Archive of SID

نشریه پژوهش‌های تولید گیاهی
جلد بیست و پنجم، شماره سوم، ۱۳۹۷
http://jopp.gau.ac.ir
DOI: 10.22069/jopp.2018.13468.2215

بهینه‌سازی ریزازدیادی گیاه دارویی تجاری استویا (*Stevia rebaudiana*) از طریق کشت درون‌شیشه‌ای ریزنمونه رأس شاخه

مهسا زارعی[۱]، *سارا دژستان[۲] و مهدی بهنامیان[۳]

[۱]دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد اصلاح نباتات، دانشگاه محقق اردبیلی، [۲]دانشیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه محقق اردبیلی،
[۳]استادیار گروه علوم باغبانی، دانشگاه محقق اردبیلی

تاریخ دریافت: ۹۶/۰۳/۲۳ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۱/۱۶

چکیده

سابقه و هدف: استویا (*Stevia rebaudiana*) شیرین‌ترین گیاه جهان است که به‌عنوان جایگزین مناسب شکر برای درمان مشکلات ناشی از چاقی و دیابت مورد توجه قرار گرفته است ولی بذور آن به‌سختی جوانه زده و بسیاری از آن‌ها به‌دلیل پدیده خودناسازگاری در هنگام شکل‌گیری غالباً پوک و عقیم هستند. همچنین، تکثیر از طرق بذر مانع تولید جمعیت همسان می‌شود. به همین دلیل، کشت بافت رهیافت مناسبی برای تکثیر سریع این گیاه می‌باشد. هدف از این پژوهش دست یافتن به روشی سریع و کارآمد برای ریزازدیادی گیاه دارویی تجاری استویا و تکثیر انبوه کلون‌های آن در سطح وسیع است.

مواد و روش‌ها: این پژوهش در دو آزمایش جداگانه به اجرا در آمد. در آزمایش اول، ریزنمونه‌های راس شاخه روی محیط کشت MS غنی‌شده با غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر برای هر کدام از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی IAA، NAA، IBA، BAP، Kin و GA_3 به‌عنوان تیمارهای منفرد به‌همراه تیمار شاهد (فاقد تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی) کشت شدند. آزمایش بر پایه طرح کاملاً تصادفی با ٤ تکرار انجام گرفت. آزمایش دوم بر اساس نتایج آزمایش اول طراحی گردید. بنابراین، در آزمایش دوم، ریزنمونه‌های راس شاخه روی محیط کشت MS غنی‌شده با BAP (۰، ۱، ۲، ۳ و ٤ میلی‌گرم در لیتر) و Kin (۰، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) کشت شدند. آزمایش به‌صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار انجام گرفت. در آزمایش ریشه‌زایی، ریزشاخه‌ها در دو محیط کشت MS و MS $\frac{1}{2}$ حاوی غلظت‌های مختلف NAA (۰، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) کشت شدند. این آزمایش همانند آزمایش دوم اجرا گردید. در تمامی آزمایش‌ها، صفات ۳۰ روز پس از کشت و نگهداری در اتاقک رشد اندازه‌گیری شدند. در نهایت، گیاهچه‌های ریشه‌دارشده در ابتدا به شرایط اتاقک رشد سازگار شدند و سپس به گلخانه منتقل شدند.

یافته‌ها: در آزمایش اول اثر تنظیم‌کننده‌های رشد بر همه صفات معنی‌داری بود ($P<0/01$)، محیط کشت MS حاوی ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP مؤثرترین تیمار در بیش‌ترین تعداد شاخه و تعداد میان‌گره (به‌ترتیب با میانگین ۵/۷۵ شاخه و ۱۹/۵ میانگره در بوته) بود و بیش‌ترین طول شاخه مربوط به ۲ میلی‌گرم در لیتر Kin و ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر GA_3 بود و بهترین تیمارهای کالوس‌دهی ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP بودند. در آزمایش دوم، برهمکنش

* مسئول مکاتبه: sdezhsetan@uma.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

BAP × Kin بر همه صفات معنی‌داری بود. بیش‌ترین میزان تکثیر شاخه و تعداد میان‌گره از محیط کشت MS غنی‌شده با ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP + ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin (به‌ترتیب با میانگین ۱۷/۶۷ شاخه و ۳۸/۶۷ میانگره در بوته) به‌دست آمد. تعداد شاخه‌ها در این تیمار بعد از یک ماه نگهداری مجدد در اتاقک کشت به‌طور قابل‌توجهی از ۱۷/۶۷ به ۵۵ شاخه در بوته افزایش یافت. مؤثرترین پاسخ ریشه‌زایی به تعداد ریشه (با میانگین ۵۵ ریشه در بوته) در محیط کشت MS $\frac{1}{2}$ حاوی ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA مشاهده شد. حدود ۹۲ درصد از گیاهچه‌های رشد یافته در شرایط درون‌شیشه‌ای به‌طور موفقیت‌آمیزی با شرایط گلخانه سازگار شدند.

نتیجه‌گیری: در مجموع نتایج همانند مطالعات قبلی بیانگر واکنش مثبت و خوب گیاه استویا به کشت بافت است. محیط کشت MS غنی‌شده با ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP + ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin برای پرآوری شاخه ریزنمونه رأس شاخه استویا توصیه می‌شود و همچنین نگهداری ریزنمونه‌های کشت‌شده به‌مدت دو ماه در اتاقک رشد به‌طور چشمگیری تعداد شاخه‌ها را افزایش می‌دهد. در ریشه‌زایی نیز محیط کشت MS $\frac{1}{2}$ حاوی ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA نتیجه‌بخش بود.

واژه‌های کلیدی: اکسین، پرآوری شاخه، تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، ریشه‌زایی، سازگاری، سیتوکنین

مقدمه

گیاه استویا (*Stevia rebaudiana* Bertoni) از خانواده Asteraceae، گیاهی دیپلوئید با عدد کروموزومی ۲n=۲۲ است (۲ و ۸). استویا یک گیاه بدون کالری، ضدباکتری دهان (۵ و ۱٤)، بدون تخمیر، دارای عطر و طعم مطلوب، ضد سرطان (۳۳)، ضد فشار خون (۵ و ۱٤) بوده و اعتیادآور نیست. برگ‌های این گیاه حاوی استویول دی‌ترپن گلیکوزیدها هستند که در کل ٤ تا ۲۰ درصد وزن خشک برگ‌ها را با توجه به نوع رقم شامل می‌شوند و از میان استویول دی‌ترپن گلیکوزیدها، ربادیوزاید A (۲-٦ درصد وزن خشک گیاه) و استویوزاید (۵-۱۰ درصد وزن خشک گیاه) از غالب‌ترین شیرین‌کننده‌های طبیعی این گیاه هستند (۳٤). تخمین زده می‌شود که استویوزاید ۳۰۰ مرتبه شیرین‌تر از چغندرقند است (۲٤).

بذرهای استویا به‌علت قدرت جوانه‌زنی پایین، باروری اندک (۱۰) و خودناسازگاری گل‌ها ناکارآمد هستند (۳٤). تکثیر از طریق بذر به‌دلیل ایجاد جمعیت غیریکنواخت، تنوع زیادی در خصوصیات ریخت‌شناسی، ترکیبات و سطح شیرین‌کننده‌های این گیاه نشان می‌دهد. تکثیر رویشی این گیاه نیز بسیار کند بوده و امکان حمله عوامل بیماری‌زا به بافت‌های گیاهی وجود دارد و تعداد افراد به‌دست آمده محدود است (۳٤). بنابراین، برای غلبه بر ناکارآمدی تکثیر، کشت درون‌شیشه‌ای این گیاه می‌تواند جایگزین مناسبی برای تکثیر سریع و تولید جمعیت یکنواخت در یک دوره زمانی کوتاه و فضای محدود با عملکرد بالا برای این گیاه باشد (۲۲). ریزازدیادی از طریق رأس شاخه[1] گیاهانی با صفات زراعی یکسان ایجاد می‌کند و روشی برای تولید گیاهان فاقد بیماری است (۲٤).

مطالعات بیان کردند که BA[2] نسبت به Kin[3] و 2ip[4] در القای تشکیل جوانه‌های شاخه از ریزنمونه رأس شاخه گیاه *Vitex trifolia* مؤثرتر بود و دلیل تأثیر بیش‌تر BA ممکن است به‌دلیل توانایی تحریک

1- Shoot tip
2- 6-benzyladenine
3- Kinetin
4- N6-(2-Isopentenyl) adenine

www.SID.ir

Archive of SID

بافت‌های گیاهی به سوخت‌وساز هورمون‌های درون‌زای طبیعی و متناوباً تولید سامانه‌های هورمونی طبیعی برای القای اندام‌زایی شاخه باشد. همچنین بیان کردند که Kin بیش‌تر در افزایش طول شاخه مؤثر است (۱). مشخص شده است که Kin در مراحل فیزیولوژیکی متعددی در گیاهان تأثیرگذار است. یکی از اثرات عمده این هورمون، تسریع در تقسیم سلولی است که یکی از بارزترین و مهم‌ترین خصوصیات سیتوکینین‌ها می‌باشد (۱۸). از اثرات جیبرلین‌ها کاهش فعالیت پروتئین‌های بازدارنده و کندکننده رشد، موسوم به پروتئین‌های دللا[1] است. مشاهده شده است که به‌دلیل آبشار پروتئین کیناز وابسته به GA_3[2]، پروتئین‌های دللا فسفریله شده و سپس با اتصال به یوبی‌کوئتین، برای تجزیه پروتئولیتیک به‌وسیله ماشین پروتئازی نشان‌دار می‌شوند. بر این اساس، جیبرلین‌ها هم مانند اکسین‌ها، با حذف عوامل محدودکننده رشد، رشد را افزایش می‌دهند (۱۲).

در گزارش‌ها نیز اثر ترکیبی تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی متنوع بر پرآوری ریزنمونه‌های مختلف بررسی شده است. سیوارام و موکوندان (۲۰۰۳) غلظت‌های مختلف BA و Kin و ترکیب BA و Kin با NAA[3] و IAA[4] را در گیاه استویا مورد بررسی قرار دادند و بیان کردند بیش‌ترین تعداد شاخه از ریزنمونه رأس شاخه در غلظت ۸/۸۷ میکرومول BA به‌همراه ۵/۷۱ میکرومول IAA (با میانگین ۱۱/۲ شاخه) به‌دست آمد (۲۶). همچنین ابراهیم و همکاران (۲۰۰۸) از غلظت‌های مختلف BA، Kin، NAA، IAA و IBA[5] به‌منظور بررسی ریزازدیادی ریزنمونه رأس شاخه گیاه استویا استفاده کردند و بیش‌ترین تعداد شاخه (۷۳/۶۵ شاخه) پس از گذشت دو ماه در محیط کشت حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BA به‌دست آمد (۱۳). جیتندرا و همکاران (۲۰۱۲) از غلظت‌های مختلف BAP[6] و Kin به‌تنهایی و در ترکیب با هم به‌منظور ریزازدیادی گیاه استویا استفاده کردند و مشخص شد که بیش‌ترین تعداد شاخه حاصل از کشت قلمه‌های تک‌گره در ترکیب ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP به‌همراه ۲ میلی‌گرم در لیتر Kin (با میانگین ۱۲ شاخه) در محیط کشت MS به‌دست آمد (۱۵).

عواملی مانند نوع رقم، ریزنمونه، نوع و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی و ترکیب آن‌ها بر نتایج ریزازدیادی تأثیر به‌سزایی دارند. بنابراین، با توجه به نوع رقم باید بهینه‌سازی شرایط ریزازدیادی انجام گیرد. تاکنون روی رقم jgstevia (بذور شرکت گروه JG کانادا)[7] مطالعه‌ای در خصوص بهینه‌سازی شرایط کشت بافت برای تکثیر غیرجنسی آن گزارش نشده است به همین دلیل این مطالعه با هدف بررسی تأثیر نوع و غلظت‌های مختلف اکسین‌ها و سیتوکنین‌ها بر روند پرآوری شاخه ریزنمونه رأس شاخه گیاه استویا رقم jgstevia و یافتن مؤثرترین نوع و غلظت تنظیم‌کننده(های) رشد گیاهی برای افزایش راندمان ریزازدیادی گیاه استویا انجام شد.

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه محقق اردبیلی در سال ۱۳۹۵ انجام گرفت. بذرهای گیاه استویا از شرکت گروه JG کانادا خریداری شدند. برای ضدعفونی بذور از محلول ۲/۵ درصد هیپوکلریت سدیم به‌مدت ۵ دقیقه استفاده شد و سپس بذور سه مرتبه با آب مقطر استریل شست‌وشو داده شدند و در محیط کشت پایه MS (۱۷) ساده برای

1- DELLA proteins
2- Gibberellic acid
3- 1-naphthaleneacetic acid
4- Indole-3-acetic acid
5- Indole-3-butyric acid
6- 6-Benzylaminopurine
7- JG Group

www.SID.ir

Archive of SID

تهیه ریزنمونه رأس شاخه کشت شدند. پس از رشد گیاهچه‌ها، ریزنمونه‌های رأس شاخه به اندازه ۱ تا ۲ میلی‌متر از نوک شاخه (با استفاده از استریو میکروسکوپ در زیر هود لامینار) برش داده شدند و در محیط کشت پایه MS حاوی ۳۰ گرم ساکارز و ۸ گرم آگار با pH برابر با ۵/۷ تا ۵/۸ و تنظیم‌کننده‌های رشد مختلف با غلظت‌های مختلف کشت شدند. در آزمایش اول از تنظیم‌کننده‌های رشد اکسین (IAA، NAA و IBA)، سیتوکینین (BAP و Kin) و GA_3 با غلظت‌های مشابه ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر به‌همراه شاهد (فاقد تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی) (در مجموع ۲۵ تیمار) استفاده شد. هدف از انجام این آزمایش بررسی تأثیر نوع و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی ذکرشده بر ریزنمونه راس شاخه در صفات تعداد و طول شاخه، تعداد و طول ریشه، تعداد برگ و میانگره و قطر کالوس بود. آزمایش بر پایه طرح کاملاً تصادفی با ٤ تکرار انجام گرفت و ویژگی‌های رشدی ریزنمونه‌ها ۳۰ روز پس از کشت و نگهداری در اتاقک رشد (با دمای بین ٢٤-٢٥ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ١٦ ساعت روشنایی و ٨ ساعت تاریکی) اندازه‌گیری شدند.

آزمایش دوم بر اساس نتایج آزمایش اول طراحی گردید. در آزمایش دوم تأثیر توأم دو سیتوکینین BAP (۰، ۱، ۲، ۳ و ٤ میلی‌گرم در لیتر) و Kin (۰، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) بر پرآوری راس شاخه استویا در محیط کشت MS ارزیابی شدند. آزمایش به‌صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد و صفات تعداد و طول شاخه، تعداد و طول ریشه، تعداد برگ و میانگره و قطر کالوس ۳۰ روز پس از کشت و نگهداری در اتاقک رشد (با دمای بین ٢٤-٢٥ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ١٦ ساعت روشنایی و ٨ ساعت تاریکی) اندازه‌گیری شدند. جهت انجام ریشه‌زایی، ریزشاخه‌های ۱ ماهه رشدیافته از رأس شاخه در دو محیط کشت MS و MS $\frac{1}{2}$ حاوی غلظت‌های مختلف NAA (۰، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) کشت شدند. آزمایش به‌صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام گرفت. صفات تعداد و طول ریشه ۳۰ روز پس از کشت و نگهداری در اتاقک رشد (با دمای بین ٢٤-٢٥ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ١٦ ساعت روشنایی و ٨ ساعت تاریکی) اندازه‌گیری شدند.

در این پژوهش نوشاخه‌های ایجادشده برای سازگاری به شرایط محیطی به گلدان‌های حاوی پرلایت و پیت‌موس (۱:۲) منتقل شدند و روی گلدان‌ها کاملاً با سلفن پوشانده شد و کم‌کم با سوراخ کردن و برداشتن درپوش در طی دو هفته، با رطوبت محیط سازگار شدند و پس از دو هفته سازگاری با شرایط اتاقک رشد به گلخانه منتقل شدند و درون گلدان‌های بزرگ‌تر حاوی پرلایت، پیت موس، خاک زراعی و خاک برگ به نسبت ۲:۲:۱:۱ کشت شدند.

همه مواد محیط کشت و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مورد استفاده از شرکت سیگما آمریکا و آگار از شرکت مرک آلمان خریداری شدند.

تجزیه و تحلیل داده‌ها با نرم‌افزار SPSS 19 انجام گرفت و مقایسات میانگین با روش چنددامنه‌ای دانکن انجام شد. همچنین رسم نمودارها با نرم‌افزار Excel نسخه ۲۰۱۳ و Minitab 17 انجام شد.

نتایج و بحث

تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی BAP، Kin، NAA، IAA، GA_3 و IBA بر پرآوری رأس شاخه: تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که بین تیمارها در تمامی صفات مورد بررسی تفاوت معنی‌داری وجود داشت (جدول ۱).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱- تجزیه واریانس تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد بر صفات مورد ارزیابی در کشت زیرنمونه رأس شاخه استویا.

Table 1. Analysis of variance the effects of different plant growth regulater on evaluated traits of *Stevia* shoot tip culture.

منابع تغییرات SOV	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean square						
		قطر کالوس (سانتی‌متر) Callus diameter (cm)	تعداد شاخه Shoot number	تعداد برگ Leaf number	تعداد ریشه Root number	طول ریشه (سانتی‌متر) Root length (cm)	طول شاخه (سانتی‌متر) Shoot length (cm)	تعداد میان‌گره Internode number
تیمار Treatment	24	1.38**	5.16**	210.58**	0.19**	4.88**	12.84**	60.86**
خطا Error	75	0.03	0.17	7.82	0.014	0.12	0.88	1.8
ضریب تغییرات (٪) CV%	-	28.8	25.62	17.58	12.09	31.62	18.80	18.49

** معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد.

** Significant at 1% probability level.

با توجه به جدول مقایسه میانگین‌ها (جدول ۲) بیش‌ترین قطر کالوس در محیط کشت حاوی ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP (به‌ترتیب با میانگین ۱/۸۵، ۱/۵٦ و ۱/۷۵ سانتی‌متر) به‌دست آمد (جدول ۲ و شکل ۱). در این آزمایش تیمار ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP بیش‌ترین تأثیر را بر قطر کالوس، تعداد شاخه، تعداد برگ و تعداد میان‌گره داشت. گروچاندران و ساسی‌کومار (۲۰۱۳) بیان کردند که در میان غلظت‌های مختلف BAP آزمایش‌شده، تیمار ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP به‌همراه ۱۰ میلی‌گرم در لیتر اسپرمین بیش‌ترین تأثیر را در القای جوانه شاخه (۲۲ شاخه) و تکثیر ریزنمونه رأس شاخه در گیاه استویا داشت و استفاده از تیمار ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP منجر به تولید ۱۰ شاخه گردید (۱۱).

در مطالعه حاضر استفاده از Kin، تأثیر قابل‌توجهی بر تعداد شاخه (۱ یا حداکثر ۲ شاخه) نداشت. که با نتایج رفیق و همکاران (۲۰۰۷) مطابقت داشت (۲۱). آن‌ها نیز گزارش کردند که در گیاه استویا افزایش قابل‌توجهی در صفت تعداد شاخه در استفاده از Kin تنها مشاهده نشد (۲۱). همچنین، موضوع اثربخشی بیش‌تر BAP در القای جوانه شاخه نسبت به دیگر سیتوکینین‌ها، پیش از این توسط بنت و داویس (۱۹۸٦) و رُگرس و همکاران (۱۹۹۸) گزارش شده است (٦ و ۲۳). در گیاهان *Eclipta alba* (۷)، *Quercus euboica* (۱٦)، *Ulmus parvifolia* (۲۹)، *Sarcostemma brevistigma* (۳۲)، *Clitoria ternotea* (۲۵) و *Stevia rebaudiana* (۳۱) نیز مشخص شد که BAP تأثیر بیش‌تری نسبت به Kin بر تعداد شاخه داشت. در پژوهش حاضر، تأثیر Kin در افزایش طول شاخه بیش‌تر از BAP بود به‌گونه‌ای که غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر Kin یکی از سه ترکیب تیماری مؤثر بر افزایش طول شاخه بود. چنین به‌نظر می‌رسد که سیتوکینین BAP بیش‌تر در افزایش تعداد شاخه و سیتوکینین Kin بیش‌تر در افزایش طول شاخه مؤثر است. نتایج حاصل از این پژوهش با نتایج احمد و انیس (۲۰۱٤) مطابقت داشت (۱).

www.SID.ir

Archive of SID

علاوه بر تیمار ۲ میلی‌گرم در لیتر Kin (با میانگین ۷/۸۶ سانتی‌متر)، محیط کشت MS حاوی ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر GA_3 بیش‌ترین تأثیر را بر طول شاخه داشت (با میانگین ۹/۲۵ و ۸/۷۵ سانتی‌متر). همچنین، شکل ۱-الف ریزشاخه‌های ایجاد شده در ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP (با میانگین ۵/۷۵ شاخه)، شکل ۱-ب افزایش طول میان‌گره در ۲ میلی‌گرم در لیتر GA_3 و شکل ۱-ج کالوس‌زایی در محیط کشت دارای ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA (با میانگین قطر ۱/۸۵ سانتی‌متر) را نشان می‌دهد. شناخته‌ترین عکس‌العمل گیاه نسبت به جیبرلین‌ها تحریک رشد میان‌گره‌ای است (۹). در این آزمایش نیز طویل‌شدن میان‌گره‌ها در اثر استفاده از اسید جیبرلیک مشهود بود. در پژوهش‌های انجام‌شده روی گیاهان *Eclipta alba* (۷)، *Andrographis paniculata* (۲۰) و *Gymnema sylvestre* (۳۰) نیز مشخص شد که GA_3 باعث افزایش رشد طولی شاخه می‌شود. در این مطالعه، همچنین، با افزایش غلظت GA_3 برگ‌های پهن‌تر و سبزتری تولید شدند و در محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر GA_3 بزرگ‌ترین برگ‌ها به‌دست آمد. بر اساس نتایج آزمایش، بیش‌ترین تعداد و طول ریشه نیز در محیط کشت‌های شاهد مشاهد شد (شکل۱-د).

جدول ۲- مقایسه میانگین تیمارهای تنظیم‌کننده رشد گیاهی برای صفات مورد ارزیابی در کشت رأس شاخه استویا.

Table 2. The compare means of plant growth regulator treatments for evaluated traits in *Stevia* shoot tip culture.

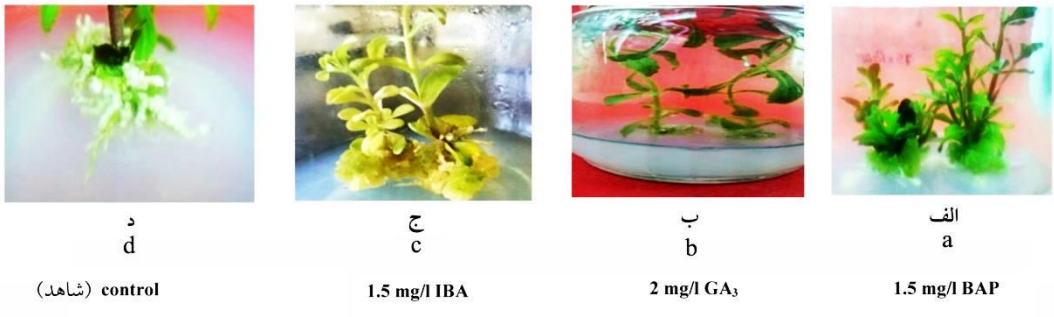
تیمار Treatment mg/l	قطر کالوس (سانتی‌متر) Callus diameter (cm)	تعداد شاخه Shoot number	تعداد برگ Leaf number	تعداد ریشه Root number	طول ریشه (سانتی‌متر) Root length (cm)	طول شاخه (سانتی‌متر) Shoot length (cm)	تعداد میان‌گره Internode number
	میانگین Mean						
شاهد Control	0.00^{d}	1.00^{de}	16.00^{ef}	20.00^{a}	3.29^{a}	7.00^{c-e}	7.33^{e-i}
0.5 Kin	0.00^{d}	1.00^{de}	11.00^{ef}	9.75^{d-f}	2.50^{bc}	4.37^{g-j}	4.50^{f-j}
1 Kin	0.92^{bc}	1.75^{de}	14.25^{ef}	5.50^{fg}	0.75^{ef}	5.75^{d-g}	6.25^{e-i}
1.5 Kin	0.42^{d}	2.25^{cd}	14.00^{ef}	4.50^{ge}	0.82^{ef}	6.87^{b-e}	6.25^{e-i}
2 Kin	0.37^{d}	1.00^{de}	14.25^{ef}	4.50^{ge}	0.72^{ef}	7.86^{a-c}	6.25^{e-i}
0.5 IAA	0.05^{d}	1.00^{de}	10.50^{ef}	7.50^{e-g}	2.12^{c}	5.12^{e-i}	3.50^{h-j}
1 IAA	0.40^{d}	2.25^{cd}	18.00^{c-e}	13.75^{d}	2.37^{c}	4.00^{g-j}	7.25^{e-h}
1.5 IAA	0.95^{d}	1.50^{de}	13.00^{ef}	18.00^{bc}	1.87^{cd}	3.50^{h-j}	5.50^{e-i}
2 IAA	0.075^{d}	0.50^{e}	4.00^{g}	0.00^{h}	0.00^{f}	3.12^{h-j}	1.75^{j}
0.5 NAA	0.15^{d}	1.00^{de}	10.00^{ef}	17.50^{bc}	1.12^{d-f}	3.50^{h-j}	4.00^{g-j}
1 NAA	0.25^{d}	1.50^{de}	13.50^{ef}	0.00^{h}	0.00^{f}	4.50^{e-j}	5.75^{e-i}
1.5 NAA	0.80^{c}	1.75^{de}	17.25^{c-e}	0.00^{h}	0.00^{f}	5.62^{d-h}	7.50^{d-h}
2 NAA	1.05^{bc}	1.00^{de}	10.00^{ef}	0.00^{h}	0.00^{f}	4.62^{f-j}	4.00^{g-j}
0.5 GA_3	0.00^{d}	1.00^{de}	15.00^{d-f}	10.00^{de}	2.50^{bc}	3.25^{h-j}	7.50^{d-h}
1 GA_3	0.00^{d}	1.00^{de}	17.50^{c-e}	9.75^{d-f}	2.50^{bc}	5.12^{e-i}	8.75^{d-f}
1.5 GA_3	0.00^{d}	1.00^{de}	18.50^{c-e}	10.50^{de}	2.37^{c}	9.25^{a}	9.25^{c-e}
2 GA_3	0.00^{d}	1.00^{de}	17.00^{c-e}	10.00^{de}	2.12^{c}	8.75^{ab}	8.50^{d-f}
0.5 IBA	0.35^{d}	1.00^{de}	16.00^{d-f}	0.00^{h}	0.00^{f}	6.37^{c-f}	7.00^{e-i}
1 IBA	1.20^{b}	1.00^{de}	12.50^{ef}	0.00^{h}	0.00^{f}	4.37^{e-j}	5.25^{e-j}
1.5 IBA	1.85^{a}	1.00^{de}	11.50^{ef}	6.00^{e-g}	1.12^{d-f}	3.62^{e-e}	4.75^{f-j}
2 IBA	1.12^{bc}	1.00^{de}	8.00^{fg}	16.75^{c}	1.50^{c-e}	3.00^{h-j}	3.00^{ij}
0.5 BAP	0.36^{d}	2.00^{d}	24.00^{c}	0.00^{h}	0.00^{f}	4.00^{g-j}	11.87^{e}
1 BAP	0.87^{bc}	3.12^{bc}	22.50^{cd}	0.00^{h}	0.00^{f}	2.62^{j}	11.25^{cd}
1.5 BAP	1.56^{a}	5.75^{a}	39.50^{a}	0.00^{h}	0.00^{f}	3.50^{h-j}	19.50^{a}
2 BAP	1.75^{a}	3.75^{b}	30.00^{b}	0.00^{h}	0.00^{f}	3.37^{ij}	15.00^{b}

در هر ستون، اعداد دارای حروف مشترک اختلاف معنی‌داری ندارند (P<۰/۰۵).

In each column, numbers followed by the same letter are not significantly different (P<0.05).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱- تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مختلف بر ریزنمونه‌های رأس شاخه گیاه استویا در محیط کشت MS.

Figure 1. The effect of different plant growth regulators on *Stevia* shoot tip explants in MS medium.

تأثیر BAP و Kin بر پرآوری رأس شاخه: با توجه به نتایج آزمایش اول مشخص گردید که BAP بر افزایش تعداد شاخه و Kin در افزایش طول شاخه مؤثر بود. با توجه به این‌که در پرآوری رأس شاخه تعداد و طول شاخه دارای اهمیت است، بنابراین در آزمایش دوم برهمکنش این دو هورمون مورد بررسی قرار گرفت. تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد غلظت‌های مختلف BAP، Kin و برهمکنش آن‌ها در تمامی صفات مورد مطالعه اختلاف معنی‌داری داشتند (جدول ۳).

جدول ۳- میانگین مربعات حاصل از تجزیه واریانس اثر ترکیب BAP و Kin بر صفات مورد ارزیابی در کشت رأس شاخه استویا.

Table 3. Mean square of analysis of variance of combination effect of BAP and Kin on evaluated traits in *Stevia* shoot tip culture.

تعداد میان‌گره Internode number	طول شاخه (سانتی‌متر) Shoot length (cm)	تعداد برگ Leaf number	تعداد شاخه Shoot number	قطر کالوس (سانتی‌متر) Callus diameter (cm)	درجه آزادی df	منابع تغییرات SOV
419.77**	33.47**	1694.27**	148.02**	7.83**	4	BAP
191.39**	1.25*	835.17**	49.04**	1.95**	3	Kin
147.69**	2.04**	662.03**	37.04**	0.19*	12	BAP × Kin
4.03	0.37	15.45	1.8	0.09	40	خطا Error
22.19	19.18	19.67	28.85	20.72		ضریب تغییرات (٪) CV%

* و ** معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد.

* and ** Significant at 5% and 1% probability level.

در این آزمایش، بیش‌ترین تعداد شاخه از محیط کشت حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP + ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin (با میانگین ۱۷/۶۷) به‌دست آمد (جدول ٤). بنابراین، تأثیر استفاده همزمان از این دو سیتوکینین نسبت به استفاده تنها از این دو هورمون در صفت تعداد شاخه آشکار بود (جدول ٤). همچنین، در غلظت‌های ۳ و ٤ میلی‌گرم در لیتر BAP به‌همراه غلظت‌های ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin شاخه‌ها از طریق اندام‌زایی از کالوس به‌وجود آمدند. بیش‌ترین تعداد شاخه در محدوده ۰/٤۸ تا ۲/٦۸ میلی‌گرم در لیتر BAP در ترکیب با ۱/۲۲ تا ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin مشاهده شد. مطالعه پیک و هالان (۲۰۰۰) بر ریزنمونه رأس شاخه لیسیانتوس (*Eustomo grandiflorum*) نشان داد که ترکیب دو

www.SID.ir

Archive of SID

سیتوکنین BA و Kin در غلظت‌های بالا باعث تشکیل شاخساره‌های بیش‌تر می‌شود (۱۹) که با نتایج حاصل از این پژوهش مطابقت داشت. به‌طورکلی، پاسخ شاخه‌زایی بالا می‌تواند با جذب سیتوکنین خارجی، سوخت‌وساز سیتوکنین، انتقال پیام سیتوکنین و تعامل با سایر هورمون‌ها مرتبط باشد. در این راستا، در برخی موارد، استفاده از سیتوکنین خارجی سریعاً تولید سیتوکنین درونی را القاء می‌کند و تعادلی بین هورمون‌های درونی ایجاد می‌کند (۳۵). در واقع، ترکیب دو سیتوکنین نتیجه‌ای بهتر از استفاده این هورمون‌ها به‌صورت انفرادی داشت که با نتایج آزمایش‌ها روی گیاهان *Vitex angus-castus* (٤)، *Alpinia calcarata* (۳) و *Gymnema sylvestre* (۳۰) مطابقت داشت.

در این آزمایش، بیش‌ترین طول شاخه در تیمارهای شاهد و غلظت ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin (به‌ترتیب با میانگین ٦/۳۳ و ۷ سانتی‌متر) مشاهده شد. طول شاخه‌ها با افزایش غلظت Kin افزایش پیدا کردند و با افزایش غلظت BAP از طول شاخه‌ها کاسته شد. بیش‌ترین طول شاخه در محیط کشت غنی‌شده با حدود ۱/۲ تا ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin و ۰ تا ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر BAP به‌دست آمد. کاهش طول شاخه‌ها در محیط کشت‌های حاوی Kin و BAP به‌دلیل ایجاد کالوس به‌ویژه در محدوده غلظت‌های بیش از ۲/۳ میلی‌گرم در لیتر BAP + غلظت‌های بیش از ۰/۳۸ میلی‌گرم در لیتر Kin مشاهده شد.

در آزمایش حاضر، بیش‌ترین تعداد برگ در محیط کشت حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP + ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin (با میانگین ۸۱) به‌دست آمد (جدول ٤). بیش‌ترین تعداد برگ در محدوده ۰ تا ۲/۲۱ میلی‌گرم در لیتر BAP + ۱/۲۷ تا ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin مشاهده شد. همچنین، با افزایش غلظت Kin تعداد برگ افزایش یافت. بیش‌ترین تعداد میانگره نیز در این آزمایش در محیط کشت حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP + ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin (با میانگین ۳۸/٦۷) مشاهده شد. افزایش تعداد برگ به‌دلیل افزایش تعداد شاخه و تعداد میانگره بود. بیش‌ترین تعداد میانگره نیز در محدوده ۰/۳۹ تا ۱/٤۹ میلی‌گرم در لیتر BAP + غلظت‌های بیش از ۱/۳۵ میلی‌گرم در لیتر Kin مشاهده شد. در واقع، با افزایش غلظت BAP تا حدود ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر افزایش تعداد میانگره مشاهده شد و پس از آن با افزایش غلظت BAP کاهش تعداد میانگره مشاهده گردید.

در این آزمایش یک هفته پس از کشت، ریزنمونه‌ها کالوس‌زایی کردند و شاخه‌ها از کالوس ایجاد شدند (این مورد در همه تیمارها به‌جز تیمار شاهد و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin صادق بود). بیش‌ترین قطر کالوس در محیط حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP + ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin، ۳ میلی‌گرم در لیتر BAP + ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin و ٤ میلی‌گرم در لیتر BAP +۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin (به‌ترتیب با میانگین ۲/۲۳، ۲/۲۳، ۲/٤۳، ۲/٤ و ۲/۷۳ سانتی‌متر) مشاهده شد. همچنین، در محیط کشت شاهد و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin هیچ کالوسی مشاهده نشد. در کل، در محیط‌های فاقد BAP کالوس‌زایی بسیار اندک و قابل چشم‌پوشی بود و در تمامی محیط‌های حاوی BAP، کالوس‌زایی اتفاق افتاد. بنابراین، BAP در کالوس‌زایی ریزنمونه رأس شاخه گیاه استویا نقش اساسی داشت. بیش‌ترین قطر کالوس در بیش از ۲/۲۹ میلی‌گرم در لیتر BAP + بیش از ۱/۲۲ میلی‌گرم در لیتر Kin مشاهده شد. در کل Kin بر کالوس‌زایی تأثیری نداشت. همچنین، قطر کالوس با طول شاخه رابطه عکس نشان داد و در نواحی که قطر کالوس بیش‌تر بود، طول شاخه کم‌تری مشاهده شد. در این آزمایش فقط در محیط‌های کشت حاوی Kin و شاهد ریشه‌زایی اتفاق افتاد و در محیط‌های کشت حاوی BAP و ترکیب BAP و Kin ریشه‌زایی مشاهده نشد.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ٤- مقایسه میانگین برهمکنش BAP و Kin برای صفات مورد ارزیابی در کشت رأس شاخه استویا.

Table 4. The compare means of interaction effects of BAP and Kin for evaluated traits in *Stevia* shoot tip culture.

میانگین Mean					تیمار (mg/l) Treatment (mg/l)	
قطر کالوس (سانتی‌متر) Callus diameter (cm)	تعداد میان‌گره Internode number	تعداد برگ Leaf number	طول شاخه (سانتی‌متر) Shoot length (cm)	تعداد شاخه Shoot number	Kin	BAP
0.00^{j}	4.67^{h-k}	11.33^{f-i}	6.33^{ab}	1.00^{j}	0	0
0.00^{j}	3.67^{i-k}	9.33^{g-i}	4.67^{cd}	1.00^{j}	0.5	0
0.17^{j}	5.33^{h-j}	12.67^{e-h}	5.67^{bc}	1.67^{h-j}	1	0
0.27^{j}	11.33^{d}	24.67^{c}	7.00^{a}	2.33^{f-j}	1.5	0
1.03^{i}	6.00^{g-i}	14.00^{d-g}	2.33^{g-j}	3.67^{e-i}	0	1
1.23^{g-i}	9.33^{d-f}	16.67^{de}	3.33^{e-g}	4.67^{d-f}	0.5	1
1.50^{e-i}	22.33^{b}	49.33^{b}	3.83^{d-f}	14.00^{b}	1	1
1.67^{d-h}	38.67^{a}	81.00^{a}	4.33^{de}	17.67^{a}	1.5	1
1.77^{d-g}	11.33^{d}	25.00^{c}	2.67^{g-i}	5.00^{dc}	0	2
1.93^{b-e}	8.00^{e-g}	17.67^{d}	2.33^{g-j}	4.00^{d-h}	0.5	2
2.23^{a-d}	5.33^{h-j}	12.33^{e-h}	2.83^{f-h}	2.33^{f-j}	1	2
2.23^{a-d}	3.33^{jk}	8.33^{hi}	2.67^{g-i}	1.33^{ij}	1.5	2
1.33^{f-i}	5.00^{h-k}	12.00^{e-h}	3.17^{fg}	3.00^{e-j}	0	3
1.83^{c-f}	7.00^{f-h}	16.00^{d-f}	2.33^{g-j}	4.33^{d-g}	0.5	3
2.00^{b-e}	10.33^{de}	22.23^{c}	1.83^{h-k}	6.33^{d}	1	3
2.43^{ab}	14.00^{c}	30.33^{b}	1.67^{i-k}	11.67^{c}	1.5	3
1.17^{hi}	5.00^{h-k}	11.67^{g-i}	3.00^{fg}	3.00^{e-j}	0	4
1.50^{e-i}	4.33^{i-k}	10.67^{g-i}	1.50^{j}	2.33^{f-j}	0.5	4
2.40^{a-c}	3.33^{jk}	8.33^{hi}	1.17^{k}	2.00^{g-j}	1	4
2.73^{a}	2.67^{k}	6.67^{i}	0.83^{k}	1.67^{h-j}	1.5	4

در هر ستون، اعداد دارای حروف مشترک اختلاف معنی‌داری ندارند (P<۰/۰۵).

In each column, numbers followed by the same letter are not significantly different (P<0.05).

تیمارهای دارای بیش‌ترین تعداد شاخه یک ماه دیگر در اتاقک رشد نگهداری شدند و پس از گذشت دو ماه از کشت ریزنمونه مشاهده گردید تعداد شاخه‌ها به‌طور چشمگیری افزایش پیدا کردند. تعداد شاخه‌ها در محیط کشت‌های حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP + ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin و ۳ میلی‌گرم در لیتر BAP + ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin به‌ترتیب از میانگین ١٤، ١٧/٦٧ و ١١/٦٧ شاخه به میانگین ۲۵، ۵۵ و ۳۸ شاخه رسیدند. همچنین، دو ماه پس از کشت در محیط‌های حاوی ترکیب تیماری BAP و Kin ریشه‌زایی مشاهده گردید. شکل ۲-الف شاخه‌زایی ریزنمونه رأس شاخه پس از گذشت یک ماه در محیط کشت حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP + ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin، شکل ۲-ب نوشاخه‌های ایجادشده از کالوس در محیط کشت حاوی ۳ میلی‌گرم در لیتر BAP + ۱ میلی‌گرم در لیتر Kin و شکل ۲-ج شاخه‌زایی ریزنمونه رأس شاخه پس از گذشت دو ماه در محیط کشت حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP + ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin را نشان می‌دهد. در کل، نسبت سیتوکنین و اکسین باعث ایجاد ریشه یا تولید ریزشاخه در ریزنمونه‌ها می‌شود. به‌طوری‌که نسبت بالای اکسین به سیتوکنین باعث ریشه‌زایی و بالعکس نسبت بالای سیتوکنین به اکسین باعث ایجاد نوشاخه‌ها می‌گردد (۲۷).

www.SID.ir

Archive of SID

الف
a
1mg/l BAP + 1.5 mg/l Kin
After one month

ب
b
3mg/l BAP + 1 mg/l Kin

ج
c
1mg/l BAP + 1.5 mg/l Kin
Afther two month

شکل ۲- تأثیر ترکیب BAP و Kin بر کشت رأس شاخه گیاه استویا.

Figure 2. The combination effect of BAP and Kin on *Stevia* shoot tip culture.

ریشه‌زایی نوشاخه‌های ایجادشده از پرآوری رأس شاخه گیاه استویا: نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که بین دو محیط کشت MS و MS $\frac{۱}{۲}$ و غلظت‌های مختلف NAA در صفات تعداد و طول ریشه و طول شاخه اختلاف معنی‌داری مشاهده شد و برهمکنش آن‌ها نیز بر صفات تعداد و طول ریشه اختلاف معنی‌داری داشت (جدول ۵).

جدول ۵- میانگین مربعات حاصل از تجزیه واریانس اثر NAA بر صفات موردارزیابی در ریشه‌زایی نوشاخه‌های استویا در محیط کشت MS و MS $\frac{1}{2}$.

Table 5. Mean square of analysis of variance of NAA effect on evaluated traits in *Stevia* shootlets rooting in MS and $\frac{1}{2}$ MS medium.

طول ریشه (سانتی‌متر) Root length (cm)	تعداد ریشه Root number	درجه آزادی df	منابع تغییرات SOV
0.667**	560.667**	3	محیط کشت Media
9.819**	1838.778**	1	NAA
0.722**	1043.444**	3	محیط کشت در NAA NAA × Media
0.135	13	1	خطا Error
16.64	17.31		ضریب تغییرات (٪) CV %

** معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد.

** Significant at 1% probability level.

در این آزمایش، یک هفته پس از کشت نوشاخه‌ها در محیط کشت MS و MS $\frac{۱}{۲}$ غنی‌شده با ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA در ابتدا در محل تماس نوشاخه و محیط کشت کالوس‌زایی مشاهده شد و ریشه‌های جانبی به‌صورت غیرمستقیم از کالوس‌ها ایجاد شدند.

www.SID.ir

Archive of SID

طبق نتایج حاصل از مقایسه میانگین داده‌ها (جدول ٦)، از بین تیمارهای مورد بررسی بیش‌ترین تعداد ریشه در محیط کشت $\frac{1}{2}$ MS حاوی ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA (با میانگین ۵۵ ریشه) به‌دست آمد (ریشه‌ها از کالوس تولید شدند). هنگامی‌که از محیط کشت MS کامل استفاده شد، با افزایش NAA تا ۱ میلی‌گرم در لیتر تعداد ریشه افزایش یافت و پس از آن کاهش مشاهده شد. همچنین، هنگامی‌که از محیط کشت $\frac{1}{2}$ MS استفاده شد با افزایش NAA تا ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر تعداد ریشه افزایش یافت. در کل تعداد ریشه‌های ایجادشده در محیط کشت $\frac{1}{2}$ MS بیش‌تر از محیط کشت MS کامل بود.

بیش‌ترین طول ریشه نیز در محیط کشت $\frac{1}{2}$ MS و MS کامل فاقد هورمون (به‌ترتیب با میانگین ٤/۳۳ و ۳/۸۳ سانتی‌متر) به‌دست آمد. در حضور NAA طول ریشه‌ها تفاوت زیادی باهم نداشتند و طولی بین ۱ تا ۲ سانتی‌متر نشان دادند (جدول ٦).

در محیط کشت $\frac{1}{2}$ MS به‌همراه ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA، ۱۰۰ درصد ریشه‌زایی نشان دادند و در همه ریزشاخه‌ها ریشه‌زایی مشاهده شد (جدول ٦). سیکدار و همکاران (۲۰۱۲) بیان کردند بیش‌ترین درصد ریشه‌زایی در محیط کشت $\frac{1}{2}$ MS غنی‌شده با ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA در ریزشاخه‌های گیاه *Stevia rebaudiana* به‌دست آمد (٢٤). همچنین در گزارشی اسلاووا و همکاران (۲۰۰۳) بیان کردند که در محیط کشت $\frac{1}{2}$ MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA بیش‌ترین درصد ریشه‌زایی در گیاه استویا مشاهده شد (۲۸). در کل درصد ریشه‌زایی در محیط کشت $\frac{1}{2}$ MS بیش‌تر از محیط کشت MS کامل بود و کم‌ترین درصد ریشه‌زایی در محیط کشت MS ساده (شاهد) و MS غنی‌شده با ۰/۵ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA مشاهده شد (جدول ٦). شکل ۳-الف ریشه‌های ایجادشده در محیط کشت $\frac{1}{2}$ MS حاوی ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA را نشان می‌دهد.

جدول ٦- مقایسه میانگین برهمکنش NAA و غلظت MS برای ویژگی‌های ریشه‌زایی نوشاخه‌ها.

Table 6. The compare means of interaction effect of NAA and MS concentration for shoot rooting characteristics.

تیمار Treatment	میانگین Mean			
	تعداد ریشه Root number	طول ریشه (سانتی‌متر) Root length (cm)	درصد ریشه‌زایی Rooting percent	القای کالوس Callus induction
MS + 0 mg/l NAA	2.33^{d}	3.83^{a}	50%	-
MS + 0.5 mg/l NAA	7.67^{d}	2.17^{b}	50%	+
MS + 1 mg/l NAA	46.67^{b}	1.33^{c}	66.67%	+
MS + 1.5 mg/l NAA	7.33^{d}	2.17^{b}	83.33%	+
$\frac{1}{2}$ MS + 0 mg/l NAA	5.33^{d}	4.33^{a}	66.67%	-
$\frac{1}{2}$ MS + 0.5 mg/l NAA	9.00^{d}	1.67^{bc}	66.67%	+
$\frac{1}{2}$ MS + 1 mg/l NAA	33.33^{c}	1.17^{c}	100%	+
$\frac{1}{2}$ MS + 1.5 mg/l NAA	55.00^{a}	1.00^{c}	83.33%	+

در هر ستون، اعداد دارای حروف مشترک اختلاف معنی‌داری ندارند (P<۰/۰۵).

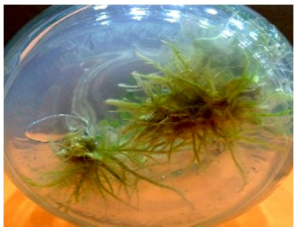
In each column, numbers followed by the same letter are not significantly different (P<0.05).
+ & - implied callus production and no callus induction, respectively.

www.SID.ir

Archive of SID

سازگاری نوشاخه‌های ایجادشده از پرآوری رأس شاخه در گلخانه: در این پژوهش نوشاخه‌های ایجادشده به شرایط محیطی سازگار شدند و میزان زنده‌مانی در گلخانه ۹۲/۸۶ درصد برآورد گردید. شکل ۳-ب گیاه استویای سازگارشده در گلخانه را نشان می‌دهد.

گیاهچه‌هایی که به‌وسیله فنون کشت بافت تکثیر می‌شوند، به‌منظور رشد و نمو به خاک انتقال می‌یابند. استقرار یک گیاهچه سالم در خاک و با حداقل تلفات، از نظر موفقیت تکثیر به‌وسیله کشت بافت گامی اساسی به‌شمار می‌رود.



الف

a

$\frac{1}{2}$ MS + 1.5 mg/l NAA

ب- گیاه استویای سازگارشده در گلخانه

b

Hardened *Stevia* in greenhouse

شکل ۳- تأثیر NAA بر ریشه‌زایی شاخه‌های استویا و انتقال استویا به گلخانه.

Figure 3. The effect of NAA on rooting of *Stevia* shoots and transferred *Stevia* to greenhouse.

نتیجه‌گیری کلی

مطالعه حاضر واکنش خوب گیاه استویا را همانند مطالعات قبلی تأیید نمود. با توجه به متفاوت بودن رقم مورد استفاده در این پژوهش می‌توان نتیجه گرفت که هر رقم در این گیاه نیاز به شرایط خاص خود برای تکثیر از طریق کشت بافت دارد. در دستورالعمل حاضر محیط کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP به‌همراه ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin ترکیب تیماری مؤثری در پرآوری رأس شاخه استویا بود و چنان‌چه ریزنمونه‌های کشت‌شده به‌مدت دو ماه در اتاقک رشد نگهداری شوند، افزایش چشمگیری در تعداد شاخه‌ها مشاهده می‌گردد و همچنین ریشه‌زایی نیز رخ می‌دهد.

منابع

1. Ahmed, R. and Anis, M. 2014. Rapid *in vitro* propagation system through shoot tip cultures of *Vitex trifolia* L.–an important multipurpose plant of the Pacific traditional Medicine. Physiol. Mol. Biol. Plants. 20: 3. 385-392.
2. Ali, A., Gull, I., Naz, S. and Afghan, S. 2010. Biochemical investigation during different stages of *in vitro* propagation of *Stevia rebaudiana*. Pak. J. Bot. 42: 4. 2827-2837.
3. Asha, K.I., Nair, R.A., Devi, A.I. and Dwivedi, N.K. 2012. *In vitro* propagation of lesser galangal (*Alpinia calcarata* Rosc.)-a commercially important medicinal plant through rhizome bud culture. Res. Plant Biol. 2: 5. 13-17.
4. Balaraju, K., Agastian, P., Preetamraj, J.P., Arokiyaraj, S. and Ignacimuthu, S. 2008. Micropropagation of *Vitex agnus-castus*, (Verbenaceae)-a valuable medicinal plant. *In vitro* Cell Dev-Pl. 44: 5. 436-441.
5. Chan, P., Xu, D.Y., Liu, J.C., Chen, Y.J., Tomlinson, B., Huang, W.P. and Cheng, J.T. 1998. The effect of stevioside on blood pressure and plasma catecholamines is spontaneously hypertensive rats. Life Sci. 63: 1679-1684.

www.SID.ir

Archive of SID

6.Bennett, L.K. and Davies Jr, F. T. 1986. *In vitro* propagation of *Quercus shumardii* seedlings. HortScience. 21: 4. 1045-1047.
7.Dhaka, N. and Kothari, S.L. 2005. Micropropagation of *Eclipta alba* (L.) Hassk–an important medicinal plant. In vitro Cell Dev-Pl. 41: 5. 658-661.
8.Frederico, A.P., Ruas, P.M., Marin-Morales, M.A., Ruas, C.F. and Nakajima, J.N. 1996. Chromosome studies in some *Stevia*. Cav. (Compositae) species from Southern Brazil. Braz. J. Genet. 19: 605-609.
9.Gardner, F.P., Pearce, R.B. and Mitchell, R.L. 1985. Physiology of crop plants. 1st ed. Iowa state university Press, Ames, USA, 327p.
10.Goettemoeller, J. and Ching, A. 1999. Seed germination in *Stevia rebaudiana*. In: J. Janick (ed.), Perspectives on new crops and new uses. ASHS Press, Alexandria, VA, Pp: 510-511.
11.Guruchandran, V. and Sasikumar, G. 2013. Effect of Polyamines on *In vitro* Organogenesis using Shoot Tip Explants of *Stevia Rebaudiana* Bert. Int. J. Rec. Biotechnol. 1: 1. 16-18.
12.Heldt, H.W. and Piechulla, B. 2011. Plant biochemistry. 4th ed. Academic Press, London, UK, 622p.
13.Ibrahim, I.A., Nasr, M.I., Mohammed, B.R. and El-Zefzafi, M.M. 2008. Plant growth regulators affecting *in vitro* cultivation of *Stevia rebaudiana*. Sugar Tech. 10: 3. 254-259.
14.Jeppensen, P.B., Gregersen, S., Rolfsen, S.E.D., Alstrup, K.K. and Hermansen, K. 2002. Antihyperglycemic and insulinotropic actions of stevioside in normal and diabetic Goto Kakizaki (GK) rats. Phytomedicine. 9: 9-14.
15.Jitendra, M., Monika, S., Ratan, S.D., Priyanka, G., Priyanka, S. and Kiran, D.J. 2012. Micropropagation of an anti-diabetic plant-*Stevia rebaudiana* Bertoni, (Natural Sweetener) in Hadoti region of south-east Rajasthan, India. India J. Biol. Sci. 1: 3.37-42.
16.Kartsonas, E. and Papafotiou, M. 2007. Mother plant age and seasonal influence on *in vitro* propagation of *Quercus euboica* Pap., an endemic, rare and endangered oak species of Greece. Plant Cell Tiss. Org. 90: 1. 111-116.
17.Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plantarum. 15: 3. 473-497.
18.Luria, G., Weiss, D., Ziv, O. and Borochov, A. 2004. Effect of planting depth and density, leaf removal, cytokinin and gibberellic acid treatments on flowering and rhizome production in *Zantedeschia aethiopica*. IX International Symposium on Flower Bulbs. Pp: 725-730.
19.Paek, K.Y. and Hahn, E.J. 2000. Cytokinins, auxins and activated charcoal affect organogenesis and anatomical characteristics of shoot-tip cultures of lisianthus [*Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn]. In vitro Cell Dev-Pl. 36: 2. 128-132.
20.Purkayastha, J., Sugla, T., Paul, A., Solleti, S. and Sahoo, L. 2008. Rapid *in vitro* multiplication and plant regeneration from nodal explants of *Andrographis paniculata*: a valuable medicinal plant. In vitro Cell Dev-Pl. 44: 5. 442-447.
21.Rafiq, M., Dahot, M.U., Mangrio, S.M., Naqvi, H.A. and Qarshi, I.A. 2007. *In vitro* clonal propagation and biochemical analysis of field established *Stevia rebaudiana* Bertoni. Pak. J. Bot. 39: 2467-2474.
22.Rathore, S., Yadav, K., Singh, N. and Singh, S.K. 2014. Comparative study on callus induction, proliferation and plantlets regeneration in two cultivars of *Stevia rebaudiana* Bertoni-The only non caloric natural sweetener. J. Agr. Sci. 37: 4. 499-508.
23.Rogers, D.S., Beech, J. and Sarma, K.S. 1998. Shoot regeneration and plant acclimatization of the wetland monocot Cattail (*Typha latifolia*). Plant Cell Rep. 18: 1. 71-75.
24.Sikdar, S.U., Zobayer, N., Azim, F., Ashrafuzzaman, M. and Prodhan, S.H. 2012. An efficient callus initiation and direct regeneration of *Stevia rebaudiana*. Afr. J. Biotechnol. 11: 45. 10381-10387.

www.SID.ir

Archive of SID

25. Singh, J. and Tiwari, K.N. 2010. High-frequency *in vitro* multiplication system for commercial propagation of pharmaceutically important *Clitoria ternatea* L.-a valuable medicinal plant. Ind. Crops Prod. 32: 3. 534-538.
26. Sivaram, L. and Mukundan, U. 2003. In vitro culture studies on *Stevia rebaudiana*. In vitro Cell Dev-Pl. 39: 5. 520-523.
27. Skoog, F. and Miller, C.O. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. Sym. Soc. Exp. Biol. 54: 118-130.
28. Slavova, Y., Nenkova, D. and Ivanova, I. 2003. Study on the influence of the substance of benzymidazol upon *Stevia rebaudiana* Bertoni, cultivated *in vitro*. Bulg. J. Agric. Sci. 9: 2. 225-228.
29. Thakur, R.C. and Karnosky, D.F. 2007. Micropropagation and germplasm conservation of Central Park Splendor Chinese elm (*Ulmus parvifolia* Jacq. 'A/Ross Central Park') trees. Plant Cell Rep. 26: 8. 1171-1177.
30. Thiyagarajan, M. and Venkatachalam, P. 2013. A reproducible and high frequency plant regeneration from mature axillary node explants of *Gymnema sylvestre* (Gurmur)-An important antidiabetic endangered medicinal plant. Ind. Crop Prod. 50: 517-524.
31. Thiyagarajan, M. and Venkatachalam, P. 2012. Large scale *in vitro* propagation of *Stevia rebaudiana* (bert) for commercial application: Pharmaceutically important and antidiabetic medicinal herb. Ind. Crop Prod. 37: 1. 111-117.
32. Thomas, T.D. and Shankar, S. 2009. Multiple shoot induction and callus regeneration in *Sarcostemma brevistigma* Wight & Arnott, a rare medicinal plant. Plant Biotechnol. Rep. 3: 1. 67-74.
33. Yasukawa, K., Kitanaka, S. and Seo, S. 2002. Inhibitory effect of stevioside on tumor promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol- 13-acetate in two-stage carcinogenesis in mouse skin. Biol. Pharm. Bull. 25: 1488-1490.
34. Yücesan, B., Büyükgöçmen, R., Mohammed, A., Sameeullah, M., Altuğ, C., Gürel, S. and Gürel, E. 2016. An efficient regeneration system and steviol glycoside analysis of *Stevia rebaudiana*. In vitro Cell Dev-Pl. 52: 3. 330-337.
35. Zhang, Z. and Finer, J.J. 2016. Use of cytokinin pulse treatments and micrografting to improve sunflower (*Helianthus annuus* L.) plant recovery from cotyledonary tissues of mature seeds. In vitro Cell Dev-Pl. 52: 4. 391-399.

www.SID.ir