Nova Biologica Reperta 6(4): 487-494 (2020)
Print ISSN: 2423-6330/Online ISSN: 2476-7115
https://nbr.khu.ac.ir; Kharazmi University Press; DOI: 10.29252/nbr.6.4.487

یافته‌های نوین در علوم زیستی
جلد ۶، شماره ۴، صفحات ۴۸۷ الی ۴۹۴ (۱۳۹۸)
انتشارات دانشگاه خوارزمی

بررسی نقش تنظیم‌کننده‌های رشد و نور بر میزان فنول و باززایی آلوئه ورا

امجد ساعدی[۱]، حسین مرادی[۲] و مهناز کریمی[۲]
[۱]گروه بیوتکنولوژی و ژنتیک مولکولی محصولات باغبانی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران؛ [۲]دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران
مسؤول مکاتبات: حسین مرادی، h.moradi@sanru.ac.ir

چکیده. گیاه صبر زرد (*Aloe vera*)، یکی از گیاهان با ارزش در صنایع دارویی، آرایشی، بهداشتی و غذایی محسوب می‌شود. افزایش نیاز به این گیاه جهت تولید تجاری محصول، سبب انجام تحقیقات گسترده‌ای بر روی کشت شرایط آزمایشگاهی آن شده است. به همین منظور این ازمایش در دو مرحله انجام گردید. در بخش اول این تحقیق بهترین روش سترون‌سازی ریزنمونه‌های منطقه پاجوش‌های آلوئه ورا مطالعه گردید. در بخش دوم، اثر نوع ریزنمونه، نور (تاریکی و روشنایی) و تنظیم‌کننده‌های رشد BAP و NAA بر باززایی و میزان مواد فنولی این گیاه بررسی شد. این آزمایش به صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار طراحی شد. بهترین پروتکل سترون‌سازی، کلرید جیوه ۰/۱ درصد (به مدت ۲ دقیقه)، اتانول ۷۰ درصد (به مدت ۳۰ ثانیه) و هیپوکلریت سدیم ۱۵ درصد (به مدت ۵ دقیقه) به دست آمد. بهترین ریزنمونه، ریزنمونه سفید کوچک به دست آمده از قاعده برگ بود که در حضور تاریکی کم‌ترین درصد فنول و بیش‌ترین درصد زنده‌مانی (۶۷/۵ درصد) را به همراه داشت. همچنین محیط کشت MS به همراه ۰/۷۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر NAA بیش‌ترین تعداد ساقه (۲/۵) و طول ساقه (۴۲/۱۰۷ میلی‌متر)، درصد استقرار (۷۳ درصد)، تعداد برگ (۶/۳۳)، قطر برگ (۴/۸ میلی‌متر)، کلروفیل b (۹/۲۱۶ میلی‌گرم/گرم) و کارتنوئید (۴/۸۱ میلی‌گرم/گرم) را فراهم کرد. بیش‌ترین مقدار کلروفیل a (۵۶/۰۷ میلی‌گرم/گرم) و کلروفیل کل (۶۱/۳۵ میلی‌گرم/گرم) نیز در محیط هورمونی حاوی ۱/۵ میلی‌گرم در لیترBAP به همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیترNAA به دست آمد. همچنین بیش‌ترین تعداد ریشه (۳) و طول ریشه (۳۳/۳ میلی‌متر) در محیط بدون هورمون مشاهده شد.

واژه‌های کلیدی. تنش، دارویی، ریزنمونه، کشت بافت،کلرید جیوه

The effect of growth regulators and light on the phenolic content and in vitro regeneration of *Aloe vera*

Amjad Saedi[1], Hossein Moradi[2] & Mahnaz Karimi[2]
[1]Biotechnology and Genetics of Molecular Horticulture Products, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University (SANRU), Sari, Iran; [2]Faculty of Crop Sciences, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University (SANRU), Sari, Iran
Correspondent author: Hossein Moradi, h.moradi@sanru.ac.ir

Abstract. *Aloe vera* L. is one of the most valuable plants in the pharmaceutical, cosmetic, sanitary and food industries. In vitro culture is used for commercial production and due to the abundant application of this plant, extensive research has been performed on the *in vitro* culture of *Aloe vera*. For this purpose, the present study was conducted at two stages . At the first stage, the best method of sterilization of explants derived from *Aloe vera* offshoots was investigated. At the second stage, the effect of the type of explants, the light condition (dark and bright) and the effect of BAP (Benzyl Amino Purine) and NAA (α-Naphthalene acetic acid)) growth regulators on regeneration and the amount of phenolic compounds were studied. A factorial experiment was executed on the basis of a completely randomized design with three replications. The best sterilization protocol was 0.1% mercuric chloride (for 2 minutes), 70% ethanol (for 30 seconds) and 15% sodium hypochlorite (for 5 minutes). The little white explant derived from the base of leaves, with the lowest percentage of phenol and the highest survival rate (67.5%) in darkness, was found to be the best candidate. MS medium supplemented with 0.75 mg / L BAP and 0.25 mg / L NAA resulted in the highest stem number (2.5) and stem length (42.107 mm), establishment percentage (73%), leaf number (6.33), leaf diameter (4.8 mm), chlorophyll b (9.216 mg/g) and carotenoids (4.81 mg/g). The highest content of chlorophyll a (56.07 mg/g) and total chlorophyll

Received 26.06.2018/ Revised 01.02.2019/ Accepted 23.02.2019/ Published 20.01.2020
دریافت: ۱۳۹۷/۰۴/۰۴/ اصلاح: ۱۳۹۷/۱۱/۱۲/ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۲/۰۴/ انتشار: ۱۳۹۸/۱۰/۳۰

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.4.12.3]
[DOI: 10.29252/nbr.6.4.487]

(61.35 mg/g) were found in samples treated with hormonal medium, supplemented with 1.5 mg / L of BAP with 0.5 mg / L of NAA. The maximum number (3) and average length (33.3 mm) of roots were observed in samples treated with the hormone-free medium.

Keywords. explant, medicine, mercuric chloride, stress, tissue culture

مقدمه

ارزش دارویی، تقاضای بازار و سطح فراوری از مهم‌ترین شاخص‌های سنجش اقتصادی یک گیاه دارویی است. به گزارش سازمان خواروبار جهانی، ارزش تجارت جهانی گیاهان دارویی که درحال حاضر حدود صد میلیارد دلار در سال است، در سال ۲۰۵۰ میلادی به رقم پنج تریلیون دلار خواهد رسید (Kashafi Bonab, 2010). کشور ایران با داشتن شرایط اقلیمی و تنوع گیاهی به مراتب بهتر از اروپا، در حال حاضر تنها ۶۰ تا ۹۰ میلیون دلار از تجارت جهانی گیاهان دارویی را به خود اختصاص داده است (Kashafi Bonab, 2010). خوشبختانه روی آوردن دنیا، به خصوص کشورهای پیشرفته به استفاده از فراورده‌های گیاهی و مصرف روز افزون آن در جهان، چه در صنعت داروسازی و چه در صنایع غذایی و آرایشی-بهداشتی و همچنین تأکید سازمان بهداشت جهانی درجایگزینی تدریجی مواد طبیعی به جای مواد شیمیایی موجب شده تا کشورهای مختلف جهان نسبت به سرمایه گذاری، برنامه ریزی، کشت و تولید انبوه گیاهان دارویی در سطوح صنعتی و استفاده از آن در صنایع دارویی، بهداشتی و غذایی اقدام کنند (Hosseini *et al.*, 2008). یکی از مهم‌ترین گیاهان دارویی حال حاضر دنیا، گیاه دارویی صبر زرد (*Aloe vera*) است که بر اساس اظهار نظر International Aloe Science Council (IASC) ارزش تجارت جهانی محصول خام این گونه گیاهی حدود ۱۲۵ میلیون دلار و ارزش محصولات نهایی تولید شده آن بالغ بر ۱۱۰ میلیارد دلار است.

تکثیر این گیاه به روش سنتی به‌وسیله جدا کردن پاجوش‌ها از گیاه مادری و کاشت آن‌ها در گلدان‌های جداگانه انجام می‌گیرد که آلوئه ورا در سال ۳ تا ۴ پاجوش تولید می‌کند و برای کشت این گیاه در یک هکتار به ۲۰ تا ۲۴ هزار پاجوش احتیاج است و تهیه این مقدار پاجوش به روش سنتی وقت و هزینه زیادی را می‌طلبد (Golchubian *et al.*, 2012). در افزایش صبر زرد با بذر نیز به دلیل پدیده نرعقیمی و دگرگشنی، افزایش گوناگونی ژنتیکی قابل‌توجهی در نتایج دیده می‌شود. تکثیر درون شرایط آزمایشگاهی این گیاه روشی است که می‌توان به تولید انبوه آن دست‌یافت (۳۰ تا ۱۰۰ برابر سرعت تکثیر نسبت به پرورش سنتی) و نیاز بازار به این گیاه را تأمین کرد (Keijzer & Cresti, 1987). بسیاری از گیاهان چوبی و تعدادی از گیاهان علفی، وقتی در شرایط آزمایشگاهی کشت می‌شوند موجب قهوه‌ای شدن ریزنمونه و تولید فنل می‌گردند. قهوه‌ای شدن از طریق فعالیت پلی فنل اکسیداز (PPO) و پراکسیداز و در اثر تحریک واکنش دفاعی ناشی از زخم شدن رخ می‌دهد (Pan & Staden, 1999).

نوع ریزنمونه استفاده‌شده در محیط کشت تاثیر زیادی در تکثیر این گیاه دارد که نوک شاخساره به دلیل تقسیم سلولی زیاد و ترشح کم مواد فنولیکی، به‌عنوان ریزنمونه مناسب در انواع محیط‌های کشت بافتی، مورداستفاده قرار می‌گیرد (Aggarwal & Barna., 2004; Liao *et al.*, 2004; Hamid Oghli *et al.*, 2005; Velcheva *et al.* 2005; Hashem Abadi & Kaviani, 2008; Kanwar *et al.*, 2015). علاوه بر نوک شاخساره در جوانه انتهایی، جوانه جانبی و ساقه به همراه دو برگ کناری (Shamsian *et al.*, 2016)، پاجوش (Golchubian *et al.*, 2012) برای ریزازدیادی و کالوس‌دهی در محیط کشت بافتی MS مورداستفاده قرار گرفت. همچنین محققین مختلف جهت تعیین غلظت مطلوب هورمونی در محیط کشت که باعث باززایی مستقیم ریز نمونه و بدون واکشت مجدد گردد، آزمایشات متفاوتی را طراحی کردند. نتایج تحقیقی (Baksha *et al.*, 2005) نشان داد که بهترین محیط کشت برای تولید شاخساره در گیاه صبر زرد، محیط حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP (۶-بنزیل آمینو پورین) به همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA (۱-نفتالین استیک اسید) با میانگین تعداد شاخساره ۱۰/۱±۰/۵ است که برای ریشه‌دهی هم از ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون NAA استفاده کردند و بعد از گذشت ۲۸ روز ۹۵ درصد از گیاهان با میانگین ۴/۸±۰/۵۳ ریشه برای هر ریزنمونه را فراهم کردند. در پژوهشی (Kalimuthu *et al.*, 2010) در مرحله شاخه‌دهی از هورمون BAP در ترکیب با غلظت‌های مختلف آدنین سولفات و در مرحله ریشه‌دهی از هورمون‌های NAA و IAA استفاده کردند که بیش‌ترین تعداد شاخساره‌ها را از محیط کشت حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP به همراه ۵۰ میلی‌گرم در لیتر آدنین سولفات با میانگین ۶ ±۰/۲۶ به دست آوردند و برای ریشه‌دهی، محیط حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA با میانگین ریشه‌های به دست‌آمده ۵/۵ را گزارش دادند. تکثیر کم این گیاه در روش سنتی و تولید فنل بالای ریز نمونه‌ها

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.4.12.3]
[DOI: 10.29252/nbr.6.4.487]

در روش کشت بافتی از جمله مشکلات محدود کننده افزایش فراوان این گیاه محسوب می‌شود. به همین منظور از جمله اهداف این تحقیق شامل کنترل مواد فنولیکی در تکثیر فراوان و تعیین بهترین غلظت هورمونی جهت باززایی و ریشه‌زایی مستقیم و بدون واکشت بود.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌ها

در پاییز سال ۱۳۹۴ گیاه آلوئه ورا از گلخانه گروه علوم باغبانی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری تهیه و پاجوش‌های متفاوت از گیاه مادری جدا شدند.

سترون‌سازی ریزنمونه‌ها

پاجوش‌ها به مدت یک ساعت زیرآب جاری قرار گرفته، سپس برگ‌ها و ریشه‌ها از پاجوش جداشده و بقیه نمونه‌ها به اتاق کشت و زیر لامینارهود منتقل شدند. ریزنمونه‌های تهیه شده ۲ سانتی‌متری به سه روش زیر سترون شدند.

۱- اتانول ۷۰ درصد (۳۰ ثانیه) + محلول تازه کلرید جیوه ۰/۱ درصد (۲ دقیقه) + هیپوکلریت سدیم ۱۵ درصد (۵ دقیقه)

۲- اتانول ۷۰ درصد (۱ دقیقه) + محلول تازه کلرید جیوه ۰/۱ درصد (۲ دقیقه) + هیپوکلریت سدیم ۱۵ درصد (۵ دقیقه)

۳- اتانول ۷۰ درصد (۳۰ ثانیه) + محلول تازه کلرید جیوه ۰/۱ درصد (۳ دقیقه) + هیپوکلریت سدیم ۱۵ درصد (۵ دقیقه)

کشت ریزنمونه‌ها در شرایط درون شرایط آزمایشگاهی

پس از یافتن بهترین تیمار سترون‌سازی، ریزنمونه‌ها به چهار نوع سبز (۱-۰/۵ سانتی‌متر)، سفید کوچک (۱-۰/۵ سانتی‌متر)، سفید بزرگ (۲-۱/۵ سانتی‌متر) و نیم‌سفید (۱-۰/۷۵ سانتی‌متر) (شکل ۱) تقسیم شدند و به محیط کشت MS بدون هورمون با ۲ شرایط نوری متفاوت تاریکی و روشنایی انتقال داده شدند.

نمونه‌ها جهت باززایی و ریشه‌زایی مستقیم، بعد از ۳۰ روز به محیط هورمون دار حاوی ترکیبات مختلف هورمونی ($mg\ L^{-1}$) ۱/۵، ۰/۷۵، ۰ BAP) و ($mg\ L^{-1}$ ۰/۵، ۰/۲۵، ۰ NAA) به تنهایی و ترکیب باهم، انتقال داده شدند. این آزمایش به‌صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملا تصادفی با ۳ بار تکرار و در هر تکرار سه ریزنمونه انجام شد. شرایط آزمایشگاهی کشت بافت حاوی نمونه‌ها در انکوباتور در دمای ۱±۲۶ درجه سانتی‌گراد و ۱۶ ساعت روشنایی (۲۰۰۰ لوکس) و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفتند. اولین نشانه‌های رشد در ریزنمونه‌ها ۲ هفته بعد از کشت در محیط هورمون‌دار ظاهر شد و اولین شاخساره در حدود ۲۰ روز بعد از زمان کشت در محیط هورمون‌دار نمایان شد.

اندازه‌گیری صفات ظاهری و فیتوشیمیایی

ریزنمونه‌ها بعد از ۴۵ روز کشت در محیط هورمون‌دار و مشاهده ریشه و ساقه مورد ارزیابی قرار گرفتند. صفات ظاهری اندازه‌گیری شده شامل درصد استقرار نمونه‌ها در محیط کشت بافتی، تعداد ساقه و ریشه، طول ساقه و ریشه (با خط‌کش میلی‌متری)، تعداد برگ، قطر برگ (با کولیس)، بزرگ‌ترین طول شاخساره و ریشه (با خط‌کش میلی‌متری) و صفت‌های شیمیایی هم شامل درصد فنول، کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کارتنوئید (میلی‌گرم/گرم) بود. برای سنجش درصد فنول، هر شرایط آزمایشگاهی کشت بافتی با استفاده از یک نشان "+" به ۴ قسمت مساوی تقسیم و فنول هر قسمت ۲۵ درصد از کل فنول موجود در ظرف در نظر گرفته شد. برای اندازه‌گیری صفات فیتوشیمیایی، از هر تکرار تیمارهای آزمایش، یک گرم برگ پودر شده با ازت مایع را با ۴۰-۲۰ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد مخلوط، سپس با دور ۱۰۰۰۰-۵۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. سپس قسمت بالایی محلول برداشته و قسمت بی رنگ در کف باقی ماند. از حلال استون ۸۰ درصد برای کالیبره کردن دستگاه اسپکتوفتومتر استفاده شد و محتوای محلول بی رنگ در طول موج‌های ۶۴۵، ۶۶۳ و۴۷۰ نانومتر به ترتیب برای سنجش مقدار کلروفیل a، b و کارتنوئید قرائت گردید.

داده‌های به‌دست‌آمده از اندازه‌گیری‌های صفات ظاهری و شیمیایی به صورت میانگین تکرارها ± انحراف از میانگین ارائه شده‌اند. آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS و مقایسه میانگین‌ها با آزمون LSD (حداقل تفاوت معنی‌دار) انجام شدند.

نتایج

نتایج حاصل از روش‌های مختلف سترون کردن نشان داد که نمونه‌های سترون شده با تیمارهای شماره ۲ و ۳ بعد از گذشت ۱۰ روز آلودگی نشان دادند و با افزایش زمان قرارگیری نمونه‌ها در کلرید جیوه ۰/۱ درصد (ضدعفونی شماره ۳)، بیش از ۸۰ درصد نمونه‌ها سوختگی نشان دادند. همچنین نمونه‌های سترون شده با تیمار شماره ۱ (اتانول ۷۰ درصد به مدت ۳۰ ثانیه + محلول تازه کلرید جیوه ۰/۱ درصد به مدت ۲ دقیقه + هیپوکلریت سدیم ۱۵ درصد ۵ دقیقه) دارای بیش‌ترین درصد زنده‌مانی، بیش‌ترین تعداد جوانه رشد کرده، کم‌ترین درصد سوختگی و کم‌ترین درصد آلودگی را داشتند (جدول ۱).

پس از یافتن بهترین تیمار سترون‌سازی و کشت نمونه‌های مختلف در محیط MS در شرایط نوری متفاوت، نمونه‌هایی که از بخش سفید پاجوش گرفته بودند دارای درصد فنل کم‌تری بوده است (شکل ۱)

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.4.12.3]
[DOI: 10.29252/nbr.6.4.487]

جدول ۱- مقایسه میانگین صفت‌های اندازه‌گیری شده تحت تاثیر تیمارهای مختلف سترون.

Table 1. Means comparison of measured traits under different disinfection treatments.

تیمار ضدعفونی	درصد زنده‌مانی	درصد سوختگی	درصد آلودگی	تعداد نمونه رشد کرده
۱	۷۵ a	۲۵/۵۵ c	۰/۰۰ b	۰/۶ a
۲	۶۵ c	۵۵ b	۳۵ a	۰/۳ b
۳	۳۵ c	۷۰ a	۳۸/۳۳ a	۰/۳ b

میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک در هر ستون، اختلاف معنی‌داری درسطح احتمال ۵٪ آزمونLSD ندارند.

Means, in each column followed by at least on letter in common are not significantly different at 5% probability level using LSD test.

جدول ۲- مقایسه میانگین صفت‌های اندازه‌گیری شده تحت شرایط نور و نوع ریزنمونه.

Table 2. Means comparison of measured traits under light conditions and the type of explant.

نور	نوع ریزنمونه	درصدفنول	درصد زنده‌مانی
	سبز	۱۱/۶۶ d	۳۲/۵ c
	سفید کوچک	۱۰ d	۶۷/۵ a
تاریک	سفید بزرگ	۰ e	۵۰ b
	نیم نصف	۰ e	۵۰ b
	سبز	۳۵ c	۰ e
	سفید کوچک	۱۱/۶۶ d	۴۰ c
روشنایی	سفید بزرگ	۵۵ b	۱۰ d
	نیم نصف	۲۳ a	۰ e

میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک در هر ستون، اختلاف معنی‌داری درسطح احتمال ۵٪ آزمونLSD ندارند.

Means, in each column followed by at least on letter in common are not significantly different at 5% probability level using LSD test.

جدول ۳- تجزیه واریانس تیمارهای مختلف هورمونی بر روی صفت‌های آلوئه ورا در شرایط کشت در شرایط آزمایشگاهی.

Table 3. Analysis of variance of the effect of different hormonal treatments on *Aloe vera* properties.

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات									
		تعداد ریشه	تعداد ساقه	تعداد برگ	طول ساقه	طول ریشه	درصد استقرار	قطر برگ	aکلروفیل	bکلروفیل	کلروفیل کل	کارتنوئید
اکسین	۲	۰/۲۵**	۱/۵**	۲۹/۶**	۸۱۱/۵۳**	۲۱/۹۸**	۳۵۵/۰۶**	۵/۴**	۱۳۱/۲**	۱۳/۹**	۲۳۳/۱**	۲/۵**
سایتوکنین	۲	۷/۲۵**	۴/۰۸**	۹**	۳۵۰/۷**	۱۳۳۹/۳**	۳۰۳۸/۲**	۴/۶۱**	۱۲۵۸/۵**	۵۷/۱**	۱۷۶۴/۹**	۹/۵**
اکسین*سایتوکنین	۲	۲/۰۹**	۱/۰۸**	۶/۱۷**	۸۲۹/۱**	۴۷۴/۱۲**	۵۴۴/۵۶**	۱۰/۸**	۱۲۰۹/۲**	۱۰/۶**	۱۳۱۹/۷**	۲/۰۸۵**
cv		۱۱/۸	۱۵/۷۸	۱۸/۶	۶/۲۲	۷/۸۳	۲/۰۱۹	۲/۶	۱۴/۴۶	۱/۵	۱/۷	۵/۳
خطا	**۱۲**	**۰/۰۰۹**	**۰/۰۲**	**۰/۱۵۷**	**۲/۳۹**	**۰/۹۲**	**۱/۰۶**	**۰/۰۵۱**	**۰/۷**	**۰/۰۰۳**	**۰/۳۹**	**۰/۰۲۳**

*و **: به ترتیب معنی‌داری در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد، ns عدم تفاوت معنی‌دار است.

*, **: Significant at 5 and 1% possibility levels respectively; ns: non- significant

و هر چقدر سطح برش بیش‌تر شد رشد آن تحت تاثیر قرار گرفت. به طوری که نمونه‌هایی که از وسط نصف شده بودند دارای کم‌ترین رشد و درصد زنده‌مانی بودند. در نمونه‌های سفید با حذف نور به‌طور کامل از ترشح فنل جلوگیری شد و رشد و زنده‌مانی نمونه‌ها افزایش یافت (جدول ۲). با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از نوع ریزنمونه، ریزنمونه سفید کوچک انتخاب و به محیط هورمون‌دار حاوی غلظت‌های مختلف هورمونی BAP و NAA منتقل شد. پس از گذشت ۲۰ روز از کشت، نمونه‌ها رشد طولی داشتند ولی اثری از جوانه جانبی دیده نشد و بعد از ۴۵ روز فاکتورهای رویشی و فیزیولوژیکی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که در تمام تیمارها، صفت‌های مختلف ذکر شده در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بودند (جدول ۳). همچنین بررسی‌های آماری بر اساس آزمون LSD نشان می‌دهند که ترکیب هورمونی سایتوکنین و اکسین در محیط کشت بافتی نسبت به کاربرد به‌تنهایی این هورمون‌ها تاثیر بیش‌تری بر روی تعداد و طول ساقه، تعداد و قطر برگ و درصد

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.4.12.3]
[DOI: 10.29252/nbr.6.4.487]

جدول ۴- مقایسه میانگین اثر تیمارهای مختلف هورمونی بر روی صفت‌های ظاهری.

Table 4. Means comparison of the effect of different hormonal treatments on external traits.

غلظت هورمون	تعداد ساقه	تعداد برگ	طول ساقه(mm)	قطر برگ(mm)	درصد استقرار	تعداد ریشه	طول ریشه
NAA (0 mgl-1) + BAP (0 mgl-1)	۲ b	۲/۵ c	۲۸/۶۲ c	۲/۶۳ d	۷۰ b	۳ a	۳۳/۳ a
NAA (0 mgl-1) + BAP (0/75 mgl-1)	۰ d	۰ e	۰ e	۰ f	۳۵ d	۰ d	۰ f
NAA (0 mgl-1) + BAP (1/5 mgl-1)	۱ c	۰/۵ de	۳۳/۵ b	۴/۰۳ b	۷۰ b	۰ d	۰ f
NAA (0/25mgl-1) + BAP (0 mgl-1)	۱ c	۲/۵ c	۲۵/۴۳۳ d	۲/۱ e	۳۷ c	۱/۳۳ b	۳۰/۱۵ b
NAA (0/25mgl-1) + BAP (0/75 mgl-1)	۲/۵ a	۶/۳۳ a	۴۲/۱۰۷ a	۴/۸ a	۷۳ a	۱ c	۱۱/۹۶ d
NAA (0/25mgl-1) + BAP (1/5 mgl-1)	۱ c	۳/۸۳ b	۳۹/۵۵ a	۲/۹۶ c	۳۳/۵ d	۰ d	۰ f
NAA (0/5mgl-1) + BAP (0 mgl-1)	۱ c	۱ d	۲۳/۱۹ d	۲/۱۳ e	۷۲/۳۳ a	۱ c	۹/۷ e
NAA (0/5mgl-1) + BAP (0/75 mgl-1)	۱ c	۲/۵ c	۳۱/۱ bc	۳/۲ c	۳۸ c	۱ c	۲۵/۲ c
NAA (0/5mgl-1) + BAP (1/5mgl-1)	۱c	۰e	۰e	۰e	۳۱e	۰ d	۰ f

میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک در هر ستون، اختلاف معنی‌داری درسطح احتمال ٪۵ آزمون LSD ندارند.

Means, in each column followed by at least on letter in common are not significantly different at 5% probability level using LSD test

جدول ۵- مقایسه میانگین اثر تیمارهای مختلف هورمونی بر روی صفت‌های بیوشیمیایی.

Table 5. Means comparison of the effect of different hormonal treatments on biochemical properties traits.

غلظت هورمون	کلروفیل a mg/g	کلروفیل b mg/g	کلروفیل کل mg/g	کارتنوئید mg/g
NAA (0 mgl-1) + BAP (0 mgl-1)	۴۶/۶۷ c	۵/۳۶۶ c	۵۱/۷۰۶ c	۲/۵۳ c
NAA (0 mgl-1) + BAP (0/75 mgl-1)	۹/۵۵۳ h	۰/۵۳ g	۱۰/۲ h	۱/۵۱ f
NAA (0 mgl-1) + BAP (1/5 mgl-1)	۲۶/۳۶ f	۳/۶۸ e	۳۰/۱۰۲ f	۲/۴۵ e
NAA (0/25mgl-1) + BAP (0 mgl-1)	۳۱/۲۳ e	۲/۱۹۶ f	۴۰/۴۵ d	۱/۷۷ f
NAA (0/25mgl-1) + BAP (0/75 mgl-1)	۱۷/۹۳ g	۹/۲۱۶ a	۲۰/۸ g	۴/۸۱ a
NAA (0/25mgl-1) + BAP (1/5 mgl-1)	۵۶/۰۷ a	۴/۹۵ d	۶۱/۳۵ a	۳/۹۵ b
NAA (0/5mgl-1) + BAP (0 mgl-1)	۵۴/۰۲ b	۶/۰۵۳ b	۵۹/۷۴ b	۳/۷۵۶ c
NAA (0/5mgl-1) + BAP (0/75 mgl-1)	۳۳/۷۳ d	۳/۶۳۳ e	۳۷/۴۶ e	۲/۷۶۳ d
NAA (0/5mgl-1) + BAP (1/5 mgl-1)	۹/۱۲۶ h	۰/۵۶ g	۹/۷۵۶ h	۱/۶۸ f

میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک در هر ستون، اختلاف معنی‌داری درسطح احتمال ٪۵ آزمون LSD ندارند.

Means, in each column followed by at least on letter in common are not significantly at 5% probability level using LSD test

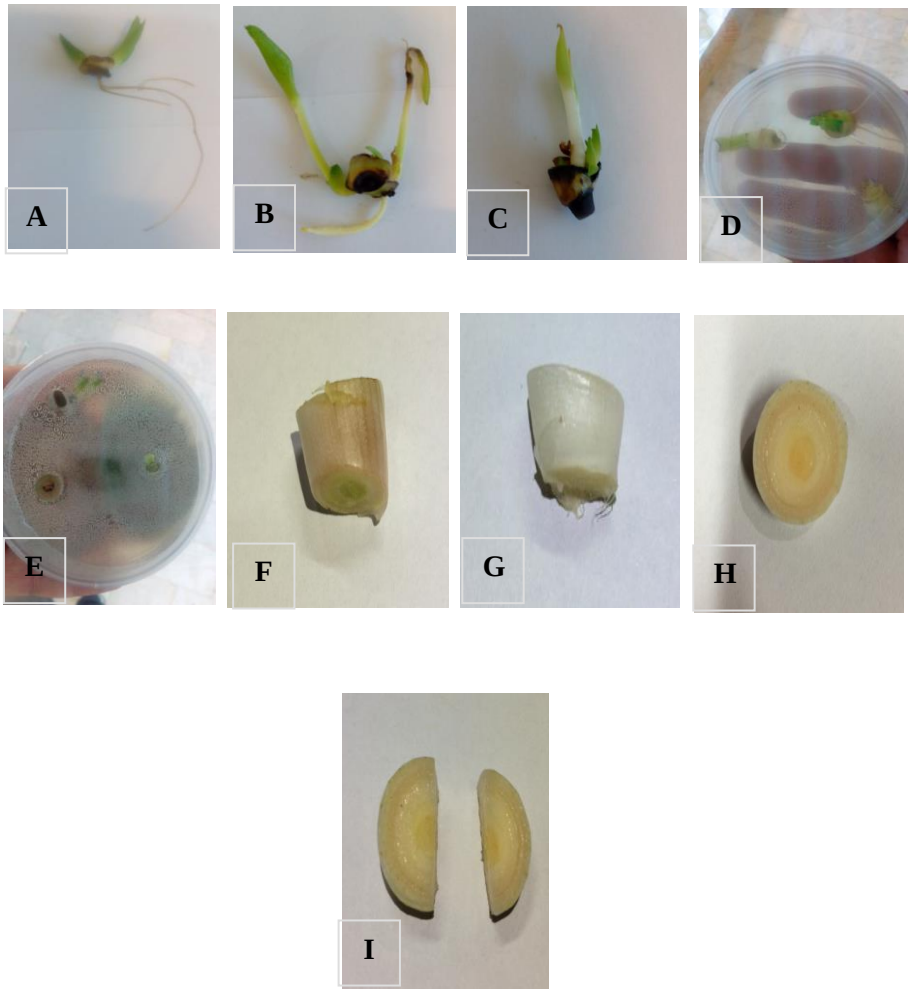
استقرار ریزنمونه در محیط کشت بافتی دارد به‌طوری‌که ترکیب هورمونی NAA (0.25 mgl-1) + BAP (0.75 mgl-1) دارای بیش‌ترین میانگین تعداد ساقه (۲/۵)، تعداد برگ (۶/۳۳)، طول ساقه (۴۲/۱۰۷ میلی‌متر)، قطر برگ (۴/۸ میلی‌متر) و درصد استقرار (۷۳ درصد) بود (جدول ۴). در مرحله ریشه‌دهی بهترین نتیجه در محیط کشت بدون هورمون با میانگین ۳ ریشه و میانگین طول ۳۳/۳۳ میلی‌متر حاصل شد که نمونه‌ها ریشه‌های نازکی را ایجاد نمودند و ضعیف‌ترین نتیجه از محیط کشت حاوی BAP به دست آمد (جدول ۴).

تجزیه‌وتحلیل داده‌های حاصل از صفت‌های شیمیایی حاکی از آن است که مقدار کلروفیل b و کارتنوئیدها با افزایش تعداد برگ‌ها افزایش پیداکرده به طوری‌که در محیط کشت هورمونی حاوی ۰/۷۵ میلی‌گرم در لیتر BAP به همراه ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر NAA مقدار کلروفیل b (۹/۲۱۶) و کارتنوئید (۴/۸۱) نسبت به شاهد و سایر تیمارها افزایش ۵۰ درصدی را نشان داد. این گونه به نظر می‌رسد زمانی که از BAP و NAA به‌صورت ترکیبی در محیط کشت استفاده می‌شود نسبت به زمانی که هر کدام از ترکیبات به صورت جداگانه مورد استفاده قرار می‌گیرند، مقدار کلروفیل‌ها و کارتنوئید موجود در نمونه‌ها افزایش بیش‌تری را نشان می‌دهد. به طوری که مقدار کلروفیل a (۵۶/۰۷) و کارتنوئید (۶۱/۳۵) در تیمار هورمونی NAA ۱۰/۲۵ mgl- و BAP ۱/۵ mgl-1 دارای بیش‌ترین مقدار بود.

بحث

بخش اول این تحقیق به دنبال یافتن پروتکل ضدعفونی مطلوب برای ریز نمونه‌های کوچکی بود که در طول مدت ضدعفونی علاوه بر سلامتی ریزنمونه از سیاه شدن آن هم جلوگیری نماید. نتایج ازمایش بخوبی اثر مدت زمان ضدعفونی بر دوام ریز نمونه را نشان داد به طوری که هر اندازه زمان قرار گرفتن نمونه‌ها در محلول کلرید جیوه ۰/۱ درصد بیش‌تر گردید موجب

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.4.12.3]
[DOI: 10.29252/nbr.6.4.487]



شکل ۱– A. نمونه رشد کرده در محیط بدون هورمون بعد از ۴۵ روز. **B**. نمونه کشت شده در محیط هورمون‌دار NAA (0.5 mgl-1) + BAP (0.75 mgl-1). **C**. نمونه کشت شده در محیط هورمون دار NAA (0.25 mgl-1) + BAP (0.75 mgl-1). **D**. نمونه‌های سفید کوچک قرار گرفته در تاریکی. **E**. نمونه‌های سفید کوچک قرار گرفته در روشنایی. **F**. نمونه‌های آلوئه ورا سبز. **G**. نمونه‌های آلوئه ورا سفید. **H**. نمونه‌های آلوئه ورا سفید بزرگ. **I**. نمونه‌های آلوئه ورا نیم‌سفید.

Fig. 1. A. Grown specimens in a hormone-free medium after 45 days. **B.** Samples cultured in NAA (0.5 mg-1) + BAP (0.75 mg / L) hormone medium. **C.** Sample cultured in NAA (0.25 mgl-1) + BAP (0.75 mgl-1) and BAP (0.75 mgl-1). **D.** Small white specimens in the dark. **E.** Small white specimens in light. **F.** *Aloe vera* green samples. **G.** *Aloe vera* white Samples. **H.** White *Aloe vera* Samples. **I.** *Aloe vera* half-whitish specimens.

سوختگی نمونه‌ها و هر قدر زمان قرار گرفتن نمونه‌ها در الکل بیش‌تر می‌شد مرگ نمونه‌ها و زرد شدن نمونه‌ها را به همراه داشت (جدول ۱). بنابراین بهترین روش ضدعفونی از اتانول ۷۰ درصد به مدت ۳۰ ثانیه، محلول تازه کلرید جیوه ۰/۱ درصد به مدت ۲ دقیقه و هیپوکلریت سدیم ۱۵ درصد ۵ دقیقه بود که با نتایج برخی پژوهش‌ها (Shamsian *et al*., 2016) مبنی بر این-که کلرید جیوه ۰/۱ درصد مؤثرترین تیمار ضدعفونی در کنترل آلودگی و زنده‌مانی ریزنمونه‌های آلوئه ورا است (Saggoo & Kaur 2010) نزدیک بوده و مطابقت دارد. تعیین مدت زمان تیمار ضدعفونی کننده در تحقیقات مختلف هم مورد توجه قرار گرفت به طوری که گاهی (Shamsian *et al*., 2016) از قارچ‌کش کاربندازیم ۱ درصد به مدت ۲۰ دقیقه، الکل ۷۰ درصد به مدت ۳۰ ثانیه، هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد به مدت ۲۰ دقیقه و کلرید جیوه ۰/۱ درصد به مدت ۱۰ دقیقه برای استریل کردن نمونه‌های آلوئه ورا استفاده شده است. همچنین ضدعفونی با محلول ۲۰ درصد شوینده و هیپوکلریت ۵ درصد به مدت ۱۵ دقیقه اعلام شده است (Hamid Oghli *et al*., 2005). در پژوهش دیگری از کاربندازیم ۱ درصد به مدت ۲۰ دقیقه و کلرید جیوه ۰/۱ درصد به مدت ۵ تا ۷ دقیقه استفاده کردند (Saggoo & Kaur, 2010).

هدف بخش دوم آزمایش جلوگیری از قهوه‌ای شدن ریز نمونه‌ها در طول باززایی مستقیم ریز نمونه بود. واکنش قهوه‌ای شدن

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.4.12.3]
[DOI: 10.29252/nbr.6.4.487]

محیط و تولید فنول توسط آنزیم پلی فنول اکسیداز صورت می‌گیرد که در واکوئل قرار دارد و پیش ماده این آنزیم یا پلی فنول در پلاستیدها مانند کلروپلاست موجود است. بنابراین در سلول‌های سالم این واکنش صورت نمی‌پذیرد در حالی که با زخمی شدن سلول‌ها در طول برش ریزنمونه، آنزیم پلی فنول اکسیداز آزاد شده در محیط به سطح پیش ماده خود (پلی فنول-ها) می‌چسبد و باعث قهوه‌ای شدن محیط و تولید فنول می‌شوند. بنابراین هر قدر سطح برش زیاد و قسمت سبز در نمونه‌ها بیش‌تر باشد فنول بیش‌تری تولید شده که نتایج حاصل از این تحقیق صحت این موضوع را تایید کرد. از این رو نمونه‌های سفید در تاریکی به دلیل نداشتن کلروپلاست نسبت به نیم سفید و سبز دارای فنول کم تر بودند که رشد نمونه‌ها در محیط بدون هورمون را در پی داشت (شکل ۱ D). همچنین نمونه‌های سبز به خاطر داشتن کلروپلاست که محل قرار گرفتن پلی فنول است پس از برش و آزاد شدن پلی فنول و آنزیم پلی فنول اکسیداز در محیط و کاتالیز شدن پلی فنول توسط پلی فنول اکسیداز، باعث قهوه‌ای شدن محیط و از بین رفتن نمونه‌ها شدند (شکل ۱ F) که با نتایج حاصل از این پژوهش همسویی دارد. بنابراین بهترین نمونه در این آزمایش بخش سفید پاجوش گیاه مادری به همراه تاریکی با بیش‌ترین درصد زنده‌مانی (۶۷/۵) و کم‌ترین درصد فنول (۱۰) بود. این تحقیق به خوبی نشان داد که اگر در تهیه ریز نمونه آلوئه ورا دقت لازم صورت گیرد، دیگر به چندین مرحله واکشت پی‌درپی با هزینه بالای محیط کشت نیست. به طوری که پژوهشگران (Kanwar *et al*., 2015) از شش بار واکشت نمونه‌ها در محیط هورمون‌دار برای کنترل و کاهش فنول استفاده کردند که ۷۲/۲۲ درصد از نمونه‌ها رشد کردند. گزارش‌های مشابهی از تاثیر واکشت‌های پی‌درپی در محیط هورمون‌دار در فاصله زمانی ۴-۳ ماه جهت حذف مواد فنولیکی منتشرشده در محیط موجود است (Hamid Oghli *et al*., 2005 و Golchubian *et al*., 2012). در تحقیق دیگری از ۲ گرم زغال فعال در محیط هورمون‌دار برای کنترل مواد فنولیکی استفاده شده بود که زغال فعال بر روی تعداد جوانه‌های جانبی (۱۸/۸۸) و درصد تولید جوانه‌های جانبی اثر مثبتی گذاشت ولی بر روی تعداد برگ (۲/۹۵)، تعداد ریشه (۰/۶۶) و درصد ریشه‌زایی (۰/۱۰۶) نسبت به محیط‌های بدون زغال فعال اثر منفی داشت (Shamsian *et al*., 2016). در این بررسی تعداد ساقه در محیط بدون هورمون نسبت به محیط هورمون‌دار اختلاف کمی نشان داد به‌طوری‌که در بررسی‌های آماری نشان داده شد که با افزایش سایتوکنین BAP با اکسین صفر در محیط کشت بافتی تعداد ساقه کم‌تری تولید شد (جدول ۴) که با بررسی‌های پیشین (Chaudhuri & Mukundan 2001; Aggarwal & Barna 2004; Liao *et al*., 2004; Baksha *et al*., 2005; Hashem Abadi & Kaviani, 2008) مبنی بر این‌که BA تنها برای القای ساقه مناسب است مغایرت دارد. ترکیب اکسین و سایتوکنین در محیط کشت بافتی باعث القای تولید ساقه شد که با تحقیق دیگری (Abdi *et al*., 2013) مبنی بر این‌که ترکیب اکسین و سایتوکنین با هم در محیط کشت بافتی برای القای ساقه مناسب است هم سویی دارد. حداکثر ارتفاع شاخساره از محیط هورمون‌دار ۰/۷۵ BAP + mgl-1۰/۵ NAA mgl-1 با میانگین ۶/۷ سانتی‌متر به دست آمد (شکل ۱). بررسی‌ها نشان می‌دهد (Abdi *et al*., 2013) که با افزایش غلظت NAA در محیط کشت ریشه‌های کوتاه و ضخیمی تولید می‌شود و محیط بدون هورمون بلندترین و نازک‌ترین ریشه‌ها را دارد. همچنین برخی از محققان معتقدند که محیط بدون هورمون برای ریشه‌زایی آلوئه ورا مناسب است و ۱۰۰ درصد ریشه‌زایی انجام می‌شود (Natali *et al*., 1990; Aggarwal & Barna 2004, Barna & Wakhlu 1994) که با نتایج حاصل از پژوهش حاضر نیز منطبق است درحالی‌که برخی دیگر از محققان تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی را برای رشد و تولید ریشه‌ها ضروری می‌دانند که با نتایج به‌دست‌آمده از این آزمایش هم‌خوانی ندارد (Abrie & Staden, 2001; Meyer & Staden, 1991; Velcheva *et al*., 2005; Baksha *et al*., 2005; Ahmed *et al*., 2007; Golchubian *et al*., 2012).

نتیجه گیری

به طور کلی نتایج نشان داد که نمونه‌های سفید به دست آمده از قاعده برگ آلوئه ورا به دلیل نداشتن کلروپلاست، فنول کم‌تری را نسبت به سایر نمونه‌های کشت بافتی در محیط آزاد و رها می‌نمایند که این امر موجب رشد مطلوب ریز نمونه‌ها می‌شود. همچنین هر چه سطح برش نمونه‌ها (نیم سفید) بیش‌تر باشد درصد زنده‌مانی و رشد نمونه‌ها کم‌تر می‌شود. محیط بدون هورمون برای رشد ریشه و محیط حاوی ۰/۲۵ mgl-1 NAA + ۰/۷۵ mgl-1 BAP برای افزایش رشد و تعداد ساقه و برگ مناسب هستند همچنین مقدار کلروفیل و کارتنوئید تحت تاثیر تیمار هورمون‌های محیط کشت قرار می‌گیرد.

سپاسگزاری

بدینوسیله از مهندس رقیه اصغرزاده مسئول آزمایشگاه کشت بافت پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان که در طول انجام این تحقیق همکاری لازم را مبذول داشتند قدردانی می‌شود.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.4.12.3]
[DOI: 10.29252/nbr.6.4.487]

REFERENCES

Abdi, Gh., Hedayat, M. and Modarresi, M. 2013. In vitro micropropagation *Aloe vera*—impact of plant growth regulators, media and types of explant. – J. Biol.. Environ. Sci. 7: 19- 24.

Abrie, A.L and Staden, J.V. 2001. Micropropagation of the endangered *Aloe polyphylla*. – Plant Growth Regul. 33: 19- 23.

Aggarwal, D., and Barna, KS. 2004. Tissue culture propagation of elite plant of *Aloe vera* Linn. – J. Plant Biochem. Biotech. 13: 77-79.

Ahmed, S., Kabir, A.H., Ahmed, M.B., Razvy, M.A. and Ganesan, S. 2007. Development of rapid micropropagation method of *Aloe vera*. – Lizvorniznanstveni Rad. 24: 121-128.

Baksha, R., Jahan, M.A.A., Khatun, R. and Munshi, J.L. 2005. Micropropagation of *Aloe barbadensis* Mill. throughin vitro culture of shoot tip explants. – Plant Tiss. Cul. Biotech. 15: 121-126.

Barna, K.S. and Wakhlu, A.K. 1994. Whole plant regeneration of *Cicer arietium* from callus culture via organogenesis. – J. Plant Cell Rep. 13: 510-513.

Chaudhuri, S. and Mukundan, U. 2001. *Aloe vera* L. Micro propagation and characterization of its gel. – J. Phytomorph. 51: 155-157.

Golchubian, S., Ranjbar, Gh. and Kazemi Tabar, S.K. 2012. In vitro micro propagation of *Aloe vera* L. – J. Plant Biol. 7: 71-78.

Hamid Oghli, Y., Fatahi Moghaddam, C. and Fotouhi Qazvini, R. 2005. In vitro fertilization of the *Aloe barbadensis* Miller. – Iranian J. Agri. Sci. 4: 903-909.

Hashem Abadi, D. and Kaviani, B. 2008. Rapid micropropagation of *Aloe vera* L. via shoot multiplication. – Afri. J. Biotech. 4: 1899-1902.

Hosseini, S.A., Abrasaghi, Gh. and Hosseini, S.A. 2008. Medicinal plants of Golestan province. – Iranian J. Medi. Aroma. Plant 24: 472-498.

Kalimuthu, K., Vijayakumar, S., Senthilkumar, R.R. and Sureshkumar, M. 2010. Micropropagation of *Aloe vera* Linn., a medicinal plant. – J. Bio. Biochem. 6: 405-410.

Kanwar, K., Devi, V., Sharma, S., Soni, M. and Sharma, D. 2015. Effect of physiological age and growth regulators on micropropagation of *Aloe vera* followed by genetic stability assessment. – Natl. Acad. Sci. Lett. 38: 29-35.

Kashafi Bonab, A.S. 2010. Comparative advantage of economic growth and trade of medicinal plants in Iran and its value in global markets. – Commerci. Survey 44: 67-78.

Keijzer, C. and Cresti, M. 1987. A comparison of anther tissue development in male sterile *Aloe vera* and male fertile *Aloe ciliaris*. – Annal. Bot. 59: 533-542.

Liao, Z., Chen,M., Tan, F., Sun, X. and Tang, K. 2004. Micro propagation of endangered Chinese aloe. – J. Plant. Cell. Tiss. Org. Cul. 76: 83-86.

Meyer, H.J. and Staden, J.V. 1991. Rapid in vitro propagation of *Aloe barbadensis* Mill. – J. Plant Cell. Tiss. Org. Cul. 26: 167-171.

Natali, L., Sanchez, I.C. and Cavallini, A. 1990. In vitro culture of *Aloe barbadensis* Mill: Micropropagation from vegetative meristems. – J. Plant Cell Tiss. Org. Cul. 20: 71-74.

Pan, M.J. and Staden, J.V. 1999 Effect of activated charcoal, autoclaving and culture media on sucrose hydrolysis. – J. Plant Growth Regul. 29: 135-141.

Saggoo, M.I. and Kaur, R. 2010. Studies in North Indian *Aloe vera*: callus induction and regeneration of plantlets. – Archi. Appli. Sci. Res. 2: 241-245.

Shamsian, S., Omidi, M. and Torabi, C. 2016 .effect of growth regulators and active charcoal on the proliferation of *Aloe vera* L. in vitro. – Iranian J. Medicin. Aroma. Plant 32: 281-289.

Velcheva, M., Faltin, Z., Vandi, A., Eshdat, Y. and Perl, A. 2005. Regeneration of *Aloe arborescens* via organogenesis from young in florescence. – J. Plant Cell Tiss. Org. Cul. 83: 293- 301.

*****

How to cite this article:

Saedi, A., Moradi, H. and Karimi, M. 2020. The effect of growth regulators and light on the phenolic content and in vitro regeneration of *Aloe vera*. – Nova Biol. Reperta 6: 487-494. (In Persian)

ساعدی، ا.، مرادی، ح. و کریمی، م. ۱۳۹۸. بررسی نقش تنظیم‌کننده‌های رشد و نور بر میزان فنول و باززایی آلوئه ورا. – یافته‌های نوین در علوم زیستی ۶: ۴۸۷-۴۹۴.

.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.4.12.3]

[DOI: 10.29252/nbr.6.4.487]