فنآوری تولیدات گیاهی/ جلد هیجدهم/ شمارهٔ اول/ بهار و تابستان ۹۷
DOI: 10.22084/ppt.2018.6579.1380

اثر نوع ریزنمونه و ترکیبات مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی روی باززایی مستقیم و غیرمستقیم گیاه استویا (*Stevia rebaudiana*) در شرایط درون‌شیشه‌ای

Effects of Explant Type and Plant Growth Regulator Combinations on *In Vitro* Direct and Indirect Regeneration of *Stevia rebaudiana*

ولی‌اله قاسمی عمران[۱*]، مهدی موحدی[۲]، فاطمه علیزاده[۳]، لیلا خلوتی[۴] و دل‌نیا پوراحمدی[۵]

تاریخ دریافت: ۹۴/۱۲/۰۷ تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۰/۲۵

چکیده

Stevia rebaudiana گیاهی دارویی متعلق به خانواده Asteraceae می‌باشد. این تحقیق به‌منظور بهینه‌سازی کالوس‌زایی و ساقه‌زایی این گیاه در شرایط درون‌شیشه‌ای صورت پذیرفت. ریزنمونه‌های برگ، نوک ساقه، گره با دو برگ و گره بدون برگ از گیاهچه‌های استریل رشد یافته در محیط درون‌شیشه‌ای جداسازی شده و در شرایط استریل به محیط‌کشت‌های حاوی هورمون‌های شامل BAP (۰/۱، ۰/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) به تنهایی یا در ترکیب با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA و TDZ (۰/۱، ۰/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) به‌تنهایی یا در ترکیب با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA و محیط‌کشت MS بدون هورمون کشت شدند. از میان ریزنمونه‌ها، ریزنمونه برگ بالاترین درصد کال‌زایی را داشته و در کل ریزنمونه‌ها بالاترین حجم کالوس تولید شده مربوط به بافت برگ در تیمار ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر TDZ بود. بیش‌ترین تعداد ساقه تولید شده از ریزنمونه‌ها در بافت گره بدون برگ، در تیمار ۲ میلی‌گرم در لیتر BA به‌همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA مشاهده شد. بیش‌ترین طول ساقه مربوط به بافت نوک ساقه در تیمار ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BA به‌همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA و کم‌ترین میزان آن نیز در همین بافت و در تیمار ۲ میلی‌گرم در لیتر TDZ به همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA به‌دست آمد. باززایی غیرمستقیم تنها در بافت برگ در تیمار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر TDZ به‌همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA مشاهده شد. بالاترین میزان ریشه‌زایی با کشت ساقه‌های باززایی شده روی محیط‌کشت MS حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA به‌دست آمد.

واژه‌های کلیدی: ریزازدیادی، کالوس، کشت بافت، هورمون گیاهی

۱. استادیار، پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران
۲. دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد، گروه اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم تحقیقات، تهران، ایران
۳ و ۴. به‌ترتیب دانش‌آموختگان کارشناسی‌ارشد و کارشناسی، گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران
۵. دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد، گروه اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران
*: نویسنده مسئول Email: ghasemiomran@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

استویا گیاهی کوتاه قد، چندساله و بوته‌ای می‌باشد که بومی منطقه کوهستانی آمامبی (Amambi) واقع در مرز برزیل و پاراگوئه است (*سوجارتو*[1] و همکاران، 1992). استفاده از برگ‌های گیاه استویا توسط بومیان منطقه آمامبی به بیش از ۱۵۰۰ سال قبل باز می‌گردد (*براندل* و *روزا*[2]، 1992). این گیاه به‌عنوان گیاه زراعی از موطن اصلی خود به کشورهایی نظیر برزیل، کره، مکزیک، ایالات متحده آمریکا، اندونزی، تانزانیا و کانادا معرفی شده است. *کوری و اشلی*[3] (2008) گزارش کردند که فراوان‌ترین گونه‌های این گیاه عبارتند از: ربادیانا (Rebaudiana)، پیلوسا (Pilosa)، اپاتوریا (Eapatoria)، اواتور (Ovatora)، پلامر (Plummera)، سالی سیفوریا (Salicforia) و سراتا (Serata). *جارسلو*[4] و همکاران (2007) بیان کردند که گلیکوزیدهای دیترپنی (Diterpenoid Glycoside) ترکیباتی می‌باشند که به‌عنوان عامل اصلی ایجاد طعم بسیار شیرین در عصاره‌های گیاه استویا شناخته شده‌اند. به‌طوری‌که میزان شیرینی آن‌ها تا ۳۰۰ برابر شکر تخمین زده شده است. *میزوتانی* و *تاناکا*[5] (2002) گزارش نمودند که عصاره خالص شده برگ‌های استویا به‌عنوان شیرین‌کننده‌های کم کالری در مواد غذایی فرآوری شده، مواد غذایی رژیمی و دارویی در ژاپن، برزیل، چین و کره به‌صورت قانونی مورد استفاده قرار می‌گیرند. این عصاره‌ها برای بیماران دیابتی توصیه شده و به‌طور وسیعی روی حیوانات آزمایش شده و در انسان بدون عوارض جانبی مورداستفاده قرار گرفته است (*جورج* و *شرینگتون*[6]، 1984). روش مناسب جایگزین جهت فراهم نمودن میزان کافی از گیاه در طول بازه زمانی کوتاه استفاده از کشت درون‌شیشه‌ای می‌باشد. ریزازدیادی گیاهان با استفاده از ریزنمونه‌های نوک ساقه یا جوانه جانبی امکان تولید نتاج پایدار از لحاظ ژنتیکی را فراهم می‌نماید. *پاتل*[7] و همکاران (2008) جهت ریزازدیادی گیاه استویا از تکنیک کشت کالوس در ریزنمونه‌های گره و قطعات برگی استفاده نمودند. بیش‌ترین میزان کالوس روی محیط‌کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA تولید شد. بیش‌ترین میزان باززایی ساقه از کالوس روی محیط‌کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA مشاهده شد. گیاهچه‌های باززایی شده بهترین ریشه‌زایی را در محیط‌کشت ۱/۴MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA داشتند. *جیتندرا*[8] و همکاران (2012) بر روی ریزازدیادی گیاه استویا از طریق ریزنمونه‌های گره ساقه با استفاده از تکثیر ساقه جانبی مطالعه نمودند. محیط‌کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP به‌همراه ۲ میلی‌گرم در لیتر Kin بیش‌ترین ساقه را در ریزنمونه گره تولید نمود. بیش‌ترین میزان ریشه‌زایی در محیط‌کشت MS حاوی یک میلی‌گرم در لیتر هورمون IBA به‌دست آمد. *لریبی*[9] و همکاران (2012) تکثیر درون شیشه‌ای استویا را با استفاده از ریزنمونه‌های گره‌ای گیاهان بالغ روی محیط‌کشت MS حاوی یک میلی‌گرم در لیتر BAP یا IBA به تنهایی یا به‌صورت ترکیبی انجام دادند. *عبدالرزاق*[10] و همکاران (2014) تحقیق مشابهی را با استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشدی BAP و Kin جهت ساقه‌زایی گیاه استویا در شرایط درون شیشه‌ای انجام دادند. *احمد*[11] و همکاران (2016) از کشت ریزنمونه‌های نوک ساقه حاوی جوانه‌های جانبی بر روی محیط MS حاوی غلظت‌های مختلف BA، Kin و TDZ جهت ریزازدیادی استویا استفاده نمود. جهت کالوس‌زایی *شرما*[12] و همکاران (2015) از ریزنمونه‌های برگی و محیط‌کشت MS حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و یک میلی‌گرم در لیتر 2,4-D استفاده نمودند.

تاکنون تحقیق جامعی مبنی بر استفاده از ریزنمونه‌های مختلف تحت تیمارهای مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد پرکاربرد صورت نگرفته است. لذا این تحقیق با هدف بهینه‌سازی ریزازدیادی گیاه استویا با استفاده از ریزنمونه‌های مختلف و ترکیبات مختلف هورمون‌های TDZ و BA به‌همراه IBA صورت پذیرفته است.

مواد و روش‌ها

این آزمایش به‌صورت آزمایشگاهی در سال ۹۲-۹۳ در پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری طبرستان در دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی ساری به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار و چهار ریزنمونه در هر تکرار انجام شد. در این تحقیق از محیط‌کشت پایه موراشی-اسکوک (1962) حاوی مقادیر مختلفی از هورمون های اکسین و سیتوکنین استفاده شد. ریزنمونه‌ها از گیاهچه‌های استریل

1. Soejarto
2. Brandle and Rosa
3. Curry and Ashley
4. Jaroslov
5. Mizutani and Tanaka
6. George and Sherrington
7. Patel
8. Jitendra
9. Laribi
10. Abdul Razak
11. Ahmed
12. Sharma

www.SID.ir

Archive of SID

رشد یافته در محیط درون‌شیشه‌ای جداسازی شده و در شرایط استریل به محیط‌کشت منتقل شدند. جهت باززایی جوانه‌ها، همه‌ی ریزنمونه‌ها در محیط‌کشت MS حاوی ترکیبات هورمونی متنوع شامل BAP، TDZ و IBA، ۳ درصد ساکارز، ۰/۸ درصد آگار و pH= ۵/۸ کشت گردیده و ظروف کشت در اتاقک رشد با فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. جهت القاء ریشه‌زایی، جوانه‌های باززایی شده به طول ۴-۲ سانتی‌متری به محیط‌کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف اکسین منتقل شدند. گیاهچه‌های ریشه‌دار سپس جهت سازگاری با شرایط هوای آزاد به اتاقک کشت منتقل شدند.

از گیاهچه‌های استریل رشد یافته در محیط درون‌شیشه‌ای پس از ۳۰ روز، قطعات ریزنمونه مختلف شامل برگ، نوک ساقه، گره بدون برگ و گره با دو برگ جداسازی شده و در شرایط استریل به محیط‌کشت‌های حاوی هورمون‌های مختلف منتقل شدند. جهت کالوس‌زایی و باززایی، ریزنمونه‌های مورد استفاده در محیط‌کشت MS حاوی ترکیبات مختلف هورمون BA (در غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) به تنهایی یا در ترکیب با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA و هورمون TDZ (در غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) به‌تنهایی یا در ترکیب با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA و محیط‌کشت MS فاقد هورمون کشت شدند. صفات مورد مطالعه شامل حجم کالوس (اندازه‌گیری با استفاده از استوانه مدرج حاوی آب)، تعداد و طول شاخه اصلی، تعداد شاخه فرعی و تعداد ریشه، ۳۰ روز پس از کشت اندازه‌گیری شدند.

بعد از دوماه ساقه‌های به‌دست آمده در مرحله ساقه‌زایی، به‌منظور تولید ریشه به محیط‌های کشت MS حاوی هورمون‌های اکسین NAA و IBA در چهار غلظت (۰/۱، ۰/۲، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) منتقل شدند. تعداد ریشه و طول ریشه بعد ار سه هفته مورد بررسی قرار گرفت.

پس از شستشوی ریشه‌ها با آب مقطر، ساقه‌های ریشه‌دار شده درون ظروف یک‌بار مصرف حاوی پرلیت، شن و خاک کشت شدند. به‌منظور جلوگیری از تبخیر آب، درب ظروف بسته و در اتاقک رشد قرار گرفتند. گیاهچه‌ها به‌طور مرتب در اتاق سازگاری آبیاری می‌شدند و پس از ۱۴ روز درب ظروف برداشته شده و به گلخانه منتقل شدند.

تجزیه‌وتحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS 9.1 v. و MSTAT-C انجام گردید و قبل از انجام آنالیز واریانس، نرمال‌بودن داده‌ها به روش کولموگروف-اسمیرنوف موردبررسی قرار گرفت. برای انجام آزمون مقایسه میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال یک درصد استفاده شد. رسم منحنی‌ها با استفاده از نرم‌افزار Excel انجام شد.

نتایج

کالوس زایی

به‌منظور ریزازدیادی گیاه استویا، در این تحقیق قطعات ریزنمونه (نوک ساقه، گره با دو برگ، گره بدون برگ و برگ) روی محیط‌کشت پایه MS جامد حاوی غلظت‌های مختلفی از تیمارهای هورمونی BA به تنهایی یا در ترکیب با هورمون IBA و تیمار هورمونی TDZ به‌تنهایی یا در ترکیب با هورمون IBA و محیط‌کشت MS بدون هورمون موردبررسی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که هر دو هورمون BA و TDZ علاوه‌بر فرایند ساقه‌زایی، باعث القای کالوس‌زایی در قطعات ریزنمونه می‌شوند. به‌طوری‌که اولین واکنش به تشکیل کالوس پس از گذشت ۱۰ روز مشاهده شد. بالاترین حجم کالوس تولید شده مربوط به بافت برگ در تیمار ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر TDZ و پایین‌ترین حجم کالوس تولید شده مربوط به بافت گره بدون برگ در تیمار ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BA بوده است. تحت تأثیر تیمار هورمونی BA به‌تنهایی و یا در ترکیب با IBA در تمام سطوح مختلف (به‌جز ۰/۱ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر در بافت برگ) کالوس‌زایی مشاهده شد، به‌طوری‌که بیش‌ترین و کم‌ترین میزان کالوس‌زایی به‌ترتیب در غلظت‌های ۲ میلی‌گرم در لیتر هورمون BA به‌همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA در بافت گره بدون برگ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون BA در همین بافت مشاهده شد. بیش‌ترین میزان کالوس تولیدی تحت سطوح مختلف این هورمون در بافت گره بدون برگ به‌دست آمد. تحت تأثیر تیمار هورمونی TDZ به تنهایی و به همراه IBA، در تمام سطوح مختلف کالوس‌زایی مشاهده شده و بیش‌ترین میزان کالوس‌زایی در ریزنمونه گره در غلظت هورمونی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر TDZ و کم‌ترین میزان کالوس‌زایی در غلظت هورمونی ۲ میلی‌گرم در لیتر TDZ به همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA در همین بافت مشاهده شد (شکل ۲). به‌طورکلی در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر TDZ در تمام ریزنمونه‌ها بیش‌ترین کالوس‌زایی به‌دست آمد. با قرار دادن قطعات ریزنمونه روی محیط‌کشت MS بدون هورمون، کالوس‌زایی صورت نپذیرفت.

ساقه‌زایی

در بررسی اثر هورمون BA به‌تنهایی و یا در ترکیب با هورمون IBA، از نظر تعداد ساقه اصلی باززایی شده، بین غلظت‌های مختلف تیمار هورمونی BA به‌تنهایی، تفاوت معنی‌داری در

www.SID.ir

Archive of SID

سطح احتمال (P<۰/۰۱) وجود داشت که نشان از تأثیر غلظت‌های مختلف BA بر ساقه زایی استویا دارد و از طرفی با اضافه نمودن مقدار ثابت از هورمون IBA به غلظت‌های مختلف BA، اختلاف معنی‌داری بین ریزنمونه‌ها دیده نشد (P<۰/۰۱). در بررسی اثر هورمون TDZ به‌تنهایی و یا در ترکیب با هورمون BA، از نظر تعداد ساقه اصلی باززایی شده، بین غلظت‌های مختلف تیمار هورمونی TDZ به تنهایی، تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال (P<۰/۰۱) وجود داشت که نشان از تأثیر غلظت‌های مختلف TDZ بر ساقه‌زایی استویا دارد. منبع ریزنمونه نیز از نظر تعداد ساقه اصلی باززایی شده، در سطح احتمال (P<۰/۰۱) معنی‌دار شده که نشان‌دهنده تفاوت قدرت باززایی ساقه بین بافت‌های ریزنمونه می‌باشد (شکل ۳).

اثر هورمون BA بر فرایند ساقه‌زایی

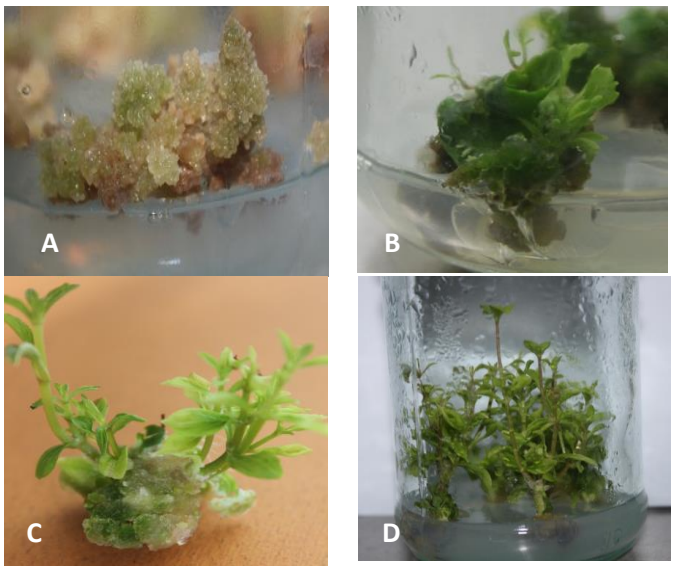
در تأثیر هورمون BA به‌تنهایی بر تعداد ساقه اصلی در بین تمام ریزنمونه‌ها، بیش‌ترین تعداد ساقه با کشت ریزنمونه گره بدون برگ بر روی محیط‌کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر از این هورمون تولید شد. کم‌ترین تعداد ساقه باززایی شده در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر در بافت‌های گره بدون برگ و گره با برگ مشاهده شده است. افزایش غلظت هورمونی از ۰/۱ به ۲ میلی‌گرم در لیتر در دو بافت گره با برگ و گره بدون برگ تأثیر مثبتی داشته و تعداد ساقه‌های باززا شده را افزایش داد اما در بافت نوک ساقه این روند نامنظم بود. در بافت برگ نیز تحت سطوح مختلف این هورمون هیچ‌گونه واکنشی نسبت به باززایی مشاهده نشده است. در مجموع می‌توان اظهار داشت به‌طور میانگین ریزنمونه نوک ساقه تحت سطوح مختلف هورمون BA بهترین باززایی را نشان داده است (شکل ۳). اضافه شدن غلظت ثابتی از هورمون IBA به سطوح مختلف BA باعث کاهش فرایند باززایی در تمام قطعات ریزنمونه شده است به‌طوری‌که بیش‌ترین کاهش باززایی ساقه تحت این ترکیب هورمونی در ریزنمونه نوک ساقه مشاهده شده است.

تحت تأثیر هورمون BA به تنهایی در بین تمام ریزنمونه‌ها، بیش‌ترین طول ساقه با کشت ریزنمونه نوک ساقه بر روی محیط‌کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر از این هورمون تولید شده و کم‌ترین طول ساقه باززا شده در غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر در همین بافت مشاهده شده است. همان‌طورکه در شکل (۴) آمده است در بافت‌های گره با برگ و گره بدون برگ افزایش غلظت هورمون BA سبب کاهش میزان طول ساقه شده است اما در بافت نوک ساقه با افزایش غلظت از ۰/۱ به ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر طول ساقه افزایش یافته و سپس در غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر طول ساقه به‌شدت کاهش یافت است. با اضافه شدن هورمون IBA به سطوح مختلف هورمون BA، تنها در بافت نوک ساقه افزایش طول ساقه اتفاق افتاده است و در سایر بافت‌ها افزوده شدن این هورمون سبب کاهش طول ساقه گردیده است. همان‌طورکه با افزایش غلظت هورمون BA به تنهایی، کاهش طول ساقه را در ریزنمونه‌ها مشاهده شده بود، با اضافه شدن IBA نیز این حالت دوباره تکرار شده است و با افزایش غلظت BA در ترکیب با IBA، کاهش طول ساقه نیز در ریزنمونه‌ها مشاهده شده است (شکل ۴).

تحت تأثیر هورمون BA به‌تنهایی در بین تمام ریزنمونه‌ها، بیش‌ترین تعداد ساقه فرعی با کشت ریزنمونه گره بدون برگ بر روی محیط‌کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر از این هورمون تولید شده و کم‌ترین تعداد ساقه فرعی در غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر در همین بافت مشاهده شده است. در بافت نوک ساقه تنها در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA بر روی ساقه اصلی ساقه‌های فرعی تولید شده و در غلظت‌های ۰/۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر هیچ‌گونه ساقه فرعی مشاهده نشده است. در بافت گره با برگ نیز در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BA ساقه‌های فرعی روی ساقه اصلی دیده نشده است اما با افزایش غلظت هورمون BA بر تعداد ساقه‌های فرعی روی ساقه اصلی افزوده شد (شکل ۵). برخلاف دو بافت پیشین، بافت گره بدون برگ در تمام سطوح این هورمون ساقه‌های فرعی تولید کرده است به‌طوری‌که با افزایش غلظت از ۰/۱ به ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر تعداد ساقه‌های فرعی به حداکثر مقدار خود رسیده و با افزایش غلظت به ۲ میلی‌گرم در لیتر دوباره تعداد ساقه فرعی کاهش یافته است. با اضافه شدن هورمون IBA به سطوح مختلف هورمون BA در مجموع تمام ریزنمونه‌ها می‌توان گفت بر میزان ساقه‌زایی ساقه‌های فرعی افزوده شده است اما افزایش چشم‌گیری نداشته است. به‌طورکلی غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر BA به همراه ۰/۵ میلی‌گرم IBA در تمام ریزنمونه‌ها بیش‌ترین میانگین تعداد ساقه‌های فرعی را داشته است (شکل ۵).

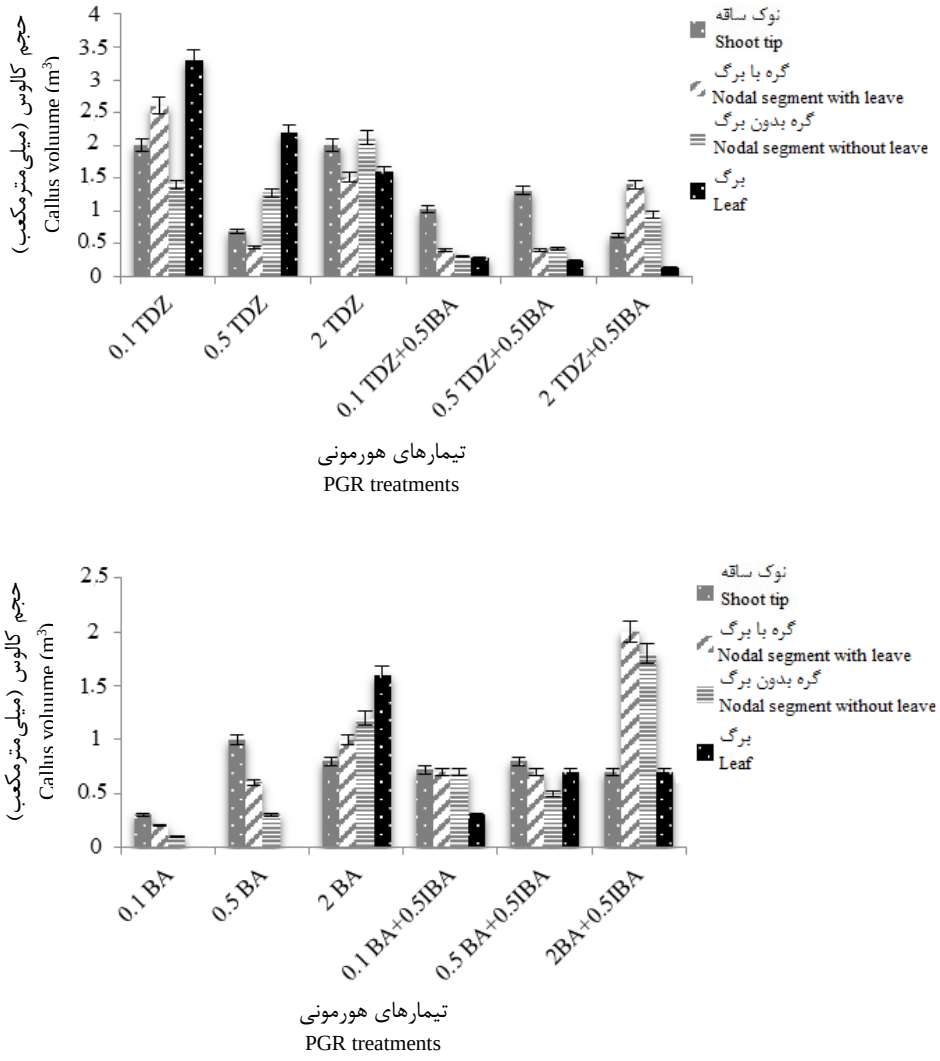
www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱: مراحل بهینه‌سازی کالوس و باززایی در استویا (*Stevia rebaudiana*). (A) کال‌زایی ریزنمونه برگ، (B) آغاز باززایی پس از ۲۵ روز، (C) باززایی غیر مستقیم در ریزنمونه برگ (D) باززایی مستقیم

Fig. 1: Optimization of callus induction and regeneration in Stevia (*Stevia rebaudiana*). (A) Callus induction from leaf explants, (B) Start of regeneration after 25 days, (C) Indirect regeneration in leaf explant (D) Direct regeneration

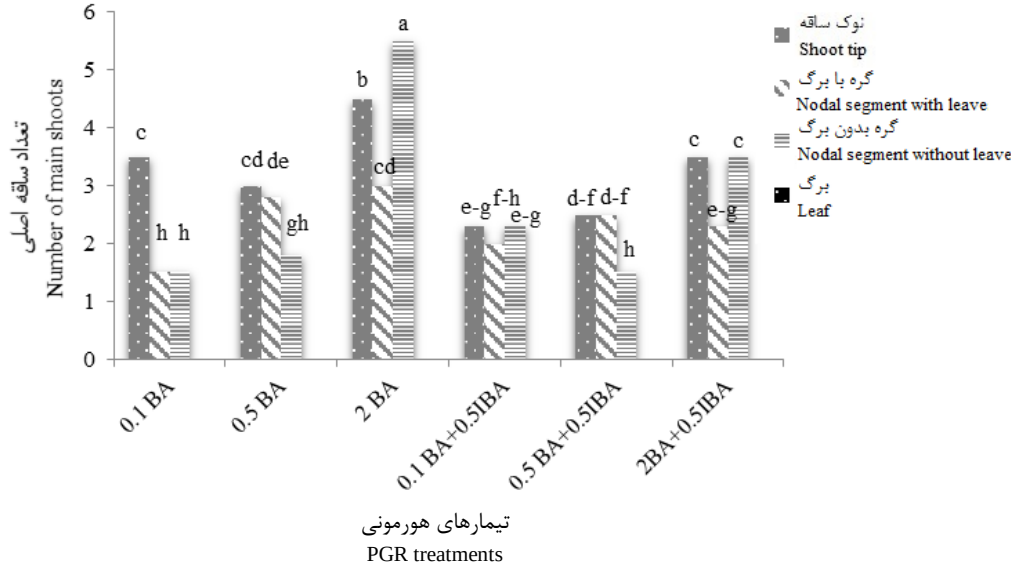


شکل ۲: تأثیر سطوح مختلف هورمون BA و TDZ در حجم کالوس القاء شده از ریزنمونه های مختلف

Fig. 2: The effects of different concentrations of BA and TDZ on calli volume induced from various explants

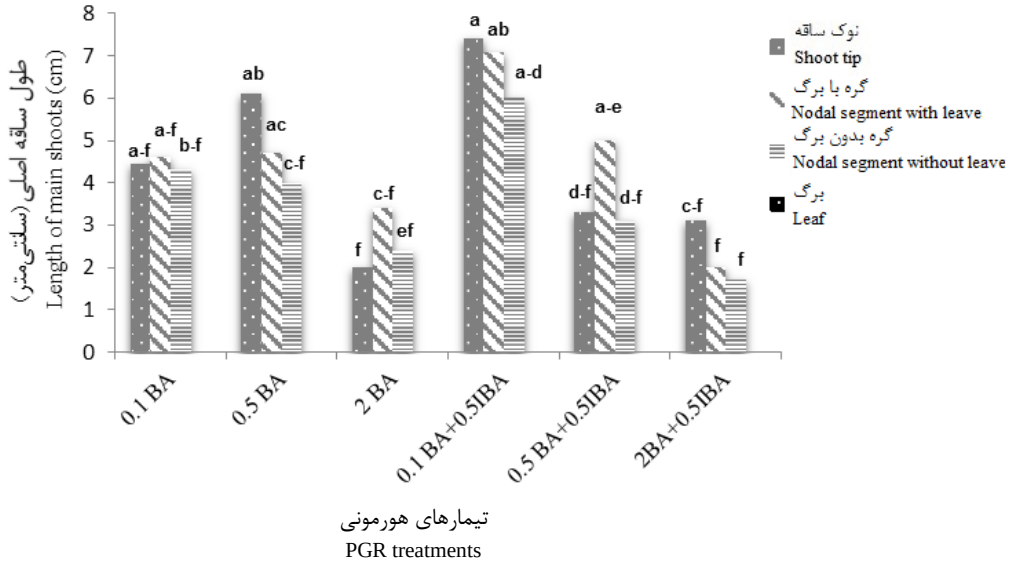
www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۳: تاثیر سطوح مختلف هورمون BA در تعداد ساقه اصلی باززایی شده از ریزنمونه‌های مختلف

Fig. 3: The effects of different concentrations of BA on the number of main shoots regenerated from various explants



شکل ۴: تاثیر سطوح مختلف هورمون BA بر طول ساقه اصلی باززایی شده از ریزنمونه‌های مختلف

Fig. 4: The effects of different concentrations of BA on the length of main shoots regenerated from various explants

اثر هورمون TDZ بر فرایند ساقه‌زایی

در تأثیر هورمون TDZ به‌تنهایی بر تعداد ساقه اصلی در بین تمام ریزنمونه‌ها، بیش‌ترین تعداد ساقه با کشت ریزنمونه گره با برگ بر روی محیط‌کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر و کمترین تعداد ساقه باززا شده در غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر در بافت نوک ساقه مشاهده شد. افزایش غلظت هورمونی از ۰/۱ به ۲ میلی‌گرم در لیتر در دو بافت گره با برگ و گره بدون برگ روندی نامنظم داشته است؛ اما در بافت نوک ساقه با افزایش غلظت هورمون TDZ تعداد ساقه‌های باززا شده کاهش داشته است. در بافت برگ نیز هیچ‌گونه واکنشی نسبت به باززایی مشاهده نشد. در مجموع می‌توان اظهار داشت به‌طور میانگین ریزنمونه گره با برگ، تحت سطوح مختلف هورمون TDZ به تنهایی، بهترین باززایی را دارد (شکل ۶). اضافه شدن غلظت ثابتی از هورمون IBA به سطوح مختلف TDZ، تأثیر متفاوتی را در انواع ریزنمونه‌ها داشته است به‌طوری‌که در ریزنمونه نوک ساقه میانگین تعداد ساقه‌های باززایی شده نسبت به تیمار TDZ به‌تنهایی افزایش یافته است ولی در ریزنمونه‌های گره بدون برگ و گره با برگ میانگین تعداد ساقه باززایی شده کاهش یافته است. به‌طورکلی می‌توان نتیجه گرفت که با اضافه شدن یک اکسین به TDZ تعداد ساقه های باززا شده در این دو

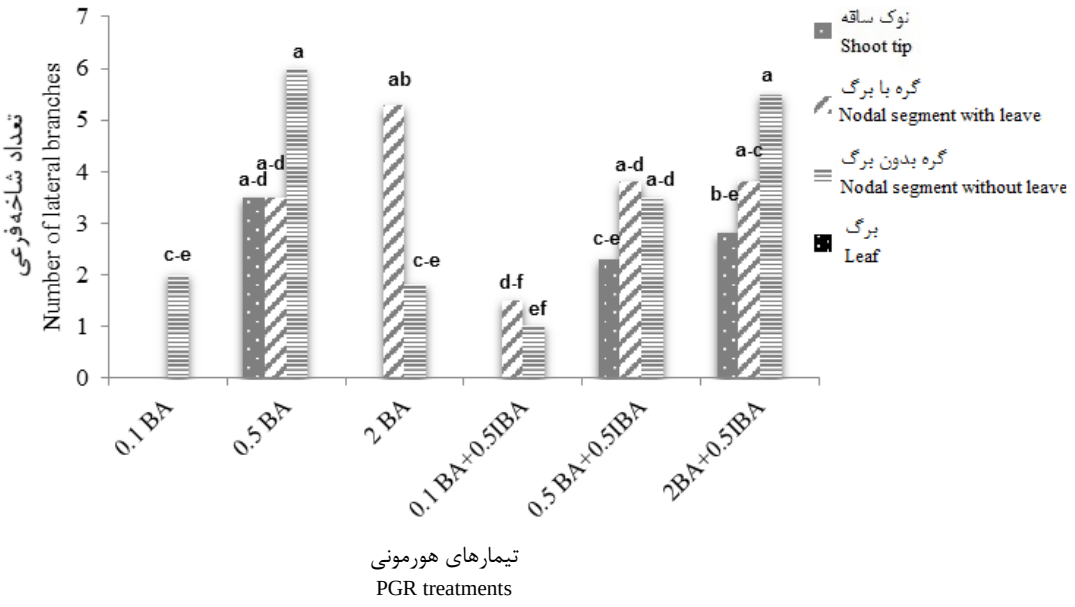
www.SID.ir

Archive of SID

ریز نمونه نسبت به حالت سیتوکنین به‌تنهایی، کاهش خواهد یافت. اما در مقایسه انواع ریزنمونه‌ها از نظر سطوح مختلف ترکیب TDZ+IBA، با افزایش غلظت TDZ، در ریزنمونه نوک ساقه کاهش تعداد ساقه‌های باززایی شده ولی در گره با برگ و گره بدون برگ با افزایش سطح هورمون TDZ در کنار IBA، تعداد ساقه‌های باززایی شده افزایش یافته است. نکته مهم این‌که تحت تیمار هورمونی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر TDZ به همراه ۰/۵میلی‌گرم IBA باززایی غیرمستقیم در ریزنمونه برگ مشاهده شده است. به این معنی که به‌طور همزمان کالوس‌زایی و باززایی از ریزنمونه برگی صورت پذیرفت.

تحت تأثیر هورمون TDZ به‌تنهایی، بیش‌ترین طول ساقه با کشت ریزنمونه گره بدون برگ بر روی محیط‌کشت MS حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر از این هورمون تولید شده و کم‌ترین طول ساقه باززا شده در غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر در بافت نوک ساقه مشاهده شده است. همان‌طورکه در شکل (۷) آمده است در بافت‌های نوک ساقه و گره بدون برگ با افزایش غلظت هورمون TDZ، میزان طول ساقه کاهش یافته است اما در بافت گره با برگ با افزایش غلظت از ۰/۱ به ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر طول ساقه افزایش یافته و سپس در غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر طول ساقه به‌شدت کاهش یافت است. اضافه‌شدن هورمون IBA به سطوح مختلف هورمون BA، میانگین طول ساقه را در نوک ساقه و گره با برگ افزایش داده و در گره بدون برگ کاهش داده است. تحت تأثیر این ترکیب هورمونی، بیش‌ترین طول ساقه باززاشده مربوط به ریزنمونه گره بدون برگ در سطح هورمونی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر TDZ به‌همراه ۰/۵ میلی‌گرم IBA مشاهده شده، کم‌ترین طول ساقه باززاشده نیز مربوط به ریزنمونه نوک ساقه در سطح هورمونی ۲ میلی‌گرم در لیتر TDZ به همراه ۰/۵ میلی‌گرم IBA مشاهده شده است.

تحت تاثیر هورمون TDZ به تنهایی، ریزنمونه نوک ساقه هیچ شاخه فرعی تولید نشده است، در ریزنمونه‌های گره با برگ و بدون برگ نیز با افزایش غلظت TDZ تعداد شاخه فرعی تولید شده روی ساقه اصلی کاهش چشم‌گیری داشته است. هم‌چنین با اضافه شدن غلظت ثابتی از هورمون IBA به سطوح مختلف TDZ این حالت تکرار شده است و با افزایش غلظت TDZ کاهش تعداد شاخه‌های فرعی مشاهده شده است (شکل ۸). به‌طورکلی بیش‌ترین تعداد ساقه فرعی با کشت ریزنمونه‌های گره بدون برگ و گره با برگ بر روی محیط کشت MS حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر به همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA، تولید شده است. در بافت نوک ساقه تنها در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA بر روی ساقه اصلی ساقه‌های فرعی تولید شده و در غلظت‌های ۰/۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر هیچ‌گونه ساقه فرعی مشاهده نشده است. در مجموع می‌توان گفت سطوح مختلف TDZ±IBA ترکیب مناسبی جهت تولید شاخه‌های فرعی نمی‌باشند. به‌طورکلی غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر TDZ به‌همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA بهترین ترکیب هورمونی از نظر تمام شاخص‌های مورد بررسی در این آزمایش بوده است.

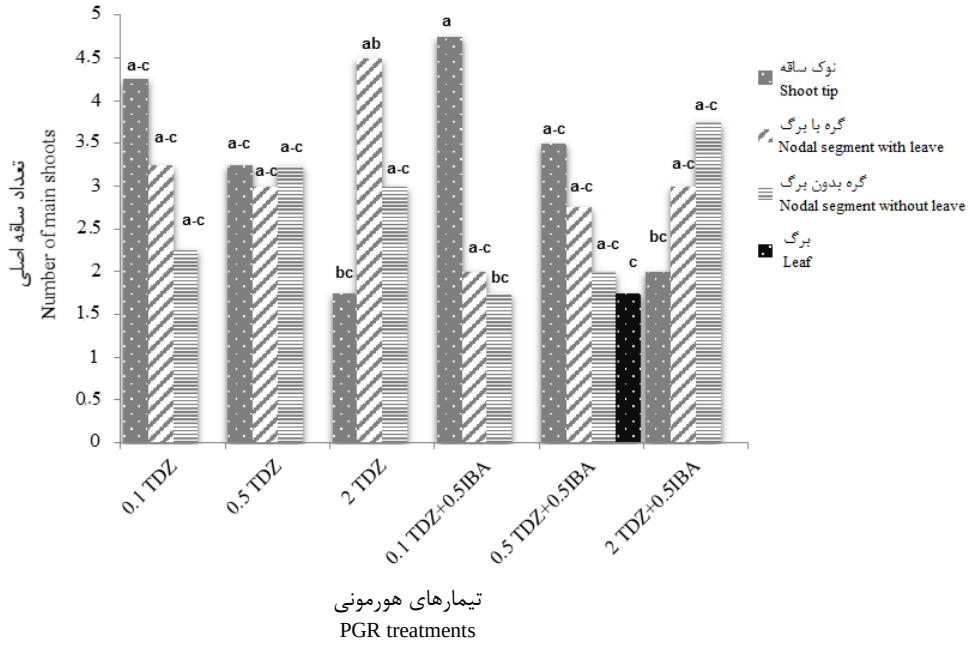


شکل۵: تأثیر سطوح مختلف هورمون BA در تعداد ساقه فرعی باززایی شده از ریزنمونه‌های مختلف

Fig. 5: The effects of different concentrations of BA on the number of lateral branches regenerated from various explants

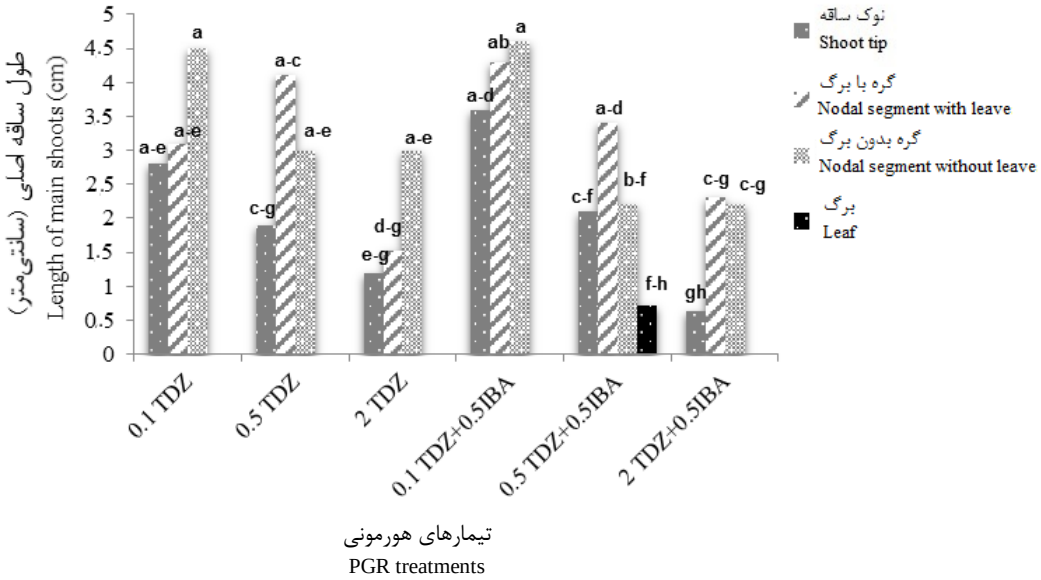
www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۶: تأثیر سطوح مختلف هورمون TDZ در تعداد ساقه اصلی باززایی شده از ریزنمونه‌های مختلف

Fig. 6: The effects of different concentrations of TDZ on the number of main shoots regenerated from various explants



شکل ۷: تأثیر سطوح مختلف هورمون TDZ بر طول ساقه اصلی باززایی شده از ریزنمونه‌های مختلف

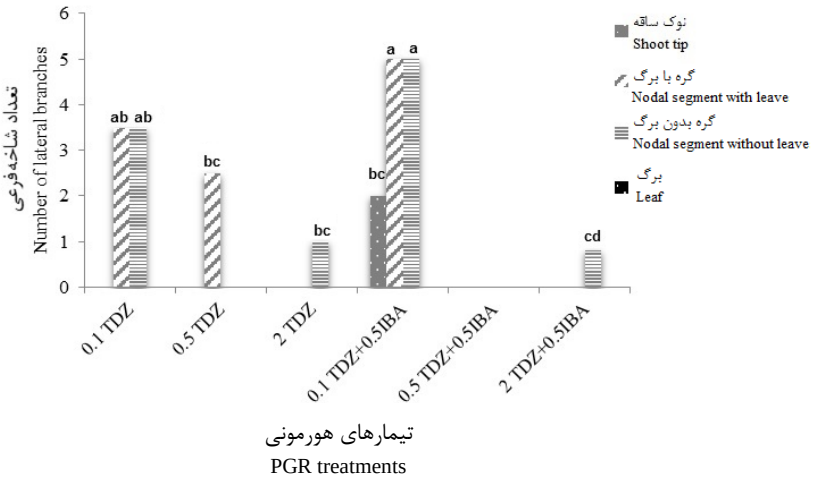
Fig. 7: The effects of different concentrations of TDZ on the length of main shoots regenerated from various explants

ریشه‌زایی

حدود ۱۰ هفته پس از کشت ساقه‌های باززا شده در محیط‌های کشت MS حاوی هورمون‌های اکسین NAA و IBA در ۴ غلظت (۰/۱، ۰/۲، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر)، مشاهده گردید که ساقه‌های باززا شده بخوبی در محیط‌کشت MS حاوی هورمون IBA ریشه‌زایی نموده و هیچ نوع سوختگی نیز در برگ‌ها مشاهده نشد. با افزایش میزان غلظت هورمون IBA میزان ریشه زایی در ساقه‌های باززا شده کاهش و بعد از مدتی متوقف شد. بالاترین میزان ریشه‌زایی مربوط به سطح ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA بوده است. شاخص طول ریشه نیز تحت تأثیر هورمون‌های اکسین، مورد بررسی قرار گرفت و بلندترین ریشه در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم NAA تشکیل شد (جدول ۱).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۸: تأثیر سطوح مختلف هورمون TDZ بر تعداد ساقه فرعی باززایی شده از ریزنمونه‌های مختلف

Fig. 8: The effects of different concentrations of TDZ on the number of lateral branches regenerated from various explants

جدول ۱: مقایسه میانگین‌های اثر سطوح مختلف IBA و NAA روی تعداد ریشه ریزنمونه‌های مختلف

Table 1: Mean comparisons of the effect of different concentration of IBA and NAA on the number of root in various explant

تعداد ریشه The number of roots		غلظت هورمونی Hormone concentrations
NAA	IBA	
6a	10a	0.1
4.67a	7b	0.2
1.67b	1c	0.5
1b	1c	1

اعداد دارای حروف مشترک، در سطح پنج درصد معنی‌دار نیستند

Data with similar letters are not significant at 5% level

گیاهچه‌های باززایی شده پس از سازگاری در فیتوترون، به گلخانه منتقل شدند. حدود ۹۵ درصد از گیاهچه‌های تولید شده در شرایط کشت بافت، زنده مانده و رشد مطلوبی از خود نشان دادند.

بحث

در این تحقیق، در تمام محیط‌های کشت باززایی صورت گرفته و علاوه‌بر باززایی در محیط‌های حاوی هورمون فرایند کالوس‌زایی نیز مشاهده شد. بیش‌ترین تعداد ساقه تولید شده از ریزنمونه‌ها در بافت گره بدون برگ، در تیمار ۲ میلی‌گرم در لیتر BA به‌همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA مشاهده شد. در تحقیقی که *رفیق*[1] و همکاران (2007) انجام دادند از غلظت‌های مختلف تنظیم کننده‌های رشد شامل BAP، Kin و IAA جهت باززایی ریزنمونه گره گیاه استویا استفاده نمودند و بیش‌ترین میزان باززایی در محیط‌کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP به‌دست آمد. هم‌چنین در تحقیق دیگری، محمد و *الهادی*[2] (2011) از محیط‌کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف BAP و Kin جهت باززایی ساقه از ریزنمونه گره ساقه‌ای استفاده نمودند. نوع سیتوکنین به‌کار رفته بیش‌ترین اهمیت را در تکثیر ساقه داشت. بیش‌ترین تعداد ساقه روی محیط MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP به همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin حاصل شد. با این حال محیط‌کشت حاوی Kin منجر به تولید ساقه‌های طویل‌تری شد که با نتایج این تحقیق مطابقت داشته است. *پاتل*[1] و همکاران (2008) جهت ریزازدیادی گیاه استویا از تکنیک کشت کالوس در ریزنمونه‌های گره و قطعات برگی استفاده نمودند. بیش‌ترین میزان کالوس روی محیط‌کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA تولید شد. بیش‌ترین میزان باززایی ساقه از کالوس روی محیط‌کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA مشاهده شد. اما در تحقیق حاضر بالاترین حجم کالوس تولید شده مربوط به بافت برگ در تیمار ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر TDZ و پایین‌ترین حجم

1. Rafiq

2. Mohamed and Alhady

www.SID.ir

Archive of SID

کالوس تولید شده مربوط به بافت گره بدون برگ در تیمار ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BA بوده است. هم‌چنین *داس*[۲] و همکاران (2011) از ریزنمونه‌های نوک ساقه، قطعات گره‌ای و جوانه جانبی جهت تکثیر انبوه گیاه استویا استفاده نمودند. محیط‌کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر Kin بهترین بازدهی را داشت و از هر ریزنمونه منفرد، قطعات نوک ساقه، تعداد ۱۱ ساقه در مدت زمان ۳۵ روز تولید نمود.

نتیجه‌گیری

در مجموع در این تحقیق بین ریزنمونه‌های مختلف و تیمارهای هورمونی مورد استفاده در هر سه آزمایش، بیش‌ترین تعداد ساقه اصلی باززا شده در بین هر چهار ریزنمونه، در غلظت هورمونی ۲ در لیتر BA در ریزنمونه گره بدون برگ مشاهده شد. بیش‌ترین طول ساقه اصلی متعلق به ریزنمونه نوک ساقه در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر به‌همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA بوده است، و بیش‌ترین تعداد شاخه فرعی تولید شده، در ریزنمونه گره بدون برگ در غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر BA به همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA مشاهده شده است. بیش‌ترین میزان کالوس در ریزنمونه برگ کشت شده روی محیط‌کشت MS حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر TDZ به‌همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA القاء شد.

منابع

Abdul Razak, U. N. A., Ong, Ch. B., Yu, T. S. and Lau, L. K. 2014. *In vitro* micropropagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni in Malaysia. Brazilian Archives of Biology and Technology, 57: 23-28.

Ahmed, S. R., Howlader, M. M. S., Sutradhar, P. and Yasmin, S. 2016. An efficient protocol for in vitro regeneration of *Stevia rebaudiana*. Asian Journal of Medical and Biological Research, 2 (1): 95-106.

Brandle, J. E. and Rosa, N. 1992. Heritability for yield, leaf: stem ratio and stevioside content estimated from a landrace cultivar of *Stevia rebaudiana*. Canadian Journal of Plant Science, 72: 1263-1266.

Curry, L. L. and Ashley, R. 2008. Subchronic toxicity of rebaudioside A. Cargill Incorporated. Journal Process Biochemistry, 83: 115-117.

Das, A., Gantait, S. and Mandal, N. 2011. Micropropagation of an elite medicinal plant: *Stevia rebaudiana* Bert. International Journal of Agricultural Research, 6: 40-48.

George, E. F. and Sherrington, P. D. 1984. Plant propagation by tissue culture. Exegetics Ltd., Eversley, Basingstoke.

Jaroslov, P., Brabora, H. and Tuulia, H. 2007. Characterisation of steviol rebaudiana by Choprehensive tow-dimensional liquid chromatography time of flight mass spectrometry. Journal of Chromatography, 1150 (1-2): 85-92.

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, ISCA Journal of Biological Sciences, 1 (3): 37-42.

Kim, N. C. and Kinghorn, A. D. 2002. Highly sweet compounds of plant origin. Archives of Pharmacal Research, 25: 725-746.

Laribi, B., Roatbi, N., Kouki, K. and Bettaieb, T. 2012. In vitro propagation of *stevia rebaudiana* (Bert.) - a non caloric sweetener and antidiabetic medicinal plant. International Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 2: 333-339.

Mizutani, K. O. and Tanaka, A. 2002. Use of *Stevia rebaudiana* sweeteners in Japan. In: Stevia, the Genus *Stevia*. Medicinal and aromatic plants-industrial profiles. Taylor and Francis: London and New York, 19: 178-195.

Mohamed, R. A. and Alhady, A. 2011. Micropropagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni. A new sweetening crop in Egypt. Global Journal of Biotechnology and Biochemistry, 6 (4): 178-182.

Patel, R. M. and Shah, R. R. 2009. Regeneration of stevia plant through callus culture. Indian Journal of Pharmaceutical Sciences, 71: 46-50.

Rafiq, M., Dahot, M. U., Muhamamd, Sh., Naqvi, H. A. and Qarshi, I. A. 2007. *In vitro* clonal propagation and biochemical analysis of field established *Stevia rebaudiana* bertoni. Pakistan Journal of Botany, 39 (7): 2467-2474.

Sharma, N., Gauchan, D. P., Dhakal, A., Luitel, A., Shakya, S. and Shakya, R. 2015. Establishment of regenerative callus, cell suspension system and molecular characterization of *stevia rebaudiana* Bertoni for the production of stevioside in *in vitro*. International Journal for Research in Applied Science and Engineering Technology (IJRASET), 3: 133-144.

Soejarto, D. D., Compadre, C., Medon, P. J., Kamath, S. K. and Kinghorn, A. D. 1983. Potential sweetening agents of plant origin. II. Field research for sweet tasting *Stevia* species. Economic Botany, 37: 71-79.

www.SID.ir

Archive of SID

Effects of Explant Type and Plant Growth Regulator Combinations on *In Vitro* Direct and Indirect Regeneration of *Stevia rebaudiana*

Ghasemiomran[1*], V., Movahedi[2], M., Alizadeh[3], F., Khalvati[4], L. and Pourahmadi[5], D.

Abstract

Stevia rebaudiana is a medicinal plant belonging to Asteraceae family. This experiment was carried out to optimize the *in vitro* callus induction and plant regeneration of *Stevia rebaudiana*. The explants used in this study were leaf, shoot tip, nodal segments with two leaves and nodal segment without leaves derived from *in vitro* grown plantlets. The explants were transferred to PGR-free MS medium or supplemented with BA (0.1, 0.5 and 2mgl^{-1}) solely or in combination with 0.5mgl^{-1} IBA and TDZ (0.1, 0.5 and 2mgl^{-1}) solely or in combination with 0.5mgl^{-1} IBA. The highest callus percentage and callus volume induced with culturing leaf explant on MS medium containing 0.1 mgl^{-1} TDZ. The nodal segment without leaves cultured on MS medium containing 2mgl^{-1} BA + 0.5mgl^{-1} IBA produced the highest regenerated shoot number. The highest and lowest shoot length was observed in shoot tip cultured on MS medium containing 0.1mgl^{-1} BA + 0.5mgl^{-1} IBA and MS medium containing 2mgl^{-1} BA + 0.5mgl^{-1} IBA, respectively. Indirect shoot regeneration was observed only in leaf explant cultured on MS medium containing 0.5mgl^{-1} TDZ + 0.5mgl^{-1} IBA. The highest percentage of root induction was observed with culturing shoots on MS medium containing 0.1mgl^{-1} IBA.

Keywords: Plant hormone, Micropropagation, Callus, Tissue culture

1. Assistant Professor, Genetics and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran
2. MSc Graduated Student, Department of Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
3 and 4. MSc and BSc Graduated Students, Respectively, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran
5. MSc Graduated Student, Department of Breeding, Faculty of Agriculture, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran
*: Corresponding author Email: ghasemiomran@yahoo.com

www.SID.ir