پرآوری گیاه استویا (*Stevia rebaudiana* Bertoni) با استفاده از تکنیک کشت بافت

صغرا رضایی گنجه[۱]، مریم دهستانی اردکانی [۲]، کاظم کمالی [۳]

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه اردکان

[۲] استادیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه اردکان

[۳] استادیار دانشکده منابع طبیعی دانشگاه یزد

*نویسنده مسئول: soghra.rezaii91@gmail.com ، kkamali@yazd.ac.ir ، mdehestani@ardakan.ac.ir

چکیده

در پژوهش حاضر کشت بافت گیاه استویا در محیط کشت پایه MS با استفاده از BA در ۶ سطح (صفر، ۰/۱، ۰/۲، ۰/۳، ۰/۴ و ۰/۵ mg/l) و IBA در ۴ سطح (صفر، ۰/۰۲۵، ۰/۰۵ و ۰/۱ mg/l) هرکدام در ۱۰ تکرار در قالب طرح کاملاً تصادفی اجرا شد. ریشه‌دار شدن قلمه‌ها در این آزمایش هم در شرایط *In vitro* و هم در In vivo انجام شد. جهت ریشه‌دار شدن قلمه‌ها در شرایط In vivo، قلمه‌ها در لیوان‌های کوچک شفاف پلاستیکی حاوی IBA ۱۰ mg/l در ۴ زمان متفاوت (۰، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) و هرکدام در ۶ تکرار قرار گرفتند و پس‌ازآن به گلدان‌های حاوی پیت موس و پرلایت به نسبت ۳:۱ منتقل شدند. نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که بیشترین تعداد ساقه در محیط کشت حاوی BA ۰/۳ mg/l بود. بیشترین طول ساقه در محیط کشت فاقد BA و بیشترین تعداد برگ در محیط کشت حاوی BA ۰/۴ mg/l مشاهده شد. همین‌طور در شرایط درون شیشه، بیشترین تعداد و طول ریشه در محیط کشت فاقد IBA به دست آمد. بیشترین تعداد قلمه‌های ریشه‌دار شده در شرایط *in vivo* در محلول IBA در مدت‌زمان ۷۲ ساعت حاصل شد و حدود ۷۰٪ گیاهان ریشه‌دار شده سالم ماندند. با توجه به نتایج حاصله به نظر می‌رسد که شاخه‌زایی و ریشه‌زایی گیاه استویای مورد مطالعه بسیار بالاست به‌طوری‌که با کاربرد غلظت‌های پایین تنظیم‌کننده‌های رشدی امکان تکثیر آن در محیط درون شیشه‌ای وجود دارد.

***کلمات کلیدی:* استویا، پرآوری، کشت درون شیشه‌ای، BA، IBA**

مقدمه

استویا با نام علمی *Stevia rebaudiana* Bertoni یک گیاه علفی شیرین مزه و ضد دیابت از تیره Asteraceae می‌باشد (Aggarwal *et al.*, 2011؛ Altaf *et al.*, 2013). این گیاه با ارزش در حال حاضر به‌عنوان منبع قندی کم‌کالری و بدون ساکارز می‌باشد و می‌تواند جایگزین مناسبی برای شیرین‌کننده‌های مصنوعی مانند آسپارتام، ساخارین و سیکلامات باشد (Babber *et al.*, 2001). استویا هم به روش جنسی و هم غیرجنسی تکثیر می‌شود. استفاده از بذر برای تکثیر گیاه به دلیل درصد جوانه‌زنی پایین و عدم تولید گیاهان یکنواخت چندان مرسوم نمی‌باشد. موفقیت پایین تکثیر رویشی عامل اصلی محدودیت کشت آن در مقیاس وسیع است، بنابراین ریزازدیادی، که گیاهان یکنواخت از نظر ژنتیکی ایجاد می‌کند به‌عنوان یک تکنیک مناسب برای تکثیر سریع گیاه استویا می‌باشد که برای تولید تعداد زیادی گیاه در مدت‌زمان کوتاه استفاده می‌شود. عوامل متعددی بر موفقیت تکثیر درون شیشه‌ای گیاه تأثیر می‌گذارند که از مهم‌ترین آن‌ها اثرات تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی نظیر نوع و غلظت اکسین و سایتوکنین بر تشکیل شاخساره و ریشه می‌باشد (Babber *et al.*, 2001).

Ojha و Chadhary (۲۰۱۳)، بهترین شرایط رشد جهت پرآوری گیاه استویا را بررسی کردند. بیشترین میزان شاخساره (۱/۴±۹/۰)، در محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP به دست آمد و بیشترین میزان ریشه‌زایی

(۱۰۰٪) در محیط کشت حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر IBA حاصل شد. نتایج حاصل از پژوهش انجام شده توسط Singh و همکاران (۲۰۱۲)، به‌منظور پرآوری ریزنمونه‌های گره استویا روی ۴ نوع محیط کشت پایه تکمیل شده با اکسین‌ها و سایتوکنین‌های متفاوت نشان داد که بیشترین میزان پرآوری شاخساره (۴/۱±۲۳/۲) در محیط کشت MS تکمیل شده با ۲ میلی‌گرم بر لیتر IAA و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر کینتین به دست آمد. به‌منظور القاء و ریشه‌زایی این قلمه‌های پرآوری شده به محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر IBA انتقال داده شد و نهایتاً حدود ۹۸٪ از قلمه‌ها ریشه‌دار شدند.

در پژوهش حاضر، غلظت‌های مختلف بنزیل آدنین (BA) و ایندول ۳- بوتریک اسید (IBA) به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر پرآوری گیاه استویا مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

به‌منظور تعیین بهترین نوع تنظیم‌کننده رشد و غلظت هورمونی، جوانه‌های جانبی استویا روی محیط کشت MS جامد حاوی ۳۰ گرم ساکارز و ۷ گرم بر لیتر آگار و سطوح مختلف بنزیل آدنین (۰/۱ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر) کشت شدند، pH محیط کشت روی ۵/۸ – ۵/۷ تنظیم شد. ریزنمونه‌های جوانه جانبی بدون برگ به طول ۱/۵- ۱ سانتی‌متر از ساقه گیاه مادری تهیه شدند. پس از ضدعفونی ریزنمونه‌های جوانه در زیر هود لامینار کشت شدند. سپس نمونه‌ها به اتاقک رشد با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و نور سفید ۲۵۰۰- ۲۰۰۰ لوکس با ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی به مدت ۳۰ روز منتقل شدند. ریزنمونه‌های مورد نیاز از گیاهچه‌های ۳۵ روزه حاصل از کشت ریزنمونه جوانه در محیط کشت MS حاوی بنزیل آدنین با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر تهیه شد. سپس ریزنمونه‌های جوانه با برگ تهیه شده به‌منظور شاخه‌زایی در محیط کشت MS حاوی سطوح مختلف بنزیل آدنین (۰، ۰/۱، ۰/۲، ۰/۳، ۰/۴ و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر) با ۱۰ تکرار در هر محیط و هرکدام حاوی یک ریزنمونه کشت گردیدند. ریشه‌دار شدن قلمه‌ها در این آزمایش هم در شرایط درون شیشه (*In vitro*) و هم در In vivo انجام شد. ریزنمونه‌های تقریباً ۳ سانتیمتری حاصل از پرآوری جهت ریشه‌زایی در محیط‌های کشت MS حاوی سطوح مختلف ایندول ۳- بوتریک اسید (۰، ۰/۰۲۵، ۰/۰۵ و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر) در ۱۰ تکرار در هر محیط و هرکدام حاوی یک ریزنمونه کشت شدند و به اتاقک رشد به مدت ۳۰ روز منتقل شدند. جهت بررسی ریشه‌زایی در محیط خاکی یا ریشه‌زایی مستقیم، ریز قلمه‌های ایجادشده به تعداد ۲۴ عدد گیاه موردنظر انتخاب و قلمه‌های تهیه شده این گیاهان داخل لیوان‌های کوچک شفاف پلاستیکی حاوی ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر ایندول ۳- بوتریک اسید در ۴ زمان متفاوت (۰، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) و هرکدام حاوی ۶ تکرار و هرکدام حاوی یک قلمه قرار داده شدند و سپس قلمه‌ها به گلدان‌های حاوی پیت موس و پرلایت به نسبت ۳:۱ انتقال داده شدند. گلدان‌های حاوی قلمه به مدت ۴ روز به تاریکی منتقل شدند و پس از ۴ روز بلافاصله به اتاقک رشد با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و درجه حرارت محیط حدود ۲۵ درجه سانتی‌گراد انتقال داده شدند و ریشه‌زایی آن‌ها در این شرایط به مدت ۳۰ روز مورد بررسی قرار گرفت که در این روش سازگاری و ریشه‌زایی در یک مرحله انجام شد. در نهایت تعداد شاخه، طول شاخه، تعداد برگ، تعداد ریشه، طول ریشه و درصد ریشه‌زایی نمونه‌ها مورد ارزیابی قرار گرفتند. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۱۰ تکرار صورت گرفت. آنالیز داده‌ها توسط نرم‌افزار آماری SAS انجام شد. هم‌چنین مقایسه میانگین سطوح تیمارها و عوامل مورد آزمایش با استفاده از آزمون چند دامنه‌ی دانکن در سطح احتمال ۵٪ انجام شد و از نرم‌افزار اکسل برای رسم نمودارها استفاده گردید.

نتایج و بحث

نتایج مقایسه میانگین تیمارهای اعمال شده نشان داد که بیشترین تعداد شاخساره در محیط کشت MS حاوی ۰/۳ mg/l و ۰/۱ BA حاصل شد که با گیاهان کشت شده در ۰/۲ mg/l BA اختلاف معنی‌دار نداشتند. همچنین محیط کشت حاوی ۰/۴ mg/l و ۰/۵ BA دارای کمترین میزان تعداد شاخساره بود (جدول ۱). بیشترین طول شاخساره در محیط کشت MS فاقد BA حاصل شد (جدول ۱). با توجه به نتایج به دست آمده بیشترین تعداد برگ در محیط کشت حاوی ۰/۳ mg/l BA به دست آمد همان‌گونه که با افزایش تعداد شاخساره تعداد برگ‌ها افزایش می‌یابد (جدول ۱). بیشترین تعداد شاخه در محیط کشت MS حاوی ۰/۳ میلی‌گرم بر لیتر BA به دست آمد (جدول ۱).

جدول ۱- مقایسه میانگین سطوح مختلف BA بر تعداد و طول شاخساره و تعداد برگ گیاه استویا کشت شده در شرایط درون شیشه

BA (mg/l)	تعداد شاخساره	طول شاخساره (cm)	تعداد برگ
۰	۲/۶(bc)	۴/۰۱(a)	۱۰/۳(bc)
۰/۱	۴(a)	۱/۶۶(b)	۱۶/۷۱(ab)
۰/۲	۳/۷(ab)	۱/۶۷(b)	۷/۵۳(c)
۰/۳	۴/۲(a)	۱/۵(b)	۱۹/۰۹(a)
۰/۴	۲/۴(c)	۱/۷۹(b)	۶/۹۹(c)
۰/۵	۲/۱(c)	۱/۶۱(b)	۷/۸۴(c)

یکی از وظایف اصلی سایتوکنین در کشت بافت، انگیزش شاخه‌های نابجا است (Green *et al*., 1990). با توجه به نتایج به دست آمده بنزیل آدنین شایع‌ترین سایتوکنین مورداستفاده در محیط کشت بافت گیاهان است و به‌تنهایی موجب باززایی و افزایش تعداد شاخساره در گیاه استویا می‌شود (Singh *et al*., 2012). با توجه به نتایج به دست آمده بیشترین طول شاخساره در محیط کشت فاقد بنزیل آدنین بود و با افزایش غلظت بنزیل آدنین طول شاخه‌ها کاهش یافت.

نتایج حاصل از ریشه‌زایی در شرایط درون شیشه‌ای:

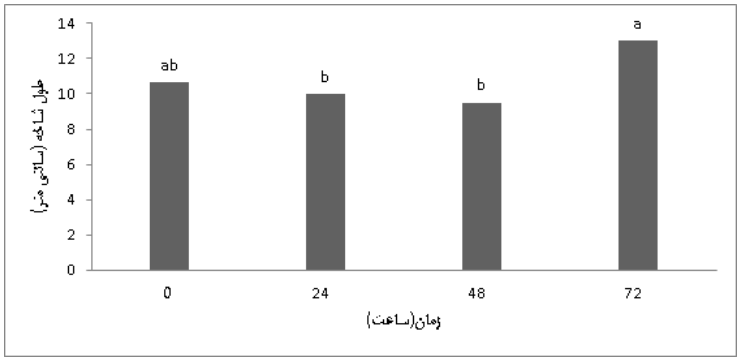
بر اساس نتایج به دست آمده بیشترین طول ریشه در محیط کشت بدون IBA و ۰/۰۵ mg/l IBA به دست آمد. هم‌چنین کمترین طول ریشه در محیط کشت حاوی ۰/۰۲۵ mg/l و ۰/۱ IBA بدست آمد (جدول ۲).

جدول ۲- مقایسه میانگین سطوح مختلف IBA بر تعداد و طول ریشه گیاه استویا کشت شده در شرایط درون شیشه

IBA (mg/l)	تعداد ریشه	طول ریشه (cm)
۰	۹(a)	۳/۴۸(a)
۰/۰۲۵	۴/۲(bc)	۲/۲۵(b)
۰/۰۵	۶/۷(ab)	۳/۱۲(a)
۰/۱	۳/۸(c)	۱/۸۹(b)

برای ریشه‌دار کردن شاخه‌های استویا غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های اکسینی گزارش شده است به‌طوری‌که بیشترین میزان ریشه‌زایی را در محیط MS با حضور ۱ میلی‌گرم بر لیتر هورمون NAA گزارش شد (Aamir et al., 2010). با توجه به نتایج به دست آمده، بیشترین تعداد و طول ریشه در محیط‌های کشت بدون IBA به دست آمد و با افزایش غلظت IBA درصد ریشه‌زایی به‌طور معنی‌دار کاهش یافت. گزارش شده است که افزایش غلظت IBA سبب افزایش ریشه‌زایی قلمه برخی از گیاهان می‌گردد، ولی در این پژوهش افزایش IBA هیچ‌گونه اثر مثبتی بر ریشه‌زایی جوانه‌های کشت شده استویا نداشت.

نتایج مقایسه میانگین تیمارها نشان داد که بیشترین طول شاخه زمانی حاصل شد که از محیط کشت حاوی IBA به مدت ۷۲ ساعت استفاده شد. همچنین کمترین طول شاخه در محیط کشت حاوی IBA که در آن به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت استفاده شد، بدست آمد و حدود ۷۰٪ از گیاهان ریشه‌دار شده و به‌طور کامل سازگار شدند (شکل ۱).



شکل ۱- اثر مدت‌زمان نگه‌داری قلمه‌ها در محلول IBA بر طول شاخه در مرحله سازگاری گیاه استویا

IBA به‌طورمعمول برای تحریک آغازش ریشه هم در کشت‌های درون شیشه و هم در قلمه‌ها مورداستفاده قرار می‌گیرد. IAA در محیط کشت بافت سریعاً تحت تجزیه نوری قرار می‌گیرد؛ درحالی‌که تجزیه نوری IBA به‌آرامی صورت می‌گیرد، حرکت کند IBA در داخل بافت و همچنین تخریب دیرهنگام آن می‌تواند دلیل اصلی کارایی بهتر این اکسین در مقایسه با IAA و NAA باشد (هاسمن، ۲۰۰۳). آنچه از مشاهدات برمی‌آید نشان می‌دهد که مدت‌زمان قرارگیری قلمه‌های گیاه استویا در ۷۲ ساعت در حضور اکسین IBA با وجود ثابت بودن غلظت این هورمون در تمام زمان‌ها نسبت به سایر قلمه‌ها بهتر جواب داده است و این نشان‌دهنده تأثیر مثبت اکسین IBA بر ریشه‌زایی قلمه استویا است و موجب افزایش طول ساقه قلمه‌ها گشته است. بر طبق نتایج به دست آمده، بیشترین افزایش ارتفاع قلمه (طول شاخه) در نمونه‌های تیمار شده با IBA به مدت ۷۲ ساعت و در بستر پرلایت و پیت ماس (۱:۳) به دست آمد.

منابع

Aamir A, Irum G, Shagufta N, Shahid A (2010). Biochemical investigation during different stages of in vitro propagation of Stevia rebaudiana. Pakistan J. Bot. 42: 2827-2837.

Aggarwal A, Singh N, Yadav K (2011). Influence of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi on survival and development of micropropagated Acorus calamus L. during acclimatization. Int. J. Agri. Technol. 7(3): 775-781.

Altaf T, Amin S, Singh S, Kaloo ZA (2013). Micropropagation of medicinally important plant species of family asteraceae– a review. Int. J. Recent Scientific Research. 4 (8): 1296- 1303.

Arteca RN (1996). Plant Growth Substances: Principles and Applications. Japan: International Thomson Publishing Asia, pp 332-338.

Babber, S, Mittal K, Ahlawat R, Varghese T (2001). Micropropagation of Cardiospermum halicacabum. Biol. Plant. 44: 603-606.

Das A, Gantait S, Mandal N (2011). Micropropagation of an Elite Medicinal Plant: *Stevia rebaudiana* Bert. Int. J. Agric. Research. 6: 40-48.

George EF, Hall MA, De Klerk GJ (2008). Plant Propagation by Tissue Culture. 3rd Edition, (eds.), Springer. pp 175–281.

Green JF, Muir RM (1979). An analysis of the role of Potassium in the growth effects of cytokinin, light and abscisic acid on cotyledon expansion. Physiol Plant. 46: 19- 24.

Hausman, J. F. 2003. Changes in peroxidase activity, auxin level and ethylene production during root formation by poplar shoots raised in vitro. Plant Growth Regul. 13(3): 263-268.

Jagatheeswari D, Ranganathan P (2012). Studies on Micropropagation of *Stevia rebaudiana* Bert. Int. Pharmaceutical & Biolo. Archives. 3: 315-320.

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, Sci Hortic. 119: 315-319.

Jena AK, Pande MK, Nayak S (2009). Effect of phytoregulators on in vitromass production of *Stevia rebaudiana* (Bert.), Int. j. Integrative Biology. 8: 156-163.

Ojha A, Chadhary R (2013). Callus development and indirect shoot regeneration from leaves and stem explants of *Stevia rebaudiana* Bertoni. J. Cell and Tiss. Research. 13 (2): 3755-3759.

O'Riordain F (1987). The effects of benzyladenine, indole butyric acid and gibberellic acid on the micropropagation of the strawberry cultivar Clonard. Common of the European communities, 47-53.

Richard, N-Arteca. 1996. Plant Growht Substances Principles and Applications. Originally published by Chapman & Hall .323p.

Singh S, Garg V, Yadav D, Beg MN (2012). *In vitro* antioxidative and antibacterial activities of various parts of *Stevia rebaudiana* Bertoni. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. ISSN- 0975-149.

Proliferation of Stevia Plant (*Stevia rebaudiana* Bertoni) by Tissue Culture Techniques

Soghra Rezaei ganjeh[1], Maryam Dehestani ardakani[2], Kazem Kamali[3]

**Corresponding author:*

Abstract

In this study, tissue culture of stevia plant in MS medium consisted of 6 concentrations of BA (0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 mg·l^{-1}) and 4 concentrations of IBA (0, 0.025, 0.05, 0.1 mg·l^{-1}) was done, each treatment consisted of 10 replications were performed as a completely randomized design. Rooting of cuttings was studied both in *in vitro* and *in vivo* situations. For rooting experiments, cuttings were transferred to small clear plastic cups containing 10 mg·l^{-1} IBA for four different times (0, 24, 48, 72 hours) in six replications were investigated. Then plants were transferred to peat Moss and perlite pots by the ratio of 1: 3. According to the results, the most number of stems obtained in the medium contained 0.3 mg·l^{-1} BA. The highest length of stems obtained in medium without BA and the most number of leaves observed in medium contained 0.4 mg·l^{-1} BA. In *in vitro* situation, the most number and length of roots obtained in a medium without IBA. The most numbers of rooted cuttings was obtained in IBA solution after 72 hours and about 70% of rooted cuttings were healthy. According to the results it was seems that producing root and shoots in stevia plant is extremely high, so its proliferation is possible by low concentrations of plant growth regulators in *in vitro* culture.

***Key words*: Stevia, Proliferation, *In vitro* culture, BA, IBA**