

اثر عوامل مختلف بر رویان‌زایی بدنی گیاه استویا (*Stevia rebaudiana* Bertoni)

صغری رضایی گنججه^۱، مریم دهستانی اردکانی^۲ و کاظم کمالی علی‌آباد^{۳*}

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه اردکان، اردکان، ایران

۲- استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه اردکان و پژوهشکده گیاهان دارویی و صنعتی، اردکان، ایران

۳- نویسنده و مسئول مکاتبات، استادیار، گروه علوم خاک‌شناسی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه یزد، یزد، ایران

پست الکترونیکی: kkamali@yazd.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۴/۱۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۰/۲۹

چکیده

گیاه استویا (*Stevia rebaudiana* Bertoni) به علت محتوای بالای شیرین‌کننده‌های طبیعی قابل استحصال دارای ارزش فوق‌العاده بالایی است. با توجه به اهمیت گیاه از نظر صنعتی و به‌ویژه دارویی، این پژوهش به منظور بهینه‌سازی جنین‌زایی بدنی گیاه انجام شد. تولید و القای کالوس رویان‌زا با استفاده از ترکیبات مختلف تنظیم‌کننده‌های رشدی شامل بنزیل آدنین (BA)، نفتالین استیک اسید (NAA) و ۲ و ۴-دی-کلروفوکسی استیک اسید (2,4-D) در ریزنمونه‌های برگ و جوانه گیاه در محیط کشت MS به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در پنج تکرار بررسی شد. بیشترین میزان کالوس‌زایی در محیط کشت حاوی ۰/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر BA + ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D و بیشترین میزان رویان‌زایی در تیمار ۰/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر BA + ۱ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D حاصل شد. همچنین اثر کازئین هیدرولیزات در پنج سطح (۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) و شیر نارگیل در دو سطح (صفر و ۵۵ میلی‌لیتر) بر رویان‌زایی گیاه استویا توسط دو ریزنمونه برگ و جوانه در آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با شش تکرار بررسی شد. در غلظت‌های صفر و ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر کازئین هیدرولیزات به ترتیب بیشترین (۲۰/۲ درصد) و کمترین (۷/۸۴ درصد) رویان‌زایی حاصل شد. بیشترین درصد رویان‌زایی (۷۸/۸۲ درصد) در محیط کشت MS بدون شیر نارگیل توسط ریزنمونه‌های جوانه و کمترین درصد رویان‌زایی با ۲۵/۰۹ درصد توسط ریزنمونه‌های برگ به دست آمد. پس از آن رویان‌های حاصل به محیط کشت حاوی ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر GA₃ (اسید جیبرلیک) برای اندام‌زایی انتقال یافتند و در این بین ۱۸/۰۳ درصد از رویان‌ها به گیاهچه کامل تبدیل شدند.

واژه‌های کلیدی: بنزیل آدنین، زغال فعال، شیر نارگیل، کازئین هیدرولیزات، کشت بافت

مقدمه

دیابت از تیره Asteraceae می‌باشد که شیرینی آن ۳۰۰ برابر بیشتر از شکر تخمین زده شده است (Aggarwal et al., 2011; Altaf et al., 2013). این گیاه با ارزش در حال حاضر به عنوان منبع قندی کم کالری و بدون ساکارز می‌باشد و می‌تواند جایگزین مناسبی برای شیرین‌کننده‌های مصنوعی مانند آسپارتام، ساخارین و سیکلامات باشد، بدون آنکه اثرهای

دیابت یکی از شایع‌ترین بیماری‌های جوامع بشری است. بنابراین استفاده از شیرین‌کننده‌های طبیعی به‌ویژه اگر افراد مبتلا به دیابت نیز بتوانند از آنها استفاده کنند، اهمیت زیادی پیدا نموده‌اند. در این میان استویا با نام علمی *Stevia rebaudiana* Bertoni یک گیاه علفی شیرین مزه و ضد

اساس نتایج آنها، بیشترین کالوس‌های سبز رنگ و کروی شکل رویان‌زا در محیط کشت حاوی ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر گلوتامین و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کازئین هیدرولیزات تشکیل شد.

طی آزمایشی Naranjo و همکاران (۲۰۱۵)، به بررسی اثر ترکیبات مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد مختلف بر القاء و توسعه رویان‌های بدنی سه ژنوتیپ استویا (Morita, Bertoni II و SRQ-93) در محیط کشت MS حاوی مکمل‌های محیط کشت شامل آدنین، شیره نارگیل و گلوتامین پرداختند. با توجه به نتایج به دست آمده بیشترین تعداد رویان‌های بدنی در هر ریزنمونه در ترکیب ۱۸/۹ میکرومولار 2,4-D و ۷/۸۳ میکرومولار ۲-ایزوپنتیل آدنین (2ip) مشاهده شد. ژنوتیپ، اثر قابل توجهی بر تولید رویان نشان داد، به طوری که بیشترین میزان شکل‌گیری و توسعه رویان‌های بدنی در ژنوتیپ 93-SRQ حاصل شد.

به منظور بررسی ویژگی‌های القاء کالوس در گیاه استویا، Keshvari (۲۰۱۶) از تیمار هورمونی در ۱۰ سطح به همراه شاهد، دو نوع محیط کشت (MS و B5) و دو نوع ریزنمونه (برگ و میانگره) استفاده کرد. نتایج او نشان داد که بهترین تیمار برای درصد القای کالوس و همچنین برای رسیدن به کالوس در کمترین زمان، ترکیب ۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP + ۲ میلی‌گرم بر لیتر NAA و برای بالاترین وزن تر و خشک کالوس، محیط کشت گامبورگ (B5) همراه با ترکیبات ۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP + ۲ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D در قطعات برگ و برای میانگره، ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP + ۰/۲۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D به دست آمد.

با توجه به اهمیت تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی و نیز عوامل دیگر مانند کازئین هیدرولیزات، شیره نارگیل و نوع ریزنمونه بر رویان‌زایی بدنی، در این پژوهش به بررسی این عوامل برای بهینه‌سازی رویان‌زایی گیاه استویا پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: به منظور بررسی رویان‌زایی بدنی گیاه استویا، ابتدا اقدام به باززایی مستقیم گیاه در شرایط درون شیشه‌ای

ناشی از سوء مصرف این شیرین‌کننده‌ها را به همراه داشته باشد (Babber et al., 2001). در آینده نزدیک، استویا می‌تواند به عنوان یک منبع شیرین‌کننده قوی جایگزین شکر مصرفی مردم شود (Din et al., 2006). دو گلیکوزید اصلی این گیاه، استویوزید (Stevioside) و ربادیوزید (Rebadioside) است که به ترتیب ۵ تا ۱۰ درصد و ۲ تا ۴ درصد از وزن خشک برگ‌ها را شامل می‌شوند و این دو شیرین‌ترین ترکیبات گیاه استویا هستند (Sekaran et al., 2007).

رویان‌زایی بدنی روش جدیدی برای تولید انبوه گیاهان در محیط کشت درون‌شیشه است که با القاء توانایی تولید رویان در سلول‌های بدنی منجر به تولید گیاه کامل می‌شود (Gram et al., 1996). رویان‌زایی بدنی قابلیت بالایی برای ریزازدیادی در مقیاس وسیع به ویژه برای گیاهان چوبی و گیاهان دارای چرخه تولیدمثل خاص (همانند ارکیدها) دارد، همچنین سیستمی بسیار کارآمد برای باززایی گیاهان در مهندسی ژنتیک و ایجاد گیاهان تراریخت محسوب می‌شود (Piri Zirkouhi et al., 2009). باززایی گیاهان، ایجاد تنوع رویشی یا همسانی بدنی، بررسی پدیده گزینش درون‌شیشه‌ای و فراهم‌سازی بستری برای تراریختی گیاهان و انتقال ژن‌های کنترل‌کننده ویژگی‌های مطلوب در گیاهان، از سودمندی عملی رویان‌زایی بدنی به شمار می‌آید. تولید بذرها، مصنوعی با شرایط مطلوب، بدون آلودگی‌های ویروسی، قارچی و باکتریایی و حفظ دقیق ذخائر توارثی (ژنوم پلاسما) گیاهان از برتری‌های دیگر رویان‌های بدنی می‌باشد (Moradi et al., 2017).

برای توسعه و رشد کالوس‌های رویان‌زا روی ریزنمونه‌های برگ *Stevia rebaudiana* از آمینواسیدهای تریتوفان و گلوتامین در غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر و عصاره مخمر، کازئین هیدرولیزات و عصاره سیب‌زمینی به میزان ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر در محیط کشت MS (Murashige & Skoog, 1962) حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D، ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آمینوپوین (BAP) و ۳۰ گرم بر لیتر ساکارز استفاده شد (Das & Mandal, 2010). بر

و pH محیط‌های کشت برای ایجاد کالوس رویان‌زا روی ۵/۸- ۵/۷ تنظیم شد. پس از تنظیم pH، ۷/۵ گرم در لیتر دیفکوباکتو آگار به آن افزوده شد. سپس ۳۰ میلی‌لیتر محیط کشت، به داخل شیشه‌های مربایی (ارتفاع ۱۰ سانتی‌متر و قطر ۶ سانتی‌متر) ریخته شد. پس از اتوکلاو محیط‌های کشت در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و با فشار ۱/۲ اتمسفر به مدت ۱۴ دقیقه نمونه‌های گیاهی به شیشه‌های مربا منتقل شده و به مدت ۶ روز در تاریکی نگهداری گردیدند، سپس به اتاقک رشد (در شرایط شدت نور ۲۰۰۰ تا ۲۵۰۰ لوکس در ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و درجه حرارت در دوره تاریکی ۱۸ و در دوره روشنایی ۲۵ تا ۲۶ درجه سانتی‌گراد) منتقل شدند (Pand & Khetmalas, 2012). تیمارهای مورد استفاده برای ایجاد کالوس رویان‌زا به شرح جدول ۱ بودند.

شد و بعد نمونه‌های رشد کرده در لوله آزمایش به عنوان ریزنمونه برای رویان‌زایی انتخاب شدند. زمانی که گیاهچه‌ها کاملاً از نظر رشد طولی و تعداد برگ به اندازه کافی رشد کردند، از آنها برای تهیه ریزنمونه استفاده شد. ریزنمونه‌های استفاده شده برای رویان‌زایی بدنی شامل برگ‌ها و جوانه‌های جانبی گیاه استویا بودند. برای کشت ریزنمونه‌های برگ‌ها، برگ‌ها را از انتهای دم‌برگ جدا نموده و به تعداد سه عدد و ریزنمونه‌های جوانه به طول ۱۰ تا ۱۵ میلی‌متر به تعداد ۴ عدد، داخل محیط کشت قرار داده شدند.

آزمایش اول

محیط و شرایط کشت: در تمام تیمارهای مورد آزمایش، محیط کشت مورد استفاده برای القای کالوس رویان‌زا، محیط کشت MS بود. پس از تهیه محیط کشت ۳۰ گرم در لیتر آگار افزوده

جدول ۱- تیمارهای مورد استفاده برای ایجاد کالوس رویان‌زا در آزمایش اول

تیمارها													ترکیبات
T13	T12	T11	T10	T9	T8	T7	T6	T5	T4	T3	T2	T1	
MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	محیط کشت
-	-	-	۲/۵	۲/۵	۰/۵	۱	۲/۵	۲	۱/۵	۱	۰/۵	۲	2,4-D(mg ^l ⁻¹)
۲	۱	۱	۱	۱	-	۰/۵	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	-	BA(mg ^l ⁻¹)
۱	۲	۱	-	-	۰/۵	۰/۵	-	-	-	-	-	-	NAA(mg ^l ⁻¹)
-	-	-	۱۶۵۰	-	-	-	-	-	-	-	-	-	آمونوم نیترات (mg ^l ⁻¹)

تبدیل شده و برای ادامه روند رشد و برای تبدیل شدن به یک گیاهچه کامل باید مراحل کروی، قلبی شکل و دوکی شکل را طی کنند. به همین دلیل کالوس‌های کروی شکل، بلافاصله به محیط کشت MS بدون تنظیم‌کننده رشد با میزان ۳۰ گرم بر لیتر ساکارز، ۷ گرم بر لیتر آگار و با pH برابر ۵/۷ انتقال داده شدند.

آزمایش دوم

بررسی اثر کازئین هیدرولیزات، شیر نارگیل، نوع ریزنمونه و محیط کشت بر تولید کالوس و رویان‌زایی گیاه استویا: برای بررسی تأثیر کازئین هیدرولیزات و شیر نارگیل در تولید کالوس‌های رویان‌زا، آزمایشی به صورت فاکتوریل

در مرحله القای کالوس رویان‌زا، از تنظیم‌کننده‌های رشد مختلف استفاده شد. آزمایش‌های مرحله رویان‌زایی بدنی نیز به صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی با پنج تکرار انجام شد که شامل ۱۳ تیمار (جدول ۱) با دو ریزنمونه (برگ و جوانه) گیاه استویا بود.

واکشت کالوس‌های رویان‌زا به محیط بدون هورمون: پس از کشت و نگهداری نمونه‌ها در شرایط مناسب برای ایجاد کالوس، واکشت نمونه‌های کالوس‌زده پس از پنج هفته انجام شد. ساختار کالوس‌های ایجاد شده به صورت پفکی، اسفنجی نرم به رنگ سبز بود. انگیزه لازم برای تبدیل به رویان در کالوس‌ها ایجاد شده بود. کالوس‌ها کاملاً به شکل کروی شکل

درصد القای کالوس و جوانه زنی رویان‌ها بود.

تحلیل آماری و تجزیه داده‌ها آزمایش‌ها به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. داده‌های به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.2 آنالیز شد و اختلاف میانگین‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن با سطح اطمینان ۹۵ درصد مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند.

نتایج

آزمایش اول

مرحله کالوس‌زایی: نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثرهای اصلی تیمار و نوع بافت بر درصد کالوس‌زایی در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. در حالی‌که اثر متقابل تیمار × نوع بافت بر درصد کالوس‌زایی اختلاف معنی‌دار نشان نداد (جدول ۲). این نتایج نشان داد که القای کالوس تحت تأثیر تیمارهای محیط کشت و نوع ریزنمونه قرار گرفته است. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر اصلی تیمار بر القای رویان در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار بود. در حالی‌که اثر اصلی نوع ریزنمونه و اثر متقابل تیمار × نوع ریزنمونه بر القای رویان اختلاف معنی‌داری نشان نداد (جدول ۲).

در قالب طرح کاملاً تصادفی شامل دو بافت متفاوت (برگ و جوانه) گیاه استویا، چهار غلظت کازئین هیدرولیزات (صفر، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر)، دو سطح شیر نارگیل (صفر و ۵۵ میلی‌لیتر بر لیتر) و دو نوع محیط کشت، در شش تکرار انجام شد. برای القای جنین‌زایی در این آزمایش، ریزنمونه‌ها ابتدا در محیط کشت پایه MS حاوی ۰/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر BA + ۱ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D کشت شدند و پس از دو هفته به محیط کشت جدید انتقال یافتند و اثر سطوح مختلف کازئین هیدرولیزات (صفر، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) و نیز شیر نارگیل (صفر و ۵۵ میلی‌لیتر بر لیتر)، ریزنمونه (برگ و جوانه) و محیط کشت بر رویان‌زایی مورد بررسی قرار گرفت.

دو نوع محیط کشت مورد استفاده، به شرح زیر بودند.

۱- محیط کشت MS + ۰/۰۵ میلی‌گرم بر لیتر BA

۲- محیط کشت MS + ویتامین‌های B5 (۲ میلی‌گرم بر

لیتر گلایسین + ۱ میلی‌گرم بر لیتر نیکوتینیک اسید + ۱۰

میلی‌گرم بر لیتر تیمامین + ۱ میلی‌گرم بر لیتر پیریدوکسین) +

۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر میواینوزیتول + ۰/۰۵ میلی‌گرم بر لیتر

BA + ۱ گرم بر لیتر زغال فعال.

رویان‌های تولید شده پس از هشت هفته به محیط کشت

MS حاوی ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر جیبرلیک اسید برای اندام-

زایی منتقل شدند. صفات مورد ارزیابی شامل اندازه‌گیری

جدول ۲- تجزیه واریانس عوامل مورد مطالعه بر درصد کالوس‌زایی و رویان‌زایی گیاه استویا

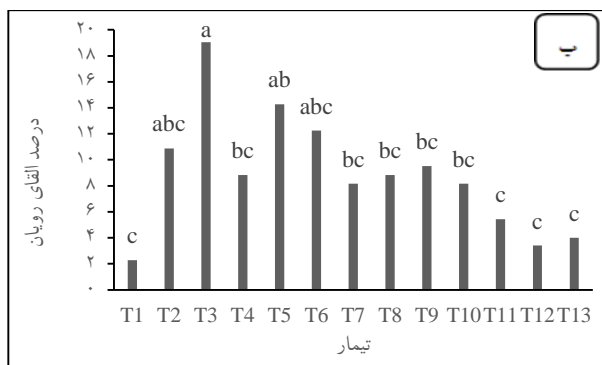
MS		درجه آزادی	منابع تغییرات
درصد رویان‌زایی	درصد کالوس‌زایی		
۵/۴۳*	۴/۴۰**	۱۲	تیمار
۰/۰۳ ^{ns}	۲۲/۴۳**	۱	نوع ریزنمونه
۲/۱۸ ^{ns}	۳/۲۱ ^{ns}	۱۲	تیمار × ریزنمونه
۲/۵۱۵	۱/۷۵۳	۱۰۴	خطای آزمایشی

ns: بدون اختلاف معنی‌دار، ** و * به ترتیب دارای اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد

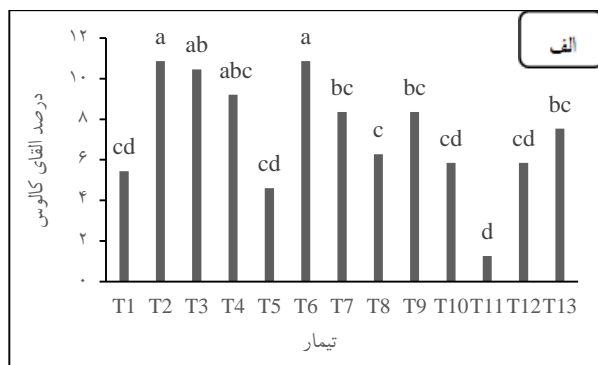
و تیمار ۶ (۰/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر BA + ۲/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D) دارای بیشترین درصد القای کالوس (۱۰/۸۷)

نتایج مقایسه میانگین بین تیمارها نشان داد که تیمار ۲ (۰/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر BA + ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D)

(D) با ۲/۲۷ درصد کمترین درصد رویان را تشکیل داد (شکل ۱-ب) (شکل ۴-ب). نتایج مقایسه میانگین نوع بافت ریزنمونه‌ها نشان داد که بافت برگ با میزان ۶۱/۵ درصد در مقایسه با ریزنمونه جوانه جانبی (۳۸/۴ درصد) دارای بیشترین میزان القای کالوس بود (شکل ۲).



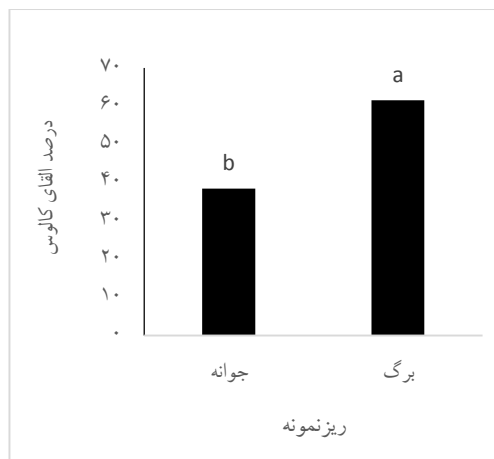
درصد) بودند (شکل ۱-الف) (شکل ۴-ب). همچنین تیمار ۱۱ (۱ میلی‌گرم بر لیتر BA + ۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA) دارای کمترین درصد القای کالوس (۱/۲۵ درصد) بود (شکل ۱-الف). نتایج مقایسه میانگین بین تیمارها نشان داد که تیمار ۳ (۰/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر BA + ۱ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D) با ۱۹/۰۴ درصد بیشترین درصد رویان را تولید کرد (شکل ۱-ب) (شکل ۴-الف). همچنین تیمار ۱ (۲ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-



شکل ۱- مقایسه میانگین اثر نوع تیمارها بر درصد القای کالوس و (ب) رویان (نام و مشخصات تیمارهای سیزده‌گانه در جدول ۱ آمده است) ستون‌های دارای حروف مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح یک درصد می‌باشد.

آزمایش دوم

اثر کازئین هیدرولیزات و شیر نارگیل به محیط کشت بر رویان‌زایی ریزنمونه‌های گیاه استویا نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثرهای اصلی کازئین هیدرولیزات، محیط کشت و ریزنمونه در سطح احتمال یک درصد بر رویان‌زایی گیاه استویا معنی‌دار بود (جدول ۳). همچنین اثر متقابل محیط کشت و ریزنمونه و اثر سه‌گانه شیر نارگیل × محیط کشت × ریزنمونه در سطح احتمال پنج درصد بر میزان رویان‌زایی معنی‌دار بود (جدول ۳). اثر متقابل چهارگانه معنی‌دار نبود. این نتایج نشان می‌دهد که رویان‌زایی به‌شدت تحت تأثیر کازئین هیدرولیزات، نوع ریزنمونه و محیط کشت می‌باشد (جدول ۳).



شکل ۲- مقایسه میانگین اثر نوع بافت بر درصد القای کالوس ستون‌های دارای حروف غیرمشابه دارای اختلاف معنی‌دار در سطح یک درصد می‌باشد.

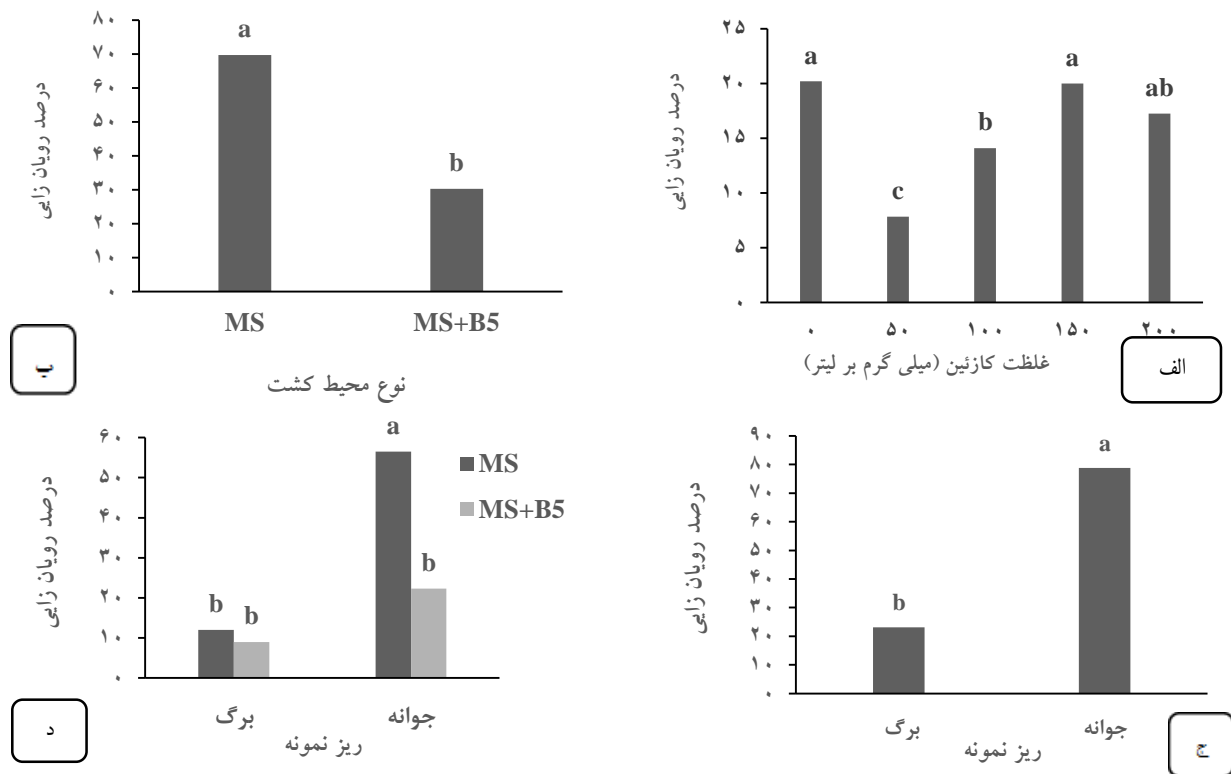
جدول ۳- تجزیه واریانس عوامل مورد مطالعه بر رویان زایی گیاه استویا

منابع تغییرات	درجه آزادی (df)	میانگین مربعات (MS)
کازئین هیدرولیزات	۴	۱/۹۹**
شیره نارگیل	۱	۰/۳۶ ns
محیط کشت	۱	۳/۹۱**
ریزنمونه	۱	۷/۸۵**
کازئین هیدرولیزات × شیره نارگیل	۴	۰/۲۳ ns
کازئین هیدرولیزات × محیط کشت	۴	۰/۷۰ ns
کازئین هیدرولیزات × ریزنمونه	۴	۰/۳۴ ns
شیره نارگیل × محیط کشت	۱	۰/۹۱ ns
شیره نارگیل × ریزنمونه	۱	۰/۰۰۶ ns
محیط کشت × ریزنمونه	۱	۱/۶۵ ns
کازئین هیدرولیزات × شیره نارگیل × محیط کشت	۴	۰/۰۴ ns
کازئین هیدرولیزات × شیره نارگیل × ریزنمونه	۴	۰/۱۴ ns
کازئین هیدرولیزات × محیط کشت × ریزنمونه	۴	۰/۱۶ ns
شیره نارگیل × محیط کشت × ریزنمونه	۱	۲/۲۳**
کازئین هیدرولیزات × شیره نارگیل × محیط کشت × ریزنمونه	۴	۰/۲۴ ns
کشت × ریزنمونه		
خطای آزمایشی	۳۶	۰/۳۴۶
خطای کل	۷۵	

ns = بدون اختلاف معنی دار، **: دارای اختلاف معنی دار در سطح ۱ درصد، *: دارای اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد

علاوه ویتامین‌های B₅ و زغال فعال با مقدار ۶۹/۶۸ درصد، رویان‌زایی بیشتری انجام شده بود (شکل ۳-ب). نتایج مقایسه میانگین دو نوع ریزنمونه نشان داد که بافت جوانه با مقدار ۷۸/۸۲ درصد رویان‌زایی نسبت به بافت برگ (با ۲۳/۱۰ درصد رویان‌زایی) برتری داشت (شکل ۳-ج). نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل محیط کشت و ریزنمونه نشان داد که ریزنمونه‌های جوانه در محیط کشت MS بدون ویتامین‌های B₅ بیشترین میزان رویان (۵۶/۴۷ درصد) را تولید کرده است (شکل ۳-د). سایر اثرهای متقابل ریزنمونه‌ها و محیط‌های کشت تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نشان ندادند (شکل ۳-د).

نتایج مقایسه میانگین غلظت‌های کازئین هیدرولیزات نشان داد که در غلظت ۰ و ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر به ترتیب بیشترین (۲۰/۲ درصد) و کمترین (۷/۸۴ درصد) رویان‌زایی حاصل شد (شکل ۳-الف). شکل ۴-د رویان‌های کروی شکل در محیط کشت حاوی کازئین هیدرولیزات را نشان می‌دهد. غلظت‌های ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کازئین هیدرولیزات از نظر آماری اختلاف معنی‌داری بر رویان‌زایی گیاه استویا نشان ندادند (شکل ۳-الف). نتایج مقایسه میانگین بین دو محیط کشت نشان داد که در محیط کشت MS حاوی ۰/۰۵ میلی‌گرم بر لیتر BA نسبت به محیط کشت MS به



شکل ۳- مقایسه میانگین الف) غلظت‌های مختلف کازئین هیدرولیزات، ب) نوع محیط کشت، ج) نوع ریزنمونه و د) اثر متقابل ریزنمونه و محیط کشت بر درصد رویان‌زایی گیاه استویا (ستون‌های دارای حروف غیرمشابه اختلاف معنی‌داری در سطح یک درصد دارند).

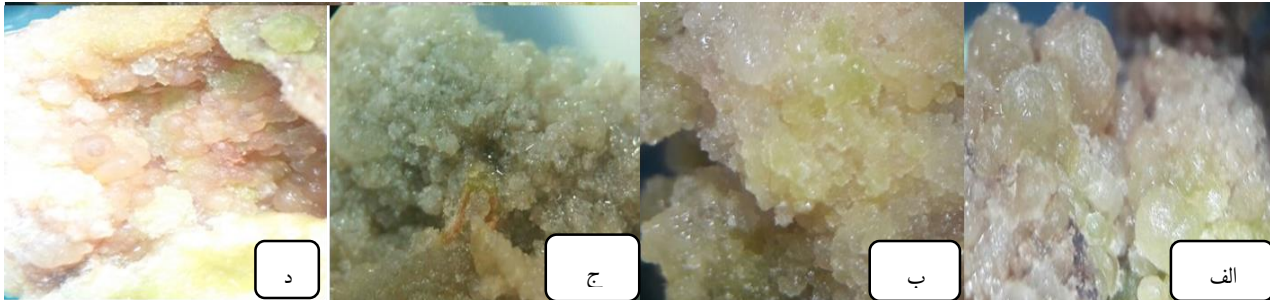
جدول ۴- مقایسه میانگین اثر سه گانه شیر نارگیل، محیط کشت و ریزنمونه بر درصد رویان‌زایی گیاه استویا

درصد رویان‌زایی	ریزنمونه	محیط کشت	شیره نارگیل
۱۳/۲bc	برگ	MS	شاهد (صفر)
۴۲/۳۵a	جوانه		
۵/۴۹cd	برگ	MS+B5	
۵/۸۸cd	جوانه		
۵/۹۶cd	برگ	MS	۵۵ میلی‌لیتر
۱۶/۸۶b	جوانه		
۰/۳۹d	برگ	MS+B5	
۱۳/۳bc	جوانه		

ستون‌های دارای حروف غیرمشابه اختلاف معنی‌داری در سطح یک درصد دارند.

میزان رویان‌زایی (۰/۳۹ درصد) زمانی حاصل شد که از ریزنمونه برگ در محیط کشت MS + ویتامین‌های B₅ همراه با ۵۵ میلی‌لیتر شیره نارگیل استفاده گردید (جدول ۳).

نتایج مقایسه میانگین اثر سه‌گانه شیره نارگیل × محیط کشت × ریزنمونه نشان داد که استفاده از ریزنمونه جوانه در محیط کشت MS فاقد شیره نارگیل بیشترین میزان رویان‌زایی (۴۲/۳۵ درصد) را نشان داد (جدول ۴). همچنین کمترین



شکل ۴- واكشت كالوس‌های رویان‌زا و غیررویان‌زا: الف) كالوس كروی شكل، ب) كالوس كروی در محیط حاوی تنظیم‌کننده رشد، ج) كالوس‌های غیررویان‌زا، د) كالوس‌های كروی در محیط کشت حاوی کازئین هیدرولیزات

میلی‌گرم بر لیتر) میزان كالوس‌های حاصل شده کاهش یافت و كالوس‌های حاصل شده نسبت به كالوس‌های دیگر تیمارها، دارای بافت سخت‌تری بوده و از میزان فشردگی آنها کاسته شد و بهترین كالوس‌های رویان‌زا توسط ۰/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر BA به دست آمد. در تیماری که فقط 2,4-D به مقدار ۲/۵ میلی‌گرم بر لیتر استفاده شده بود و محیط بدون سیتوکینین بود كالوس‌های تشکیل شده پس از پنج هفته، دارای رنگ قهوه‌ای روشن بودند و پس از انتقال به محیط کشت بدون تنظیم‌کننده-های رشد، در تعداد بسیار کمی مراحل تغییر كالوس تا اندام-زایی طی شد. نتایج به دست آمده با نتایج Pand و Khetmalas (۲۰۱۲) مغایرت داشت. از این رو می‌توان گفت که پاسخ متفاوت ریزنمونه برگ گیاه استویا در ایجاد كالوس-زایی در مقایسه با ریزنمونه جوانه آزمایش شده در این پژوهش ممکن است در نتیجه وضعیت غشای سلولی در این اندام باشد. بنابراین سلول‌های برگگی دارای قابلیت‌های بیشتری در مورد 2,4-D برای تبدیل شدن به كالوس‌های رویان‌زا می‌باشند. نتایج حاصل با نتایج Bagheri و همکاران (۲۰۱۴) مطابقت داشت.

در میان عواملی که به طور مستقیم در تنظیم مراحل مختلف رویان‌زایی شرکت می‌کنند تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی

بحث

بیشترین میزان كالوس‌زایی در دو تیمار T₂ و T₆ (۰/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر BA + ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D و ۰/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر BA + ۲/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D) به دست آمد که وجه مشترک آنها تنظیم‌کننده رشد گیاهی BA و 2,4-D بود که می‌تواند اثبات‌کننده کارایی خوب این تنظیم-کننده‌ها در فرایند كالوس‌زایی باشد. در واقع 2,4-D به عنوان یک اکسین مصنوعی در کشت بافت و نگهداری كالوس حاصل از کشت بافت مفید می‌باشد (Kumar, 1999). در این پژوهش بیشترین میزان كالوس‌ها در محیط‌های کشت حاوی 2,4-D مشاهده شد و NAA تأثیر چندانی بر القاء كالوس نداشت. این نتایج با نتایج Banerjee و Sarkar (۲۰۱۰) مطابقت داشت. آنان تیمار حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D با ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP با میزان ۹۶ درصد كالوس‌زایی را بهترین تیمار برای القای كالوس در نظر گرفتند و وجود 2,4-D را برای القای كالوس مؤثر دانستند. در این پژوهش نیز مشخص شد که حضور 2,4-D و BA در کنار یکدیگر سبب تشکیل با کیفیت‌ترین كالوس‌های گلوبولار (کروی) و رویان‌زا گردید (شکل ۴-الف). نکته قابل توجه اینکه در تیمارهایی که مقادیر سیتوکینین بالاتری به کار رفته بود (۰/۵، ۱ و ۲

نیازمندند (Pola & Srada, 2006). سیتوکنین معمولاً به محیط دارای اکسین افزوده می‌شود. در واقع این هورمون مسئول تنظیم سنتز پروتئین‌هاست که طی تشکیل دوک سلولی در زمان میتوز دخیل است.

وجود کازئین هیدرولیزات بر رویان‌زایی تأثیر مثبتی نشان داد. در کل نتایج نشان داد که وجود کازئین هیدرولیزات نسبت به شیر نارگیل در رویان‌زایی مؤثرتر بود. در کنار ضرورت استفاده از اکسین، اهمیت حضور شکل‌های مختلف نیتروژن در ترکیب محیط‌های کشت برای القای رویان‌زایی بدنی نیز از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (Inocente *et al.*, 2007). این در حالی است که شکل‌های مختلف نیتروژن (سایر مواد نیتروژن‌دار مانند اسیدهای آمینه) بر رویان‌زایی اثر دارد که این نتایج مطابق نتایج حاصل شده است. در کازئین هیدرولیزات اسیدهای آمینه لازم برای رویان‌زایی مانند گلوتامین، پرولین، آلانین، سرین و گلیسین وجود دارد. اسیدهای آمینه پرولین و سرین از طریق افزایش میزان هورمون‌های داخلی باعث افزایش فعالیت‌های میتوزی سلول‌ها شده و به این وسیله تشکیل توده‌های سلولی پیش‌رویان‌زا را افزایش می‌دهند (Nutironchi *et al.*, 1984). طی بررسی‌هایی که توسط Sanjabi (۲۰۱۶)، برای بررسی القای رویان‌های بدنی اولیه از جداکشت برگ نارون ملج (*Ulmus glabra*) روی محیط کشت MS حاوی سیتوکنین‌های مختلف و اکسین 2,4-D به همراه غلظت ثابت ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کازئین هیدرولیزات انجام شد، نتایج نشان داد که وجود کازئین هیدرولیزات در رویان‌زایی و میانگین تعداد رویان اثر مثبتی دارد که این نتایج با نتایج حاصل از این پژوهش مطابقت دارد. اسیدآمینه‌های آلی موجود در کازئین هیدرولیزات می‌توانند جایگزین مناسبی برای آمونیوم معدنی و مکمل نیترات باشند. همچنین جذب نیتروژن از طریق یک منبع آلی مثل کازئین هیدرولیزات بسیار آسان‌تر و سریع‌تر از منابع غیرآلی است (Thom *et al.*, 1981).

بر اساس نتایج اگرچه هر دو ریزنمونه تحت تأثیر ترکیبات محیط کشت یکسان تولید رویان نمودند، اما نوع ریزنمونه در

مهمترین نقش را دارند. در بیش از ۸۰ درصد از ۱۲۴ پروتکل اخیر منتشر شده با القاء رویان‌های بدنی در حضور اکسین به تنهایی و یا در ترکیب با سیتوکنین‌ها گزارش شده است (Gaj, 2004). در میان اکسین‌ها بیشترین گزارش‌های تولید رویان مربوط به هورمون 2,4-D بوده است. بعد از 2,4-D هورمون‌های IAA, IBA و NAA قرار دارند. در این تحقیق با توجه به نتایج حاصل از مقایسه میانگین تیمارها بیشترین میزان رویان‌زایی در محیط کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D در ترکیب با ۰/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر BA با میزان ۱۹/۰۴ درصد بیشترین رویان و کمترین میزان رویان در تیمار حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D با میزان ۲/۲۷ درصد به‌دست آمد (شکل ۱-ب). نتایج به‌دست آمده با نتایج Gopi و Rosemary (۲۰۱۴)، حاصل از آزمایش رویان‌زایی بدنی گیاه *Coleus forskohlii* مطابقت داشت. آنان بهترین محیط کشت برای رویان‌زایی را ترکیب ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D به همراه ۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP معرفی کردند، طبق نتایج بیان کردند که 2,4-D در محیط کشت به‌عنوان یک عامل تنش‌زا مطرح بوده و می‌تواند باعث شروع برخی از فرایندهای مربوط به تشکیل سلول‌های پیش‌رویان شود. اگرچه هنوز نقش واقعی 2,4-D در انگیزه سلول‌های رویانی مشخص نشده است، اما پیشنهاد شده است که 2,4-D با متیله کردن مولکول DNA، الگوی بیان ژن سلول‌های گیاه را به الگوی بیان رویان‌زایی تغییر می‌دهد و آنها را به سلول‌های رویانی تبدیل می‌کند (Loschiavo *et al.*, 1989). با توجه به نتایج آزمایش، اکسین NAA تأثیر چندانی بر ایجاد رویان‌زایی بدنی نداشت. این نتایج مطابق با نتایج به‌دست آمده از آزمایش‌های Musavizadeh و همکاران (۲۰۱۰) بود. نتایج این مطالعه نشان داد که تشکیل رویان‌های بدنی تنها تحت تأثیر اکسین قرار ندارد. حضور مقادیر مختلف BA نیز در کنار مقادیر مختلف اکسین‌های 2,4-D و NAA باعث تشکیل رویان‌های بدنی شد. حضور مقدار کم سیتوکنین BA (۰/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر) به همراه 2,4-D حداکثر تولید رویان‌های بدنی را داشت. سلول‌ها به هورمون‌های گیاهی به‌ویژه اکسین‌ها و سیتوکنین‌ها برای فعال شدن سلول‌های بدنی و ورود به چرخه سلولی

- of *arbuscular mycorrhizal* (AM) fungi on survival and development of micropropagated *Acorus calamus* L. during acclimatization. International Journal of Agricultural Technology, 7(3): 775-781.
- Altaf, T., Amin, S., Singh, S. and Kaloo, Z.A. 2013. Micropropagation of medicinally important plant species of family asteraceae- a review. International Journal of Recent Scientific Research, 4 (8): 1296-1303.
- Babber, S., Mittal, K., Ahlawat, R. and Varghese, T. 2001. Micropropagation of *Cardiospermum halicacabum*. Biologia Plantarum, 44: 603-606.
- Bagheri, A., Moshiri, F. and Khosravinia, S. 2014. Investigation on reaction of explants and plant growth regulators on callus induction, rooting and *in vitro* regeneration of *Bunium persicum* (Boiss.) B. Fedtsch. Crop Biotechnology, 3(5): 53-61.
- Banerjee, M. and Sarkar, P. 2010. Somatic embryogenesis in (*stevia rebaudiana* Bertoni) using different concentration of grow hormones. International journal of plant sciences, (5)1: 284- 289.
- Das, A. and Mandal, N. 2010. Enhanced Development of Embryogenic Callus in (*Stevia rebaudiana* Bertoni). Biotechnology, 9(3): 368-372.
- Din, M.S.U., Chowdhury, M.M.H. and Khan M.B.U. 2006. *In vitro* propagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni in Bangladesh. African Journal of Biotechnology, 5: 1238-1240.
- Gaj, M.D. 2004. Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to (*Arabidopsis thaliana* L.) Heynh. Plant Growth Regulation, 43: 27-47.
- Gatica, M. A., Arrieta, G. and Espinoza, A. M. 2008. Direct somatic embryogenesis in (*coffea arabica* L.) cvs. Caturra and catua: effect of triacontanol, light condition, and medium consistency. Agronomía Costarricense, 32 (1): 139-147.
- Gopi, C. and Rosemary, M.D. 2014. *In vitro* Plant Regeneration through Somatic Embryogenesis in Medicinally Important leaf explants of *Coleus forskohlii* Briq. Journal of Agriculture and Veterinary Science, 7 (9): 20-23.
- Gram, T., Mattson, O. and Joerson, M. 1996. Division frequently of pea protoplast in relation to starch accumulation. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 45: 3. 179-187.
- Inocente, G.C.C., Vesco, L.L.D., Steinmacher, D., Torres, A.C. and Guerra, M.P. 2007. Improvements in somatic embryogenesis protocol in Feijoa (*Acca sellowian* (Berg) Burret): Induction, conversion and synthetic seeds. Scientia Horticulture, 111: 228-234.
- Keshvari, T. 2016. Improvement of Somatic embryogenesis in medicinal plant of *Stevia*. Ms.c
- تشکیل تعداد رویان تأثیرگذار بود، به طوری که تعداد رویان- های کروی تشکیل شده در ریزنمونه جوانه استویا بیشتر بود. این بررسی مشخص نمود که عامل ریزنمونه و محیط کشت در القا رویان زایی رویشی نقش مهمی را ایفا می کنند و قسمت های مختلف ریزنمونه از لحاظ توان و استعداد رویان- زایی بدنی متفاوت هستند. نتایج به دست آمده با نتایج Naranjo و همکاران (۲۰۱۵) مطابقت داشت. Gatica و همکاران (۲۰۰۸) نیز قطعات برگ قهوه (*Coffea arabica* L.) را به عنوان اندام مناسب رویان زایی بدنی معرفی کردند. در محیط کشت حاوی زغال فعال میزان رویان های تولیدی کمتر بود و اثر منفی زغال فعال با هورمون BA مشاهده شد. این می تواند ناشی از آن باشد که زغال فعال علاوه بر محصولات اکسیداسیونی فنلی، باعث جذب برخی از ترکیبات تنظیم کننده های رشد نیز بشود که برای رشد ضروری هستند و این می تواند یک ویژگی منفی برای آن به شمار آید (Marks & Simpson, 1990). همچنین زغال فعال، ویتامین های تیامین و اسید نیکوتینیک را از محیط حذف کرده (Weatherhead *et al.*, 1979) و با افزودن زغال فعال به محیط کشت، pH محیط بعد از اتوکلاو کاهش یافته و باعث کم شدن قدرت ژله ای شدن آگار موجود در محیط کشت می- گردد (Monteuuis & Bon, 1985). هر چند با کاهش ژله ای شدن جذب سریع تر انجام می شود ولی به لحاظ افزایش آب بیشتر در محیط، تنفس افزایش یافته و از این طریق واکنش- های بازدارندگی رشد ظاهر می شود. بنابراین محیط کشت حاوی زغال فعال با جذب بنزیل آدنین و ویتامین های موجود در محیط کشت مانع از القا رویان زایی گیاه استویا شد و اثر منفی بر رویان زایی بدنی استویا را نشان داد.

سپاسگزاری

از همه افرادی که برای رسیدن این مقاله به مرحله چاپ کمک نمودند، قدردانی می گردد.

منابع مورد استفاده:

- Aggarwal, A., Singh, N. and Yadav, K. 2011. Influence

- Nutironchi, V., Caligo, M.A., Nozzolini, M. and Luccarini, G. 1984. Stimulation of carrot somatic embryogenesis by proline and serine. *Plant Cell Reports*, 3: 210-214.
- Pand, S. and Khetmalas, M. 2012. Effect of concentration of sucrose on callus induction & Somatic embryogenesis of anti-diabetic plant: *stevia rebaudiana*. *Asian Journal of biochemical and pharmaceutical research*, 1(2): 27- 31.
- Piri Zirkouhi, M., Mashayekhi, K., Kamkar, B., Hemmati, Kh. and Vahdatpour, F. 2009. Embryogenesis of a commercial and a native tomato cultivar using different culture media, *Journal of Plant Production Research*, 16(1): 101-114. (In Persian)
- Pola, S.R. and Srada, M.N. 2006. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration in (*Sorghum bicolor* L.) Moench, from leaf segments. *Journal of Cell & Molecular Biology*, 5: 99- 107.
- Sanjabi, M. 2016. Induction of direct somatic embryogenesis in leaf explants of *Ulmus glabra*. *Journal of Plant Researches*, 28(4): 885-894.
- Sekaran, T., Giridhar, P., Ravishankar, G.A. 2007. Production of steviosides in *ex vitro* and *in vitro* grown *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Journal of Science Food & Agriculture*, 87: 420-424.
- Thom, M., Marezki, A., Komor, E. and Sakai, W.S. 1981. Nutrient uptake and accumulation by sugarcane cell cultures in relation to the growth cycle, *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 1: 3-14.
- Weatherhead, M., Burdon, J. and Henshaw, G. 1979. Effects of activated charcoal as an additive to plant tissue culture media: Part 2. *Z Pflanzenphysiol*, 94: 399-405.
- thesis in Razi university. (In Persian).
- Kumar, U.K. 1999. *Methods in plants tissue culture*. Agrobios. pp. 139- 147, India.
- Loschiavo, F., Pitto, L., Giuliano, G., Torti, G., Nutironchi, V., Marazziti, D., Vergara, R., Orselli, S. and Terzi, M. 1989. DNA methylation of embryogenic carrot cell culture and its variation as caused by mutation differentiation hormones and hypomethylating, *Theory Apply Genetic*, 77: 325-331.
- Marks, T. and Simpson, S. 1990. Reduced phenolic oxidation at culture initiation *in vitro* following the exposure of field-grown stock plants to darkness or low levels of irradiance. *Journal of Horticultural Science*, 65: 103-111.
- Monteuis, O. and Bon, M.C. 1985. Microbuturage dusequoia geant. *Ann Rech Sylvicoles, AFOCEL*, Pp: 49-87.
- Moradi, S., Azimi, M., Pourdad S.S and Habibi, F. 2017. Direct somatic embryogenesis from immature embryos of sunflower hybrids. *Iranian Journal of Field Crop Science*, 47(4): 701-707. DOI: 10.22059/ijfcs.2017.126609.653888. (In Persian).
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3): 473-497.
- Musavizadeh, S.J., Mashayekhi, K., Hemmati, Kh. and Kamkar, B. 2010. Evaluation of media elements and materials on petiole somatic embryogenesis of Carrot (*Daucus carota* L.). *Journal of Plant Production*, 17(1): 1-21. (In Persian).
- Naranjo, J.E., Fernandez-Betin, O., Urrea-Trujillo, A.J., Callejas- Posada, R. and Atehortua-Garces, L. 2015. Effect of genotype on the *in vitro* regeneration of (*Stevia rebaudiana*) via somatic embryogenesis. *Acta biologica Colombiana Journal*, 21(1):87-98.

The effect of different factors on somatic embryogenesis of stevia plant (*Stevia rebaudiana* Bertoni.)

S. Rezaii Gangeh¹, M. Dehestani-Ardakani², K. Kamali Aliabad^{3*}

1- M.Sc. student, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture & Natural Resources, Ardakan University, Ardakan, I.R. Iran.

2- Assist. Prof., Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture & Natural Resources and Medicinal and Industrial Plants Institute, Ardakan University, Ardakan, I.R. Iran.

3- Corresponding Author, Assist. Prof., Department of Soil Science, Faculty of Agriculture & Natural Resources, Yazd University, Yazd, I.R. Iran. Email: kkamali@yazd.ac.ir

Received: 04.07.2018

Accepted: 19.01.2019

Abstract

Stevia plant (*Stevia rebaudiana* Bertoni.) is an important plant species due to its high content of recoverable natural sweeteners. Considering the industrial and medical importance of plant, the current study was performed with the aim of optimizing somatic embryogenic of this plant. Embryogenic callus induction and embryogenesis were investigated using different concentrations of Benzyl Adenine (BA), Naphthalene Acetic Acid (NAA) and 2,4-Dihydrophenoxy acetic acid (2,4-D) in leaf and bud explants in MS culture medium in a factorial experiment based on completely randomized design (CRD) with five replications. The highest callus induction was obtained in culture media contained 0.01 mg/l (BA + 0.5 mg/l 2, 4-D) and the highest embryo induction was obtained in 0.01 mg/l BA + 1 mg/l⁻¹ 2, 4-D treatment. Also the effect of Casein hydrolysate on the embryogenesis of the *Stevia* plant were investigated in five concentrations (0, 50, 100, 150 and 200 mg/l⁻¹) and coconut milk in two levels (0 and 55 ml) by both explants of leaf and bud in a factorial experiment based on CRD with six replications. In concentrations of 0 and 50 mg/l of Casein hydrolysate respectively obtained the highest (20.2%) and lowest (7.84%) embryos. The percentages of embryogenesis in MS medium without coconut milk was 78.82% for bud explants and 25.09% for leaf explants, and finally, embryos were transferred to medium containing 0.1 mg/l⁻¹ of GA₃ for organogenesis, and 18.03% of the embryos were grown to complete seedling.

Keywords: Benzyl-adenin, Activated charcoal, Coconut milk, Casein hydrolysate, Tissue culture