ریزازدیادی درون شیشه‌ای گیاه ضد دیابت استویا (*Rebaudiana stevia*) به منظور ارائه دستورالعمل برای تولید تجاری آن در ایران

سارا قهرمان زاده[۱]، هاشم رحمانی[۱]، سمیه متقی[۱]، لیلا کوهی[۱]، فرزان لاهوت،[۱] رباب قهرمان زاده*[۱]
[۱]دانشگاه آزاد اسلامی واحد اردبیل- اردبیل
*نویسنده مسئول: ghahramanzadeh9@gmail.com

چکیده

این تحقیق به منظور معرفی محیط کشت و روش کشت مناسب و مقرون به صرفه اقتصادی در گیاه استویا در دانشگاه آزاد اسلامی واحد اردبیل انجام گرفت. در تحقیق حاضر به منظور افزایش تعداد شاخه جانبی، ریزنمونه های جوانه جانبی در محیط کشت های MS و B5 حاوی غلظت های مختلف BAPو KIN هر کدام در ۵ سطح مختلف (۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲ و ۳ میلی گرم در لیتر) کشت شدند. به منظور تولید ساقه در حجم وسیع ریز نمونه های بدست آمده از محیط ساقه زایی روی محیط کشت MS حاوی یک میلی گرم در لیتر BAP کشت شدند. بعد از چهار واکشت تعداد ساقه بدست آمده از هر نمونه شمارش شدکه میانگین تعداد ساقه بدست آمده ۱۹۲ شاخه به ازای هر ریز نمونه بود. به منظور انتقال گیاهچه های ریشه دار شده از محیط کشت مصنوعی به محیط خاک و خوپذیری آنها به شرایط محیط، گیاهچه ها به سینی های کشت کوچک حاوی کوکوپیت و پرلیت که از قبل استریل شده بودند، منتقل شدند. پس از سپری شدن حدود دو هفته گیاهچه ها به گلخانه و در نهایت به مزرعه منتقل شدند. با در نظر داشتن اینکه هزینه مالی تولید درون شیشه ای گیاه استویا مانع گرایش زارعین به تولید این گیاه ارزشمند می شود، در تحقیق حاضر ما موفق به معرفی روش تولید مقرون به صرفه اقتصادی برای گیاه غیر بومی استویا شدیم که می تواند هزینه های تولید درون شیشه ای این گیاه را کاهش دهد، در ضمن اینکه در کیفیت محصول تغییری ایجاد نشود.

کلمات کلیدی: استویا، کشت بافت، تولید تجاری

مقدمه

استویا به دلیل شیرینی سیصد برابری آن نسبت به ساکارز، بدون کالری بودنش، تاثیر اندک بر قند خون، تاثیر احتمالی بر کاهش چاقی و فشار خون بالا، نداشتن اثرات سرطان زایی در مقایسه با سایر شیرین کننده ها، غیر سمی بودن وگیاهی بودن بسیار مورد توجه قرار گرفته است (Chalapathin and Thimmegowda, 1997) وبا توجه به اینکه اثر ناچیزی بر افزایش قند خون دارد و حتی باعث افزایش تحمل گلوکز می شود؛ بنابراین بسیار مورد توجه افراد مبتلا به دیابت و افرادی که محدودیت مصرف مواد قندی دارند، قرار گرفته است(Mehta, et al. 2012). کشت آن در نواحی گرم و مرطوب بصورت زراعی و در سایر نواحی در گلخانه امکانپذیر است، این گیاه از طریق قلمه و بذر تکثیر می گردد اما تکثیر آن از طریق بذر بدلیل قوه نامیه بسیار پایین و از طریق قلمه نیز به دلیل مشکلاتی چون بیماری و سرعت پایین تکثیر با محدودیت همراه است(Sivaram, and Mukundan, 2003). همچنین در تکثیر بوسیله بذر جمعیت تولید شده یکنواخت نبوده و در نتیجه سبب غیر یکنواختی در خصوصیات مهم گیاه شامل سطوح شیرینی و ترکیبات مختلف آن می شود. بر اساس آزمایشات تجربی انجام شده ، تکثیر از طریق قلمه بسیار گرانتر از کشت بافت است چرا که میزان موفقیت استقرار قلمه های آن بسیار پایین است و در حدود ۳۰ درصد از قلمه های جوانتر در اولین هفته های قلمه زنی از بین می روند. علاوه بر این محتوای استویوزاید در گیاه حاصل از قلمه پایین تر است. بنا به دلایل ذکر شده، امروزه با بکار گیری روشهای نوین از قبیل کشت بافتهای گیاهی میتوان این موانع را مرتفع کرد و در مدت زمان کمتری تعداد زیادی از گیاهان مورد نظر را تولید نمود و شرایط اپتیمم رشد را برای آنها بدست آورد. در حال حاضرکشت در شرایط آزمایشگاهی راه حل پیشنهادی برای تولید استویا در ایران است. به نظر می رسد با ارائه دستورالعملی برای تولید تجاری این محصول بتوان در جهت افزایش میزان تولید آن در کشور گامی اساسی برداشت.

IrHC2019

مواد و روش ها

برای تهیه ریزنمونه های مناسب برای کشت در شرایط درون شیشه ای، گیاهچه های ۳ الی ۴ گره ای که بعد از قرار گرفتن بوته های یک ساله استویا در محیط آزمایشگاه شروع به رشد کرده بودند، انتخاب شد. در این آزمایش از محیط کشت های پایه MS و B5 عاری از هورمون برای تولید ساقه و تکثیر تعداد بوته استفاده گردید. سپس برای بررسی اثر نسبت های مختلف هورمونهای سیتوکنین بر میزان افزایش تولید جوانه جانبی و به تبع آن پر شاخ و برگی، از محیط کشت های پایه MS و B5 که حاوی ۳ درصد ساکارز و ۱/۷ درصد آگار بودند به همراه هورمون کنیتین (KIN) و بنزیل آمینو پورین (BAP) (هر کدام در ۵ سطح ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲ و ۳ میلی گرم در لیتر) ، هر کدام به تنهایی و غلظت پایین KIN و BAP (۰/۵ میلی گرم در لیتر) در ترکیب با یکدیگر و همچنین شاهد (عدم استفاده از هر گونه هورمون) در نظر گرفته شدند. جهت بررسی ریشه زایی ریز نمونه ها، ساقه های تشکیل شده در مرحله ساقه زایی به طول تقریبی یک سانتی متر برش داده شده و ریز نمونه های حاصل در محیط کشت های پایه MS ، ½MS که حاوی ۳ درصد ساکارز و ۱/۷ درصد آگار و هورمونهای ریشه زایی بودند، کشت گردیدند. به منظور انتقال گیاهچه های ریشه دار شده از محیط کشت مصنوعی به محیط خاک گیاهان دو هفته در آزمایشگاه مرحله خوپذیری را طی کرده و بعد از یک ماه رشد در گلخانه به مزرعه با مساحت یک هکتار منتقل شدند.

نتایج و بحث

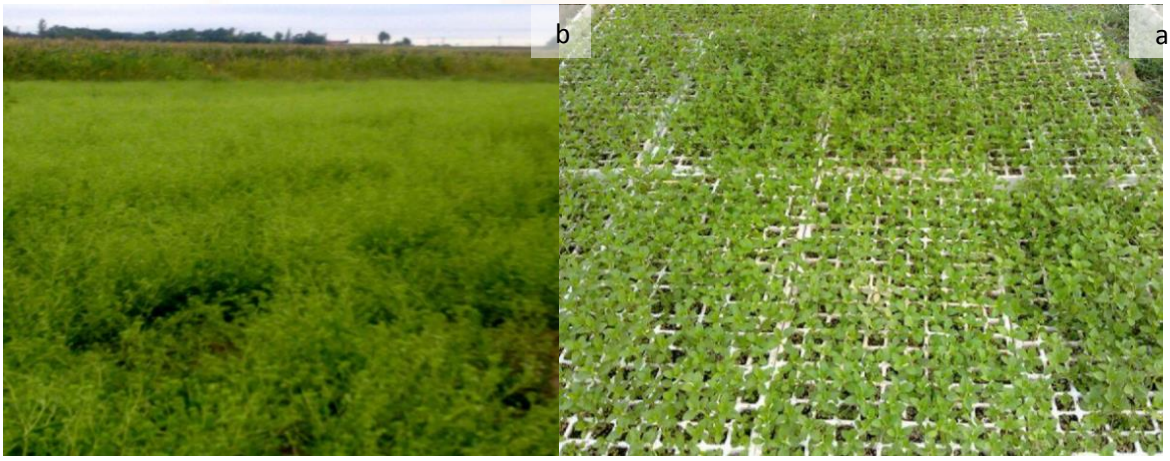
وجود سیتوکنین در محیط کشت برای القاء تولید جوانه جانبی در ریز نمونه ها ضروری بود و در بین سیتوکنین های استفاده شده در این مطالعه BAP نسبت به KIN در جهت القاء تولید جوانه جانبی موفق تر عمل کرد (جدول ۱) درصد ساقه زایی با افزایش غلظت BAPتا یک میلی گرم در لیتر افزایش پیدا کرد ولی در غلظت های بالاتر از یک میلی گرم میزان تولید ساقه کاهش پیدا کرد. اثر بازدارنده غلظت های بالای BAP در تولید ساقه در *Pterocarpus marsupium* نیز گزارش شده است(Chand and Singh, 2004). اثر رضایت بخش BAP روی ساقه زایی در گیاهان دارویی در مقایسه با سایر سایتوکنین های معمول مورد استفاده در کشت بافت توسط سایر پژوهشگران نیز گزارش شده است (Chand and Singh, 2004). به منظور افزایش تعداد شاخه جانبی، ریزنمونه های جوانه جانبی در محیط کشت MS حاوی غلظت های مختلف BAP و KIN هر کدام در ۵ سطح کشت شده بودند. نتایج نشان داد که در بین غلظت های مختلف استفاده شده، میزان یک میلی گرم در لیتر BAP بهترین غلظت هورمونی برای القاء درصد جوانه زنی متعدد (۱۶٪) با تعداد ساقه بدست آمده بالایی (۱۶/۸) در هر محیط کشت بود داده ها در سطح ۵ ٪تفاوت معنی داری بایکدیگر نشان دادند (جدول۲). در بین دو سیتوکنین بکار برده شده در این مطالعه BAP نتایج بهتری نسبت به KIN در القاء تولید بیشتر جوانه جانبی در جهت تولید انبوه گیاه استویا نشان داد. تعداد جوانه جانبی در هر کشت با افزایش غلظت BAP تا یک میلی گرم در لیتر افزایش پیدا کرد. نتایج بدست آمده با نتایج گزارش شده توسط Sivaram, and Mukunda, مشابه بود(2003). لازم به ذکر هست که اثر BAP روی القاء تولید جوانه های متعدد توسط محققان در سایر گیاهان دارویی نیز بررسی شده و نتایج مشابه گزارش شده است (Purohit, et al. 1994 و Komalavalli, and Rao, 2000). نتایج مطالعه حاضر همچنین به وضوح نشان می دهد که در محیط کشت حاوی ترکیب BAP با IAA بیشترین تعداد ساقه تولید شد، که هیچ کالوسی نیز در این محیط کشت مشاهده نشد در حالیکه ترکیب BAP با IBA و BAP با NAA باعث تولید کالوس شد. Nunes و همکاران (۲۰۰۲) نشان دادند که BAP در ترکیب با غلظت های پایین اکسین بیشترین تاثیر را در پرشاخه شدن ریزنمونه های کشت دارند. بیشترین درصد ریشه زایی (۱۳٪) در محیط کشت MS ½ حاوی ۱/۵ میلی گرم در لیتر NAA بدست آمد و بیشترین تعداد ریشه (۱۲/۳) نیز در این ترکیب محیط کشت بدست آمد (شکل۱). با افزایش میزان NAAمیزان ریشه دهی نیز در محیط کشت MS ½ افزایش پیدا کرد. نتایج حاصل با نتایج گزارش شده توسط Komalavalli and Rao(۲۰۰۰) مشابه بود. شایان ذکر هست که میزان ریشه زایی در غلظت های بالای ۱/۵ میلی گرم در لیتر IBA و NAA و غلظت بالای ۱ میلی گرم در لیتر IAA کاهش پیدا کرد. در واقع در بالاترین غلظت اکسین (۲ میلی گرم در لیتر) ریشه زایی کاملاً متوقف شد و کالوس تشکیل گردید(جدول۳)که نتایج بدست آمده در این تحقیق نتایج پژوهشگران قبلی را تایید کرد (Anitha and Pullaiah, 2002) نمونه های ریشه دار شده با موفقیت به سینی

IrHC2019

های رشد حاوی بستر مناسب برای رشد گیاهچه ها منتقل شدند. سطح هر سینی رشد به منظور جلوگیری از هدر رفت رطوبت گیاهچه ها پوشیده شد بعد از گذشت دو هفته نمونه ها به گلخانه منتقل شدند(شکل1a) نمونه های به مدت یک ماه در گلخانه رشد کرده و سپس به مزرعه منتقل شدند که در شکل ۲ مزرعه استویا را یک سال بعد از انتقال گیاهچه ها به مزرعه نشان می دهد (شکل 1b). نتایج طرح حاضر در واقع مستقیم و همزمان با تولید انبوه گیاهچه ها وارد فاز تجاری شد و در طول یک سال گیاهچه های لازم برای کشت در مزرعه یک هکتاری تولید گردید.

جدول ۱: اثر غلظت های مختلف BAP و KIN روی جوانه زنی گیاهچه های استویای به دست آمده از محیط کشت ساقه

هورمون سیتوکنین(mg/l)		درصد القاء جوانه متعدد	تعداد جوانه جانبی
BAP	KIN		
۰/۵		۸۲	^{b} ۹/۷
۱		۹۶	^{a} ۱۶/۸
۱/۵		۹۲	^{a}۱۲/۳
۲		۷۲	^{b} ۹/۵۸
۳		^{d}۶۸/۶	^{d} ۵/۵۷
	۰/۵	۸۱	^{d}۴/۲
	۱	۶۲	^{e} ۳/۷
	۱/۵	^{d} ۶۸/۱	^{e}۳/۵
	۲	^{d} ۶۲/۲	^{e} ۳/۲۵
	۳	۵۰	^{f}۲/۵



شکل ۱: گیاهچه های آداپته شده استویا در گلخانه(a) و مزرعه استویا بعد از یک سال انتقال گیاهچه ها به زمین (b)

IrHC2019

جدول ۲: اثر غلظت ها و ترکیبات مختلف هورمون اکسین روی ریشه زایی استویا در محیط درون شیشه ای

مقدار هورمون اکسین (mg/l)	میانگین درصد ریشه زایی (/.)	میانگین تعداد ریشه	میانگین طول ریشه (cm)
NAA+ ½MS			
۰/۱	b۷۹	c۵	c ۵/۷
۰/۳	b۷۹	b۹/۴	c ۶/۸
۰/۵	a۹۳	b ۱۲/۳	b ۹/۷۳
NAA+ MS			
۰/۵	b۸۵	a ۹/۳	b ۷/۱
۱	d۵۹	d۴/۶	c ۵/۳
۲	تشکیل کالوس	۰	۰
IAA+ MS			
۰/۵	c۷۲	d ۴/۷	c ۵/۴
۱	b۷۹	c۵/۹	c ۶/۵
۲	تشکیل کالوس	۰	۰
IBA+MS			
۰/۵	d۶۷	c۵/۴	c۶/۱
۱	e۴۱	d ۴/۳	d ۴/۳
۲	تشکیل کالوس	۰	۰

منابع

Anitha, S., Pullaiah, T., 2002. In vitro propagation of Decalepis hamiltonii. Journal of Tropical Medicinal Plants 3:227–232

Chalapathi, M.V., Thimmegowda, S., 1997. Natural non-calorie sweetener Stevia (Steviarebaudiana Bertoni) a future crop of India. Crop. Res. Hisar 14 (2), 347–350.

Chand, S., Singh, A.K., 2004. In vitro shoot regeneration from cotyledonary node explants of a multipurpose leguminous tree, Pterocarpus marsupium Roxb. InVitro Cell. Dev. Biol. Plant 40, 167–170.

Komalavalli, N., Rao, M.V., 2000. In vitro micropropagation of Gymnema sylvestre – a multipurpose medicinal plant. Plant Cell Tissue Organ Cult. 61, 97–105

Mehta J., Sain M., Sharma D.R., Gehlot P., Sharma P. and Dhaker J.K., 2012. Micropropagation of an Anti-diabetic Plant- Stevia rebaudiana Bertoni, (Natural Sweetner) in Hadoti Region of South-East Rajasthan , India, ISCA J. Of Bio. Sci., 1(3), 37-42

Nunes, E., Cathiho, C.V., Moreno, F.N., Viana, A.M., 2002. In vitro culture of Cedrela fissillis vellozo (Mieliaceae). Plant Cell Tissue Organ Cult. 70, 259–268.

Purohit, S.D., Dave, A., Kukda, G., 1994. Micropropgation of safed musli (Chlorophytum borivilianum), a rare medicinal herb. Plant Cell Tissue Organ Cult. 39,93–96

Sivaram, L., Mukundan, U., 2003. In vitro culture studies on Stevia rebaudiana. Cell. Dev. Biol. Plant 39, 520–523.

IrHC2019

Cost Effective Invitro Propagation Of Antidiabetic Medicinal Plant, *Stevia Rebaudiana* For Commercial Application In Iran

Sara Ghahramanzadeh[1], Hashem Rahmani[1], Somayeh Mottagh[1], Leila Koohi[1], Farzan Lahoot[1], Robab Ghahramanzadeh[1]*

[1]Islamic Azad university , Ardabil branch

Corresponding author : ghahramanzadeh9@gmail.com ❋

Abstract

In order to introduce the most appropriate and cost effective media for in vitro propagation of Stevia this study was established in Islamic Azad university , Ardabil branch. The effect of different types of PGRs (KIN (0.5, 1, 1.5,2 , 3.0 mg/l) and BAP (0.5, 1, 1.5,2 , 3.0 mg/l) individually in different growth media (MS, B5) were standardized to get the enhanced in vitro multiplication of Stevia. For large scale plant production, in vitro derived nodal bud explants were cultured on MS medium fortified with 1.0 mg/l BAP,in which about 192 shoots/explant were obtained after four subcultures on the same media composition. The rooted plantlets were successfully transferred into plastic cups containing perlite, peat moss and soil which had been sterilized in advance and subsequently established in the greenhouse and open filed. Considering the cost of in vitro plant production is an obstacle for its access to farmers, in the present investigation we were able to develop a cost effective in vitro micropropagation protocol for exotic medicinal plant Stevia which can reduce cost of the medium without compromising the production. This will greatly enhance availability of Stevia planting at an affordable cost which will boost its production.

Key words: Stevia, Tissue culture, Commercial production

IrHC2019