر نظیر بررسی شدت نور، طول موج های مختلف نوری، میزان غلظت CO_2 و کربوهیدرات مورد استفاده از قلم افتاده اند.

تکنیک کشت بافت گیاهی مستلزم داشتن ژرمیناتور مناسب جهت ثابت نگه داشتن شدت نور، طول نوردهی، میزان رطوبت و دما می باشد. استفاده از لامپ های فلورسنت درون ژرمیناتور موجب از دست رفتن بی رویه انرژی الکتریسیته می گردد در صورتیکه به کمک فناوری های جدید نظیر LED می توان به حفظ انرژی و همچنین تامین نور مناسب با طول موج های دلخواه پرداخت. به همین دلیل منبع نوری مورد استفاده در تحقیق حاضر دیودهای ساطع کننده نور یا LED به جای لامپ های فلورسنت بودند.

علاوه بر بحث انرژی، عوامل تاثیرگذار دیگر نظیر انتخاب طول موج های خاص، در پژوهش های قبلی که بر روی گیاه آلوئه ورا انجام شد مورد بررسی قرار نگرفتند و همین دلایل کافی بود تا جهت تحقیق مورد نظر از LED هم، جهت حفظ انرژی و هم تامین نورهای مختلف رنگ موردنظر استفاده گردد.

۱-۱-۱ اهداف

۱. انتخاب مناسب جوانه های راسی جهت کشت بافت

۲. بررسی نحوه رشد و نمو ریز نمونه های انتخاب شده در زیر نور های مختلف

۳. بررسی چگونگی تاثیر نورهای مختلف بر میزان کلروفیل های جوانه های شکل گرفته

در محیط کشت

۴. بررسی چگونگی رشد گیاهچه های ریشه دار پس از انتقال به محیط خاک در اتاق

سازگاری

فصل دوم

مروری بر منابع

۲-۱ گیاه آلوئه ورا (Aloe vera)



شکل ۲-۱ نمونه ای از جنس آلوئه و محل رشد ساقه واجد گل (عکس از مولف)



شکل ۲-۲ نمونه ای از گل جنس آلوئه (عکس از مولف)

نام آلوئه ورا به نظر می رسد که از لغت “ – als alòs” در زبان یونانی به معنای “نمک” گرفته شده باشد، چرا که طعم تلخ این گیاه مشابه طعم آب دریا است. [۳] این گیاه با ظاهری شبیه به کاکتوس، گیاهی دائمی، گوشتی و آبدار است. اگر تیغ هایی را که در لبه برگ ها قرار دارند جدا کنند از محل به جای مانده ژلی ترشح می شود که تمام خواص گیاه در آن نهفته است. این گیاه پایدار و چند ساله است و هر شش تا نه ماه یک بار می توان از هر بوته ۳ تا ۴ برگ کناری را برداشت و برای استخراج ژل آن اقدام کرد. [۳]

تاریخچه کاربرد دارویی این گیاه به بیش از چهار هزار سال برمی گردد که از مجموعه لوحه های سفالی سومریان که قریب به ۲۱۰۰

سال قبل از میلاد می زیسته اند، کشف شده است. [۴] در افسانه های به جای مانده از مصر باستان آمده است که آلوئه ورا گیاهی چنان گرامی است که افراد برای حضور در مراسم پس از مرگ یک فرعون باید تحفه ای از برگ های آلوئه ورا تقدیم کنند زیرا مصریان باستان این گیاه را به نام “گیاه جاودانگی” می خواندند. [۵]

بر طبق افسانه های دیگر، ملکه نفرتی تی (Nefertiti) و کلئوپاترا (Cleopatra) که به ترتیب در قرون چهاردهم و اول قبل از میلاد می زیسته اند، از ژل آلوئه برای حفظ زیبایی شان

استفاده می کردند. [۶] مصریان باستان تنها ملتی نبودند که آلوئه ورا را می شناختند. بر اساس منابع قدیمی، ارسطو یکی از طرفداران بسیار معتقد خواص آلوئه ورا بوده است. قدر و ارزشی که او برای آلوئه ورا در ترمیم زخم قائل بود چنان بوده است که در سال ۳۲۵ قبل از میلاد در مقام مشاور به اسکندر اصرار می کند تا جزیره سوکوترا (Socotra) را تصرف کند. تا اینکه در سال ۳۳۳ قبل از میلاد، اسکندر برای درمان زخم های سربازان، جزیره سوکوترا را به تصرف خود در می آورد. [۷]

آشوریان نیز از ژل آلوئه ورا در درمان علائم دردناک گاز روده و ترش کردن معده استفاده می کردند. همچنین مردمان تمدن های دیگر از قبیل رومی ها، آفریقایی ها، سرخپوستان آمریکایی، مایایی ها، بابلی ها و چینی ها از این گیاه در موارد دارویی و آرایشی استفاده می کردند. [۵]

۲-۲ گیاه شناسی تیره لیلیاسه (Liliaceae)

یکی از تیره های سلسله گیاهی که از نظر گلکاری نیز جزو مهمترین دسته می باشند، تیره لیلیاسه است. گیاهان این تیره، دارای پیاز دائمی اند و ساقه های این گیاهان غیر منشعب، بدون کرک یا کرک دار هستند و معمولاً رنگ سبز روشن و یا بنفش قهوه ای دارند. پریانت (Perianth) (قسمت های بیرونی و غیر زایشی یک گل هستند که غالباً بصورت کاسه و جام گل متمایز می شوند) شامل ۶ گلبرگ است که بصورت دو حلقه سه تایی آرایش یافته اند. اندام نر شامل ۶ پرچم که بصورت ۲ حلقه ۳ تایی قرار می گیرند. این تیره شامل ۲۵۴ جنس و بیش از ۴۰۰۰ گونه است که در سرتاسر جهان پراکنده شده اند. [۸] گیاهان این تیره اهمیت اقتصادی و دارویی بسیاری دارند. مارچوبه، تره، موسیر، پیازچه و سیر به عنوان ماده غذایی یا چاشنی، کشت و زرع می شوند در صورتیکه صبر زرد، پیاز عنصل (Urginea)، و وراتروم (Veratrum) دارای ارزش دارویی اند. پیاز گل حسرت (*Colchicum autumnal*) که آکالوئید کلشی سین از آن استخراج می شود در کارهای بهنژادی سبب پلی پلوئیدی سلول می

گردد. گونه های زیادی از این تیره فقط جنبه تزئینی داشته و غالباً در باغچه ها کاشته می شوند.[۹]

۲-۳ گیاه شناسی و پراکنش گیاه آلوئه ورا

Kingdom: Plantae

Phylum: Anthophyta

Class: Monocotyledonae

Subclass: Liliidae

Order: Liliales

Family: Aloeaceae

Genus: Aloe

نام علمی این گیاه *Aloe vera L* و یا *Aloe barbadensis Miller* می باشد و همانطور که در رده بندی گیاه آلوئه ورا نیز آمده است متعلق به خانواده Liliaceae یا سوسن سانان می باشد.[۶] آلوئه ورا یا صبر زرد، گیاهی چند ساله دارای برگ های گوشتی و آبدار با ظاهر بوته ای انبوه است. این گیاه طی مدت ۴ سال به گیاه بالغ تبدیل می شود و در این مدت واجد

برگ هایی به اندازه ۶۰ تا ۹۰ سانتی متر خواهد شد. در شرایط آرمانی وزن هر یک از برگ های گیاه به ۱ تا ۱,۵ کیلوگرم خواهد رسید. برگ ها نیزه ای مانند، پهن و تیغ دار است و مستقیم به محور ساقه متصل اند. رنگ آن ها سبز یا سبز مایل به خاکستری می باشد.[۱۰]

در ساختمان برگ های این گیاه دو بخش اصلی را می توان دید:

پوسته سبز خارجی که شامل دسته های آوندی می باشد اولین بخش برگ را می سازد و قسمت مرکزی و درونی که شامل سلول های پارانشیم می باشد. سلول های پارانشیمی، همان محل ذخیره ژل گیاه آلوئه ورا می باشد.[۱۱] این گیاه دارای ساقه ای چوبی و کوتاه بوده و گل های زنگوله ای و واژگون در رنگ های زرد و یا قرمز دارد.[۱۰] گیاه آلوئه ورا بومی مناطق مدیترانه ای شامل جنوب اروپا، آفریقای شمالی و جزایر قناری می باشد.[۱۲]

گیاه آلوئه ورا در آب و هوای گرمسیری و نیمه گرمسیری بر راحتی رشد می کند اما امروزه، بدلیل سازگاری زیاد این گیاه به مناطق بسیار گرم و مرطوب، در اکثر مناطق مختلف جهان از قبیل آسیا، آمریکای مرکزی و جنوبی، مکزیک، ایالات جنوبی آمریکا کشت می شود. [۱۰]



شکل ۲-۳ *Aloe saponaria*
(http://en.wikipedia.org/wiki/Aloe_saponaria)

۲-۴ طبقه بندی جنس آلوئه

یک راه بسیار عمومی و کلی جهت تمایز گونه های مختلف جنس گیاه آلوئه، مشاهده تنه (Trunk) و برگ گیاه می باشد. در این روش ساده می توان گیاهان آلوئه را در ۳ گروه بزرگ جای داد.

الف) گروهی که گیاهان آن تنه ندارند و آن

ها را *acauleas* می نامند.

در این دسته *Aloe barbadensis*

Miller, Aloe saponaria, Aloe

aristata نمونه هایی از این گیاهان هستند

که در این دسته جای می گیرند.



شکل ۲-۴ *Aloe succotriner*
(http://en.wikipedia.org/wiki/Aloe_succotriner)

ب) گروه دوم که *Aloe succotriner* و

Aloe chinesis نمونه هایی از این دسته

به شمار می آیند واجد تنه چوبی کوتاه قامتی هستند که گاهی به ارتفاع ۳۰ سانتی متر هم

می رسد. به این گروه *subcauleas* می گویند.



ج) گروه سوم که با تنه ای بزرگ و منشعب از سایر گروه ها متمایز می شوند cauleas نام دارند و *Aloe ferox*, *Aloe arborescence* نمونه هایی از این دسته به حساب می آیند. ارتفاع این گیاهان معمولا تا چندین متر نیز می رسد. [۱۳]

شکل ۵-۲ *Aloe ferox*

(http://en.wikipedia.org/wiki/Aloe_ferox)

۵-۲ ترکیبات شیمیایی و خواص درمانی آلوئه ورا

مطالعات صورت گرفته بر روی گیاه آلوئه ورا نشان داده است که برگ های این گیاه واجد ۷۵ ترکیب مختلف است که هر یک به جهت درمانی، نقش های بسیاری را ایفا می کنند. خلاصه ای از این ترکیبات در جدولی که در صفحه بعد ترسیم شده، آمده است. [۱۱، ۱۴، ۱۵]

جدول ۱-۲. ترکیبات موجود در ژل گیاه آلوئه ورا

(Hamman, J.H. Composition and application of Aloe vera leaf gel. *Molecules* 13)

Class	Compounds
Anthraquinones/anthrones	Aloe-emodin, aloetic-acid, anthranol, aloin A and B (or collectively known as barbaloin), isobarbaloin, emodin, ester of cinnamic acid
Carbohydrates	Pure mannan, acetylated mannan, acetylated glucomannan, glucogalactomannan, galactan, galactogalacturan, arabinogalactan, galactoglucoarabinomannan, pectic substance, xylan, cellulose
Chromones	8-C-glucosyl-(2'-O-cinnamoyl)-7-O-methylaloediol A, 8-C-glucosyl-(S)- aloesol, 8-C-glucosyl-7-O-methyl-(S)-aloesol, 8-C-glucosyl-7-O-methylaloediol, 8-C-glucosyl-noreugenin, isoaloeresin D, isorabaichromone, neoaloesin A
Enzymes	Alkaline phosphatase, amylase, carboxypeptidase, catalase, cyclooxygenase, cyclooxygenase, lipase, oxidase, phosphoenolpyruvate carboxylase, superoxide dismutase
Inorganic compounds	Calcium, chlorine, chromium, copper, iron, magnesium, manganese, potassium, phosphorous, sodium, zinc
Miscellaneous including organic compounds and lipids	Arachidonic acid, γ -linolenic acid, steroids (campesterol, cholesterol, β - sitosterol), triglycerides, triterpenoid, gibberillin, lignins, potassium sorbate, salicylic acid, uric acid
Non-essential and essential amino acids	Alanine, arginine, aspartic acid, glutamic acid, glycine, histidine, hydroxyproline, isoleucine, leucine, lysine, methionine, phenylalanine, proline, threonine, tyrosine, valine
Proteins	Lectins, lectin-like substance
Saccharides	Mannose, glucose, L-rhamnose, aldopentose
Vitamins	B1, B2, B6, C, β -carotene, choline, folic acid, α -tocopherol

تاکنون خواص درمانی بسیاری را به گیاه آلوئه ورا نسبت داده اند که به برخی از موارد مهم

آن اشاره می شود.

باربالوئین (Barbaloin) موجود در برگ آلوئه ورا اثر تحریک کننده قوی بر روی روده دارد و به عنوان مسهل قوی عمل می کند. کاربرد موضعی آن نیز اثر ضد خارش دارد.

پلی ساکارید های با خصلت ژلاتینی اثرات موضعی بر روی پوست و مخاط می گذارند و به عنوان یک سد در برابر عوامل تحریک کننده شیمیایی و فیزیکی عمل می کنند. از این ویژگی در درمان زخم های سطحی، سوختگی، التهابات معدی- روده ای و زخم های معده استفاده می شود. [۶]

اثر ضد التهابی ژل آلوئه ورا را به ترکیباتی مانند سیلیکات منیزیم، برادیکیناز و آلوکتین A نسبت می دهند که مانع از سنتز پروستاگلاندین می شود. ژل آلوئه ورا در بهبود پوستی که در معرض تشعشع امواج قرار گرفته بسیار موثر بوده است. [۱۶, ۱۷]

وجود آنتراکوئینون های متنوع در آلوئه ورا خاصیت ضد عفونی کننده ای قوی بر روی باکتری ها از جمله استافیلوکوک، استرپتوکوک، سالمونلا و قارچ ها مانند *Candida albicans* دارد. [۱۸, ۱۹]

محلول خوراکی ژل آلوئه ورا موجب کاهش قند خون می گردد و مصرف همزمان آن با داروی Glibenklamid موجب افزایش تاثیر این دارو در کاهش قند خون می گردد. [۲۰]

ژل آلوئه ورا موجب تعدیل دستگاه ایمنی می گردد و این اثر را به فعال سازی سلول های ماکروفاژ جهت تولید نیتریک اکسید، اینترلوکین ۱، اینترلوکین ۶، اینترفرون گاما و α -TNF نسبت می دهند. [۲۱]

وجود برخی آنزیم ها مانند Glutathione peroxidase و Superoxide dismutase تاثیر آنتی اکسیدانی بسیار قوی دارند که در ژل آلوئه ورا نهفته است. همچنین وجود ویتامین های C و E قدرت آنتی اکسیدانی ژل آلوئه ورا را افزایش می دهند. [۱۴, ۲۲] مطالعات صورت گرفته بر روی ژل آلوئه ورا این موضوع را به اثبات رساند که ژل آلوئه ورا به میزان ۳۰۴٪ و ۳۶۹٪ به ترتیب جذب روده ای ویتامین های C و E را افزایش داده است. [۲۳] همچنین

مطالعات صورت گرفته بر روی اثر ضد ویروسی ژل آلوئه ورا نشان داده است که مصرف همزمان ژل آلوئه ورا با داروی azidothymidine (AZT) و acyclovir مانع از تکثیر ویروس های ایدز (AIDS) و هرپس (Herpes) در بیماران مبتلا گردیده است. [۲۴]

۲-۶ روش تکثیر گیاه آلوئه ورا

۲-۶-۱ تکثیر رویشی یا غیر جنسی

گیاه آلوئه ورا بطور متوسط ۱۲ سال عمر می کند و طی این سال ها، هر سال تعداد ۳ الی ۴ جوانه کوچک از کنار گیاه مادر بوجود می آید که این توانایی را دارد تا پس از جدا شدن، بطور مستقل به رویش خود ادامه دهد. البته به دلیل حساسیت جوانه ها در مراحل اولیه رشد، ترجیحا باید در محیطی به دور از نور شدید آفتاب قرار گیرند. [۲۵-۲۸]

۲-۶-۲ تکثیر جنسی

هر سال تابستان، گیاه آلوئه ورا از مرکز برگ های گوشتی یک ساقه بلند و نسبتا سخت ایجاد می کند که در بالای آن، گل هایی به رنگ زرد و یا متمایل به نارنجی- قرمز بوجود می آید. اما بدلیل نازا بودن دانه های گرده گل های نر، تولید بذرهای زایا نیز امکان پذیر نمی باشد. [۲۶، ۲۹-۳۲]

۲-۷ تکثیر از طریق کشت بافت گیاهی

۲-۷-۱ تاریخچه و مبانی کشت بافت

به حفظ و تکثیر سلول ها یا بخشی از اندام یک گیاه در محیط فاقد عوامل بیماریزا و مصنوعی کشت بافت گفته می شود. این روش دامنه وسیعی از اندام های گیاهی از جمله سلول، پروتوپلاست، ساقه، ریشه و جنین را شامل می شود. با استفاده از این روش مطالعات

سیتولوژیکی، فیزیولوژیکی، تمایز یابی و ریخت زایی قسمت های مختلف گیاه که بیشتر میسر می شود استفاده شد. اولین مطالعات صورت گرفته که منجر به پایه ریزی کشت بافت گردید توسط Henri- Louis Duhumal du Monceau و در سال ۱۷۵۶ بر روی ترمیم زخم در گیاهان آغاز گردید. به مرور و با مطالعات بیشتر فرضیه توانمندی سلول توسط Schwann و Schleiden مطرح شد که طی این تئوری یک سلول قادر به تشکیل و تکامل به یک گیاه کامل است. [۳۳] اولین نمونه از کار کشت بافت توسط Haberlandt و در سال ۱۹۰۲ آغاز گردید. او کارش را بر روی گیاه *Tradescantia Sp* شروع کرد و با جدا نمودن یک سلول از برگ این گیاه و قرار دادن آن در محیط کشت موفق به مشاهده تقسیمات سلولی گیاه گردید اما نتوانست گیاه کاملی را ایجاد کند. [۳۴، ۳۵] در سال های بعد Gautheret توانست اولین گیاه کامل را از رشد ریشه هویج گزارش دهد. [۳۴] در ادامه پیشرفت هایی که در زمینه کشت بافت در حال وقوع بود Skoog and Miller مقاله ای را منتشر ساختند که در آن به تاثیر متقابل اکسین ها و سایتوکینین ها اشاره کردند و نشان دادند که غلظت های بالای اکسین نسبت به سایتوکینین سبب القای رشد ریشه ای در گیاه تنباکو می گردد ولی از شاخه زایی ممانعت به عمل می آورد. [۳۶] امروزه بسیاری از گیاهان، به کمک این روش در سطح انبوه تکثیر می شوند و مطالعاتی که بر روی گیاه آلوئه ورا نیز صورت پذیرفته روشن ساخته است که این گیاه را نیز می توان به فراوانی از این طریق تکثیر نمود تا نیاز تجاری و اقتصادی آن مرتفع گردد. [۳۷، ۳۲] هم اکنون کاربرد های متداول کشت بافت به ۵ دسته تفکیک می شوند که عبارتند از:

(۱) مطالعه رفتار سلولی

(۲) تغییر و بهبود گیاه

(۳) تولید گیاهان عاری از عوامل بیماری زا و حفظ ژرم پلاسما

(۴) تکثیر هم گروه ها (clones)

(۵) تولیدات ثانویه گیاهی [۳۸]

۸-۲ تنظیم کننده های رشد

گیاهان به دلیل طبیعت بی حرکت، ساکن و همچنین دوره زندگی طولانی مدت شان، به گونه ای رشد و نمو می یابند که توانایی مقابله با موقعیت های بسیار دشوار آب و هوایی و تهدیدات ناشی از موجودات مهاجم و صیاد را داشته باشند. بنابراین، گیاهان توانایی بسیاری در سازگاری با محیط پیرامون خود را دارا هستند که بسیاری از این سازگاری ها در ارتباط با رشد و نمو و تغییر در نوع متابولیسم گیاه می باشد. این حالت به گیاه کمک می کند تا بهترین حالت سازگاری را جهت ادامه زندگی انتخاب کند.

یکی از مهمترین توانایی ها، آغاز مجدد تقسیمات سلولی تقریباً از هر بافت گیاه است. این قابلیت که پرتوانی (Totipotency) نام دارد به گیاه اجازه می دهد تا در پاسخ به تحریکات گوناگون، مسیرهای متابولیسمی متفاوتی را انتخاب کند و یا به باززایی اندام از دست رفته بپردازد. مواجهه با چنین موقعیتی، در محیط های کشت سلولی نیز بوقوع می پیوندد و ریز نمونه (Explant) بکار رفته در محیط کشت، با توجه به نوع ترکیبات شیمیایی بکار گرفته شده، به محیط خود پاسخ مناسبی می دهد. به سبب چنین ویژگی، انتخاب یک محیط کشت مناسب و مخصوص منجر به هدایت سلول های گیاهی در مسیر مناسبی از رشد و نمو خواهد شد. تنظیم کننده های رشد یکی از ترکیبات مهم و حیاتی محیط های کشت می باشند. متداول ترین تنظیم کننده های رشد که در محیط های کشت بکار می روند عبارتند از: اکسین ها، سایتوکینین ها و بندرت جبرلین ها. [۳۹]

۸-۲-۱ تنظیم کننده های رشد اکسینی

لغت اکسین یک واژه یونانی است و از "Auxein" به معنی رشد یا بزرگ شدن گرفته شده است و برای اولین بار توسط Kogl، Hagen-Smit و Went برای ماده خاصی که موجب ایجاد خمیدگی در *Avena coleoptil* می شود، بکار برده شد.

اکسین ها گروهی از هورمون های گیاهی هستند که باعث طول شدن سلول های گیاهی می گردند. این مواد طیف گسترده ای از واکنش های رشد و نمو گیاهان را سبب می شوند. مهمترین اثراتی که تاکنون به تنظیم کننده های رشد اکسینی نسبت داده شده اند عبارتند از: بزرگ شدن سلول گیاهی، طول شدن ساقه گیاه، تولید ریشه، تولید آوند چوبی، افزایش رشد جوانه راسی، جلوگیری از رشد جوانه جانبی، تشکیل میوه، بزرگ شدن میوه، تشکیل گرهک (Nodule) در ریشه گیاهانی که دارای باکتری های تثبیت کننده نیتروژن هستند، جلوگیری از ریزش برگ، بیوسنتز پروتئین و RNA، ژئوتروپیسم (Geotropism) و فتوتروپیسم (Phototropism)، ظهور اندام های جنسی و.....

مطالعات صورت گرفته بر روی اثر القایی اکسین به همراه ترکیبات بازدارنده اکسین نشان داده اند که اکسین باعث افزایش سنتز RNA و پروتئین در سلول می شود. [۴۰] اکسین ها عمدتاً در بخش های مریستمی گیاه به خصوص جوانه های راسی و برگ های جوان بیوسنتز می شوند. در مورد اکسین گفته شده است که ایندول استیک اسید (IAA)، که تنها اکسین ایندولی طبیعی می باشد، از نظر ساختمان شیمیایی شبیه به اسید آمینه تریپتوفان است و از آن نیز سنتز می شود. اکسین ها با توجه به غلظتی که در محیط کشت بکار می رود اثرات بازدارندگی یا تحریکی خواهند داشت. موثرتر بودن یک اکسین نه تنها به غلظت آن، بلکه به نوع فعل و انفعالات و قسمتی که بر روی آن تاثیر می گذارد بستگی دارد. امروزه با پیشرفت هایی که در زمینه سنتز ترکیبات شیمیایی صورت گرفته است انواع اکسین های مصنوعی برای اهداف گوناگون ساخته شده است. اکسین های مصنوعی ترکیباتی هستند که فعالیت های شیمیایی مشابه IAA را دارند ولی از نظر ساختمانی شبیه به آن نیستند و به شش گروه تقسیم می شوند:

الف) مشتقات ایندول: ایندول-۳- استیک اسید (IAA)، ایندول-۳- بوتیریک اسید (IBA)

ب) اسید های بنزوئیک: ۲و۳ و ۶ تری کلرو بنزوئیک اسید، ۲- متوکسی ۳و۶- دی کلرو

بنزوئیک اسید

پ) اسید های نفتالین: α و β نفتالین استیک اسید (α و β -NAA)، کلرو فنوکسی استیک اسید، ۲و۴-تری کلرو فنوکسی استیک اسید (2,4,5-T) و ۲و۴-دی کلرو فنوکسی استیک اسید (2,4-D)

ت) اسید های نفتوکسی استیک: α و β نفتوکسی استیک اسید (α و β -NOA)

ث) اسید های پیکولینیک: ۴-آمینو-۳و۵و۶-تری پیکولینیک اسید. [۴۱]

از اکسین های IAA، NAA، IBA و 2,4-D جهت القای تقسیمات سلولی و انگیزش ایجاد ریشه استفاده می شود. اکسین ها به گرما مقاومند و دمای °C ۱۲۰-۱۱۰ را به مدت ۱ ساعت نیز تحمل می کنند. پایداری NAA و 2,4-D از دیگر اکسین ها بیشتر بوده و همانند IAA نیز عمل می کنند. [۴۲] NAA همانند IAA می باشد و در غلظت های کم نیز باعث ایجاد رشد و تمایز بیشتری می شود. معمولاً از اکسین های مصنوعی و موثرتر همچون NAA، IBA و 2,4-D در غلظت های ۱-۰,۰۱ mg/l استفاده می شوند. [۴۳]

۲-۸-۲ تنظیم کننده های رشد سایتوکینینی

سایتوکینین یک واژه عمومی است که به گروهی از تنظیم کننده های رشد اطلاق می گردد که در تقسیمات سلولی موثرند. سایتوکینین های طبیعی که در گیاهان یافت می شوند از لحاظ ساختار شیمیایی مشتقاتی از پورین هستند. دو نمونه از سایتوکینین هایی که بطور طبیعی در گیاهان یافت می شوند زآتین (Zeatin) و N^6 -(2-isopentyl) adenine (2iP) می باشند. [۴۴] سایتوکینین ها در نواحی مریستمی و نواحی دارای پتانسیل رشد زیاد مانند ریشه ها، برگ های جوان، میوه های کامل و بذور به مقدار زیاد وجود دارند. [۴۵] علاوه بر تحریک تقسیم سلولی، بسیاری دیگر از واکنش های بیولوژیکی را نیز نظیر اندام زایی، به تعویق انداختن پیری، باز و بسته شدن روزنه ها، تکامل جوانه ها و شاخه ها، انتقال انتخابی مواد غذایی و مواد آلی به بافت های تیمار شده و به سایتوکینین ها نسبت می دهند. [۴۶] علیرغم

وجود دو نمونه از سایتوکینین های طبیعی که در گیاهان نیز سنتز می شوند، با این حال از سایتوکینین های مصنوعی جهت کشت بافت استفاده می گردد بدین خاطر که سایتوکینین های طبیعی هم ناپایدار و هم جهت استخراج بسیار هزینه بر هستند.

برخی نمونه های سایتوکینین های مصنوعی عبارتند از بنزیل آمینو پورین (BAP)، کینتین (Kinetin) و تیدیازورون (Thidiazuron). [۴۴] معمولا از سایتوکینین ها در محدوده غلظت ۰,۰۱-۱۰ mg/l استفاده می کنند. [۴۲]

در کشت بافت گیاهی، نوع ریخت زایی عمدتا به نسبت غلظت اکسین ها و سایتوکینین های موجود در محیط کشت بستگی دارد. شروع رشد ریشه ها در گیاهچه ها، رویان زایی و تشکیل کالوس همگی در صورت زیاد بودن نسبت اکسین به سایتوکینین می باشد. در حالیکه پرآوری شاخساره نابجا و جانبی هنگامی انجام می شود که نسبت سایتوکینین ها به اکسین ها بیشتر باشد. [۴۷]

بر اساس تقسیم بندی پیریک (Pierik)، کشت ها را می توان با توجه نیازشان به اکسین و سایتوکینین به ۴ دسته تقسیم کرد:

الف) کشت هایی که به اکسین و سایتوکینین نیازی ندارند.

ب) کشت هایی که فقط به اکسین نیاز دارند.

ج) کشت هایی که فقط به سایتوکینین نیاز دارند.

د) کشت هایی که هم به اکسین و هم به سایتوکینین نیاز دارند. [۴۸]

۹-۲ مروری بر تحقیقات انجام شده

از زمانیکه اسکوگ و میلر گزارش کردند که تمایز یابی اندام های نابجا در کشت کالوس با تعادل بین اکسین و سایتوکینین مورد استفاده در محیط کشت کنترل می گردد دانشمندان زیادی گزارشاتی را دال بر وقایع مشابه در تعداد وسیعی از گونه های گیاهی ارائه کردند.

گونه های مختلف و حتی ارقام یک گونه نیازهای متفاوتی به این تنظیم کننده ها نشان می دهند و گزارش های کمی در مورد قابلیت باززایی و کیفیت تولید گیاهچه در مورد آلوئه ها بدست آمده است که در ذیل به برخی از آن ها اشاره می گردد.

در آزمایشی اثر سایتوکینین BA بر روی فعالیت جوانه های جانبی *A. polyphylla* مورد مطالعه قرار گرفت. در این آزمایش بیشترین تعداد جوانه ها یعنی میانگین ۱۴ عدد جوانه، توسط ۱ میلی گرم در لیتر BA بر روی محیط کشت MS بدست آمد. همچنین در این آزمایش بیشترین تعداد ریشه ها بر روی محیط کشت MS به همراه ۰,۵ میلی گرم در لیتر IBM بدست آمد. [۴۹]

در مطالعه ای دیگر به منظور تکثیر از طریق کشت بافت مطالعاتی بر روی اثر غلظت های متفاوت BA, NAA و sucrose بر روی گونه *A. vera L. var. chinesis* صورت گرفت. نتایج حاصل از این آزمایشات نشان دادند که بیشترین تعداد جوانه ها در محیط کشت MS و در حضور غلظت های ۲ میلی گرم در لیتر BA ، ۰,۳ میلی گرم در لیتر NAA و ۳۰ گرم بر لیتر sucrose بدست آمد. نتایج این آزمایشات نشان دادند که غلظت sucrose به عنوان یکی از عوامل اصلی در تولید گیاهچه ها به حساب می آید. همچنین بهترین محیط کشت مطلوب جهت ریشه زایی در حضور تنها ۰,۲ میلی گرم در لیتر NAA بدست آمد. [۳۷]

بر روی گونه دیگری از جمله *A. vera L* مطالعات بیشتری توسط محققین در سرتاسر جهان صورت گرفته است. در طی آزمایشات متنوعی که انجام شده است نتایج متفاوتی بدست آمده است که یکی از دلایل اصلی آن راتغییر اندک در ژنوتیپ متفاوت هر یک از این گونه ها ذکر کرده اند که در زیر به چند نمونه از آن ها اشاره می شود.

در تحقیقی بر روی *A. vera L* در بنگلادش، نشان داده شده است که جهت تولید و تکثیر جوانه ها از طریق کشت بافت، بهترین محیط برای این منظور، محیط کشت MS در حضور ۲ میلی گرم در لیتر BA ، ۰,۵ میلی گرم در لیتر KIN و ۰,۲ میلی گرم در لیتر NAA می باشد.

همچنین بهترین محیط کشت برای ریشه زایی، در محیط کشت MS به همراه ۰,۲ و یا ۰,۵ میلی گرم در لیتر NAA است. [۵۰]

در پژوهش دیگری که بر روی این گیاه صورت گرفته است نشان داده اند که ریزنمونه ها در محیط کشت MS به همراه ۲ میلی گرم در لیتر BAP و ۰,۵ میلی گرم در لیتر NAA بیشترین تعداد جوانه ها را ایجاد کردند و بهترین محیط جهت ریشه زایی محیط واجد ۰,۵ میلی گرم در لیتر NAA بوده است. [۳۱]

در تحقیقی دیگر که بر روی گیاه آلوئه ورا که در جنوب ایران انجام شده است بهترین محیط کشت را جهت جوانه زایی محیط کشت MS در حضور ۱ میلی گرم در لیتر KIN و ۰,۱ میلی گرم IAA معرفی کرده اند. هم چنین جهت ریشه زایی به عنوان بهترین محیط، محیط کشت MS معرفی گردیده است. در این آزمایش به منظور تکثیر آلوئه ورا از طریق کشت بافت، علاوه بر جوانه راسی از ریزنمونه های برگ این گیاه هم استفاده شد. نتایج نشان داد که برگ های این گیاه، قابلیت تکثیر در شرایط درون شیشه ای را ندارد و بافت پس از مدتی قهوه ای شده و از بین می رود. [۵۱]

در مطالعه ای دیگر که به منظور استفاده بهینه از مقادیر کم جوانه های راسی صورت گرفته بود نشان داده شد که اگر جوانه های راسی را به دو قسمت تقسیم کرده و آن ها را در محیط کشت قرار دهیم نتایج مناسب تری حاصل خواهد شد. همچنین بهترین محیط کشت جهت تولید و تکثیر جوانه ها نیز محیط کشت MS در حضور ۸ میلی گرم در لیتر BAP و ۱ میلی گرم در لیتر IAA به همراه ۵۰ میلی گرم برلیتر آدنین سولفات معرفی گردید. همچنین مناسب ترین محیط جهت ریشه زایی محیط کشت MS به همراه ۰,۱ میلی گرم در لیتر IAA انتخاب گردید. [۵۲]

در تحقیقی دیگر که بر روی این گیاه صورت گرفت، معلوم گردید که قسمت های مریستمی به همراه بخش هایی از قاعده برگ ها که واجد گره های مریستمی هستند نتایج بهتری را بدست

می دهند. این نتایج در محیط کشت MS به همراه ۱۱,۴۲ میکرو مولار IAA، ۹,۸ میکرو

مولار IBA و ۸,۸۸ میکرو مولار BA بدست آمدند. [۲۶]

در پژوهشی دیگر، از جوانه های جوان جانبی که بر روی ریزوم گیاه و در زیر خاک بوجود آمده بودند، استفاده گردید. این آزمایش به منظور ایجاد کالوس از ریزنمونه جوانه و به دنبال آن ایجاد گیاه کامل طراحی شده بود. محققین این آزمایش موفق شدند که در محیط کشت MS در حضور ۱ میلی گرم در لیتر ۲ و ۴- دی کلرو فنوکسی استیک اسید و ۰,۲ میلی گرم در لیتر

کینیتین (KIN) به القای کالوس دست یابند. [۵۳]

در تمام مواردی که در بالا ذکر شد تنها قسمتی از گیاه که توانایی رشد در محیط کشت را داراست جوانه راسی و یا جوانه جانبی است و هیچ یک از قسمت های دیگر قابلیت تکثیر را ندارند.

فصل سوم

مواد و روش ها

۳-۱ گیاه تحت بررسی

نمونه های گیاهی مورد استفاده جهت آزمایش، تعداد ۴۵ پایه جوان آلوده و را بودند که از گلخانه ای واقع در شهرک الهیه کمال شهر خریداری شدند. این گیاهان حدودا ۱۵-۱۲ برگ گوشتی داشتند.

۳-۲ روش ضد عفونی

برای ضد عفونی نمودن نمونه های گیاهی، با توجه به پژوهش های مشابهی که در این زمینه صورت گرفته است، تلفیقی از روش های مختلف با تغییراتی اندک انتخاب گردید.

مراحل ضد عفونی به صورت زیر انجام شد:

۱. ابتدا پس از خارج ساختن گیاه از خاک، برگ های گیاه از بدنه گیاه جدا گردید.
۲. پس از جدا سازی برگ ها، تقریبا ۱,۵-۲ cm از قسمت جوانه راسی به همراه تعداد ۲-۱ برگ کوچک از گیاه جدا گردید. در ادامه جوانه های راسی داخل بشر و به مدت ۴۵ دقیقه زیر آب روان قرار داده شدند. طی هر ۱۵ دقیقه چندین قطره مایع ظرفشویی به آب اضافه می شد. متعاقب این مرحله بقیه اقدامات در زیر هود لامینار و در شرایط کاملاً استریل انجام گردید.
۳. جوانه های راسی درون محلول ۲٪ از هیپوکلریت سدیم (NaClO) به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفتند و سپس با آب دو بار تقطیر ۳ مرتبه شستشو داده شدند.
۴. جوانه های راسی درون اتانول ۷۰٪ به مدت ۲-۳ دقیقه قرار گرفتند.
۵. بلافاصله جوانه های راسی را درون محلول ۰,۱٪ از کلرید جیوه (II) قرار داده و پس از ۳-۴ دقیقه با آب دو بار تقطیر برای ۳ مرتبه شستشو داده شدند. در ادامه، پس از دور ریختن قسمت هایی که در اثر ضد عفونی کردن تغییر رنگ داده بودند وارد محیط کشت می شدند.

- برای تهیه محلول ۲٪ از هیپوکلریت سدیم، از یک مایع سفید کننده تجاری که حاوی ۵,۴۵٪ ماده موثر هیپوکلریت سدیم بود استفاده گردید. بدین صورت که ۱۸۵ ml از محلول مذکور، با آب مقطر به حجم ۵۰۰ ml رسانده می شد.
- برای تهیه اتانول ۷۰٪، به میزان ۷۰ ml اتانول ۹۶٪ تا حجم ۹۶ ml، آب مقطر اضافه می گردید.
- برای تهیه محلول ۰,۱٪ از کلرید جیوه (II)، مقدار ۵۰۰ میلی گرم از کلرید جیوه (II) در ۵۰۰ ml آب اضافه و حل می شد.

۳-۲-۱ ضد عفونی وسایل آزمایشگاهی

تمام وسایل و ادوات قابل سترون شدن در اتوکلاو همچون لوله های آزمایش، شیشه های کشت، بشر، بالن، پتری دیش و وسایل دیگر نظیر پنبه، پنس ها، اسکالپل و آب مقطر بوسیله اتوکلاو در دمای ۱۲۰ درجه سانتیگراد و فشار $1,7 \text{ lb/in}^2$ به مدت ۲۰ دقیقه استریل می شدند.

در زمان کشت دادن نمونه ها، پنس ها و اسکالپل ها بر روی شعله آتش قرار می گرفتند و این کار نیز پس از کشت هر چند شیشه تکرار می شد. همچنین قبل از شروع کار اتاق کشت به مدت ۲۴ ساعت تحت تابش اشعه ماورای بنفش قرار داده می شد و دستگاه هود لامینار نیز به مدت ۳۰ دقیقه روشن می گردید. هر وسیله مورد استفاده نیز قبل از آنکه زیر هود برده شود با اتانول ۷۰٪ کاملاً ضد عفونی می شد.

۳-۳ تهیه محیط کشت

محیط کشت پایه ای که در کلیه آزمایشات مورد استفاده قرار گرفت، محیط کشت MS (Murashige & Skoog) بود. [۳۶] غلظت هایی که جهت تهیه این محیط کشت مورد استفاده قرار می گیرد در صفحات بعد آورده شده است.

برای تهیه یک لیتر محیط، ابتدا ۶۰۰ ml آب مقطر داخل یک بشر ۲ لیتری ریخته و بر روی یک دستگاه همزن-گرم کن قرار داده می شد. سپس حجم مشخصی از هر محلول ذخیره را با استفاده از پیپت برداشته و به ظرف تهیه محیط کشت اضافه می گردید.

در ادامه موادی چون آگار و ساکارز مستقیماً به محیط کشت اضافه می گردیدند. مقادیر مورد نیاز هورمون های رشد BA، NAA و IBA پس از محاسبه از محلول های ذخیره آن ها به آرامی با استفاده از میکروپیپت برداشته شده و به محیط کشت اضافه می شد. سپس حجم محلول حاصل را به ۱۰۰۰ ml افزایش می یافت و به کمک همزن-گرم کن اجازه داده می شد تا محلول مورد نظر در مدت ۲۰ دقیقه کاملاً به هم زده شود و یک محلول شفاف زرد رنگ حاصل گردد. در آخر، pH محیط کشت با استفاده از NaOH یا HCl یک نرمال، در ۵,۸ تنظیم می گردید. سپس محیط کشت، درون شیشه های کشت به میزان ۲۰ ml توزیع می گردید. پس از بستن در آن ها، شیشه ها به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۰ درجه سانتی گراد و فشار ۱,۷ lb/in² استریل می شدند. پس از اتوکلاو نمودن، اجازه داده می شد تا شیشه ها خنک شده و نهایتاً در درون یخچال با دمای ۱ درجه سانتی گراد نگهداری می شدند تا در زمان مناسب از آن ها استفاده گردند.

جدول ۳-۱. غلظت نمک های تشکیل دهنده محلول های ذخیره ای و محلول اصلی محیط کشت (Slater, A., Scott, N.W. & Fowler, M.R. Plant biotechnology: the genetic manipulation of plants, Edn. 2nd).

Essential element	Concentration in stock solution (mg l ⁻¹)	Concentration in medium (mg l ⁻¹)
<i>Macroelements^a</i>		
NH ₄ NO ₃	33 000	1 650
KNO ₃	38 000	1 900
CaCl ₂ ·2H ₂ O	8 800	440
MgSO ₄ ·7H ₂ O	7 400	370
KH ₂ PO ₄	3 400	170
<i>Microelements^b</i>		
KI	166	0.83
H ₃ BO ₃	1 240	6.2
MnSO ₄ ·4H ₂ O	4 460	22.3
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1 720	8.6
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	50	0.25
CuSO ₄ ·5H ₂ O	5	0.025
CoCl ₂ ·6H ₂ O	5	0.025
<i>Iron source^b</i>		
FeSO ₄ ·7H ₂ O	5 560	27.8
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	7 460	37.3
<i>Organic supplement^b</i>		
Myoinositol	20 000	100
Nicotinic acid	100	0.5
Pyridoxine-HCl	100	0.5
Thiamine-HCl	100	0.5
Glycine	400	2
<i>Carbon source</i>		
Sucrose	Added as solid	30 000

۳-۳-۱ تهیه محلول های ذخیره

به منظور تهیه محیط کشت، ابتدا محلول های مادری با غلظت های چند برابر به شرح زیر تهیه شده و تمامی آن ها در یخچال و در دمای 1 درجه سانتی گراد نگهداری می گردیدند. تمامی مواد شیمیایی و ویتامین ها و هورمون های رشد مورد استفاده در این آزمایشات، ساخت شرکت Merck آلمان بودند.

۳-۳-۱-۱ محلول ذخیره عناصر پر مصرف

عناصر پر مصرف محیط MS همانطور که در جدول نشان داده شده است، در ۲۰ برابر غلظت نهایی محیط کشت ابتدا توزین و سپس در آب مقطر دو بار تقطیر حل می شدند و در

نهایت به حجم یک لیتر رسانده می شد. مقدار حجمی که از این محلول پایه برای تهیه یک لیتر محیط کشت برداشت می شد برابر با ۵۰ ml بود.

۳-۳-۱-۲ محلول ذخیره عناصر کم مصرف

به جز آهن، محلول های کلرید کبالت و سولفات مس، عناصر کم مصرف محیط MS را به میزان ۱۰۰ برابر غلظت اصلی توزین و در آب مقطر دو بار تقطیر حل می گردیدند و حجم محلول حاصل به ۵۰۰ ml رسانده می شد. مقدار حجم مورد استفاده از این محلول برای تهیه یک لیتر محیط کشت برابر با ۵ ml بود.

۳-۳-۱-۳ محلول ذخیره آهن

به منظور جلوگیری از رسوب آهن و در دسترس بودن این عنصر ابتدا هر کدام از ترکیبات $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ و Na_2EDTA را به میزان ۲۰ برابر غلظت اصلی توزین کرده و هر کدام را در ۵۰ ml آب مقطر به صورت جداگانه حل کرده و پس از حل شدن، محلول ها با یکدیگر مخلوط می شدند و محلول به حجم ۲۰۰ ml رسانده می شد.

۳-۳-۱-۴ محلول ذخیره عناصر کم مصرف مس و کبالت

به دلیل اینکه این عناصر باید به میزان بسیار کم استفاده شوند، لذا محلول ذخیره آن ها به صورت جداگانه تهیه می گردید. بدین منظور، ابتدا ۱۰ mg از هر یک از این ترکیبات در ۱۰۰ ml آب مقطر دو بار تقطیر حل می گردید و بعد به میزان ۲۵ ml از این محلول به محلول ذخیره ای عناصر کم مصرف اضافه می گردید.

۳-۳-۱-۵ محلول ذخیره ویتامین ها

همه ویتامین ها پس از توزین به میزان ۲۰ برابر غلظت اصلی در آب مقطر دو بار تقطیر حل گردیده و سپس محلول حاصل به حجم ۲۰۰ ml رسانده می شد. حجم مورد نیاز جهت محیط کشت ۱۰ ml بود.

۳-۳-۱-۶ محلول ذخیره هورمون های رشد

تمامی محلول های ذخیره هورمون های رشد در غلظت ۸ mg در ۱۰ ml آب مقطر تهیه شدند. بدلیل انحلال ناپذیری این هورمون ها، ابتدا آن ها را در چندین قطره سود یک نرمال حل کرده و بعد به حجم نهایی ۱۰ ml رسانده می شدند. سپس بر حسب غلظت مورد نیاز از هورمون مورد نظر حجم مشخصی محاسبه می شد و با میکروپیپت به محیط کشت اضافه می گردید. به عنوان مثال برای بدست آوردن محیط کشت با غلظت هورمونی ۰,۲ میلی گرم در لیتر، مقدار حجمی برابر ۲۵۰ میکرولیتر از محلول ذخیره کشیده و به محیط کشت افزوده می شد.

۳-۳-۲ محیط کشت جوانه زایی

در مدت آزمایش از دو نوع محیط کشت جهت جوانه زایی استفاده گردید. در مورد اولین نمونه غلظت ۱ mg/l از BA و ۰,۲ mg/l از IBA انتخاب گردید. این محیط صرفاً به جهت آشنایی با شرایط کشت بافت تهیه گردید و نمونه های اندکی نیز برای این محیط کشت انتخاب شد. نمونه دیگر که بیشترین نمونه ها در این محیط کشت مورد آزمایش قرار گرفتند محیط کشتی با غلظت هورمونی ۱ mg/l از BA و ۰,۵ mg/l از NAA انتخاب گردید.

۳-۴ مراحل کشت بافت

پس از ضد عفونی جوانه های راسی، آن ها را در محیط کاملاً استریل هود لامینار، و در درون پتری دیش قرار داده و سپس بخش هایی که در اثر ضد عفونی نمودن بافت ها آسیب دیده بودند حذف می گردید. قسمتی که در نزدیکی جوانه های کوچک قرار داشتند وارد محیط کشت می گردید. پس از اتمام کار درهای هر یک از شیشه ها بسته شده و در اتاقک رشد قرار داده می شدند. کشت ها هر هفته از لحاظ آلودگی قارچی و باکتریایی تحت بررسی قرار می گرفتند تا در صورت آلودگی برای رفع آلودگی آن اقدام گردد.

۳-۵ شرایط اتاقک رشد

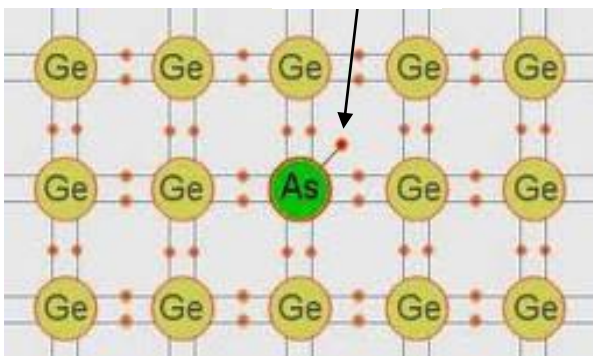
با توجه به اینکه مقایسه شرایط نوری مختلف در این آزمایش مد نظر بود در نتیجه نمونه ها در ژرمیناتور گذاشته نشدند و در عوض هر یک از نمونه ها در اتاقک هایی که بدین منظور تعبیه گردیده بودند، قرار داده می شدند. این اتاقک ها به کمک فناوری جدید LED (دیودهای ساطع کننده نور) نوردهی می شدند بنابراین نیاز بود تا اتاقک ها از میزان شدت نور یکسانی بهره مند باشند. به همین منظور به وسیله نورسنج (Lutron LX- 107) شدت نوری تقریباً در حدود 2300 ± 50 LUX برای اتاقک های مورد نظر تنظیم گردید. برای این آزمایش ۴ اتاقک فراهم شد که عبارتند از اتاقک با نور سفید، اتاقک با نور قرمز به همراه نور آبی، اتاقک با نور قرمز و اتاقک با نور آبی. شرایط طول دوره نوردهی نیز به صورت ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در نظر گرفته شد. درجه حرارت محیط نیز بطور ثابت $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$ بود. علاوه بر اتاقک های واجد LED اتاقک دیگری وجود داشت که به کمک نور سفید فلورسنت نوردهی می شد. این اتاقک هم، شرایط یکسانی همانند نمونه اتاقک های قبلی داشت و نمونه های اولیه که بیشتر جنبه تمرینی داشته است در زیر این اتاقک قرار گرفتند.

۱-۵-۳ دیودهای ساطع کننده نور (LED)

همانطور که از نام آن پیداست، LED دیودی است بر پایه مواد نیمه هادی که هرگاه تحریک شوند از خود نور منتشر می نمایند. اما قبل از آن که به ساختار آن پرداخته شود توضیح مختصری راجع به مواد نیمه هادی و همچنین پیوند n-p داده می شود. مواد نیمه هادی مانند ژرمانیوم و سیلیکون، همانطور که از نامشان پیداست موادی هستند که سطح هدایت جریان الکتریکی در آن ها چیزی ما بین مواد هادی و عایق می باشد. مشخصات مواد نیمه هادی که LED ها هم در ساختار خود از این مواد بهره می برند، بدین گونه می باشد که ویژگیشان با افزوده شدن اتم های ناخالص تغییر می کند و تا حدی خاصیت الکترونیکی آن ها را افزایش می دهد. پیوند های n-p که در تمام انواع دیود ها و LED ها بکارگرفته می شوند ساختارهای منحصر بفردی دارند که بطور خلاصه توضیحی در ذیل ارائه می گردد.

۱-۵-۳-۱ ماده نوع n

الکترون

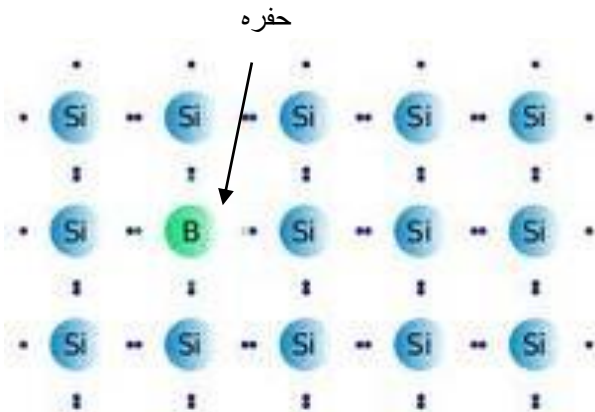


شکل ۳-۱ آرایش اتم ناخالص آرسنیک با اتم های ژرمانیم در ماده نوع n

هر دو ماده نوع n و p با افزودن تعداد از پیش تعیین شده ای از اتم های ناخالص به قطعه ژرمانیوم یا سیلیکون تهیه می شوند. نوع n با افزودن آن دسته عناصر ناخالصی که دارای ۵ الکترون در لایه ظرفیت هستند، مانند آنتیموان، آرسنیک و

فسفر ساخته می شود. اثر یک چنین عناصر ناخالصی در شکل ۳-۱ با استفاده از آرسنیک (As) به عنوان ناخالصی در قطعه ژرمانیوم نشان داده شده است. در این ساختار الکترون اضافی پنجم از اتم ناخالص بدون پیوند باقی می ماند. این الکترون که تقریباً حالت آزاد دارد می تواند در این ماده به راحتی حرکت کند.

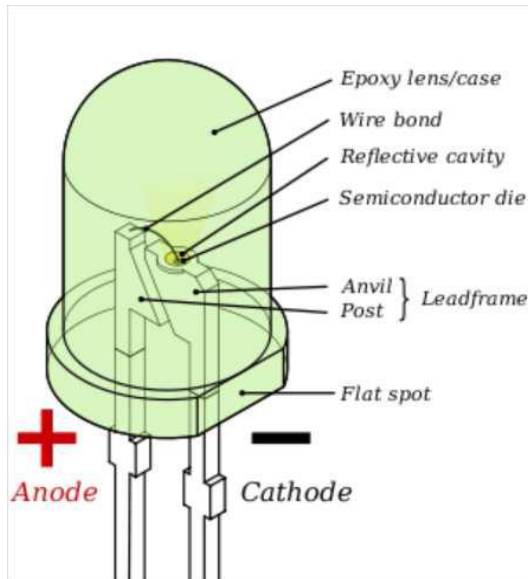
۳-۵-۱-۲ ماده نوع P



شکل ۳-۲ آرایش اتم ناخالص بور با اتم های سیلیکون در ماده نوع p

ماده نوع P از وارد کردن ناخالصی هایی که در مدار ظرفیت فقط سه الکترون دارند در کریستال ژرمانیوم یا سیلیکون خالص بدست می آید. عناصری که غالبا بدین منظور به کار می روند عبارتند از بور، گالیوم و ایندیم. اثر یکی از این

عناصر، یعنی بور در شکل بر روی قطعه سیلیکون نشان داده شده است. در این حالت جهت تکمیل پیوند های اشتراکی کمبود الکترون وجود دارد. به این کمبود نیز حفره گفته می شود و با بار مثبت یا دایره کوچک نشان داده می شود. جهت ساخت LED ها از ترکیب مواد n و p استفاده می شود. [۵۴]



شکل ۳-۳ تصویری از یک ساختمان فیزیکی قطعه LED

۳-۵-۲ ساختار فیزیکی LED

در LED ها به هنگام تغذیه مستقیم، در محل پیوند n-p ترکیب الکترون ها و حفره ها اتفاق می افتد. این ترکیب سبب می شود که الکترون ها مقداری از انرژی خود را بصورت فوتون های نوری و اندکی گرما از دست بدهند. طول موج گسیل شده نیز به انرژی حاصل از فاصله لایه های موادی که پیوند n-p را

بوجود می آورد بستگی دارد. این ویژگی ها باعث می شود که نورهای متنوعی تولید شود. نورهای تولید شده نیز در زمینه های گسترده ای از جمله چراغ های راهنما، صفحات

تلویزیون، ماشین حساب و موارد صنعتی بکار گرفته می شود. با توجه به اندازه کوچک آن ها، طول عمر بیشتر، گسیل طول موج های اختصاصی و ایجاد نورهای آبی، قرمز، سبز و سفید زمینه بکارگیری این نوع منابع نوری جدید را در پژوهش های کشاورزی و کشت بافت نیز فراهم آورده است. [۵۵] در جدول زیر نیز خلاصه ای از ویژگی های LED با نورهای متنوع در صفحه بعد آمده است. [۵۶]

جدول ۲-۳. خصوصیات و ویژگی های فیزیکی انواع مختلف LED
Held, G. Introduction to Light Emitting Diode Technology and Applications.
CRC Press, (2008).

Color	Wavelength (nm)	Voltage (V)	Semiconductor material
White	Broad spectrum	$\Delta V = 3.5$	Blue/ UV diode with yellow phosphor
Blue	$450 < \lambda < 500$	$2.48 < \Delta V < 3.7$	Zinc selenide (ZnSe) Indium gallium nitride (InGaN) Silicon carbide (SiC) as substrate Silicon (Si) as substrate (under development)
Red	$610 < \lambda < 760$	$1.63 < \Delta V < 2.03$	Aluminium gallium arsenide (AlGaAs) Gallium arsenide phosphide (GaAsP) Aluminium gallium indium phosphide (AlGaInP) Gallium(III) phosphide (GaP)

۳-۶ تعیین مقدار کلروفیل a و b

در ادامه پژوهش، مطالعاتی هم بر روی میزان کلروفیل موجود در هر یک از بافت هایی که در نور های مستقل بودند انجام پذیرفت که مراحل آن بصورت زیر بود.

از هر یک از بافت ها مقادیری از بافت تازه برداشته شد و درون ظروف شیشه ای که از قبل اتوکلاو شده بودند قرار داده شدند. پس از جداسازی بافت ها، به دور هر یک از ظروف با فویل

آلومینیوم پوشیده شد تا در معرض نور قرار نگیرد. این عمل از تخریب کلروفیل در برابر نور جلوگیری می کند زیرا کلروفیل مولکول ناپایداری است. به دنبال آن بافت ها به کمک ترازو توزین شدند.

حلالی که برای استخراج کلروفیل انتخاب گردید استون ۸۰٪ بود و حجم نهایی نیز به گونه ای محاسبه گردید که بر اساس ۱۰ mg ماده گیاهی استخراج شده به ازای هر میلی لیتر استون باشد. بافت مورد نظر را در هاون به خوبی کوبیده و مطابق با وزن آن سعی شد تا به حجم مورد نظر برسد. پس از اضافه کردن استون و عبور آن از کاغذ صافی، آنچه که بر روی کاغذ صافی باقی می ماند بافتی سفید رنگ بود. پس از اولین مرحله جداسازی، برای مرتبه دوم نیز از کاغذ صافی عبور داده می شدند تا هیچ گونه ماده شناوری درون محلول باقی نمانده باشد. محلول حاصل نیز در محل تاریکی قرار می گرفت تا در معرض نور قرار نگیرد. در ادامه، جهت تعیین مقدار کلروفیل a ، b و کلروفیل تام به شرح زیر عمل گردید:

چگالی نوری عصاره کلروفیل در یک کووت ۱ ml در طول موج های ۶۴۵، ۶۶۳ و ۶۵۲ نانومتر توسط اسپکتروفوتومتر خوانده شد. جهت کالیبره نمودن عصاره کلروفیل، چگالی نوری ابتدا در مقابل حلال شاهد (استون ۸۰٪) خوانده شد و بعد عصاره مورد نظر در معرض طول موج قرار گرفت. طبق معادله هایی که در ادامه آمده است مقدار کلروفیل بر حسب میلی گرم از هر گرم بافت محاسبه گردید.

$$\text{Chlorophyll a mg} = [12.7(D_{663}) - 2.69(D_{645})] \times \frac{V}{1000 \times W}$$

$$\text{Chlorophyll b mg} = [22.9(D_{645}) - 4.68(D_{663})] \times \frac{V}{1000 \times W}$$

$$\text{Chlorophyll total mg} = [20.2(D_{645}) + 8.02(D_{663})] \times \frac{V}{1000 \times W}$$

در معادله های بالا، D نمایانگر عدد مربوط به چگالی نوری (جذب) عصاره کلروفیل در طول موج ویژه ذکر شده، V حجم نهایی عصاره کلروفیل در استون ۸۰ % و W وزن بافت مورد استخراج بر حسب گرم می باشد. [۵۷]

۳-۷ انتقال به خاک و سازگاری گیاهچه ها

در این مرحله، گیاهچه هایی را که در محیط کشت تولید ریشه کرده بودند از شیشه خارج کرده و به کمک آب جاری ژل های باقی مانده بر روی ریشه کاملاً شستشو داده می شدند مضافاً برای چند ثانیه نیز درون محلول قارچ کش ۰٫۳ % دینوکاپ فرو برده می شدند. گیاهچه ها سپس درون گلدان های کوچکی کاشته می شدند که واجد مخلوطی از کود برگ، ماسه و پرلیت (۱:۱:۱) بودند. به منظور غنی نمودن خاک، قبل از انتقال گیاهچه ها به خاک به میزان یک لیتر از نمک های غیر آلی به همان نسبتی که در محیط کشت استفاده شد به خاک اضافه می شد. سپس گلدان ها درون کاورهای شفاف قرار گرفته و وارد اتاق سازگاری می شدند. برای سازگاری هر روز به مدت ۴ ساعت کاور آن ها برداشته شده تا هوادهی شوند و طی یک هفته این کار ادامه می یافت تا به مرور این زمان به ۸، ۱۲ و ۱۶ ساعت در روز افزایش یابد. همچنین پس از ۲ هفته، استفاده از کود مایع ۰٫۲ % فوماسکو به خاک نیز استفاده شد. آبیاری گلدان ها به صورت آفشان و هر ۲ روز یک بار انجام می شد.

۳-۷-۱ شرایط اتاق سازگاری

اتاق سازگاری اتاق بسته ای با دمای در حدود $25 \pm 1^{\circ}C$ بود که نور خورشید بطور کاملاً غیرمستقیم وارد آن می شد. گلدان ها در زیر پنج لامپ فلورسنت و در فاصله ۴۰ cm از آن ها قرار داده شده و طول دوره نوردهی نیز در ۱۶ ساعت روشنایی تنظیم شد.

فصل چهارم

مشاهدات و نتایج

اهداف اصلی از انجام این پژوهش مقایسه میزان رشد و ریخت شناسی و همچنین میزان کلروفیل موجود در نمونه هایی بود که در زیر نورهای متفاوت رشد کردند. در طول مدت آزمایشات، مقایسه های دیگری با پژوهش هایی که قبلا بر روی این گیاه انجام شده بود نیز جهت تکمیل کار صورت گرفت که در خلال توضیحات زیر آورده شده است.

۱. تهیه نمونه های مختلف (جوانه راسی، برگ ها و ریشه ها) از گیاه آلوده ورا به

جهت انتخاب صحیح از بافت مورد نظر.

۲. بررسی نحوه رشد جوانه راسی که به دو نیم قسمت شده بود.

۳. انتخاب صحیح ظرف مورد نیاز به جهت نگهداری ریزنمونه ها بر روی محیط کشت.

۴. میزان آلودگی و تغییرات رنگ بوجود آمده در محیط کشت نمونه ها.

۵. بررسی برخی محیط های کشت که از ترکیب IBA و BA استفاده شده بود.

۶. انتقال گیاهچه های ریشه دار از شرایط کاملا استریل درون شیشه ای به درون گلدان

های حاوی مخلوطی از کود برگ، ماسه و پرلیت و بررسی میزان رشد آن ها.

۴-۱ بررسی نمونه های مختلف جهت کشت بافت

شروع کار با انتخاب ۶ گیاه جوان آلوده ورا آغاز گردید. پس از حذف برگ ها، قسمت هایی از برگ ها، جوانه راسی و همچنین ریشه جهت تهیه نمونه انتخاب گردید. پس از ضد عفونی سطحی، نمونه ها به درون هود لامینار انتقال یافتند.

در زیر هود نیز جوانه راسی به دو قسمت تقسیم شد تا به ازای هر جوانه راسی دو نمونه بدست آید. هر یک از نمونه ها درون لوله های آزمایشی قرار گرفتند که حاوی محیط کشت MS به همراه هورمون های رشد با غلظت 0.2 mg/l IBA و 1 mg/l BA بودند.

بدلیل اینکه اقدام به کشت بافت برای اولین بار توسط نگارنده انجام می گردید تمام نمونه های کشت داده شده انتخابی، در زیر نور فلورسنت سفید قرار داده شدند. مشاهدات بدست آمده در زیر بطور خلاصه آمده است:

پس از چهار هفته هیچ نشانه ای از رشد در ۳۰ عدد نمونه از برگ ها ملاحظه نشد و در کلیه آن ها تغییر رنگ و قهوه ای شدن بروز کرده بود.

در بین آن تعداد از ریشه های کشت داده شده نیز رشدی دیده نشد لکن برخلاف کشت از برگ ها تغییر رنگی نیز در محیط کشت ایجاد نشده بود.

بر خلاف نمونه های برگ و ریشه، اغلب جوانه های راسی انتخاب شده مراحل اولیه رشد را بعد از این مدت آغاز کرده به جز دو نمونه که آثاری از رشد در آن ها دیده نشد، باقیمانده نمونه ها با شرایط محیط کشت سازگار شده بودند.

در طول مدت آزمایش، هر گاه محیط کشت نمونه ای قهوه ای می شد نمونه ها به محیط کشت جدید واکشت (Reculture) می شدند. این کار باعث می گردید تا همواره مواد غذایی تازه در دسترس نمونه ها قرار داشته باشند. در مدت زمان ۲ ماه که نمونه ها درون محیط کشت MS به همراه هورمون های رشد با غلظت 0.2 mg/l IBA و 1 mg/l BA بودند، هیچ گونه

آثاری از ریشه زایی در نمونه ها دیده نشد. به همین لحاظ به جهت تحریک ریشه زایی در نمونه ها، محیط کشتی با هورمون NAA و به غلظت 0.1 mg/l تهیه شد و بعد از انتخاب نمونه ها برخی از نمونه ها وارد محیط جدید گردید و برخی دیگر نیز در محیط کشت با غلظت هورمونی 1 mg/l BA و 0.5 mg/l NAA قرار داده شدند تا تاثیر این دو محیط جدید در ریشه زایی نمونه ها مشخص گردد. در نمونه هایی که وارد محیط کشت محتوی 0.1 mg/l NAA شدند، ریشه زایی به کندی صورت گرفت چرا که در هفته های اول هیچ گونه اثری از ریشه در نمونه ها دیده نشد اما به مرور از هفته چهارم به بعد در برخی نمونه ها ریشه ها نیز شکل گرفتند.

همین مشاهدات یعنی تاخیر در بروز ریشه در مورد نمونه هایی بدست آمد که در محیط کشت با غلظت هورمونی 1 mg/l BA و 0.5 mg/l NAA قرار داشتند.

۲-۴ بررسی محیط کشت از لحاظ میزان آلودگی و تغییرات رنگی محیط کشت



شکل ۱-۴ قهوه ای شدن محیط کشت

بررسی محیط های کشت، پس از استقرار ریزنمونه ها مشخص کرد که میزان آلودگی در نمونه ها خیلی فراگیر نیست و یکی از دلایلی که می توان به آن نسبت داد این می باشد که نمونه های انتخابی اکثرا از قسمت هایی انتخاب گردیدند که خارج از محیط خاک بودند و میزان آلودگی نسبت به نمونه هایی که منشأ درون خاکی دارند مانند پیاز و ریزوم ها بسیار اندک بود. اما در مواردی نیز که آلودگی مشاهده می شد می توان به عدم دقت، عدم تجربه کافی و سرعت عمل پایین در انجام کار نسبت داد.

در مورد تغییرات رنگی که در محیط کشت بوقوع می پیوندد، زمانی که بافتی از گیاه جدا می شود اندکی ترشحات وارد محیط می گردد که بسته به نوع ماده ترشحاتی و واکنش های احتمالی ماده مترشحه تغییرات رنگی نیز بروز می کند. یکی از این مواد که در اثر متابولیسم گیاهی به خارج ترشح می شود ترکیبات فنولی است و در اثر تغییرات بعدی قهوه ای شدن را موجب می شود. همچنین این نکته نیز قابل ذکر است که شدت قهوه ای شدن در نمونه هایی که از برگ ها جدا شده بودند از نمونه های دیگر بیشتر بود و شاید دلیل آن میزان آسیب دیدگی بیشتر سلول ها و همچنین وجود ترکیبات متنوعی است که در ژل این گیاه موجود می باشد.

۳-۴ بررسی انتخاب ظرف مناسب محیط کشت

یکی از مواردی که موجب بهبود انجام پژوهش حاضر گردید انتخاب مناسب ظرف محیط کشت بود. در آزمایشات اولیه که بطور تمرینی صورت گرفت از لوله های آزمایش استفاده شد. لوله های آزمایش ظروف محدودی از لحاظ حجم هستند ولی کار با آن ها میزان آلودگی را پایین می آورد. متعاقبا از فلاسک هایی که دهانه بزرگی داشتند استفاده شد.

علت انتخاب و پذیرفتن خطر آلودگی بیشتر نمونه ها این بود که گیاه آلوده ورا دارای برگ هایی است که علاوه بر گوشتی بودن، به اطراف نیز باز می شوند تا به رشد خود ادامه دهند. این خصوصیت باعث می شد تا نمونه ها پس از اندکی رشد در فضای محدود لوله های آزمایش به دیواره بچسبند و همین مسئله دلیلی بود برای آسیب دیدگی نمونه هایی که می بایست پس از مدتی واکشت می شدند. انتخاب این فلاسک ها موجب شد که نمونه ها با آزادی بیشتر به رشد خود ادامه دهند و با محدودیت مواجه نشوند. در موارد اندک، آلودگی مشاهده شده به صورت هاله ای از کدر شدن محیط کشت دیده شد که حدس زده می شود آلودگی باکتریایی باشد.

۴-۴ بررسی نمونه های قرار داده شده در زیر نورهای مختلف

همانطور که در بالا ذکر گردید، هدف از آزمایش مقایسه میزان رشد نمونه ها در زیر نور با طول موج های مختلف بود. شروع کار در تاریخ ۸۹/۴/۳ و با تعداد ۲۴ نمونه از گیاه آلوئه ورا بود. با توجه به تجربه بدست آمده از آزمایش های اولیه، نمونه های انتخابی بیشتر از جوانه های راسی و قسمت های نزدیک به جوانه های راسی بودند. این نمونه ها که در شکل های ۴-۲ و ۴-۳ آمده است به شکل دیسک هایی بودند که بر حسب نوع آزمایش تا حدی قسمت هایی از قاعده برگ ها نیز در آن مشهود بود. تمامی این نمونه ها درون لوله های آزمایش کشت شدند و به تعداد مساوی ۱۲ عددی به ازای هر اتاقک نوری در زیر هر نور قرار داده شدند. در این سری از نمونه ها، جوانه های راسی انتخاب شده واجد قسمت های بزرگی شامل برگ های بسیار جوان و قاعده های برگی بودند. محیط کشت انتخابی برای این تعداد محیط کشت MS به همراه هورمون های NAA و BA که به ترتیب غلظت ۰,۵ mg/l و ۱ mg/l داشتند، انتخاب گردید. در طی مدت نگهداری در اتاقک های رشد، در اکثر نمونه ها تغییرات محسوسی از لحاظ رشد دیده نمی شد اما در این بین نمونه هایی هم جلب توجه می کردند و آن هم، گروهی از نمونه ها بودند که حلقه های بیشتری در زیر جوانه راسی داشتند. این گروه از نمونه ها پس از قرار گیری در محیط کشت و پس از مدتی از استقرار در درون لوله ها واجد جوانه های ریزی در کنار حلقه ها می شدند. این حالت به نظر می رسد بدلیل مواجهه سلول های خفته مریستمی در قاعده برگ ها با غلظت بسیار زیاد هورمون ها در محیط کشت می باشد و چون قبلاً ممانعت رشدی توسط مریستم راسی بر روی این سلول های خفته بعمل آمده بود پس از رها شدن از سد این مانع شروع به تکثیر نمودند. در این سری از نمونه ها تنها جوانه های راسی همچنان به رشد ادامه دادند و نمونه های دیگر از نقاطی به غیر از جوانه های راسی نتوانستند نمو یابند و در همان هفته های اول تغییر رنگ داده از بین رفتند. در اتاقک های قرمز و آبی نمونه هایی از جوانه های راسی بودند که به دلیل کوچک بودن و یا آسیب دیدگی، بافت

مریستمی آن ها دچار اضمحلال شده و در ادامه نتوانستند به مرحله رشد برسند. همانطور که در قسمت قبل توضیح مختصری راجع به انتخاب ظروف کشت داده شد، رشد جوانه های کناری نمونه ها موجب گردید تا نمونه ها به ظروف با دهانه بزرگ منتقل شوند. انتقال آن ها به ظروف جدید بسیار مفید بود و نمونه ها بدون محدودیت رشد می کردند و حتی به تعداد جوانه ها نیز اضافه می گشت. اکثر قریب به اتفاق جوانه های رشد یافته پس از مدتی در همین محیط ریشه دار گشته و آمادگی انتقال به محیط خاک را کسب می کردند. از این سری از نمونه ها برای گروه سفید ۵ نمونه، برای گروه قرمز + آبی ۳ نمونه، برای گروه قرمز ۵ نمونه و برای گروه آبی ۴ نمونه باقی ماندند.

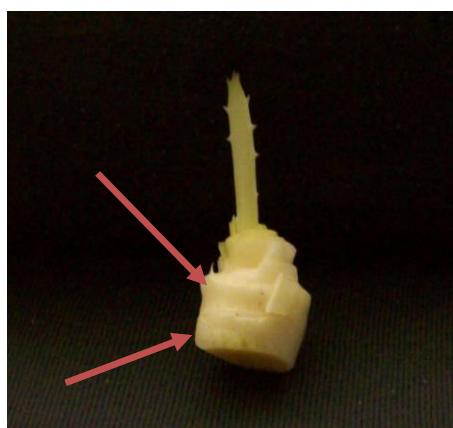
در تاریخ ۸۹/۵/۱۲، مجدداً ۱۶ گیاه آلوده و راه جهت کشت بافت انتخاب گردیدند. این بار سعی شد تا تمامی نمونه ها هم از نظر اندازه و هم از لحاظ شکل شبیه به یکدیگر باشند. همچنین این نمونه ها واجد حلقه های بسیار کمی بودند و در ظاهر بسیار کوچک بودند. به ازای هر اتاقک چهار نمونه به زیر نور منتقل شدند. محیط کشت این گروه ها نیز همان محیط MS با هورمون های NAA و BA به ترتیب با غلظت های ۰,۵ mg/l و ۱ mg/l بود. در مدت استقرار آن ها در زیر نورهای مختلفه با عکس برداری دوره ای مراحل رشد آن ها ثبت می گردید.

در نمونه های جدید، میزان جوانه زایی کاهش یافت. همچنین در میزان رشد آن ها از لحاظ طولی و افزایش جوانه تغییر محسوسی دیده نمی شد. تنها تغییری که کاملاً محسوس بود اینکه ملاحظه نمونه هایی بود که در زیر نور قرمز + آبی از لحاظ رنگ برگ ها سبزتر از سایرین بودند که در تمام نمونه ها این گروه دیده می شد. خلاصه ای از اطلاعات بدست آمده از مشاهدات در جدول ۱-۴ آمده است.

در ادامه به بحث در مورد نحوه رشد این سری از نمونه ها پرداخته خواهد شد.

جدول ۴-۱ خلاصه ای از اطلاعات بدست آمده از مشاهدات

نوع نور/اتاقک	نمونه ها			
	نور سفید	نور قرمز + آبی	نور قرمز	نور آبی
تعداد نمونه های بافت مریستم	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰
تعداد نمونه های آلوده	۰	۰	۰	۲
تعداد نمونه هایی که در اثر عدم رشد از بین رفتند	۲	۴	۲	۲
تعداد نمونه های باقی مانده	۸	۶	۸	۶
تعداد نمونه های ریشه دار	۸	۶	۸	۶



شکل ۴-۲ محل قرار گیری حلقه ها توسط فلش نشان داده شده است (عکس از مولف)

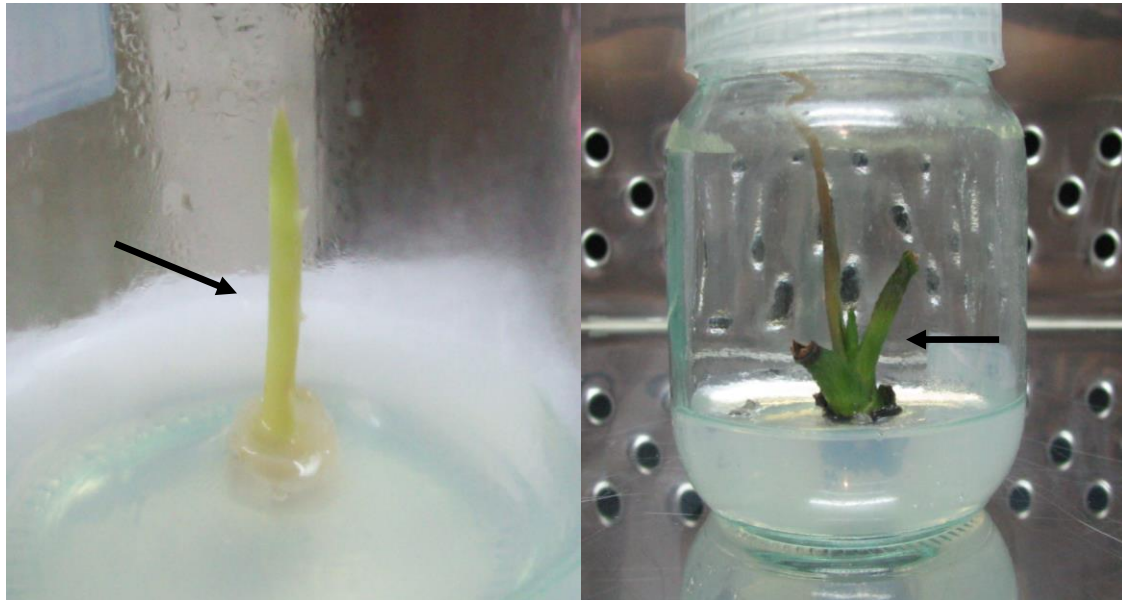


شکل ۴-۳ نمونه ای با تعداد حلقه های کم (عکس از مولف)

۴-۵ بررسی ریخت شناسی نمونه های کشت داده شده

در تمام مدت آزمایش با عکس برداری های مکرر، سعی گردید تا مراحل مختلف رشد به ثبت تصویری کشیده شود. نمونه هایی که در زیر آمده است عکس هایی از مراحل مختلف رشد بافت هایی است که در زیر نورهای مختلف قرار داده شدند.

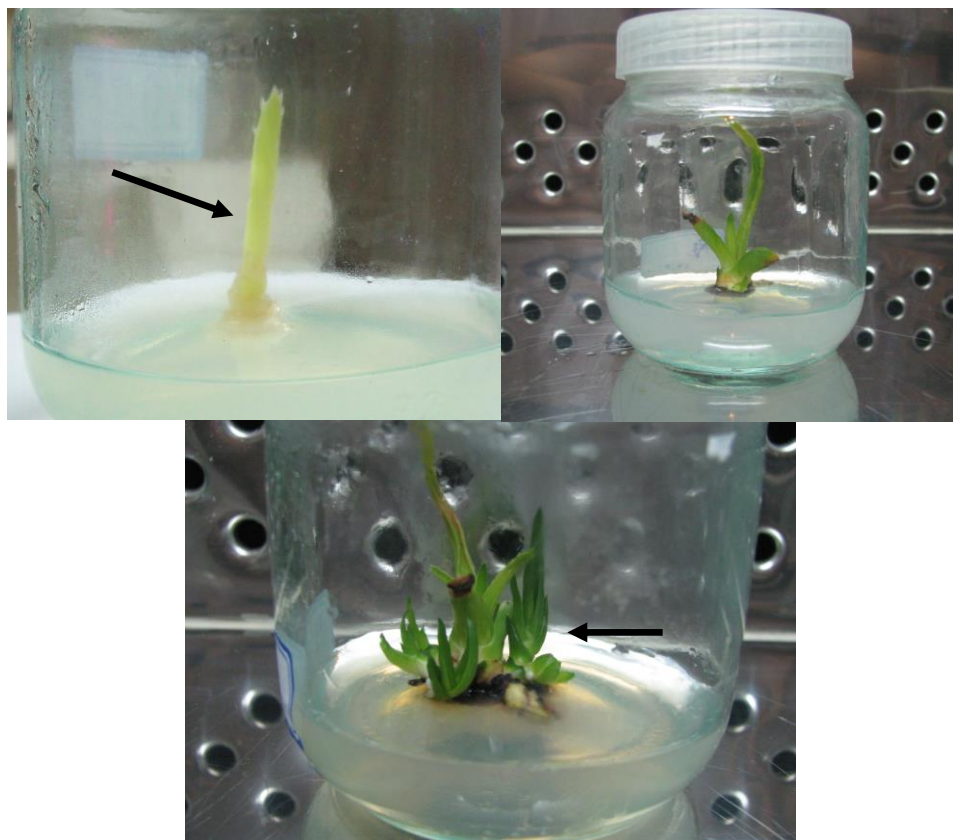
۱. از چپ به راست مراحل رشد نمونه ای از بافتی که زیر نور آبی قرار داده شده است.



شکل ۴-۴ مراحل رشد نمونه زیر نور آبی

در آغاز، نمونه تنها واجد یک برگ جوان بود که در تصویر سمت چپ نشان داده شده است. فلش در تصویر آخر همان نمونه با برگ های بیشتر را نشان می دهد.

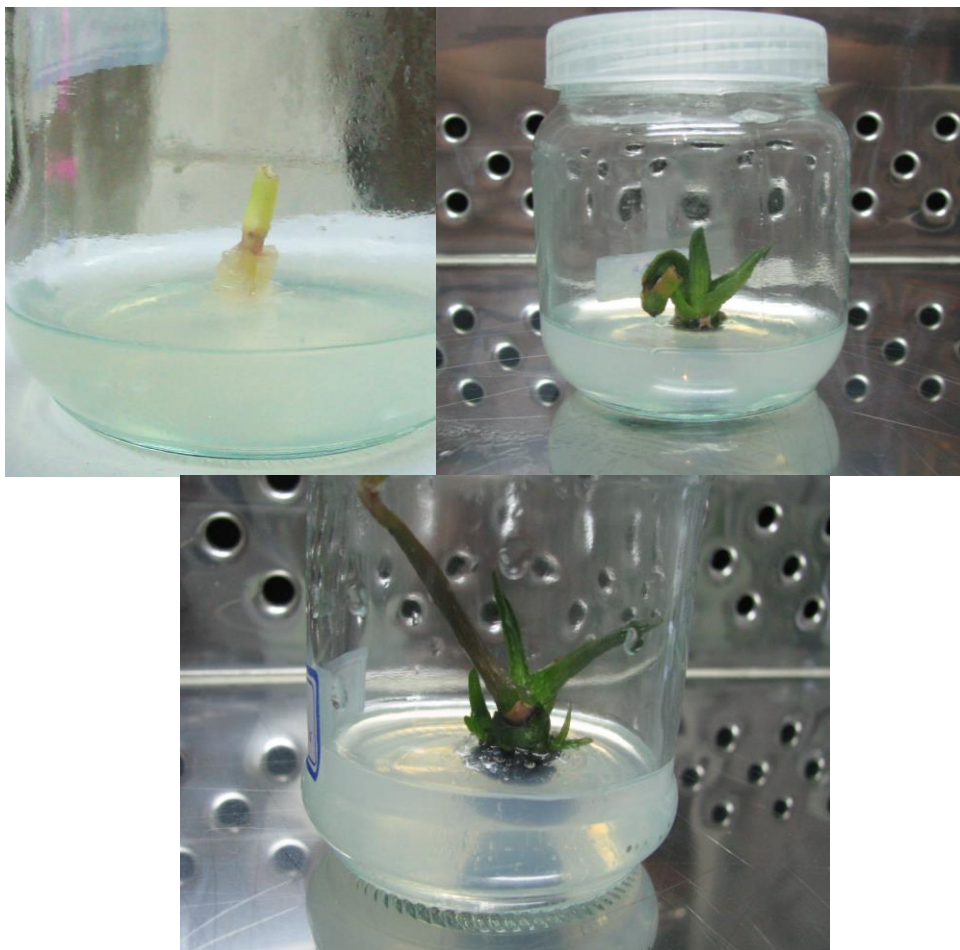
۲. از چپ به راست و از بالا به پایین مراحل رشد نمونه ای از بافتی که زیر نور قرمز قرار داده شده است.



شکل ۵-۴ مراحل رشد نمونه زیر نور قرمز

در تصاویر فوق مراحل رشد یک نمونه در زمان های مختلف نشان داده شده است که تنها واجد یک برگ در ابتدای پژوهش بود و طی مراحل بعد با تعداد برگ های بیشتر نسبت به زمان شروع، ملاحظه می شود.

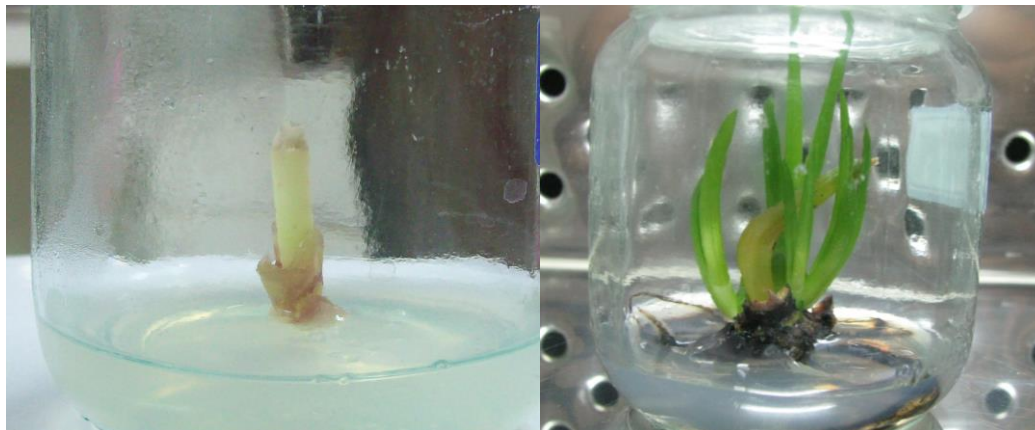
۳. از چپ به راست و از بالا به پایین مراحل رشد نمونه ای از بافتی که زیر نور قرمز + آبی قرار داده شده است.



شکل ۶-۴ مراحل رشد نمونه زیر نور قرمز + آبی

تصاویر فوق مراحل رشد نمونه ای است که در زمان های مختلف عکس برداری شده است. این نمونه هم تنها با یک برگ که بر روی جوانه راسی می باشد وارد محیط کشت گردید و پس از مراحل مختلف زمانی نمونه آخر با چندین برگ بدست آمد.

۴. از چپ به راست مراحل رشد نمونه ای از بافتی که زیر نور سفید قرار داده شده است.



شکل ۷-۴ مراحل رشد نمونه زیر نور سفید

تقریباً تمام نمونه هایی که در روز اول وارد محیط کشت شدند به همین صورت رشد کردند و اختلافی در نوع رشد آن ها دیده نمی شد. اما نمونه های دیگری نیز وجود داشتند که با توجه به اندازه آن ها تفاوت هایی را از لحاظ تعداد جوانه ها و حتی تعداد ریشه ها نشان می دادند. در زیر به تعدادی از این نمونه ها پرداخته می شود که با عکس برداری مراحل رشد و نمو آن ها نشان داده شده است.

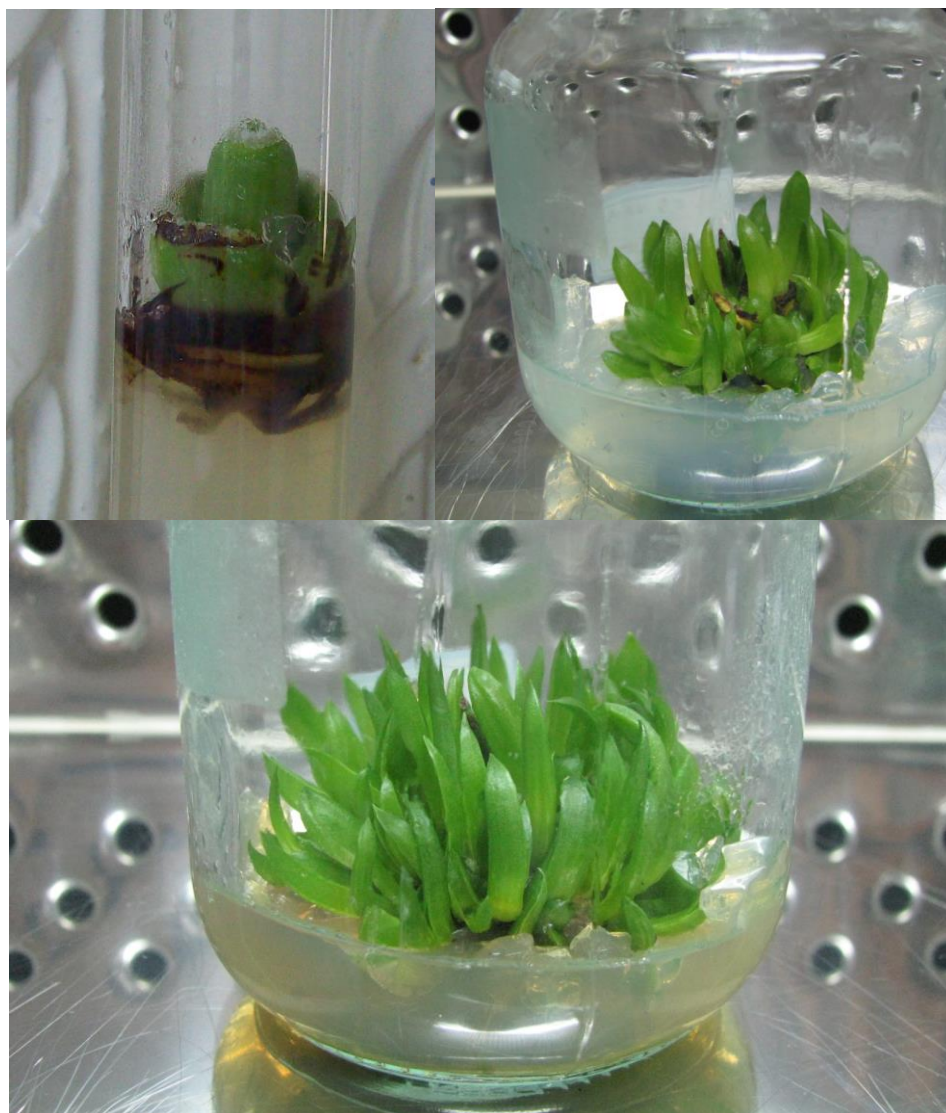
۱. از چپ به راست و از بالا به پایین مراحل رشد نمونه ای از بافتی که زیر نورآبی قرار داده شده است.



شکل ۸-۴ مراحل رشد نمونه زیر نورآبی

همانطور که ملاحظه می شود در ابتدا نمونه ها درون لوله های آزمایش بودند و با توجه به محدودیت فضا و فشاری که برگ ها در اثر رشد به بدنه لوله وارد می کردند نمونه ها وارد ظروف بزرگتری گردیدند. نتایج مثبت حاصل از رشد در شرایط جدید این نمونه کاملاً مشهود است. این نمونه از لحاظ اندازه بزرگتر و از نظر تعداد حلقه های زیرین جوانه راسی نیز واجد حلقه های بیشتری بود.

۲. از چپ به راست و از بالا به پایین مراحل رشد نمونه ای از بافتی که زیر نور قرمز قرار داده شده است.



شکل ۹-۴ مراحل رشد نمونه زیر نور قرمز

این نمونه نیز ابتدا درون لوله آزمایش بود و بعد از آن درون ظرفی بزرگتر قرار گرفت. پیشرفت رشد در محیط جدید کاملاً مشهود است.

۳. از چپ به راست و از بالا به پایین مراحل رشد نمونه ای از بافتی که زیر نور قرمز + آبی قرار داده شده است.



شکل ۱۰-۴ مراحل رشد نمونه زیر نور قرمز + آبی

در این نمونه نیز جابجایی از محیط کوچک لوله آزمایش به محیط بزرگ تر تاثیر بهتری در پیشرفت رشد داشته است.

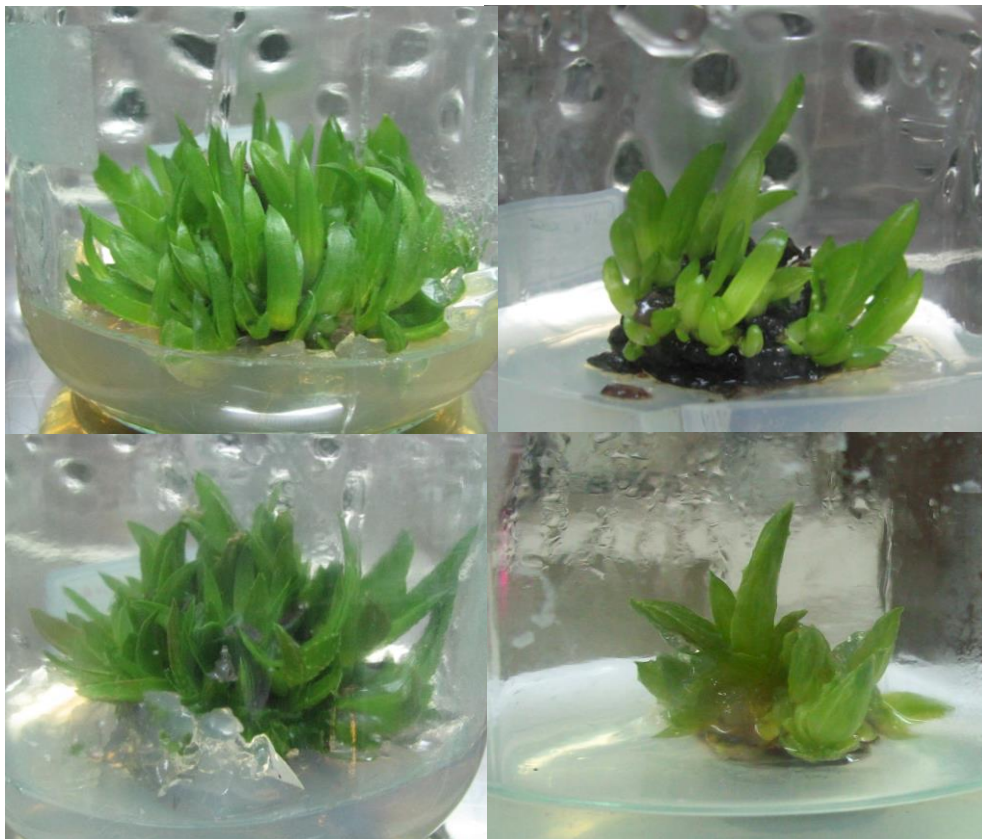
۴. از چپ به راست و از بالا به پایین مراحل رشد نمونه ای از بافتی که زیر نور سفید قرار گرفته است.



شکل ۱۱-۴ مراحل رشد نمونه زیر نور سفید

این نمونه نیز همانند نمونه های قبلی پس از جابجایی رشد بهتری داشته است. همانطور که نشان داده شد نمونه ها در زیر نورهای مختلف، از لحاظ ریخت شناسی تفاوت مشخصی نداشتند و تنها اختلافی که می توان به آن اشاره کرد اینکه نمونه هایی که تعداد حلقه های بیشتری در زیر جوانه راسی دارند توان بالایی جهت جوانه زایی دارند که ظاهراً به طول موج نور بستگی ندارد.

اما همانطور که قبلا هم اشاره شد رنگ برگ ها در نمونه هایی که در زیر نورهای مختلف قرار داشتند اندکی تفاوت را نشان می دادند که برای مقایسه آن ها چند نمونه از عکس ها در زیر آورده شده است.



شکل ۱۲-۴ به ترتیب از سمت چپ بالا، بافت زیر نور قرمز، بافت زیر نور سفید، بافت زیر نور قرمز+ آبی و بافت زیر نور آبی

مقایسه نمونه ها با هم تفاوتی را در رنگ برگ ها نشان می دهد که در بافت زیر نور قرمز+ آبی این تفاوت بیشتر به چشم می آید. جهت مقایسه علمی این مورد، آزمایش طیف نورسنجی کلروفیل طبق آن چه که قبلا ذکر گردید، انجام شد تا بطور حتم راجع به آن اظهار نظر شود.

۴-۶ نتایج حاصل از طیف نور سنجی

طی مدت ۸ هفته، ۳ مرتبه آزمایش طیف نور سنجی انجام شد و برای هر نور نیز یک مجموعه

۹ تایی از نمونه ها بدست آمد. بعد از محاسبات آماری به کمک نرم افزار SPSS نتایج زیر

بدست آمد که در قالب برخی جداول در زیر آورده شده است.

آمارهای توصیفی بدست آمده بصورت زیر می باشد:

جدول ۴-۱. آمارهای توصیفی بدست آمده از نمونه ها

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum	
					Lower Bound	Upper Bound			
Chlorophyll a	white	9	.1463	.06915	.02305	.0931	.1994	.09	.24
	red+ blue	9	.2638	.07722	.02574	.2044	.3231	.16	.32
	red	9	.1429	.10809	.03603	.0598	.2260	.00	.22
	blue	9	.2626	.00827	.00276	.2563	.2690	.25	.27
	Total	36	.2039	.09361	.01560	.1722	.2356	.00	.32
Chlorophyll b	white	9	.1029	.07263	.02421	.0470	.1587	.04	.20
	red+ blue	9	.1555	.02247	.00749	.1382	.1728	.12	.18
	red	9	.1158	.02307	.00769	.0981	.1335	.09	.15
	blue	9	.1856	.02654	.00885	.1652	.2060	.16	.23
	Total	36	.1399	.05201	.00867	.1223	.1575	.04	.23
Chlorophyll a+b	white	9	.2491	.14166	.04722	.1402	.3580	.12	.45
	red+ blue	9	.4191	.09786	.03262	.3439	.4944	.28	.49
	red	9	.2586	.12452	.04151	.1629	.3543	.09	.37
	blue	9	.4616	.04014	.01338	.4307	.4924	.41	.54
	Total	36	.3471	.14099	.02350	.2994	.3948	.09	.54

در توضیح جدول فوق، ستون Mean معرف میانگین غلظت های بدست آمده از ۹ نمونه

می باشد که در مورد هر یک از کلروفیل ها، نتایج آن در کنار نورها به تفکیک آمده است.

ستون بعدی که با Std. deviation معرفی شده است، انحراف معیار را نشان می دهد که به روش زیر محاسبه گردیده است.

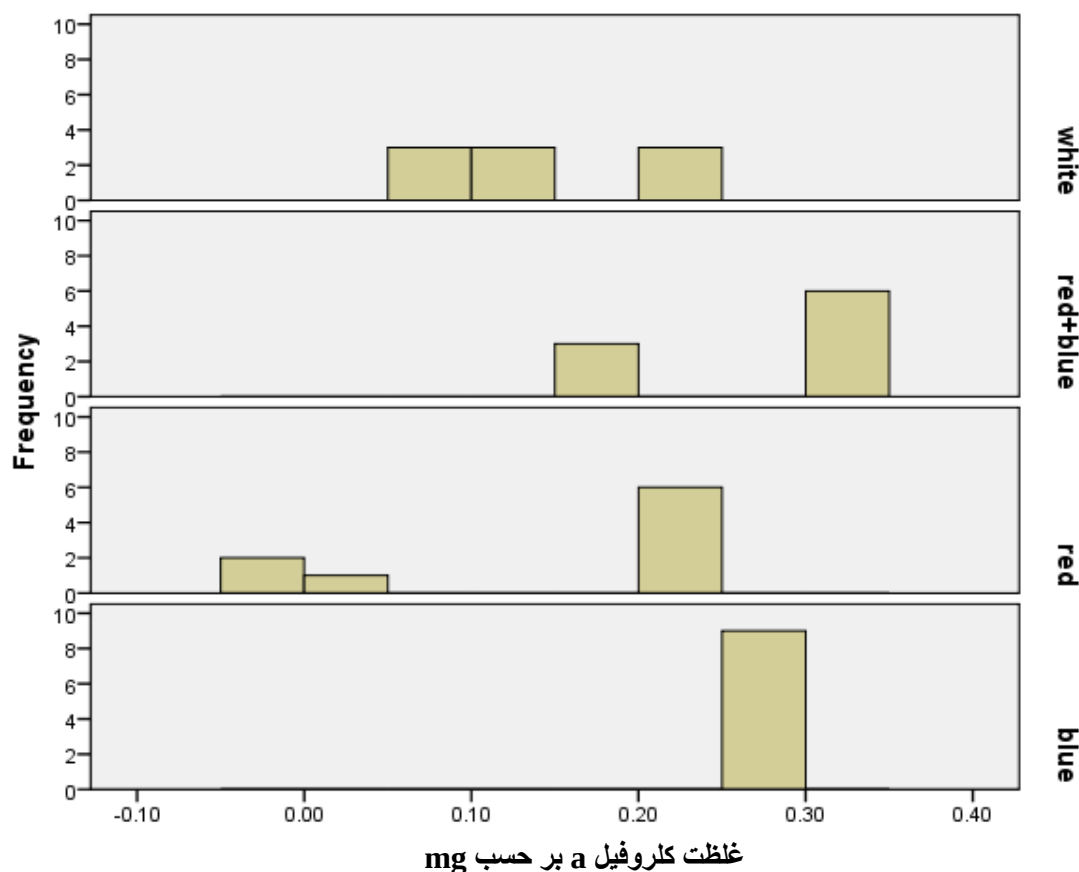
در معادله زیر $\bar{x}$ میانگین نمونه ها و x_i نمونه ها می باشد. به عبارتی انحراف معیار، مقدار

$$\sigma = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

انحراف از میانگین نمونه ها می باشد.

کران های بالا و پایین که به ترتیب با upper bound و lower bound مشخص شده اند بیشترین و کمترین مقادیر حاصل از غلظت های نمونه ها می باشند که به شکل گرد شده در ستون های بیشینه (Maximum) و کمینه (Minimum) محاسبه شده اند.

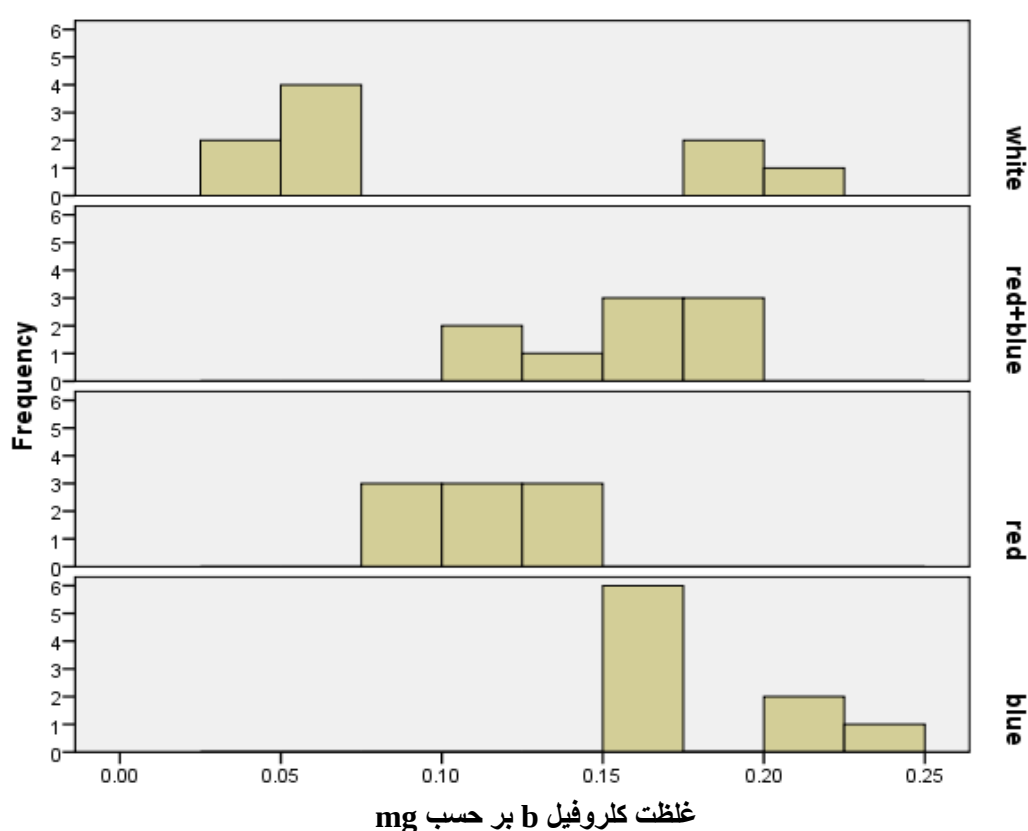
همچنین نمودارهایی از نحوه پراکندگی مقادیر غلظت های کلروفیل در هر آزمایش تهیه شد. در این نمودارها میزان غلظت کلروفیل های a ، b و همچنین غلظت مجموع کلروفیل های $a+b$ ترسیم گردید تا به درک و تصویر بهتر میزان پراکندگی غلظت کلروفیل ها در هر مرتبه از آزمایش کمک نماید.



شکل ۱۳-۴ نمودار پراکندگی غلظت کلروفیل a در هر مرتبه از آزمایش

در شکل ۱۳-۶ محور افقی، غلظت کلروفیل a را نشان می دهد و محور عمودی نیز تعداد نمونه هایی را که به ازای هر اتاقک نور ۹ مورد بوده است به شکل ستون نشان می دهد. بنابراین تعداد ستون ها در محور افقی همان پراکندگی مقادیر غلظت های کلروفیل a را در میان ۹ نمونه نشان می دهد. برای مثال در نمونه های حاصل از زیر نور آبی، بدلیل نزدیکی مقادیر غلظت های هر ۹ نمونه، تنها یک ستون برای آن ها ترسیم شده است. بالعکس در نمونه سفید پراکندگی مقادیر غلظت ها به گونه ای بوده است که ۳ ستون ترسیم شده است.

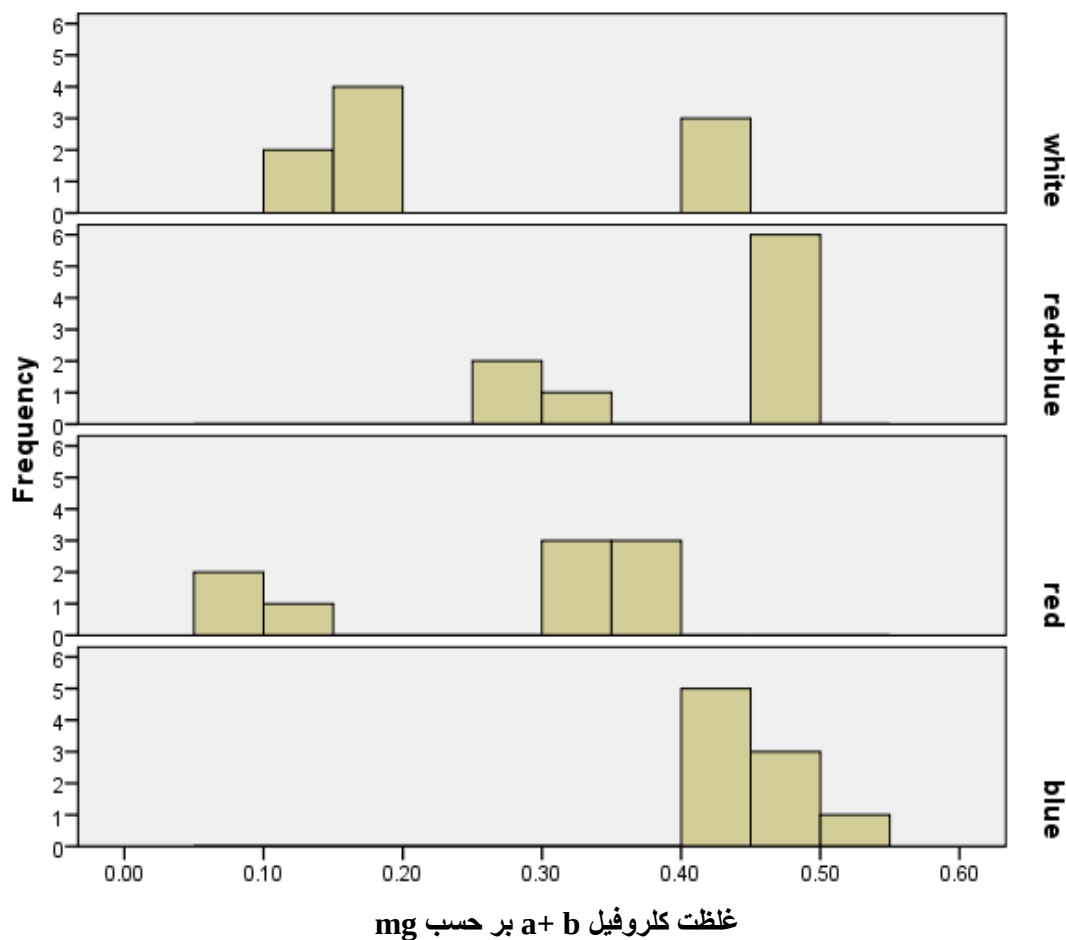
این نتیجه بدین معنی است که در ۳ مرتبه نور سنجی، مقادیر غلظت های بدست آمده متفاوت از یکدیگر بوده است. همچنین در نمونه های حاصل از تحت تاثیر بودن در زیر نور قرمز، ۶ نمونه از غلظت های بدست آمده از ۲ سری آزمایش طیف نور سنجی در یک محدوده بودند و بالطبع در قالب یک ستون ترسیم شده اند. با توجه به پراکندگی ۳ نمونه دیگر ۲ ستون ترسیم گردید. بنابراین هر اندازه پراکندگی غلظت کلروفیل ها بیشتر باشد ستون ها نیز بطور مجزا به نمایش در می آیند.



شکل ۴-۱۴ نمودار پراکندگی غلظت کلروفیل b در هر مرتبه از آزمایش

در شکل ۴-۱۴ که پراکندگی مقادیر غلظت های کلروفیل b را در هر نمونه نشان می دهد، محور افقی میزان مقادیر غلظت کلروفیل b و محور عمودی نیز تعداد نمونه های بدست آمده را نشان می دهد. همانند توضیحاتی که برای شکل قبل آورده شد علت متغیر بودن تعداد ستون ها در نمونه های مختلف متغیر بودن میزان مقادیر غلظت های بدست آمده می باشد. برای مثال در نمونه های حاصل از زیر نور آبی غلظت بدست آمده برای کلروفیل b در ۶ نمونه آن قدر به هم

نزدیک بوده است که در قالب یک ستون به تصویر کشیده شده است و ۳ نمونه دیگر بدلیل متفاوت بودن محدوده غلظت شان در ۲ ستون مجزا ترسیم شده اند. بالعکس در نمونه های زیر نورهای سفید و قرمز+ آبی بدلیل متغیر بودن مقادیر غلظت های کلروفیل b، ۴ ستون ایجاد گردیده است.



شکل ۱۵-۴ نمودار پراکندگی غلظت مجموع کلروفیل های a و b در هر آزمایش

پراکندگی مقادیر غلظت مجموع کلروفیل های a و b نیز در نمودارهای شکل ۱۵-۴ نشان داده شده است. با توجه به نمودارها و همچنین آمارهای توصیفی بدست آمده، جهت دستیابی و بررسی دقیق تر نتایج، آنالیز واریانس (ANOVA) نیز انجام شد تا سطح معنی دار بودن نتایج بدست آمده تعیین گردد. جدولی که در ادامه می آید نتایج حاصل از آنالیز واریانس می باشد:

جدول ۴-۲. نتایج حاصل از آنالیز واریانس نمونه ها

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Chlorophyll a	Between Groups	.127	3	.042	7.511	.001
	Within Groups	.180	32	.006		
	Total	.307	35			
Chlorophyll b	Between Groups	.039	3	.013	7.324	.001
	Within Groups	.056	32	.002		
	Total	.095	35			
Chlorophyll a+b	Between Groups	.322	3	.107	9.172	.000
	Within Groups	.374	32	.012		
	Total	.696	35			

همانطور که در ستون معنی دار بودن که با رنگ زرد نشان داده شده است، ملاحظه می گردد نتایج کوچکتر از ۵ % می باشند که این معنی دار بودن نتایج را به اثبات می رساند. به عبارت دیگر نتایج بدست آمده تصادفی نیست. با توجه به نتایج حاصل از ANOVA، به کمک آزمون تعقیبی Tukey HSD سعی گردید تا به یافتن اختلافات پرداخته شود.

Multiple Comparisons

جدول ۴-۳

Tukey HSD

Dependent Variable	(I) colour	(J) colour	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Chlorophyll a	white	red+blue	-.11750*	.03535	.011	-.2133	-.0217
		red	.00340	.03535	1.000	-.0924	.0992
		blue	-.11638*	.03535	.012	-.2122	-.0206
	red+blue	white	.11750*	.03535	.011	.0217	.2133
		red	.12090*	.03535	.009	.0251	.2167
		blue	.00112	.03535	1.000	-.0947	.0969
	red	white	-.00340	.03535	1.000	-.0992	.0924
		red+blue	-.12090*	.03535	.009	-.2167	-.0251
		blue	-.11978*	.03535	.010	-.2156	-.0240
	blue	white	.11638*	.03535	.012	.0206	.2122
		red+blue	-.00112	.03535	1.000	-.0969	.0947
		red	.11978*	.03535	.010	.0240	.2156
Chlorophyll b	white	red+blue	-.05262	.01974	.055	-.1061	.0009
		red	-.01296	.01974	.913	-.0664	.0405
		blue	-.08273*	.01974	.001	-.1362	-.0292
	red+blue	white	.05262	.01974	.055	-.0009	.1061
		red	.03967	.01974	.206	-.0138	.0932
		blue	-.03011	.01974	.435	-.0836	.0234
	red	white	.01296	.01974	.913	-.0405	.0664
		red+blue	-.03967	.01974	.206	-.0932	.0138
		blue	-.06978*	.01974	.007	-.1233	-.0163
	blue	white	.08273*	.01974	.001	.0292	.1362
		red+blue	.03011	.01974	.435	-.0234	.0836
		red	.06978*	.01974	.007	.0163	.1233
Chlorophyll a+b	white	red+blue	-.17006*	.05097	.011	-.3081	-.0320
		red	-.00951	.05097	.998	-.1476	.1286
		blue	-.21251*	.05097	.001	-.3506	-.0744
	red+blue	white	.17006*	.05097	.011	.0320	.3081
		red	.16054*	.05097	.018	.0225	.2986

ادامه جدول در صفحه بعد

	blue	-.04246	.05097	.838	-.1805	.0956
red	white	.00951	.05097	.998	-.1286	.1476
	red+blue	-.16054*	.05097	.018	-.2986	-.0225
	blue	-.20300*	.05097	.002	-.3411	-.0649
blue	white	.21251*	.05097	.001	.0744	.3506
	red+blue	.04246	.05097	.838	-.0956	.1805
	red	.20300*	.05097	.002	.0649	.3411

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

نتایج حاصل از مقایسه نمونه ها معنی دار بودن را در برخی نمونه ها نشان می دهد که با رنگ زرد نشان داده شده است. برای مثال میزان کلروفیل a در نمونه های زیر نور قرمز + آبی از نمونه های زیر نور سفید و قرمز بیشتر می باشد که نشان از تاثیر گذار بودن نور بر میزان کلروفیل دارد. به منظور تحلیل ساده تر، در جداولی جداگانه معنی دار بودن نمونه ها بطور مجزا نشان داده شده است:

Chlorophyll a			
Color	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
Red	9	.1429	
White	9	.1463	
Blue	9		
Red+ blue	9		.2638
Sig.		1.000	1.000

جدول ۴-۴. معنی دار بودن میزان کلروفیل a در نمونه هایی که در زیر نور قرمز + آبی و آبی قرار گرفته بودند.

همانطور که در جدول ۴-۵ آمده است میزان کلروفیل b در نمونه هایی که زیر نور قرمز + آبی و آبی قرار گرفته اند تحت تاثیر نور افزایش یافته است. در مورد نمونه های زیر نور سفید و قرمز مقدار کلروفیل b کمتر از دیگر نمونه ها است.

Chlorophyll b			
Color	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
white	9	.1029	
red	9	.1158	
Red+ blue	9	.1555	.1555
Blue	9		.1856
Sig.		.055	.435

جدول ۴-۵. معنی دار بودن میزان کلروفیل b در نمونه هایی که در زیر نور قرمز+ آبی و آبی قرار گرفته بودند.

بررسی نتایج حاصل از میزان کلروفیل a + b که در جدول ۴-۶ نیز آمده است معنی دار بودن نمونه های زیر نور قرمز+ آبی و آبی را نشان می دهد که نسبت به نمونه های زیر نور سفید و قرمز بیشتر می باشد.

Chlorophyll a+b			
Color	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
white	9	.2491	
red	9	.2586	
Red+ blue	9		.4191
Blue	9		.4616
Sig.		.998	.838

جدول ۴-۶. معنی دار بودن میزان کلروفیل a + b در نمونه هایی که در زیر نور قرمز + آبی و آبی قرار گرفته بودند.

جهت بررسی مقایسه ای نمونه ها از لحاظ میزان کلروفیل، نتایج در جدول زیر نیز آورده شده است تا با نگاهی اجمالی به اطلاعات بدست آمده جمع بندی داده ها نیز صورت گیرد.

Color	Chlorophyll a	Chlorophyll b	Chlorophyll a + b	Chlorophyll a/b
White	.1463	.1029	.2491	1.42
Red+ blue	.2638	.1555	.4191	1.70
Red	.1429	.1158	.2586	1.23
Blue	.2626	.1856	.4616	1.41

جدول ۴-۷. مقایسه ای از میزان غلظت کلروفیل ها در نمونه های مختلف.

آمار و ارقام بدست آمده در یک نگاه کلی بصورت زیر بود:

کلروفیل a : قرمز > سفید > آبی > قرمز + آبی

کلروفیل b: سفید > قرمز > قرمز + آبی > آبی

کلروفیل a + b: سفید > قرمز > قرمز + آبی > آبی

کلروفیل a/b: قرمز > آبی > سفید > قرمز + آبی

۴-۷ انتقال به خاک و سازگاری

مرحله آخر، انتقال به خاک و سازگاری می باشد. در این مرحله دو نوع آزمون صورت گرفت. در آزمون اول خاک غیر استریل (اتوکلاو نشده) انتخاب گردید. پس از انتقال گیاهچه ها، پس از چند روز لاروهای مشاهده گردید که اطراف گیاهچه حضور داشتند و از بافت گیاه نیز بیرون می آمدند. عدم موفقیت در رشد این گیاه این تصور را بوجود آورد که اضمحلال و پژمردگی گیاهچه ها در خاک ممکن است نتیجه وجود اینگونه لاروها باشد به همین دلیل برای نمونه های دیگر از خاک اتوکلاو شده استفاده شد. متأسفانه در آزمون دوم نیز علیرغم عدم مشاهده لارو، گیاهچه های ریشه دار توان تحمل در محیط خاک را نداشتند و تقریباً پس از یک هفته گیاهچه ها پژمرده شده و از بین می رفتند.

فصل پنجم

بحث و نتیجه گیری

در مباحث مرتبط با ریز ازدیادی اکثر قریب به اتفاق محققین، پس از یافتن راهی مناسب جهت ازدیاد نمونه های مورد نظر عوامل دیگری را نیز مورد تحقیق و تفحص قرار می دهند تا در بهبود نتایج تاثیر گذار باشند. کیفیت طیف رنگ های نوری، شدت نور آن ها و دوره نوردهی از جمله مواردی هستند که تاثیر بسیار بر روند رشد ریزنمونه ها دارند. استفاده از فناوری های جدید در زمینه منابع نوری از جمله LED که مصرف سرانه پایین انرژی، طول عمر بالا و اختصاصی بودن طول موج ساطعه را میسر می سازند، می توانند جایگزین های مناسبی برای شیوه های قدیمی تر باشند.

۱-۵ انتخاب نمونه های مناسب

در تمامی بررسی هایی که بر روی گیاه آلوئه ورا و برخی گونه های دیگر جنس آلوئه صورت گرفته است جوانه راسی گیاه آلوئه ورا به عنوان بهترین قسمت جهت ریزازدیادی انتخاب گردیده است و آزمایشات متعدد در این پژوهش نیز موید همین انتخاب درست است و گزارشات محققین قبلی نیز تایید می گردد. [۳۱، ۳۲، ۵۰، ۵۳، ۵۸] لهذا قسمت های دیگر گیاه همچون برگ ها و ریشه ها برای این منظور انتخاب نشدند.

همچنین در گزارشی که به منظور افزایش تعداد گیاه آلوئه ورا با استفاده از کشت بافت بود و به جهت تجاری انجام گردیده بود، عنوان شده بود که نصف کردن جوانه های راسی و قرار دادن آن ها در محیط کشت منجر به افزایش در تکثیر گیاه آلوئه ورا شده است. [۵۲] بدین منظور برای بررسی چنین موردی، در آزمایشات اولیه که به منظور فراهم سازی مقدمات کشت بافت بودند این پیشنهاد مورد بررسی مجدد قرار گرفت و همانطور که گزارش شده بود در نمونه های تحت آزمایش نیز این مورد مشاهده شد لکن در ادامه آزمایشات و انتخاب نمونه های دیگر، این شیوه مورد استفاده قرار نگرفت و همان جوانه کامل راسی درون محیط کشت قرار گرفت.

علت عدم استفاده از این روش نیز پس از تصور این موضوع این بود که احتمال آسیب به بافت مریستم در اثر برش وجود دارد و به همین خاطر از بکارگیری مجدد آن صرف نظر گردید. انتخاب و مقایسه نمونه هایی که علاوه بر جوانه راسی، حلقه های برگ نیز در انتهای خود به همراه داشتند با نمونه هایی که تنها جوانه راسی و یا همراه با حداقلی از حلقه های برگ باشند، هدف دیگری بود که در پژوهش حاضر مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصله همانند گزارشی بود که توسط Balraj, S & Neelu, S در ارتباط با این موضوع آزمایشاتی انجام داده بودند. [۲۶] نتایج بدست آمده در این تحقیق نیز اثبات کردند که هرگاه نمونه های انتخابی همانند شکل ۵-۲ باشد رشد بهتری ملاحظه می گردد. در غیر این صورت نمونه ها جوانه های کمتری را تولید خواهند کرد شکل ۵-۱.



شکل ۵-۲ نمونه ای با دو تا سه حلقه برگ در زیر جوانه راسی و بدنبال آن رشد جوانه ها از اطراف جوانه راسی (عکس از مولف)



شکل ۵-۱ نمونه ای با حلقه های برگ بسیار کم (عکس از مولف)

۵-۲ آلودگی های محیط کشت

محیط کشت، هوا، گیاه و عدم دقت محقق چهار عامل اساسی در آلودگی به شمار می روند و در این بین گیاه یکی از مهمترین عوامل آلودگی به حساب می آید زیرا با کمی دقت و تامل می توان سه عامل دیگر را حذف کرد. بنابراین از بین بردن آلودگی سطحی گیاه باید در جریان ضد عفونی به نحو کامل انجام شود تا محیط کشت آلوده نگردد. انواع نمونه هایی که معمولا در محیط کشت مورد استفاده قرار می گیرند برگ، گره های موجود در ساقه ها، ریشه، پیاز و جوانه های راسی می باشند که با توجه به نمونه انتخابی مقدار آلودگی نیز متغیر می باشد. برای مثال، ریشه و پیاز بدلیل قرار گیری در خاک منشا آلودگی های بسیاری خواهند بود. بالعکس، در قسمت هایی که بیرون از خاک هستند، و از جمله نمونه های انتخابی در این آزمایش، میزان آلودگی کاهش چشمگیری دارد.

بافت های گیاهی را با توجه به اینکه از کدام قسمت گیاه مادری تهیه می شوند، با انواع مختلفی از مواد شیمیایی استریل می نمایند. نوع و غلظت ماده استریل کننده مورد استفاده و مدت زمان تماس آن با نمونه گیاهی، بطور تجربی تعیین می شود. بسیاری از مرسوم ترین مواد شیمیایی که جهت استریل سطحی بکار گرفته می شود شامل سدیم هیپوکلریت، کلسیم هیپوکلریت، پراکسید هیدروژن، نیترات نقره و کلرید جیوه می باشد. یکی از متداولترین موادی که در ضد عفونی نمودن سطحی از آن استفاده می شود هیپوکلریت سدیم می باشد. برای مثال در تحقیقی که به منظور دستیابی به مقادیر زیاد از جوانه راسی گیاه آلوئه ورا صورت گرفته بود، نمونه ها پس از ۳۰ دقیقه قرار گیری در زیر آب روان به مدت ۳۰ دقیقه در محلول ۲٪ سدیم هیپوکلریت قرار گرفتند. [۲۷] در آزمایشی دیگر نیز که به منظور ریزازدیادی انجام گرفت نمونه ها در انواع محلول های هیپوکلریت سدیم با غلظت های متفاوت ۱٪، ۲٪ و ۳٪ به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفتند تا تاثیر غلظت های مختلف هیپوکلریت سدیم را در میزان ضد عفونی نمودن سطحی با یکدیگر مقایسه شوند. [۵۸] همچنین تعدادی از محققین علاوه بر سدیم

هیپوکلریت از کلرید جیوه نیز برای این کار استفاده می کردند. در آزمایشی که بر روی ریزازدیادی وارسته چینی از گیاه آلوئه ورا صورت گرفت پس از قرارگیری نمونه ها در زیر آب روان به مدت ۲۴ ساعت، نمونه ها وارد محلول ۷۰٪ اتانول به مدت ۱ دقیقه و ۰٫۱٪ کلرید جیوه به مدت ۱۰ دقیقه گردیدند و در نهایت با سه نوبت آبکشی در آب استریل دوبار تقطیر ضد عفونی پایان یافت. [۳۷] تقریباً با اندکی تغییرات در مراحل ضد عفونی، آزمایشات دیگری نیز بر روی این گیاه صورت گرفته است. [۳۲، ۵۰] در پژوهش جاری نیز از محلول هیپو کلریت سدیم ۲٪، اتانول ۷۰٪ و محلول کلرید جیوه (II) ۰٫۱٪ جهت ضد عفونی سطحی استفاده گردید که قبلاً در پژوهش های گذشته مورد استفاده قرار گرفته بود و نتایج بدست آمده نیز نشان دادند که نوع مواد مورد استفاده مناسب بودند. هرچند اندکی آلودگی در برخی محیط های کشت نیز دیده می شد که غیر قابل انتظار هم نیست.

۳-۵ قهوه ای شدن

همانطور که در تفسیر نتایج هم گزارش گردید برخی از نمونه هایی که وارد محیط کشت می شدند پس از مدتی تغییر رنگ داده، قهوه ای می شدند.

علت چنین واکنشی آزاد شدن آنزیم های polyphenyl oxidize از پلاست های آسیب دیده سلولی می باشد که در اثر قرار گرفتن در مجاورت سوبستراهای این آنزیم که آن ها هم در اثر آسیب دیدگی سلولی از واکوئل های سلول های گیاهی آزاد می شوند، منتج به تغییرات شیمیایی شده که نشانه آن بروز رنگ قهوه ای در محیط کشت می باشد. بنابراین برش دادن نمونه ها و آسیب سلول ها عامل اصلی در بروز قهوه ای شدن می باشد زیرا از دخالت سایر عواملی که منجر به قهوه ای شدن می گردند، مانند رقیق بودن بیش از حد محیط کشت، شدید اسیدی یا قلیایی بودن محیط کشت، کهنگی و فاسد بودن آگار و اتوکلاو نمودن نادرست محیط کشت پرهیز شده بود.

حتی در هنگام ضد عفونی نمودن نیز سعی گردید با تکان های آرام مراحل هم زدن انجام شود تا آسیب کمتری به نمونه ها وارد گردد. با این وجود هنوز مواردی نیز ملاحظه می شوند که تغییر رنگ در محیط کشت ملاحظه می گردید. در این موارد و برای کاهش قهوه ای شدن محیط کشت نمونه ها مرتباً به فاصله زمانی چهار هفته یکبار نمونه ها واکشت می گردیدند.

۴-۵ هورمون های رشد

در قسمت روش ها ذکر گردید که در این پژوهش از دو نوع محیط کشت با غلظت هورمون های مختلف استفاده گردیده است. اولین محیط کشت به همراه غلظت هورمون های 0.2 mg/l IBA و 1 mg/l BA انتخاب گردید و همانطور که ذکر شد این محیط کشت انتخابی بیشتر جنبه تمرینی داشت اما نتایجی که بدست آمد بدین گونه بود که در مدت قرار گیری نمونه ها درون محیط کشت فقط رشد جوانه دیده می شد و هیچ نشانه ای از زایش ریشه پس از ۲ ماه ملاحظه نشد. به همین دلیل با توجه به پژوهش های گذشته که بیشتر از BA و NAA استفاده می کردند [۳۱، ۴۹، ۵۰] محیط کشت با غلظت هورمون های mg/l NAA 0.5 و 1 mg/l BA، که قبلاً نیز توسط محققى که در تکثیر گیاه آلوئه ورا به روش ریزازدیادی کار کرده بود، استفاده گردید. [۲۷] همانند آنچه که توسط محقق قبلی اعلان شده بود این محیط کشت جهت رشد جوانه و ریشه زایی مناسب بود و در تمام موارد زایش جوانه و ریشه دیده شد.

۵-۵ تاثیر نورهای مختلف بر روی ریخت شناسی نمونه ها

از جمله بررسی هایی که انجام شد مقایسه نحوه رشد نمونه ها و ریخت شناسی آن ها در زیر نورهای مختلف با ایجاد اتاقک های رشد و قرار گیری نمونه ها در هر یک از اتاقک های مخصوص به خود بود. با بررسی مقالات و نوشتجات مختلفه که در این زمینه به چاپ رسیده اند با نتایج متفاوتی برخورد می گردد.

در تحقیقی که بر روی نوعی ارکید (*cattleya lindl*) انجام شده است و هدف آن تاثیر طول موج های آبی، قرمز، سفید و محیط تاریکی است، ملاحظه می شود که گیاهچه هایی که در زیر نور قرمز رشد کرده اند طول جوانه ها نسبت به نمونه های زیر نور آبی و سفید طویل تر می شوند و بالعکس نمونه های زیر نور آبی اولاً تعداد ریشه های بیشتری ایجاد می نمایند و ثانیاً ریشه ها نسبت به نمونه های زیر نور سفید و قرمز طویل تر می گردند. در همین تحقیق و همچنین در بررسی دیگر معلوم گردیده است که میزان وزن تر نمونه های زیر نور قرمز از نمونه های زیر نور آبی و سفید بیشتر است. اما وزن خشک نمونه های زیر نور آبی از نمونه های دیگر بیشتر می شود. [۵۹]

در پژوهشی دیگر که هدف آن تاثیر نور قرمز و آبی بر روی میزان رشد گیاهچه های توت فرنگی در محیط درون شیشه ای بود، تعداد برگ ها و میزان کلروفیل در زیر نور قرمز + آبی بیشتر از نمونه های موجود در زیر نور آبی و قرمز و سفید بود. همچنین ریشه ها در نمونه هایی که در زیر نور آبی قرار داشتند طویل تر از نمونه های دیگر بود. بالعکس وزن تر نمونه های زیر نور قرمز و طول گیاهچه ها نیز از نمونه های دیگر بیشتر بود. [۶۰]

در پژوهشی دیگر که مقایسه میزان کلروفیل ها، بتا کاروتن و لوتئین در کلم پیچ در زیر نورهای مختلف LED هدف اصلی آزمایش بود میزان کلروفیل های a و b در نمونه های زیر نور قرمز بیشتر از نمونه های زیر نور آبی و فراسرخ بود. همچنین میزان لوتئین و بتاکاروتن موجود در نمونه های زیر نور قرمز از نمونه ها دیگر بیشتر بود [۶۱].

در مطالعه ای دیگر که بر روی تاثیر نورهای LED قرمز و آبی در قیاس با لامپ های Halide metal (MH) صورت گرفت بافت مزوفیل اسفنجی و پالیسید (Palisade) در نمونه های زیر لامپ های MH ضخیم تر از نمونه های زیر نور قرمز + آبی، قرمز و آبی بود اما از لحاظ ضخامت نمونه های زیر نور قرمز + آبی حالت میانه را داشتند. ضخامت روپوست

در نمونه های زیر نور قرمز+ آبی و MH بیشتر از نمونه های زیر نور قرمز و آبی بودند. [۵۵]

در این تحقیق، تمام نمونه هایی که درون اتاقک های خود قرار داشتند، چه آن هایی که واجد حلقه های برگ بودند و چه آن هایی که فاقد حلقه های برگ بودند مشابه با یکدیگر رشد کردند و تقریباً هیچ گونه تغییری در شکل ظاهری آن ها دیده نشد. اما از لحاظ میزان غلظت کلروفیل که در طی ۸ هفته بررسی آن صورت پذیرفت متفاوت بودن و تاثیر گذار بودن طیف نوری نشان داده شد. در آزمایشی که شرایط یکسانی از لحاظ تازگی و شادابی بافت برای تمام نمونه ها در طی سه مرتبه آزمایش در نظر گرفته شد، میزان کلروفیل a در نمونه های زیر نور قرمز+ آبی و آبی بیشتر از نمونه های زیر نور قرمز و سفید بود. همچنین میزان کلروفیل b در نمونه های زیر نور آبی بیشتر از نمونه های دیگر بود.

این تفاوت ها در پاسخ به میزان کلروفیل، احتمالاً بدلیل دور بودن این گیاهان از لحاظ سیر تکاملی (Phylogenetically) نسبت به هم، متفاوت بودن نوع LED های بکار رفته و شدت نور بکار رفته و حتی نوع محیط رشد آن ها دانست که تفاوت هایی را بوجود آورده است. معذک مطالعات و آزمایشات دقیق تر بخصوص بررسی های بیوشیمیایی جهت پاسخ گویی صریح به این مشاهدات لازم و ضروریست.

۵-۶ سازگاری

نکته ای که در پایان این بحث لازم است به آن پرداخته شود تفاوت شرایط درون محیط درون شیشه با محیط خاک است که کاملاً از لحاظ رطوبت و میزان مواد غذایی در دسترس متفاوت از یکدیگر می باشند بنابراین انتقال سریع نمونه ها به خاک، حاصلی جز از بین رفتن نمونه ها نخواهد داشت.

در پژوهش های گذشته از تعدادی از ترکیبات مختلف مانند ورمیکولیت، ماسه، کوکوپیت، پرلیت و خاک باغچه به منظور خاک گلدان استفاده می شد [۲۷, ۳۷, ۴۹] و در این تحقیق نیز جهت سازگاری نمونه های ریشه دار، از مخلوطی از خاک های پرلیت، کود برگ و ماسه به نسبت (۱:۱:۱) استفاده گردید. نخست خاک غیر استریل مورد استفاده قرار گرفت. در ضمن خاک حاصل نیز با محلول MS بدون ویتامین، هورمون و آگار تقویت گردید و گلدان ها نیز به کمک پوشش پلاستیکی پوشیده شده و در زیر نور فلورسنت در دمای $25 \pm 1^\circ C$ قرار گرفتند. همانطور که در بخش مشاهدات ذکر گردید لاروهایی پس از انتقال گیاهچه ها دیده شد که به نظر می رسید عامل اضمحلال بافت گیاه باشد. به همین دلیل برای نمونه های دیگر خاک را اتوکلاو نموده اما این کار نیز با موفقیت همراه نبود و گیاهچه ها به فاصله یک هفته از انتقال به خاک از بین رفتند. همچنین گیاهچه هایی که در زیر نورهای مختلف رشد کرده بودند و واجد ریشه هایی به تعداد ۸-۶ عدد و با میانگین طول ۱۰-۱۲ cm، پس از انتقال به خاک دچار اضمحلال و پژمردگی گردیدند و هیچ تفاوتی بین نمونه ها در زیر نورهای مختلف دیده نشد. علیرغم اعلام موفقیت پژوهش های گذشته در انتقال گیاهچه ها به محیط خاک، در این تحقیق موفقیتی حاصل نشد. در صورتیکه تفاوت ناچیزی بین ترکیب محیط خاک در این تحقیق با پژوهش های قبلی وجود داشت. به نظر میرسد جهت حفظ و پرورش نمونه های حاصله در محیط خاک یا باید از پایه های رشد یافته تر و مسن استفاده نمود و یا آنکه سعی در تغییر ترکیب و ماهیت محیط جدید یعنی خاک نمود تا گیاهان تازه منتقل شده به خاک فرصت لازم برای سازگاری در اختیار داشته باشند.

آن چه که در انتها می توان به عنوان نتیجه گیری از این پژوهش اعلام نمود این است که از جمله طرق تکثیر فراوان این گیاه پرارزش کشت بافت جوانه راسی آن است. طول موج های نوری مختلفه تاثیر چندانی در رشد پایه های جدید ندارند ولیکن برخی از طول موج ها می توانند تغییراتی در میزان و نسبت کلروفیل های a و b آن ها ایجاد نمایند که جای تحقیقات بعدی دارد.

۵-۷. پیشنهادات

مطالعات آینده می تواند در زمینه های زیر باشد:

۱. بررسی سایر هورمون های رشد مانند KIN، TA، IAA، D 2,4 و Zeatin زیر

نورهای مختلف در این گیاه

۲. استفاده و بررسی طول موج های خاص

۳. بررسی تاثیر طول دوره نوردهی در زیر نورهای مختلف

۴. بررسی تاثیر شدت های نوری مختلف بر روی نمونه ها

۵. استفاده از LED های با نور فرا سرخ، نور زرد، نور نارنجی، و سبز

۶. بررسی سایر غلظت های NAA و BA در زیر نورهای مورد استفاده

۷. بررسی تاثیر نورهای مختلف بر میزان غلظت کربوهیدرات ها، کاروتنوئید ها و ...

۸. تغییر در نسبت، ترکیب و ماهیت محیط خاک در هنگام مرحله سازگاری جهت ادامه رشد

پایه های نوین و همچنین بررسی مجدد محیط های خاکی که در تحقیقات قبلی از آن ها

استفاده شد

منابع

فهرست منابع

۱. سمایی کیا، ر. رساله تحقیقاتی. تکثیر گیاه سوسن چلچراغ و سه گونه دیگر از جنس لیلیوم با استفاده از روش مایکروپروپاگیشن؛ مقایسه روش های ضد عفونی، تاثیر هورمون های رشد و شرایط سازگاری. ۱۳۸۶-۱۳۸۷، BIHE: تهران.
۲. دادور، ر. رساله تحقیقاتی. بررسی تاثیرات تنظیمی نفتالین استیک اسید و ۶- بنزیل آدنین بر باززایی ریز نمونه های فلسی سوسن چلچراغ از طریق روش کشت بافت گیاهی. ۱۳۸۸-۱۳۸۶، BIHE: تهران.
۳. Bassetti, A. and S. Sala, *The Great Aloe book*. 2005: Zuccari. p. 12.
۴. Kramer, S.N., *First pharmacopeia in man's recorded history*. Am J Pharm Sci Support Public Health, 1954. **126**(3): p. 76-84.
۵. Bassetti, A. and S. Sala, *The Great Aloe book*. 2005: Zuccari. p. 11.
۶. Danhof, I.E., *Remarkable Aloe: Aloe Through the Ages*. Omnimedicus Press: Grand Prairie, Texas, USA, 1987: p.82.
۷. El Zawahry, M.E., M.R. Hegazy, and M. Helal, *Use of aloeiim treating leg ulcers and dermatoses*. dermatology, 1973. **12**(1): p. 68-73.
۸. Pande, A., *Introductory Botany*. 2000: Rastogi Publications. 992.
۹. Hickey, M. and C. King, *100 families of flowering plants*. 1988: Cambridge University Press. p. 546.
۱۰. Bassetti, A. and S. Sala, *The Great Aloe book*. 2005: Zuccari. p. 20.
۱۱. Ni Yawei and I.R. Tizard., *Analytical methodology: the gel-analysis of aloe pulp and its derivatives*. CRC Press: Boca Raton, 2004: p. 111-126.
۱۲. Morton ,J.F., *Major Medicinal Plants*. 1977: springfield.
۱۳. Bassetti, A. and S. Sala, *The Great Aloe book*. 2005: Zuccari. p. 19.
۱۴. Atherton, P., *The Essential Aloe vera*. 1997: Mill Enterprises.
۱۵. Hamman, J.H., *Composition and applications of Aloe vera leaf gel*. Molecules, 2008. **13**(8): p. 1599-616.
۱۶. Goyal, P.K. and P. Gehlot, *Radioprotective effects of Aloe vera leaf extract on Swiss albino mice against whole-body gamma irradiation*. J Environ Pathol Toxicol Oncol, 2009. **28**(1): p. 53-61.

١٧. Morton, J.F., *Folk uses and commercial exploitation of Aloe leaf pulp*. economic botany, 1961. **15**: p. 311-319.
١٨. Duke, J.A., *The green pharmacy: new discoveries in herbal remedies for common diseases and conditions from the world's foremost authority on healing herbs* : ١٩٩٧ . Rodale Press.
١٩. Lorenzetti, L.J., et al., *Bacteriostatic Property of Aloe Vera*. J Pharm Sci, 1964. **53**: p. 1287.
٢٠. Yongchaiyudha, S., et al., *Antidiabetic activity of Aloe vera L. juice, I - Clinical trial in new cases of diabetes mellitus*. Phytomed, 1966. **3**: p. 241-243.
٢١. Zhang, L. and I.R. Tizard, *Activation of a mouse macrophage cell line by acemannan: the major carbohydrate fraction from Aloe vera gel*. Immunopharmacology, 1996. **35**(2): p. 119-28.
٢٢. Langmead, L., R.J. Makins, and D.S. Rampton, *Anti-inflammatory effects of aloe vera gel in human colorectal mucosa in vitro*. Aliment Pharmacol Ther, 2004. **19**(5): p. 521-7.
٢٣. Vinson, J.A., H. Al Kharat, and L. Andreoli, *Effect of Aloe vera preparations on the human bioavailability of vitamins C and E*. Phytomedicine, 2005. **12**(10): p. 760-5.
٢٤. Kahlon, J.B., et al., *In vitro evaluation of the synergistic antiviral effects of acemannan in combination with azidothymidine and acyclovir*. Mol Biother, 1991. **3**(4): p. 214-23.
٢٥. Kalimuthu, K. and S. Vijayakumar, *Micropropagation of Aloe vera Linn. A medicinal plant*. International Journal of Biotechnology and Biochemistry, 2010. **6**(3): p. 405-410.
٢٦. Balraj, S. and S. Neelu, *Significance of explant preparation and sizing in Aloe vera L. A highly efficient method for in vitro multiple shoot induction*. Scientia Horticulturae, 2009. **122**: p. 146-151.
٢٧. Hashemabadi, D. and B. Kaviani, *Rapid micro-propagation of Aloe vera L. via shoot multiplication*. African Journal of Biotechnology, 2008. **7**(12): p. 1899١٩٠٢,-
٢٨. Bassetti, A. and S. Sala, *The Great Aloe book*. 2005: Zuccari. p. 21.
٢٩. Keijzer, C.J. and M. Cresti, *A Comparison of Anther Tissue Development in Male Sterile Aloe vera and Male Fertile Aloe ciliaris*. Annals of Botany, 1987. **59**(5): p. 533-542.

٣٠. Aggarwal, D., *Tissue culture of a medicinal plant-ALOE VERA L.*, in *Department of Biotechnology and Environmental Sciences*, Deemed University. p. 52.
٣١. Baksha, R. and R. Khatun, *Micropropagation of Aloe barbadensis Mill. Through In vitro Culture of Shoot tip Explants*. *Plant Tissue Cult. & Biotech*, 2005. **15**(2): p. 121-126.
٣٢. Natali, L. and A. Cavallini, *In vitro culture of Aloe Barbadensis Mill.: Micropropagation from vegetative meristems*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1990. **20**: p. 71-74.
٣٣. Smith, R., *Plant tissue culture: techniques and experiments*. 2000: Academic Press. p. 2.
٣٤. Smith, R., *Plant tissue culture: techniques and experiments*. 2000: Academic Press. p. 3.
٣٥. Gautheret, R., *Plant tissue culture: A history*, in *Journal of Plant Research*. 1983, Springer Japan. p. 393-410.
٣٦. Murashige, T. and F. Skoog, *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures*. *Physiol Plant*, 1962. **15**: p. 473-497.
٣٧. Liao, Z., M. Chen, and F. Tan, *Micropropagation of endangered Chinese aloe*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2004. **76**: p. 83-86.
٣٨. Smith, R., *Plant tissue culture: techniques and experiments*. 2000: Academic Press. p. 8.
٣٩. Slater, A., N.W. Scott, and M.R. Fowler, *Plant biotechnology : the genetic manipulation of plants*. 2nd ed. 2008, Oxford ; New York: Oxford University Press. p. 42.
٤٠. Arteca, R.N., *Plant growth substances: principles and applications*. 1996: Chapman & Hall. p. 85.
٤١. Arteca, R.N., *Plant growth substances: principles and applications : ١٩٩٦*. Chapman & Hall. p. 51.
٤٢. Smith, R., *Plant tissue culture: techniques and experiments*. 2000: Academic Press. p. 48.
٤٣. Pierik, R., *In vitro culture of higher plants*. 1999: Kluwer Academic Publishers. p. 69.

۴۴. Slater, A., N.W. Scott, and M.R. Fowler, *Plant biotechnology : the genetic manipulation of plants*. 2nd ed. 2008, Oxford ; New York: Oxford University Press. p. 43.
۴۵. Arteca, R.N., *Plant growth substances: principles and applications*. 1996: Chapman & Hall. p. 17.
۴۶. Arteca, R.N., *Plant growth substances: principles and applications*. 1996: Chapman & Hall. p. 18.
۴۷. Slater, A., N.W. Scott, and M.R. Fowler, *Plant biotechnology : the genetic manipulation of plants*. 2nd ed. 2008, Oxford ; New York: Oxford University Press. p. 44.
۴۸. Pierik ,R., *In vitro culture of higher plants*. 1999: Kluwer Academic Publishers. p. 67.
۴۹. Abrie , A.L. and V. Staden J, *Micropropagation of the endangered Aloe polyphylla*. Plant Growth Regulation, 2001. **33**: p. 19-23.
۵۰. Ahmed, S. and A.H. Kabir, *Development of rapid Micropropagation method of Aloe vera L*. Sjemearstvo, 2007. **24**.
۵۱. Hosseini, R. and M. Parsa, *Micropropagation of Aloe vera L. Grown in south Iran*. Pakistan Journal of Biological Sciences, 2007. **10**(7): p. 1134-1137.
۵۲. Kumar, A., *Plant Tissue Culture And Molecular Markers: Their Role In Improving Crop Productivity*. 2009: I.K. International Publishing House Pvt. Ltd.
۵۳. Aparajita, S. and S.C. Roy, *In vitro regeneration and micropropagation of Aloe vera L*. Scientia Horticulturae, 1991. **47**: p. 107\۱۱۲,-
۵۴. Boylestad, R., L. Nashelsky, and F. Monssen, *Electronic devices and circuit theory: laboratory manual*. 8th ed. 2002: Prentice Hall. p. 11- 12.
۵۵. Schuerger, A.C., C.S. Brown, and E.C. Stryjewski, *Anatomical features of pepper plants (Capsicum annuum L.) grown under red light-emitting diodes supplemented with blue or far-red light*. Ann Bot, 1997. **79**(3): p. 273-82.
۵۶. Held, G., *Introduction to Light Emitting Diode Technology and Applications*. 2008: CRC Press.
۵۷. Momeni, T.k. and K. Sedaghat, *chlorophyll and its stability*. 2000, Tehran, Iran: Research Institute of Forests and Rangelands. p. 161.
۵۸. Albany, N. and J. Vilchez, *A methodology for the in vitro propagation of Aloe vera L*. Rev. Fac. Agron, 2006. **23**: p. 211-219.

59. Cybularz-urban, T., E. Hanus-fajerska, and A. Swiderski, *effect of light wavelength on in vitro organogenesis of a cattleya hybrid*. Acta Biologica Cracoviensia, 2007. **49**(1): p. 113-118.
60. Nhut, T.D., *Responses of strawberry plantlets cultured in vitro under superbright red and blue light-emitting diodes*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2003. **73**: p. 43-52.
61. Lefsrud, G.M., *Irradiance from Distinct wavelength light-emitting diodes affect secondary metabolites in kale*. HortScience, 2008. **43**(7): p. 2243-2244.