

## بررسی ریز ازدیادی گیاه دارویی استویا (*Stevia rebaudiana*)

محدثه فرزادیان\*<sup>۱</sup>، حسین حسینی مقدم<sup>۲</sup>، مهدی زارعی<sup>۲</sup>، یاسر حسینی<sup>۲</sup>  
<sup>۱\*</sup> دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه تولیدات گیاهی، دانشگاه گنبد کاووس، گنبد کاووس  
استادیار گروه تولیدات گیاهی، دانشگاه گنبد کاووس، گنبد کاووس  
دانش آموخته کارشناسی ارشد گیاه پزشکی، گنبد کاووس  
<sup>۲\*</sup> نویسنده مسئول: [m.farzadian@ymail.com](mailto:m.farzadian@ymail.com)

### چکیده

استویا با نام علمی *Stevia rebaudiana* دارای منبع گلیکوزیدهای دی‌ترین از جمله استویوزید و گلیکوزید که حدود ۲۵۰ تا ۳۰۰ برابر شیرین‌تر از شکر می‌باشد. به علت درصد جوانه‌زنی پایین بذور استویا، می‌توان از تکنیک کشت بافت برای تکثیر این گیاه با ارزش کمک گرفت. پژوهش حاضر با هدف مطالعه تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد اکسین و سایتوکینین بر باززایی گیاه استویا انجام شد. در این پژوهش ریزازدیادی گیاه استویا در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف هورمون‌های Adenin و NAA مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به دست آمده نشان داد در میان تیمارهای اعمال شده، محیط کشت حاوی ۱/۰ میلی‌گرم در لیتر Adenin به همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA برای ساقه‌زایی مناسب است. میانگین تعداد ساقه و طول شاخه به دست آمده در این پژوهش ۱/۳۹ و ۲/۴۳ سانتی‌متر بوده است.  
**کلمات کلیدی:** کشت بافت، باززایی، Adenin، NAA، تکثیر

### مقدمه

استویا با نام علمی *Stevia rebaudiana* به گیاه برگ‌عسلی، گیاه شیرین و علف شیرین معروف می‌باشد (Sabrhmshygyet *al.*, 2013). استویا گیاهی بوته‌ای، علفی، چندساله، خزان‌کننده، شاخه‌دار، کوچک، باریک با برگ‌های سبز و ارتفاعی برابر ۶۰-۷۰ سانتی‌متر است. جنس استویا متعلق به خانواده Asteraceae شامل بیش از ۲۴۰ گونه طبیعی بوده که بیش از ۷۰ گونه آن در مکزیک یافت می‌شود. در کشورهای آمریکای جنوبی نیز ۳۸ گونه در بولیوی، ۲ گونه در برزیل، ۲ گونه در اکوادور و ۱۳ گونه در پاراگوئه دیده شده است. این گیاه قابلیت تولید تا ۶ سال را داشته و حتی در سال ۲ تا ۲ چین می‌توان آن را برداشت نمود. استویا در گروه گیاهان صنعتی، دارویی و معطر قرار می‌گیرد (Soltanbeigiet *al.*, 2015).

ساقه گیاه کرک‌دار و برگ‌ها بیضوی، دندانه‌دار، نیزه‌ای و متقابل هستند و دارای گل‌های سفید کوچک به‌اندازه ۱۷-۱۵ میلی‌متر می‌باشد. ریشه استویا از نوع چرخشی، نخ‌مانند (باریک)، دراز و سطحی بوده و حداکثر عمق نفوذ ریشه ۲۲ سانتی‌متر و بیش‌ترین عمق گسترش آن در عمق ۱۵ سانتی‌متر است (Soltanbeigiet *al.*, 2015). در قرن ۱۶ ارزش پزشکی استویا شناخته شد و استفاده از آن در چای آغاز شد، از آن زمان به بعد، استفاده از آن به‌طور وسیعی در سراسر اروپا و آسیا رایج شده است (Otroshy et *al.*, 2015). این گیاه به علت ویژگی‌های خاص خود که یک شیرین‌کننده طبیعی عاری از کالری است می‌تواند ارائه‌دهنده راه‌حل مؤثری در جهت برطرف نمودن مشکلات پیچیده مبتلایان به بیماری دیابت و چاقی مفرط باشد. ازدیاد این گیاه در طبیعت عمدتاً از طریق بذر صورت می‌گیرد. تحقیقات نشان داده که مشکل جوانه‌زنی بذر استویا به علت پوکی بذر است. در صورت در دست داشتن ارقام مرغوب می‌توان گیاه را به‌صورت ازدیاد کلونی در شرایط درون شیشه‌ای تکثیر نمود (Azar pooret *al.*, 2013). در تحقیقی که بر روی گیاه *Stevia rebaudiana* انجام شد، ساقه‌چه‌ها از کشت گره ساقه جانبی تکثیر شدند. القا شاخه‌زایی از قطعات گره در محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر کینتین بیش‌تر بود. برای

ریشه‌زایی از غلظت‌های مختلف IBA استفاده شد و بالاترین ریشه‌زایی در محیط کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA ثبت شد. گیاهچه‌های ریشه‌دار در ابتدا در شرایط تنش کشت داده شدند و سپس به اتاق سازگاری انتقال داده شدند (Jitendra et al., 2012). در مطالعه مقایسه‌ای کاشت درون شیشه‌ای و مزرعه‌ای کالوس و گیاه استویا، ریزنمونه‌ها در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف سیتوکینین و اکسین کشت داده شدند. ریشه‌زایی در محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA بهینه‌سازی شد. بهینه‌سازی کالوس نیز در محیط کشت حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D مشاهده شد. ساقه‌دهی کالوس در محیط کشت MS حاوی BA+2,4-D حداکثر بود و ریشه‌دهی با اضافه کردن IBA در محیط کشت MS تقویت شد. گیاهچه‌های ریشه‌دار شده با موفقیت و با میزان بقای ۴۰٪ سازگار شدند (Taware., 2010). در پژوهش حاضر تولید این گیاه از طریق کشت بافت مورد بررسی قرار گرفته است.

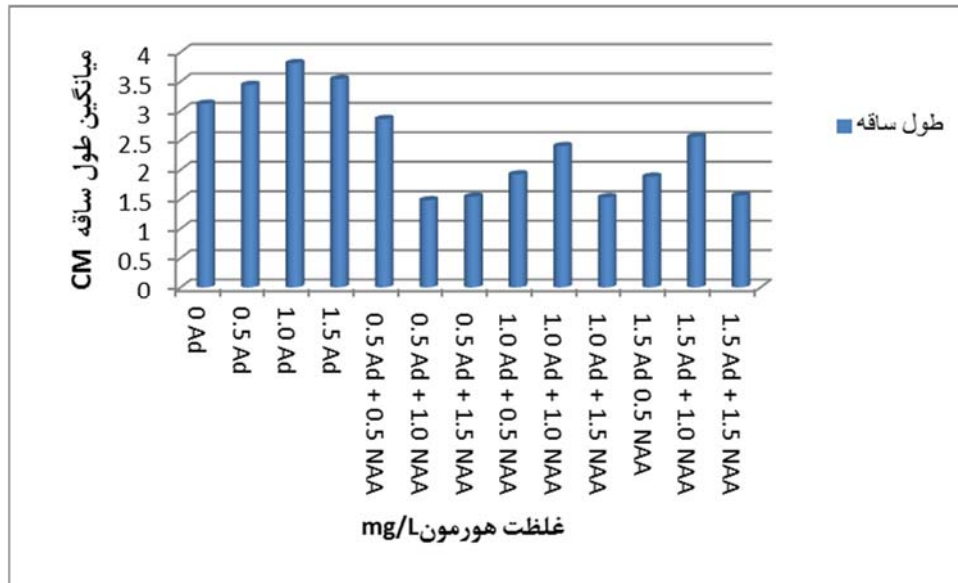
### مواد و روش‌ها

نمونه‌های گیاهی جدا شده از پایه مادری با آب و مایع ظرف‌شویی شسته و با کلرید جیوه ۰/۰۳ درصد به مدت ۶ دقیقه ضدعفونی شدند و به محیط کشت MS حاوی ۱/۰ میلی‌گرم در لیتر IBA منتقل شدند. ریزنمونه‌های استویا به طول ۰/۵ سانتی‌متر در محیط کشت MS حاوی اکسین و سایتوکینین در ۱۵ تکرار در قالب یک طرح فاکتوریل بر پایه کاملاً تصادفی کشت شدند. pH محیط کشت حدود ۵/۸ و میزان آگار ۷ گرم در لیتر بود. ریزنمونه‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، دوره روشنایی ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفتند. غلظت‌های مختلفی از تنظیم‌کننده‌های رشد Adenin و NAA هر کدام به مقدار صفر، ۰/۵، ۱/۰ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر برای القای تولید شاخه در ریزنمونه‌ها مورد آزمون قرار گرفتند. داده‌برداری ۲۰ روز بعد از کشت انجام شد.

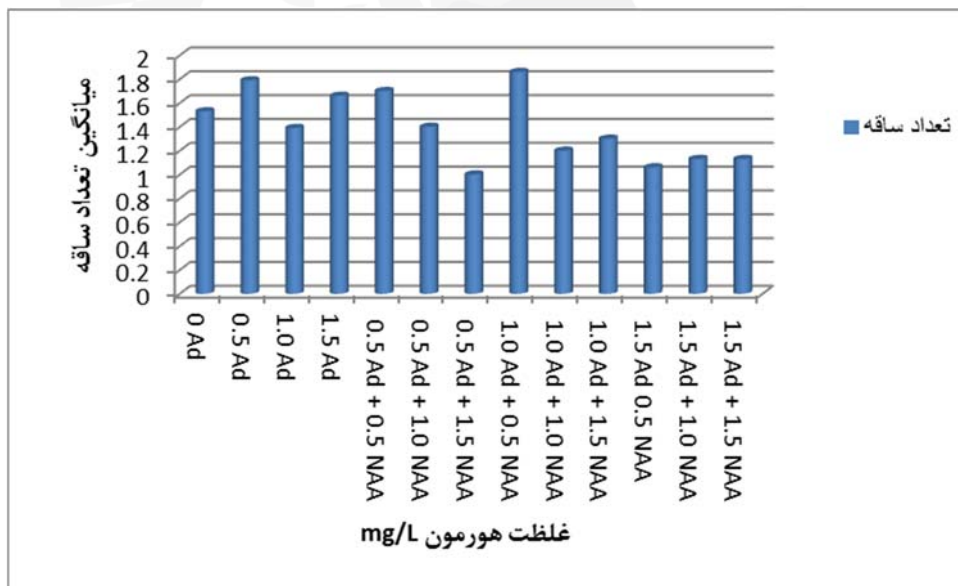
### نتایج و بحث

نتایج حاصل از این تحقیق نشان می‌دهد که روند باززایی در کشت بافت استویا با ترکیب هورمونی محیط کشت در ارتباط است. نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد، تیمار Adenin با غلظت ۱/۰ میلی‌گرم در لیتر بهترین اثر را بر روی رشد طولی ساقه‌ها داشت (نمودار شماره ۱). پژوهش مشابهی به‌وسیله سایتوکینین روی ساقه گیاه *Stevia rebaudiana* انجام شد، که در آن حداکثر رشد ساقه به‌وسیله سایتوکینین Kinetin با غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر به دست آمد (Daset et al., 2011)، اما در پژوهش دیگری روی گیاه *Stevia rebaudiana* حداکثر طول ساقه در محیط کشت دارای ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP به دست آمد (Rafiqet et al., 2007).

حداکثر تعداد ساقه در گیاه *Stevia rebaudiana* در محیط MS دارای ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP به دست آمد (Thiyagarajan and Venkatachalam, 2011) اما در پژوهش دیگری حداکثر تعداد ساقه با استفاده از ترکیب هورمون‌های BAP و Kin هر کدام به‌اندازه ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر به دست آمد (Yadav et al., 2016). طبق بررسی که روی گیاه *Stevia rebaudiana* انجام شد، حداکثر تعداد ساقه در محیط MS دارای ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin به دست آمد (Ahmed et al., 2007). طبق نتایج این آزمایش بیش‌ترین تعداد ساقه در محیط دارای ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Ad همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA به دست آمد (نمودار شماره ۲). میانگین رشد ساقه در این محیط کشت ۳/۸۱ سانتی‌متر بوده است.



نمودار ۱- میانگین طول ساقه در محیط MS



نمودار ۲- میانگین تعداد ساقه در محیط MS

#### منابع

- Azar poor, E., Motamed, M. and Bozorgi, H. 2013. Stevia Agronomy And Extension, Publication Of Islamic Azad University of Lahijan, First Edition, Page 54 (In Persion).
- Ahmed, M.B., Salahin, M., Karim, R., Razvy, M.A., Hannan, M.M., Sultana, R., Hossain, M. and Islam, R. 2007. An Efficient Method for in vitro Clonal Propagation of a Newly Introduced Sweetener Plant (Stevia rebaudiana Bertoni.) in Bangladesh. American-Eurasian Journal of Scientific Research 2 (2): 121-125
- Das, A., Gantait, S. and Mandal, N. 2011. Micropropagation of an elite medicinal plant: Stevia rebaudiana Bert. international journal of agricultural research. 6 (1): 40-48
- 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, 37-42.

- Otroshy, M., Vafadar Esfehan, F. and Amooaghaie, R. 2015.** Effect of mycorrhiza and plant growth promoting rhizobacteria on plant growth rate, flowering time and stevioside accumulation pattern in *Stevia rebaudiana* Bert. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, Vol. 31, No. 2: 220-234 (in Persian).
- Rafiq, M., Umar dahot, M., Mangrio, S., Naqvi, H. and Qarshi, I. 2007.** in vitro clonal propagation and biochemical analysis of field established *Stevia rebaudiana* bertoni. Pakistan Journal of Botany 39(7): 2467-2474.
- Sabrhmyshgy, F., Trang, AR., Mablighi, M., Dehpour, AA. and Sabrhmyshgy, Z. 2013.** Effect of different levels of nitrogen and potassium on morphology and chemical stevia plant (*Stevia rebaudiana* Bertoni). New Findings Agriculture: Volume 7, Number 2 (26) ; 127-135 (in Persian).
- Soltanbeigi, A., Samadpourrigani, E. and Taherloo, A. A. 2015.** review: *Stevia* (Honey Leaf), Medicinal and Industrial Plant. International Conference On Applied Research in Agriculture (icara). (in Persian).
- Taware, AS., Mukadam, DS., and Chavan, AM. 2010.** Comparative studies of in vitro and in vivo grown plants and callus of *Stevia rebaudiana* (Bertoni). International Journal of Integrative Biology. Vol. 9, No. 1, 10.
- Thiyagarajan, M. and Venkatachalam, P. 2011.** Large scale in vitro propagation of *Stevia rebaudiana* (bert) for commercial application: Pharmaceutically important and antidiabetic medicinal herb, Industrial Crops and Products Journal, Volume 37, 111-117
- Yadav, A., K. Subhah., P. Anil K.2, Yadav, I.S. and Yadav, R.C. 2016.** An efficient micropropagation protocol for *Stevia rebaudiana*. International Journal of Phytomedicines and Related Industries Volume : 8, 65-73



## Study Micropropagation of Stevia (*Stevia rebaudiana*)

Mohadese Farzadian<sup>1\*</sup>, Hossein Hosseini Moghaddam<sup>2</sup>, Mehdi Zarei<sup>2</sup>, Yasser Hosseini<sup>3</sup>

<sup>1</sup>MSc. Student of Agricultural Biotechnology. Gonbad Kavous University, Gonbad Kavous

<sup>2</sup>Assistant Professor of plant production Dept., Gonbad Kavous University, Gonbad Kavous

<sup>3</sup>Educated of MSc. degree in plant protection, Gonbad Kavous

\*Corresponding Author: [m.farzadian@gmail.com](mailto:m.farzadian@gmail.com)

### Abstract

*Stevia* (*Stevia rebaudiana*) is a source of diterpene glycosides, including Stevioside and Glycoside is about 250 to 300 times sweeter than sugar. Because of low percentage of seed germination, tissue culture technique is used for propagation of this valuable plant. This research was conducted with the aim of study on the effect of auxin and cytokinin growth regulators on regeneration of *Stevia*. In this study, micropropagation of *Stevia* on MS medium containing different concentrations of Adenin and NAA hormones were studied. The results showed that between treatments, the culture medium supplemented with 1mg/l Adenin and 0/5 mg/l NAA is the best treatment for shoot regeneration. The average number of stem and branch length obtained in this study was 1/39 and 2/43 cm.

**Keywords:** Tissue culture, Regeneration, Adenin, NAA, Propagation

