مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
ISSN 2588-5073 چاپی
ISSN 2588-5081 الکترونیکی
دوره ٦، شماره ٢، پاییز و زمستان ٩٦
صفحه ٢٥٦-٢٤٥

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 6, Number 2

Archive of SID

ریزازدیادی گیاه دارویی استویا (*Stevia rebaudiana*) از طریق پرآوری رأس شاخه

Micropropagation *Stevia* Medicinal Plant (*Stevia rebaudiana*) Using Proliferation of Shoot Tip

مهسا زارعی[1]، سارا دژستان[2*]، مهدی بهنامیان[3]

Mahsa Zarei[1], Sara Dezhsetan[2*], Mahdi Behnamian[3]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد اصلاح نباتات ۲- دانشیار گروه زراعت و اصلاح نباتات

۳- استادیار گروه علوم باغبانی دانشگاه محقق اردبیلی، ایران

1- M.Sc. of plant breeding, 2- Associte Professor, Department of Agronomy & Plant Breeding, 3- Assistant Professor, Department of Horticultural Sciences,

Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: sdezhsetan@uma.ac.ir

(تاریخ دریافت: ٩٦/٥/٤ - تاریخ پذیرش: ٩٦/١٠/١٩)

چکیده

استویا *(Stevia rebaudiana)* گیاه دارویی مهم، فاقد کالری با طعم شیرین و مفید برای بیماران دیابتی می باشد. به‌منظور بهینه‌سازی ریزازدیادی این گیاه سه آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار طراحی شد. ریزنمونه‌های رأس شاخه در محیط کشت MS غنی‌شده با Kin (۰، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) + IAA (۰، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) (آزمایش ۱)، Kin (۳ و ٤ میلی‌گرم در لیتر) + IAA (۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) (آزمایش ۲) و BAP (۰، ۱، ۲، ۳ و ٤ میلی‌گرم در لیتر) + IBA (۰، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) (آزمایش ۳) کشت شدند. با افزایش غلظت Kin در محیط کشت تعداد شاخه‌ها افزایش یافت و در آزمایش ۲، محیط کشت MS غنی‌شده با ٤ میلی‌گرم در لیتر Kin + ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IAA بیشترین تعداد شاخه (با میانگین ۷ شاخه به ازای هر ریزنمونه) را تولید کرد. با وجود این، بهترین نتیجه پرآوری رأس شاخه در آزمایش ۳ از محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP + ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA (با میانگین ۹ شاخه به ازای هر ریزنمونه) به‌دست آمد. افزایش غلظت BAP از ۲ میلی‌گرم در لیتر منجر به کاهش معنی‌دار در تعداد و طول شاخه‌ها و کیفیت گیاهچه‌ها و افزایش کالوس-زایی گردید. علاوه‌بر این، نگهداری ریزنمونه‌های کشت‌شده به مدت دو ماه در اتاقک رشد به‌طور چشمگیری تعداد شاخه‌ها را افزایش داد. بیشترین ریشه‌زایی نوشاخه‌های نمویافته از محیط کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA به‌دست آمد. گیاهچه‌های ریشه‌دار شده در اتاقک رشد سازگار شدند و با موفقیت بالا در خاک مستقر شدند.

واژه‌های کلیدی

تنظیم‌کننده‌های رشد،
رأس شاخه،
ریزازدیادی،
استویا،
سازگاری

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

استویا (*Stevia rebaudiana*) گیاه دارویی بومی مناطق گرمسیری از خانواده *Asteraceae* است. استویا گیاهی خودناسازگار است که گرده‌افشانی آن به‌وسیله حشرات انجام می‌شود (Miyagawa *et al*., 1986). به‌دلیل تجمع مقدار قابل‌توجهی شیرین‌کننده‌های مشتق‌شده از استویول گلیکوزیدها در برگ‌های استویا، این گیاه دارای ارزش هنگفت در بازار جهانی شیرین‌کننده‌ها است (Yücesan *et al*., 2016). استویول گلیکوزیدهای برگ استویا عبارت از استویول مانوزاید، رباسوزاید، استویول بایوزاید، استویوزاید، ربادیوزید A، ربادیوزید B، ربادیوزید C، ربادیوزید F و دالکوزید A هستند که استویوزاید و دالکوزید A بیشتر از بقیه‌ی استویول گلیکوزیدها در برگ‌های استویا تولید می‌شوند و به‌صورت تجاری مورداستفاده قرار می‌گیرند (Yadav *et al*., 2011). استویوزاید به‌دلیل داشتن طعم خوب و ثبات شیمیایی به‌عنوان یک شیرین‌کننده‌ی ارزشمند مطرح است (Yamazaki *et al*., 1991; Abd Alhady, 2011). به‌علاوه برگ‌های این گیاه شامل پروتئین، فیبر، کربوهیدرات، فسفر، آهن، کلسیم، روی و ویتامین A و C می‌باشد (Yasukawa *et al*., 2002; Lailerd *et al*., 2004; Singh *et al*., 2011; Verma *et al*., 2011; Rathore *et al*., 2014).

استویول گلیکوزیدها یک عنصر طبیعی بدون کالری دارای خواص شیمیایی و دارویی مناسب برای افراد دارای رژیم غذایی هستند و تخمین زده می‌شود که ۱۰۰–۴۰۰ مرتبه شیرین‌تر از گلوکز می‌باشد (Abd Alhady, 2011). از خواص دارویی این گیاه می‌توان به تنظیم قند خون، جلوگیری از فشار خون بالا و پوسیدگی دندان و درمان اختلالات پوستی اشاره کرد (Singh and Rao, 2005; Singh and Dwivedi, 2014).

در کشاورزی سنتی، تکثیر استویا به‌وسیله‌ی قلمه و بذر انجام می‌گیرد. با وجود این، توانایی جوانه‌زنی بذرها پایین است (Jain *et al*., 2009; Kalpana *et al*., 2009). به‌علاوه، تکثیر از طریق بذر مانع تولید جمعیت همسان می‌شود و در خصوصیات تجاری مانند میزان و نوع شیرین‌کننده‌ها و میزان متابولیت‌های ثانویه تنوع نشان می‌دهند (Tamura *et al*., 1984; Nakamura and Tamura, 1985). همچنین، تکثیر این گیاه از طریق قلمه روش تجاری محسوب نمی‌شود و گیاهانی که از طریق قلمه تولید می‌شوند میزان استویوزاید پایین‌تری دارند (Sakaguchi and Kan, 1982). از طرفی، تعداد گیاهانی که از طریق قلمه‌های ساقه از یک گیاه به‌وجود می‌آیند محدود است (Tamura *et al*., 1984; Ferreira and Handro, 1988; Patil *et al*., 1996; Sivaram and mukundan, 2003; Mitra and pal, 2007; Jain *et al*., 2009). با توجه به اهمیت اقتصادی این گیاه، استفاده از فنونی مانند کشت بافت که بتوان بر اساس آن تعداد قابل‌توجهی گیاه همسان در مدت زمان کوتاه تولید کرد حائز اهمیت می‌باشد (Handro *et al*., 1977; Bondarev *et al*., 1998; Bondarev *et al*., 2002; Mirniam *et al*., 2013).

در مطالعه‌ی انجام‌شده توسط هوانگ مشخص شد که محیط کشت حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin (Kinetin) + ۲ میلی‌گرم در لیتر IAA (3-indoleacetic acid) دارای بیشترین تعداد شاخه از جداکشت‌های قلمه‌ی تک‌گره استویا (با میانگین ۲۳/٤ ریزشاخه) بود (Hwang, 2006). همچنین مشخص شد که تیمار ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP (6-Benzylaminopurine) به‌همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IAA بیشترین تأثیر را در افزایش تعداد شاخه (با میانگین ۳۷ ریزشاخه) از قلمه تک‌گره استویا در شرایط درون شیشه‌ای داشت (Kalpana *et al*., 2009). در بررسی انجام‌شده در گیاه استویا توسط تیاگاراجان و ون‌کاتاچالام مشخص گردید که بیشترین تعداد شاخه حاصل از قلمه تک‌گره (با میانگین ۱۵/٦۹ ریزشاخه) در محیط کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP به‌همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IAA حاصل شد (Thiyagarajan and Venkantalacham, 2012). در پژوهش

www.SID.ir

Archive of SID

میرنیام مشخص شد موثرترین ترکیب تیماری بر جداکشت-های جوانه‌های جانبی استویا در صفت تعداد شاخه (با میانگین ٤٢ ریزشاخه) ترکیب ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP به-همراه ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA (Naphthaleneacetic acid) بود (Mirniam *et al*., 2013). در پژوهشی دیگر که روی ریزنمونه قلمه تک‌گره و رأس شاخه استویا انجام شد مشخص گردید که بیشترین تعداد شاخه (١٤ تا ١٦ ریز شاخه از ریزنمونه قلمه تک‌گره و ۱۰ تا ۱۲ ریزشاخه از ریزنمونه رأس شاخه) از تیمار ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP به‌دست آمد (Jahan *et al*., 2014).

هدف از پژوهش حاضر، بررسی ریزازدیادی گیاه دارویی *استویا ربادیانا* از طریق پرآوری رأس شاخه بود. بدین منظور تأثیر غلظت‌های مختلف سیتوکنین و اکسین بر ریزنمونه رأس شاخه گیاه استویا، پرآوری رأس شاخه، ریشه‌زایی و سازگاری گیاهچه‌ها در شرایط گلخانه مطالعه شد.

مواد و روش‌ها

به‌منظور ریزازدیادی گیاه استویا (*Stevia rebaudiana*) بذرهای این گیاه از شرکت JG Group کانادا خریداری شد. برای حذف آلودگی‌های سطحی بذور استویا از محلول ۲/۵ درصد هیپوکلریت سدیم به‌مدت ۵ دقیقه استفاده شد و پس از آن بذور سه مرتبه با آب مقطر استریل شست‌وشو داده شدند و جهت تهیه ریزنمونه رأس شاخه در محیط کشت پایه MS (Murashige & Skoog, 1962) ساده کشت شدند. پس از استقرار و رشد گیاهچه‌ها، ریزنمونه‌های رأس شاخه به-اندازه‌ی 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 در لیتر ساکارز و ۸ گرم در لیتر آگار با pH حدود ۵/۷ تا ۵/۸ و تنظیم‌کننده‌های رشد مختلف کشت شدند. در آزمایش اول تاثیر دو تنظیم‌کننده رشد Kin (۰، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) و IAA (۰، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر)، در آزمایش دوم تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد Kin (۳ و ٤ میلی‌گرم در لیتر) در ترکیب با IAA (۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) و در آزمایش سوم تاثیر دو تنظیم-کننده رشد BAP (۰، ۱، ۲، ۳ و ٤ میلی‌گرم در لیتر) و IBA (Indole-3-butyric acid) (۰، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) بر ریزنمونه‌های راس شاخه به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی بررسی شدند. تمامی آزمایشات با سه تکرار انجام شد و ویژگی‌های رشدی ریزنمونه‌ها ۳۰ روز پس از کشت و نگهداری در اتاقک رشد (دوره نوری ١٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و دمای بین ٢٤-٢٥ درجه سانتی‌گراد) اندازه‌گیری شدند. به‌منظور ریشه‌زایی، ریزشاخه‌های یک ماهه به‌دست‌آمده از پرآوری رأس شاخه در دو محیط کشت MS و $\frac{1}{2}$ MS حاوی غلظت‌های مختلف IBA (۰، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) کشت شدند. در مرحله‌ی بعدی، با هدف سازگاری، پس از حذف آگار از گیاهچه‌های ریشه‌دارشده، گیاهچه‌ها در محیط کشت حاوی پرلیت و پیت‌موس به‌مدت دو هفته نگهداری شدند. کلیه مواد محیط کشت و هورمون‌های مورداستفاده از شرکت سیگما آمریکا و آگار از شرکت مرک آلمان خریداری شدند. به‌منظور تجزیه‌ی داده‌ها از نرم‌افزار SPSS 19 و برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Minitab 17 استفاده شد. مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام گرفت.

نتایج

تأثیر دو تنظیم‌کننده رشد Kin و IAA بر پرآوری رأس شاخه

تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر اصلی غلظت‌های مختلف Kin، IAA و اثرمتقابل IAA × Kin در کلیه‌ی صفات اختلاف معنی‌داری داشتند (داده‌ها نشان داده نشده‌اند).

www.SID.ir

Archive of SID

در این آزمایش، بیشترین تعداد شاخه در محیط کشت حاوی ۲ و ۱ میلی‌گرم در لیتر Kin به‌همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IAA (به‌ترتیب با میانگین ۳/۳۳ و ۲/۶۷ ریزشاخه) به‌دست آمد. بیشترین طول شاخه در محیط کشت کنترل، ۱ میلی‌گرم در لیتر Kin + ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر IAA و ۲ میلی‌گرم در لیتر Kin (به‌ترتیب با میانگین ٦/٥، ۷/۱۷، ٦/٦۷، ٦/۳۳ و ۷/٦٥ سانتی‌متر) مشاهده شد. همچنین، بیشترین تعداد برگ در محیط کشت کنترل، ۱ میلی‌گرم در لیتر IAA به‌تنهایی، ۱ میلی‌گرم در لیتر Kin به‌تنهایی، ۱ میلی‌گرم در لیتر Kin + ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IAA، ۲ میلی‌گرم در لیتر Kin به‌تنهایی و ۲ میلی‌گرم در لیتر Kin + ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر IAA (به‌ترتیب با میانگین ١٦، ١٨، ١٥، ١٦، ١٥/٦٧، ١٨/٦٧ و ۱۷/۳۳ برگ) به‌دست آمد. با افزایش غلظت Kin تعداد برگ‌ها افزایش یافت. ولی، با افزایش غلظت IAA از تعداد برگ‌ها کاسته شد. بیشترین تعداد میان‌گره در محیط کشت کنترل، ۱ میلی‌گرم در لیتر IAA به‌تنهایی، ۱ میلی‌گرم در لیتر Kin به‌تنهایی، ۱ میلی‌گرم در لیتر Kin + ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IAA، ۱ میلی‌گرم در لیتر Kin + ۱ میلی‌گرم در لیتر IAA، ۲ میلی‌گرم در لیتر Kin به‌تنهایی، ۲ میلی‌گرم در لیتر Kin + ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر IAA (به‌ترتیب با میانگین ٦/٦٧، ٦/٣٣، ٦/٦٧، ۷، ٥، ۷، ۸/۳۳، ۷/٦٧ میان‌گره) به‌دست آمد. نتایج نشان داد که تعداد برگ و تعداد میان‌گره تحت تأثیر تعداد شاخه قرار گرفتند (جدول ۱). در مطالعه‌ی حاضر، بیشترین تعداد ریشه در محیط کشت شاهد و حاوی ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر IAA (به‌ترتیب با میانگین ۲۰/٦٧ و ۱۷/۳۳) مشاهده شد و با افزایش غلظت Kin از تعداد ریشه‌ها کاسته شد. همچنین بیشترین طول ریشه در محیط کشت شاهد (با میانگین ٤ سانتی‌متر) مشاهده گردید (جدول ۱). همچنین، در این آزمایش کالوس‌زایی در ریزنمونه‌های رأس شاخه گیاه استویا مشاهده شد و بیشترین قطر کالوس در محیط کشت حاوی ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر IAA به‌تنهایی، ۱ میلی‌گرم در لیتر Kin به‌تنهایی و در ترکیب با ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر IAA، ۲ میلی‌گرم در لیتر Kin + ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر IAA (به‌ترتیب با میانگین ۰/۹۷، ۰/۹، ۰/۸۳، ۱، ۰/۸۳ و ۰/۹۲ سانتی‌متر) رخ داد (جدول ۱).

جدول۱- مقایسه میانگین اثرات متقابل Kin (۰، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) و IAA (۰، ۰/۵ ، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) بر صفات موردارزیابی در کشت رأس شاخه استویا

Table 1- Mean comparison for the interaction effects of Kin (0, 1 and 2 mg/l) and IAA (0, 0.5, 1 and 1.5 mg/l) on the evaluated traits in *Stevia* shoot tip culture

تیمار (mg/l)	میانگین						
	تعداد شاخه	طول شاخه	تعداد برگ	تعداد میان‌گره	تعداد ریشه	طول ریشه	قطر کالوس
۰ Kin + ۰ IAA	۱^{d}	٦/٥^{abc}	١٦^{ab}	٦/٣٣^{abc}	٢٠/٦٧^{a}	٤^{a}	۰^{c}
۰ Kin + ۰/۵ IAA	۱^{d}	٥/٥^{cde}	١٠/٦٧^{cd}	٣/٦٧^{d}	٧/٣٣^{cd}	٢/٣٣^{bc}	۰/۰۷^{c}
۰ Kin + ۱ IAA	۲/۳۳^{bc}	٣/٦٧^{fg}	١٨^{a}	٧/٣٣^{ab}	١٣/٦٧^{b}	٢/٦٧^{bc}	۰/٤٣^{b}
۰ Kin + ۱/۵ IAA	۱/٦٧^{cd}	٣/٣٣^{g}	١٢/٦٧^{bc}	٥/٣٣^{bcd}	١٧/٣٣^{a}	٢^{c}	۰/۹۷^{a}
۱ Kin + ۰ IAA	۱/٦٧^{cd}	٦^{bcde}	١٥^{ab}	٦/٦٧^{abc}	٥/٦٧^{cde}	۰/۸۳^{d}	۰/۹^{a}
۱ Kin + ۰/۵ IAA	۲/٦٧^{ab}	٧/١٧^{ab}	١٦^{ab}	٧^{abc}	٨/٦٧^{c}	٣^{b}	۰/٤٢^{b}
۱ Kin + ۱ IAA	۲^{bc}	٦/٦٧^{abc}	١٢^{bc}	٥^{abc}	١/٣٣^{fg}	٣^{b}	۰/۸۳^{a}
۱ Kin + ۱/۵ IAA	۱/٦٧^{cd}	٦/٣٣^{abcd}	٨^{d}	٣/٣٣^{d}	٢^{efg}	٣^{b}	۱^{a}
۲ Kin + ۰ IAA	۱^{d}	٧/٦٥^{a}	١٥/٦٧^{ab}	٧^{abc}	٤/٦٧^{def}	۰/٧٣^{de}	۰/٤^{b}
۲ Kin + ۰/۵ IAA	۳/۳۳^{a}	٤/٦٧^{efg}	١٨/٦٧^{a}	٨/٣٣^{a}	٢/٦٧^{efg}	٢/٦٧^{bc}	۰/٥٨^{b}
۲ Kin + ۱ IAA	۲^{bc}	٥^{def}	١٧/٣٣^{a}	٧/٦٧^{a}	۰^{g}	۰^{e}	۰/۸۳^{a}
۲ Kin + ۱/۵ IAA	۱/٦٧^{cd}	٦/١٧^{bcd}	١٢^{bc}	٥^{bc}	۰^{g}	۰^{e}	۰/۹۲^{a}

میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون اختلاف معنی‌داری از لحاظ آماری ندارند (بر اساس آزمون دانکن).

In each column, numbers followed by the same letter are not significantly different based on Duncan test.

www.SID.ir

Archive of SID

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از آزمایش اول، افزایش غلظت Kin در ترکیب با IAA موجب افزایش تعداد شاخه گردید، آزمایشی طراحی گردید که در آن از غلظت‌های بالاتر Kin در ترکیب با IAA استفاده شد تا تاثیر آن بر پرآوری گیاه استویا مورد بررسی قرار گیرد.

تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که بین ترکیب‌های مختلف Kin و IAA در تمامی صفات به‌جز طول شاخه و قطر کالوس تفاوت معنی‌داری وجود داشت (داده‌ها نشان داده نشده‌اند).

در مطالعه حاضر، بیشترین تعداد شاخه و تعداد میان‌گره (به‌ترتیب با میانگین ۷ ریزشاخه و ۱۶/۶۷ میان‌گره) در محیط کشت حاوی ٤ میلی‌گرم در لیتر Kin در ترکیب با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IAA به‌دست آمد. بیشترین تعداد برگ در محیط کشت حاوی ٤ میلی‌گرم در لیتر Kin در ترکیب با ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر IAA به‌دست آمد (به‌ترتیب با میانگین ۳۵/۳۳ و ۲۹/۳۳ برگ). برگ‌های تولیدشده در این آزمایش بسیار کوچک و میان‌گره‌ها طویل بودند. همچنین در تمامی محیط کشت‌ها، به‌جز محیط کشت حاوی ٤ میلی‌گرم در لیتر Kin به‌همراه ۱ میلی‌گرم در لیتر IAA ریشه‌زایی مشاهده گردید (جدول ۲).

جدول۲- مقایسه میانگین اثرات متقابل Kin (۳ و ٤ میلی‌گرم در لیتر) و IAA (۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) بر صفات موردارزیابی در کشت رأس شاخه استویا

Table 2- Mean comparison for the interaction effects of Kin (3 and 4 mg/l) and IAA (0.5, 1 and 1.5 mg/l) on the evaluated traits in Stevia shoot tip culture

تیمار (mg/l)	میانگین				
	تعداد شاخه	تعداد برگ	تعداد میان‌گره	تعداد ریشه	طول ریشه
۳ Kin + ۰/۵ IAA	٤/۳۳^{c}	۲۸^{b}	۱۳^{b}	۳^{a}	۲/۱۷^{a}
۳ Kin + ۱ IAA	۳/۳۳^{cd}	۲۰^{c}	۹^{c}	۳/۳۳^{a}	۱/۸۳^{a}
۳ Kin + ۱/۵ IAA	۲^{e}	۱٦^{c}	۷^{cd}	۱^{b}	۲/۳۳^{a}
٤ Kin + ۰/۵ IAA	۷^{a}	۳۵/۳۳^{a}	۱٦/٦۷^{a}	۳/٦۷^{a}	۲/۱۷^{a}
٤ Kin + ۱ IAA	۵/٦۷^{b}	۲۹/۳۳^{ab}	۱۳/٦۷^{b}	۰^{b}	۰^{b}
٤ Kin + ۱/۵ IAA	۲/۳۳^{de}	۹/٦۷^{d}	٤/۳۳^{d}	۲/٦۷^{a}	۲/۳۳^{a}

میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون اختلاف معنی‌داری از لحاظ آماری ندارند (بر اساس آزمون دانکن).

In each column, numbers followed by the same letter are not significantly different based on Duncan test.

لازم به ذکر است که تیمار ٤ میلی‌گرم در لیتر Kin + ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IAA که بیشترین تعداد شاخه را تولید کرد مجدداً به‌مدت یک ماه در اتاقک رشد نگهداری شد و تعداد شاخه‌ها از ۷ به ۲۵ شاخه رسید (شکل ۱).

شکل ۱- تأثیر ترکیبات IAA و Kin بر کشت رأس شاخه گیاه استویا. الف) شاخه‌چه‌های ایجادشده در ٤ میلی‌گرم در لیتر Kin + ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IAA یک ماه پس از کشت. ب) شاخه‌چه‌های ایجادشده در ٤ میلی‌گرم در لیتر Kin + ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IAA دو ماه پس از کشت.

Figure 1- The effects of Kin and IAA compounds on *Stevia* shoot tip culture. A) The sootlets produced in 4 mg/l Kin + 0.5 mg/l IAA one month after culture. The sootlets produced in 4 mg/l Kin + 0.5 mg/l IAA two month after culture.

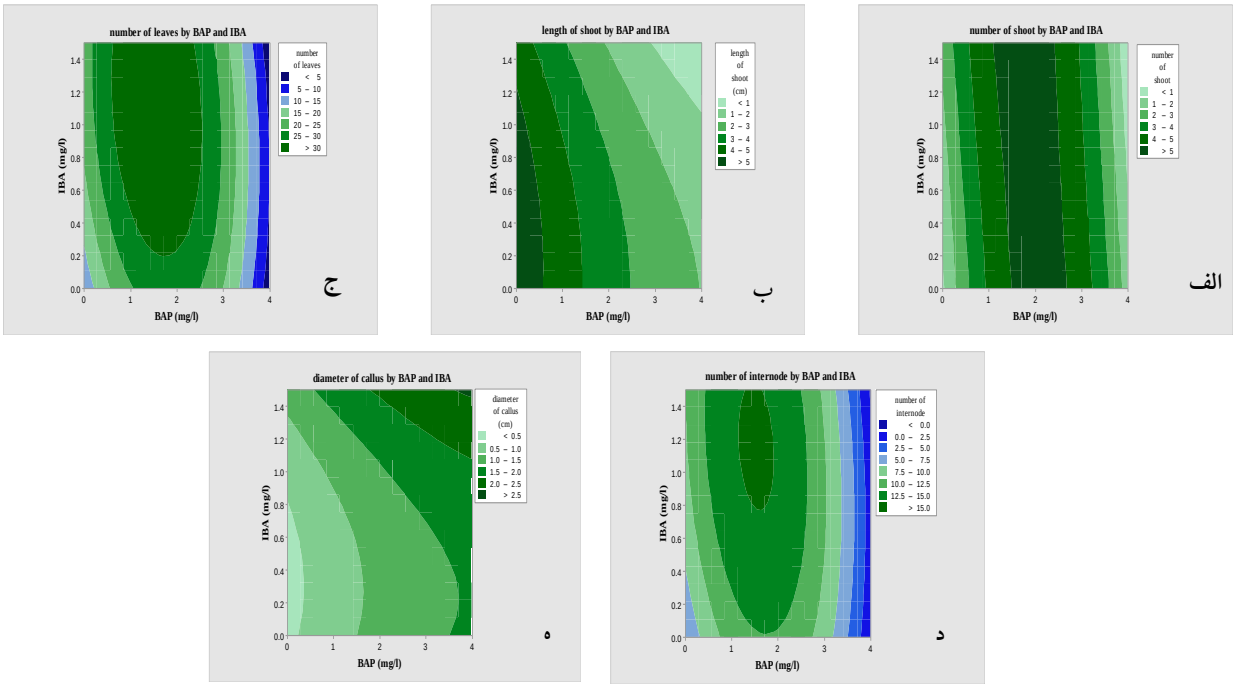
www.SID.ir

Archive of SID

تأثیر BAP و IBA بر پرآوری ریزنمونه‌های رأس شاخه

در تجزیه واریانس داده‌ها، بیشترین تعداد شاخه از محیط کشت حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP + ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP + ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA (به‌ترتیب با میانگین ۹ و ۷/٦۷) به‌دست آمد (جدول ۳). براساس نمودار کنتور در کل بیشترین تعداد شاخه‌ها در محدوده ۱/۵ تا ۲/٦ میلی‌گرم در لیتر BAP + ۰ تا ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA به‌دست آمد و با افزایش غلظت BAP تعداد شاخه‌ها کاهش و کالوس‌زایی افزایش یافت (شکل ۲-الف). همچنین، بیشترین طول شاخه در محیط کشت شاهد و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA (به‌ترتیب با میانگین ٦/۸۳ و ٦/۵ سانتی‌متر) به‌دست آمد. با افزایش BAP طول شاخه‌ها نیز کاهش پیدا کردند. با توجه به نمودار بهترین محیط کشت در طویل‌شدن شاخه‌ها محدوده‌ی ۰ تا ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP + ۰ تا ۱/۲ میلی‌گرم در لیتر IBA بود (شکل ۲-ب). در کل، IBA بر دو صفت تعداد و طول شاخه مؤثر نبود. لازم به ذکر است که تیمارهای دارای بیشترین شاخه‌زایی مجدداً به‌مدت یک ماه دیگر در اتاقک رشد نگهداری شدند و تعداد شاخه‌ها از ۹ و ۷/٦۷ به ۳٦ و ۲۷ شاخه رسید.

بیشترین تعداد برگ نیز در محیط کشت‌های حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP + ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA، ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP + ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA (به‌ترتیب با میانگین ۵۰ و ۵۲/٦۷) مشاهده شد (جدول ۳). برگ‌های تولیدشده در تمامی غلظت‌های تیماری بسیار کوچک بودند. با توجه به نمودار بیشترین تعداد برگ در محدوده ۱ تا ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP + ۰/۲۵ تا ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA به‌دست آمد. به‌عبارت دیگر، غلظت‌های IBA تأثیری بر تعداد برگ نداشت (شکل ۲-ج و ۳-الف).



شکل ۲- اثر متقابل BAP و IBA: الف) اثر متقابل BAP و IBA بر تعداد شاخه؛ ب) اثر متقابل BAP و IBA بر طول شاخه؛ ج) اثر متقابل BAP و IBA بر تعداد برگ؛ د) اثر متقابل BAP و IBA بر تعداد میان‌گره؛ ه) اثر متقابل BAP و IBA بر قطر کالوس.

Figure 2- The interaction effect of BAP and IBA. A) The interaction effect of BAP and IBA on shoot number; B) The Interaction effect of BAP and IBA on shoot length; c) The interaction effect of BAP and IBA on leaf number; D) The interaction effect of BAP and IBA on internode number; E) The interaction effect of BAP and IBA on callus diameter.

www.SID.ir

Archive of SID

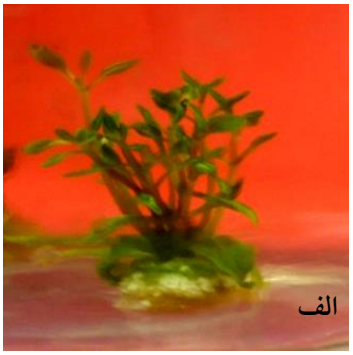
جدول۳- مقایسه میانگین اثرات متقابل BAP و IBA بر صفات موردارزیابی در کشت رأس شاخه استویا

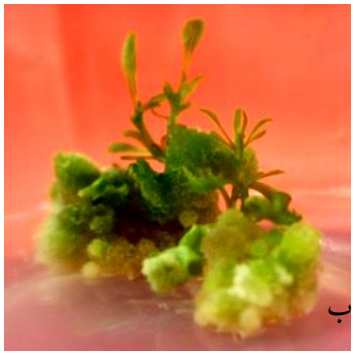
Table 3- Mean comparison for the interaction effects of BAP and IBA on the evaluated traits in *Stevia* shoot tip culture

تیمار (mg/l)	میانگین				
	تعداد شاخه	طول شاخه	تعداد برگ	تعداد میان‌گره	قطر کالوس
۰ BAP + ۰ IBA	۱^{h}	٦/۸۳^{a}	۱۸^{ef}	۸^{e}	۰^{i}
۰ BAP + ۰/۵ IBA	۱^{h}	٦/۵^{a}	۱٦^{ef}	۷^{ef}	۰/۳^{hi}
۰ BAP + ۱ IBA	۱^{h}	٤/۱۷^{cde}	۱۲/٦۷^{ef}	۵/۳۳^{efg}	۱^{efg}
۰ BAP + ۱/۵ IBA	۱^{h}	۳/۵^{def}	۱۲^{ef}	۵^{efg}	۱/۷۳^{bcd}
۱ BAP + ۰ IBA	۳/٦۷^{cde}	۲/۳۳^{gh}	۱٤^{ef}	٦^{efg}	۱/۰۳^{defg}
۱ BAP + ۰/۵ IBA	۷/٦۷^{a}	۵^{bc}	۵۰^{ab}	۲۳/۳۳^{a}	۰/۵^{ghi}
۱ BAP + ۱ IBA	۵/۳۳^{b}	۵/۳۳^{b}	٤٤/٦۷^{b}	۲۰/۳۳^{b}	۰/۸۳^{fgh}
۱ BAP + ۱/۵ IBA	۵^{bc}	٤/۳۳^{cd}	۳۷^{c}	۱٦/۳۳^{c}	۱/۱۷^{cdefg}
۲ BAP + ۰ IBA	۵^{bc}	۲/٦۷^{fg}	۲۵^{d}	۱۱/۳۳^{d}	۱/۷۷^{bc}
۲ BAP + ۰/۵ IBA	٤/٦۷^{bcd}	۳/۳۳^{ef}	۲٦/٦۷^{d}	۱۱^{d}	۱/۰۷^{cdefg}
۲ BAP + ۱ IBA	٤/٦۷^{bcd}	۲/٦۷^{fg}	۲۹/۳۳^{d}	۱۲/٦۷^{d}	۱/۳۳^{cdef}
۲ BAP + ۱/۵ IBA	۹^{a}	۱/۵^{hi}	۵۲/٦۷^{a}	۲٤/۳۳^{a}	۱/٦۷^{bcde}
۳ BAP + ۰ IBA	۳^{efg}	۳/۱۷^{fg}	۱۲^{ef}	۵^{efg}	۱/٦۷^{bcde}
۳ BAP + ۰/۵ IBA	۳/۳۳^{def}	۲/۳۳^{gh}	۱۸/۳۳^{e}	۷/٦۷^{e}	۱/۳^{cdef}
۳ BAP + ۱ IBA	۲/٦۷^{efg}	۱/۵^{hi}	۱۲/٦۷^{ef}	٤/۳۳^{fg}	۲/۳^{ab}
۳ BAP + ۱/۵ IBA	۱/٦۷^{gh}	۱/۱۷^{ij}	۱۲^{ef}	٤^{fg}	۲/۵^{a}
٤ BAP + ۰ IBA	۳^{efg}	۳^{fg}	۱۱/٦۷^{f}	۵^{efg}	۱/۱۷^{cdefg}
٤ BAP + ۰/۵ IBA	۲^{fgh}	۱^{ij}	۱۱/٦۷^{f}	۳/٦۷^{gh}	۱/۲۳^{cdef}
٤ BAP + ۱ IBA	۰/٦۷^{h}	۰/۵۷^{ij}	٤/۲^{g}	۱/۳۳^{hi}	۲/۲۷^{ab}
٤ BAP + ۱/۵ IBA	۰/٦۷^{h}	۰/٤^{j}	۲^{g}	۰/۳۳^{i}	۲/۵۷^{a}

میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون اختلاف معنی‌داری از لحاظ آماری ندارند (بر اساس آزمون دانکن).

In each column, numbers followed by the same letter are not significantly different based on Duncan test.





شکل ۳- تأثیر ترکیبات BAP و IBA بر ریزنمونه‌های رأس شاخه گیاه استویا در محیط کشت MS. الف) شاخه‌چه‌های ایجادشده در ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP + ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA؛ ب) القای کالوس در ٤ میلی‌گرم در لیتر BAP + ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA.

Figure 3- The effects of BAP and IBA compounds on *Stevia* shoot tip explants in MS medium. A) The sootlets produced in 2 mg/l BAP + 1.5 mg/l IBA; B) The induction of callus in 4 mg/l BAP + 1.5 mg/l IBA.

www.SID.ir

Archive of SID

همچنین، بیشترین تعداد میان‌گره نیز در محیط کشت‌های MS غنی‌شده با ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP + ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA، ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP + ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA (به‌ترتیب با میانگین ۲٤/۳۳ و ۲۳/۳۳) مشاهده شد (جدول ۳). همان‌طور که نمودار نشان می‌دهد بیشترین تعداد میان‌گره در محدوده‌ی ۱ تا ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP + ۰/۸ تا ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA مشاهده شد. در این مورد نیز غلظت‌های IBA به‌طور موثر تأثیرگذار نبودند (شکل ۲–د). براساس نتایج حاصل از این آزمایش، تعداد برگ، تعداد میان‌گره و تعداد شاخه با یکدیگر رابطه مستقیمی نشان دادند. به‌عبارت دیگر، تعداد برگ و میان‌گره تحت تأثیر تعداد شاخه قرار گرفتند.

نتایج حاصل از بررسی انجام‌شده نشان داد که در ترکیبات BAP و IBA ریشه‌زایی صورت نمی‌گیرد و ترکیب این دو موجب کالوس-زایی می‌گردد. در این آزمایش، بیشترین میزان کالوس در محیط کشت‌های دارای غلظت ۳ میلی‌گرم در لیتر BAP + ۱ و ۱/۵ میلی-گرم در لیتر IBA و در محیط کشت‌های دارای غلظت ٤ میلی‌گرم در لیتر BAP + ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA (به‌ترتیب با میانگین ۲/۳، ۲/۵، ۲/۲۷ و ۲/۵۷ سانتی‌متر) به‌دست آمد. با افزایش غلظت BAP و IBA قطر کالوس‌ها افزایش پیدا کرد. با افزایش قطر کالوس‌ها، از طول شاخه‌ها کاسته شد.

کالوس‌های ایجادشده کروی، ترد و به رنگ سبز روشن و سفید بودند. نمودار کنتور نشان می‌دهد که بیشترین قطر کالوس در محدوده‌ی ٤ میلی‌گرم در لیتر BAP + ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA به‌دست آمد (شکل ۲–ه). براساس نتایج به‌دست‌آمده قطر کالوس با تعداد و طول شاخه رابطه عکس داشت (شکل‌های ۲–الف، ۲–ب و ۲–ه). به‌نظر می‌رسد دلیل کاهش تعداد و طول شاخه در غلظت-های بالای BAP، افزایش میزان کالوس‌زایی باشد.

ریشه‌زایی

مجاورت هوا قرار گرفتند و سپس به گلدان‌های بزرگتر حاوی پرلایت، پیت موس، خاک زراعی و خاک برگ به نسبت ۲:۲:۱:۱ جدول تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد بین دو محیط کشت برای صفات تعداد ریشه وجود داشت. همچنین، بین غلظت‌های مختلف IBA در صفات تعداد و طول ریشه در سطح احتمال ۱ درصد اختلاف معنی‌داری مشاهده شد. اثر متقابل محیط کشت و IBA نیز برای صفات تعداد و طول ریشه در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود (داده‌ها نشان داده نشده‌اند).

در این آزمایش، در محیط کشت‌های حاوی IBA کالوس‌زایی مشاهده شد. کالوس‌ها پس از گذشت یک هفته از محل برش در قسمت تحتانی شاخساره‌ها پدیدار شدند و ریشه‌ها از کالوس‌ها ایجاد شدند. در این آزمایش با توجه به جدول مقایسه میانگین‌ها (جدول ٤) بیشترین تعداد ریشه در محیط کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA (با میانگین ۵۸/۳۳ ریشه) به‌دست آمد. در هر دو محیط کشت با افزایش IBA تا سطح ۱ میلی‌گرم در لیتر تعداد ریشه‌ها افزایش و پس از آن کاهش یافت. بیشترین طول ریشه نیز در طی این آزمایش در محیط کشت MS $\frac{1}{2}$ فاقد IBA (با میانگین ۵/۳۳ سانتی‌متر) به‌دست آمد (شکل ٤–الف و ٤–ب). همچنین، درصد ریشه‌زایی در محیط کشت MS $\frac{1}{2}$ بیشتر از محیط کشت MS بود (جدول٤).

سازگاری

به‌منظور سازگاری گیاهچه‌های ریشه‌دارشده با شرایط برون شیشه-ای، پس از شست‌وشوی ریشه‌های گیاهچه‌ها و حذف آگار، گیاهچه‌ها به گلدان‌های شفاف پلاستیکی حاوی پرلایت و پیت موس (۱:۲) منتقل شدند. برای حفظ رطوبت، در گلدان‌ها کاملاً با سلفن پوشیده شد و در اتاقک رشد قرار گرفتند. برای ایجاد سازگاری تدریجی، به‌تدریج و به‌مدت دو هفته روی سلفن سوراخ-هایی ایجاد شد و پس از گذشت دو هفته گیاهچه‌ها به‌طور کامل در منتقل شدند و در گلخانه مستقر شدند. میزان زنده‌مانی در گلخانه پس از گذشت یک ماه ۹۲/۸٦ درصد برآورد گردید (شکل ٤–ج).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول٤- مقایسه میانگین اثر IBA بر ریشه‌زایی نوساقه‌ها در محیط کشت MS و $\frac{1}{2}$ MS

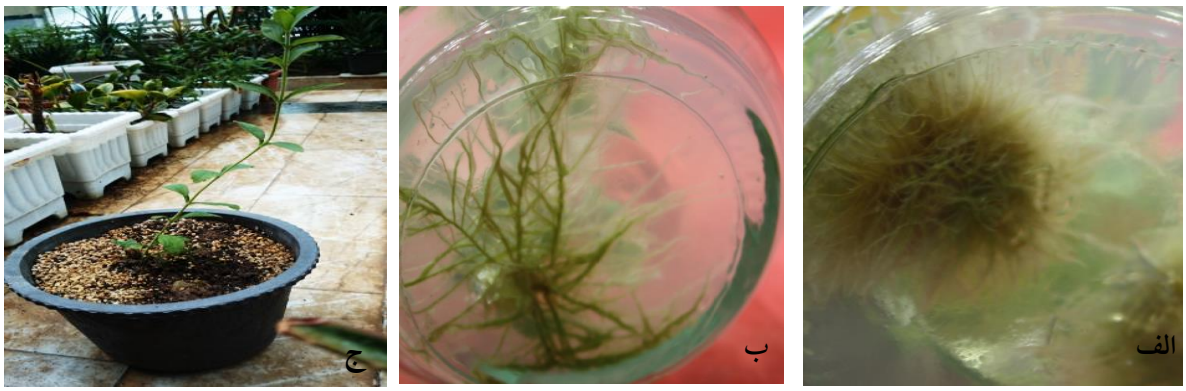
Table 4- Mean comparison for the effects of IBA on shootlet-rooting in full and half strength MS medium

تیمار	میانگین تعداد ریشه	میانگین طول ریشه	میانگین ایجاد کالوس
MS +۰ IBA (mg/l)	۲/٦۷^{d}	۳^{b}	–
MS +۰/ ۵ IBA (mg/l)	۹/۳۳^{cd}	۱/٦٦۷^{c}	+
MS +۱ IBA (mg/l)	۵۸/۳۳^{a}	۱/۳۳^{cd}	+
MS +۱/۵ IBA (mg/l)	٤۱/٦۷^{b}	۲/۸۳۳^{b}	+
$\frac{1}{2}$ MS +۰ IBA (mg/l)	۱۲/۳۳^{c}	۵/۳۳^{a}	–
$\frac{1}{2}$ MS +۰/۵ IBA (mg/l)	۳٦/٦۷^{b}	۱^{cd}	+
$\frac{1}{2}$ MS +۱ IBA (mg/l)	٤۸/۳۳^{b}	۱/٦٦۷^{C}	+
$\frac{1}{2}$ MS +۱/۵ IBA (mg/l)	۲۵^{b}	۰/٦٦۷^{d}	+

میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون اختلاف معنی‌داری از لحاظ آماری ندارند (بر اساس آزمون دانکن).

+ و – به‌ترتیب نشان‌دهنده‌ی ایجاد و عدم ایجاد کالوس می‌باشد.

In each column, numbers followed by the same letter are not significantly different based on Duncan test.
+ And - indicated the callus induction and no callus induction, respectively.



شکل٤- الف) ریشه‌های ایجادشده در محیط کشت $\frac{1}{2}$ MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA؛ ب) ریشه‌های ایجادشده در محیط کشت $\frac{1}{2}$ MS (شاهد)؛ ج) گیاهچه سازگارشده در گلخانه.

Figure 4– A) The roots produced in half strength MS medium supplemented with 1 mg/l IBA; B) The roots produced in half strength MS medium (control); C) Hardened plantlet in the greenhouse.

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که حضور سیتوکنین بر پرآوری ریزنمونه رأس شاخه استویا موثر است. در آزمایش اول ترکیب Kin با IAA باعث افزایش تعداد شاخه شد و همچنین در حضور IAA میانگره‌های طویل‌تری مشاهده شدند. Taiz و Zeiger (2002) بیان کردند که سیتوکینین‌ها رشد جوانه‌های جانبی را افزایش می‌دهند و از غالبیت انتهایی جلوگیری می‌کنند، اما اکسین‌ها از رشد جوانه جانبی ممانعت می‌کنند و از طرفی باعث افزایش رشد طولی ساقه به‌وسیله‌ی تحریک غالبیت انتهایی می‌گردند. مشخص شده که حدود یک ساعت پس از افزودن IAA، سنتز پروتئین‌های لازم برای رشد سلولی آغاز می‌شود. این آغاز سنتز به اثر اکسین بر بیان ژن‌ها نسبت داده شده است. IAA در بافت‌های مختلف، اثرات متفاوتی به‌جا می‌گذارد. برای مثال، IAA در لایه‌ی کامبیوم تقسیم سلولی را تحریک می‌کند و در ساقه، با ممانعت از رشد جوانه‌های جانبی باعث تحریک غالبیت انتهایی می‌گردد (Heldt and Piechulla, 2011). نتایج پژوهش حاضر نشان داد که بهترین محیط کشت برای افزایش پرآوری رأس شاخه استویا حاصل از برهمکنش ترکیب تیماری BAP با IBA بود. مشخص شده است که نقش BAP در شکستن غالبیت انتهایی و تحریک رشد شاخه‌های جدید است (Iapichino and Airo, 2009). به‌طور کلی، نسبت بالای اکسین به سیتوکنین باعث ریشه‌زایی و بالعکس، نسبت بالای سیتوکنین به اکسین باعث شاخه‌زایی می‌گردد (Skoog and Miller, 1957).

به‌طور کلی، در مطالعه‌ی حاضر BAP نسبت به Kin تأثیر بیشتری بر پرآوری رأس شاخه داشت. Thiyagarajan و Venkatachalam (2012) و Razak و همکاران (2014) بیان کردند سیتوکینین BAP در مقایسه با سیتوکینین Kin اثر بیشتری در توسعه جوانه شاخه در ریزنمونه رأس شاخه گیاه استویا دارد. در حقیقت، BAP یک سیتوکینین عمومی برای تکثیر اکثر گیاهان در شرایط درون شیشه‌ای است (Sikdar *et al.*, 2012).

در این پژوهش، بیشترین تعداد ریشه در محیط کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA به‌دست آمد. Razak و همکاران (۲۰۱٤) نیز بیان کردند بیشترین تعداد ریشه در ریزشاخه‌های به‌دست‌آمده از قلمه‌های تک‌گره گیاه استویا در محیط کشت MS غنی‌شده با ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA مشاهده شد. Hwang (2006) اظهار کرد استفاده از غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر تنظیم‌کننده‌ی رشد IBA منجر به القای بیشترین تعداد ریشه در گیاه *Stevia rebaudiana* می‌گردد. Tadhani و همکاران (2007) نیز گزارش کردند در گیاه *Stevia rebaudiana* بیشترین میزان القای ریشه در محیط کشت MS غنی-شده با ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA به‌دست آمد که با نتایج این آزمایش همخوانی داشت. بنابراین می‌توان محیط کشت MS غنی‌شده با غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA را به‌عنوان بهترین محیط جهت ریشه‌زایی گیاه استویا معرفی کرد.

منابع

Abd Alhady MRA. 2011. Micropropagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni—a new sweetening crop in Egypt. Global Journal of Biotechnology and Biochemistry 6(4): 178-182.

Bondarev N, Reshetnyak O, Nosov A. 2002. Features of development of *Stevia rebaudiana* shoots cultivated in the roller bioreactor and their production of steviol glycosides. Planta Medica 68(08): 759-762.

Bondarev NI, Nosov AM, Kornienko AV. 1998. Effects of exogenous growth regulators on callusogenesis and growth of cultured cells of *Stevia rebaudiana* Bertoni. Russian Journal of Plant Physiology 45(6): 770-774.

Ferreira CM, Handro W. 1988. Micropropagation of *Stevia rebaudiana* through leaf explants from adult plants. Planta Medica 54(02): 157-160.

Handro W, Hell KG, Kerbauy GB. 1977. Tissue culture of *Stevia rebaudiana*, a sweetening plant. Planta Medica 32(06): 115-117.

Heldt HW, Piechulla B. 2011. Plant biochemistry. 4rd edn. Academic Press, London, UK, 622p.

Hwang SJ. 2006. Rapid *in vitro* propagation and enhanced stevioside accumulation in *Stevia rebaudiana* Bert. Journal of Plant Biology 49(4): 267-270.

Iapichino G, Airò M. 2009. Multiplication of *Crataegus monogyna* by *in vitro* culture of nodal segments. Acta Horticulturae 812: 135-140.

www.SID.ir

Archive of SID

Jahan MT, Islam MR, Mamun PRA, Islam MA. 2014. *In vitro* clonal propagation of *stevia rebaudiana* bertoni through node and shoot tip culture. Nuclear Science and Applications 23: 1.61-65.

Jain P, Kachhwaha S, Kothari SL. 2009. Improved micropropagation protocol and enhancement in biomass and chlorophyll content in *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni by using high copper levels in the culture medium. Scientia Horticulturae 119(3): 315-319.

Kalpana M, Anbazhagan M, Natarajan V. 2009. Utilization of liquid medium for rapid micropropagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni. Journal of Ecobiotechnology 1(1): 16-20.

Lailerd N, Saengsirisuwan V, Sloniger JA, Toskulkao C, Henriksen EJ. 2004. Effects of stevioside on glucose transport activity in insulin-sensitive and insulin-resistant rat skeletal muscle. Metabolism 53(1): 101-107.

Mirniam A, Roshandel P, Otroshi M, Ebrahimi M. 2013. A novel protocol for *Stevia rebaudiana* Bert regeneration. Journal Advanced Laboratory Research in Biology 1: 15-22.

Mitra A, Pal A. 2007. *In vitro* regeneration of *Stevia rebaudiana* (Bert) from the nodal explant. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology 16(1): 59-62.

Miyagawa H, Fujioka N, Kohda H, Yamasaki K, Taniguchi K. 1986. Studies on the tissue culture of Stevia rebaudiana and its components (IInd) Induction of shoot primordia. Planta Medica 45:321–322.

Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Plant Physiology 15 (3): 473–497.

Nakamura S, Tamura Y. 1985. Variation in the main glycosides of Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni). Japanese Journal of Tropical Agriculture 29(2): 109-115.

Patil V, Reddy PC, Purushotham MG, Prasad TG, Udayakumar M. 1996. *In vitro* multiplication of Stevia rebaudiana. Current Science 70(11): 960.

Rathore S, Yadav K, Singh N, Singh SK. 2014. Comparative study on callus induction, proliferation and plantlets regeneration in two cultivars of *Stevia rebaudiana* Bertoni-the only non caloric natural sweetener. Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science 37(4): 499-508.

Razak UNAA, Ong CB, Yu TS, Lau LK. 2014. *In vitro* micropropagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni in Malaysia. Brazilian Archives of Biology and Technology 57(1): 23-28.

Sakaguchi M, Kan T. 1982. As pesquisas japonesas com *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni eo esteviosideo. (Japanese researches on *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni and stevioside.). Ciencia E Cultura 34(2): 235-248.

Sikdar SU, Zobayer N, Azim F, Ashrafuzzaman M, Prodhan SH. 2012. An efficient callus initiation and direct regeneration of *Stevia rebaudiana*. African Journal of Biotechnology 11(45): 10381-10387.

Singh N, Yadav K, Kumari S. 2011. Metabolic changes during differentiation in callus cultures of *Stevia rebaudiana* (Bertoni). Journal of Phytology 3(3): 63-67.

Singh P, Dwivedi P. 2014. Two-stage culture procedure using thidiazuron for efficient micropropagation of *Stevia rebaudiana*, an anti-diabetic medicinal herb. 3 Biotech 4(4): 431-437.

Singh SD, Rao GP. 2005. Stevia: the herbal sugar of 21st century. Sugar Tech 7:17-24.

Sivaram L, Mukundan U. 2003. *In vitro* culture studies on *Stevia rebaudiana*. *In Vitro* Cellular and Developmental Biology-Plant 39(5): 520-523.

Skoog F, Miller CO. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. Symposia of the Society for Experimental Biology 54: 118-130.

Tadhani MB, Patel VH, Subhash R. 2007. *In vitro* antioxidant activities of *Stevia rebaudiana* leaves and callus. Journal of Food Composition and Analysis 20(3): 323-329.

Taiz L, Zeiger E. 2002. Plant Physiology. Sinauer Associates, Sunderland, 623p.

Tamura Y, Nakamura S, Fukui H, Tabata M. 1984. Clonal propagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni by stem-tip culture. Plant Cell Reports 3(5): 183-185.

Thiyagarajan M, Venkatachalam P. 2012. Large scale *in vitro* propagation of *Stevia rebaudiana* (bert) for commercial application: Pharmaceutically important and antidiabetic medicinal herb. Industrial Crops and Products 37(1): 111-117.

Verma S, Yadav K, Singh N. 2011. Optimization of the protocols for surface sterilization, regeneration and acclimatization of *Stevia rebaudiana* Bertoni. American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences 11: 221-227.

Yadav AK, Singh S, Dhyani D, Ahuja PS. 2011. A review on the improvement of stevia [*Stevia rebaudiana* (Bertoni)]. Canadian Journal of Plant Science 91(1): 1-27.

Yamazaki T, Flores HE, Shimomura K, Yoshihira K. 1991. Examination of steviol glucosides production by hairy root and shoot cultures of *Stevia rebaudiana*. Journal of Natural Products 54(4): 986-992.

Yasukawa K, Kitanaka S, Seo S. 2002. Inhibitory effect of stevioside on tumor promotion by 12-O-

www.SID.ir

Archive of SID

tetradecanoylphorbol-13-acetate in two-stage carcinogenesis in mouse skin. Biological and Pharmaceutical Bulletin 25(11): 1488-1490.

Yücesan B, Büyükgöçmen R, Mohammed A, Sameeullah M, Altuğ C, Gürel S, Gürel E. 2016. An efficient regeneration system and steviol glycoside analysis of *Stevia rebaudiana*. *In Vitro* Cellular & Developmental Biology-Plant 52(3): 330-337.

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 6, Number 2

Micropropagation *Stevia* Medicinal Plant (*Stevia rebaudiana*) Using Proliferation of Shoot Tip

Mahsa Zarei1, Sara Dezhsetan2*, Mahdi Behnamian3

1- M.Sc. of plant breeding, 2- Associte Professor, Department of Agronomy & Plant Breeding, 3- Assistant Professor, Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Iran

*Email corresponding author: sdezhsetan@uma.ac.ir

Abstract

Stevia rebaudiana is a medicinally important plant, free-calorie with sweet test and beneficial for diabetic patient. In order to optimization of the micropropagation of this plant, three experiments were conducted by factorial experiment based on completely randomized design (CRD) with three replications. Shoot tip explants were cultured on MS media supplemented with Kin (0, 1 & 2 mg/l) + IAA (0, 0.5, 1 & 1.5 mg/l) (test 1), Kin (3 & 4 mg/l) with IAA (0.5, 1 & 1.5 mg/l) (test 2) and BAP (0, 1, 2, 3 & 4 mg/l) + IBA (0, 0.5, 1 & 1.5 mg/l) (test 3). The shoot number increased with increasing concentrations of Kin in media and in second experiment, the highest shoot number was produced in MS medium supplemented with 4 mg/l Kin + 0.5 mg/l IAA (with an average of 7 shoots per explant). However, the best result of micropropagation was obtained from MS medium containing 2 mg/l BAP + 1.5 mg/l IBA in test 3 (ith an average of 9 shoots per explant). Also, increasing BAP concentrations from 2 mg/l resulted to a significant reduction in shoot number and shoot length and quality of plantlets as well as increase in callusing. In addition, shoot number was dramatically increased by incubation the cultured explants in culture room for two months. The maximum rooting of developed shootlets was achieved from MS medium supplemented with1 mg/l IBA. The rooted plantlets were hardened in culture room and with high successfully established in soil.

Keywords: Hardening, Micropropagation, Plant growth regulators, Stevia, Shoot-tip

www.SID.ir