ریزازدیادی گیاه دارویی استویا (Stevia rebaudiana Bertoni) به منظور تولید انبوه

سیده محبوبه یوسفی شیاده1، ویدا چالوی2*، ستاره زنگی3
دانشجوی کارشناسی ارشد1، استادیار2 گروه باغبانی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، صندوق پستی 578، ساری، مازندران، 3
کارشناس ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی شرکت اولین سبزآوران خزر، محمودآباد
v.chalavi@sanru.ac.ir

چکیده

بر اساس آمارهای موجود، بیماری نوع 2 دیابت به دلیل شیوه زندگی و تغذیه مردم در سراسر دنیا در حال افزایش است. استویوزاید یک شیرین کننده‌ای طبیعی و بدون کالری است که از برگ گیاه دارویی استویا (Stevia rebaudiana Bertoni) از خانواده Asteraceae بدست می‌آید، می‌تواند جایگزین مناسبی به جای قند معمولی در رژیم غذایی بیماران دیابتی باشد. بذرهای استویا قدرت جوانه زنی بسیار پایینی دارند از این رو یکی از بهترین راه‌های ازدیاد استویا ، استفاده از کشت بافت گیاهی می باشد. در پژوهش حاضر اثر چندین ترکیب تنظیم کننده های رشد گیاهی بر روی شاخه زایی و ریشه زایی استویا مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که محیط شاخه زایی حاوی 5 میلی‌گرم در لیتر بنزل آمینو پورین (BAP) به اضافه نیم میلی‌گرم در لیتر ایندول بوتریک اسید(IBA) و یک میلی‌گرم در لیتر ژیبرلیک اسید (GA3)، برای شاخه زایی مناسب است. هر ریزنمونه، پس از یکماه، قرار داشتن در محیط فوق، بین 10 تا 15 شاخه تولیدنمود. از طرف دیگر، وقتی نفتالین استیک اسید (NAA)، جایگزین IBA شد هر ریز نمونه فقط بین 2 تا 5 شاخه تولید نمود . شاخه های تولید شده در محیط 1/2موراشیگ و اسکوک (MS) و بدون هیچگونه تنظیم کننده رشد پس از مدت 10روز ریشه دار شدند. این گیاهان در مرحله سازگاری به محیط حاوی 50٪پیت و 50٪پرلایت منتقل و بوسیله کیسه‌های پلاستیکی پوشانده شدند. پوشش‌های پلاستیکی پس از هفته اول باز شدند و در پایان هفته دوم کاملا برداشته شدند. بیش از 95٪ گیاهان سازگار شده به هوای آزاد در اتاق کشت به رشد خود ادامه دادند.

کلمات کلیدی: استویا، ریزازدیادی، تنظیم کننده‌های رشد گیاهی

مقدمه

استویا (Stevia rebaudiana Bertoni.) گیاهی علفی ،چند ساله ،روز کوتاه ودیپلویید (2n=22) می باشد که نتایج بررسی ها بیانگر این است که گلیکوزیدهای دی ترپنی به نام استویوزاید عامل اصلی ایجاد طعم شیرینی در عصاره برگ استویا می‌باشد (Gardana و همکاران 2010). روش‌های ازدیاد استویا از طریق قلمه ساقه و بذر می باشد. به دلیل خود ناسازگاری گل ها، بذر های استویاقدرت جوانه زنی پایینی دارند (Hwang و همکاران 2006). از طرف دیگر، تکثیر استویا از طریق قلمه گرفته شده از گیاهان مسن کار دشواری است. از این رو با توجه به مشکلات فوق، استفاده ازکشت بافت گیاهی و ریزازدیادی بهترین راه برای ازدیاد سریع وانبوه استویا در مدت زمان کوتاه و هزینه کمتر می باشد . گیاهان تولید شده در شرایط کشت بافت را نمی‌توان مستقیما به گلخانه انتقال داد و باید یک مرحله تدریجی سازگار شدن با محیط هوای آزاد را طی کنند. انتقال گیاهچه‌ها به گلخانه یکی از مهمترین قدم‌ها در ریز ازدیادیست که در آن گیاه از نظر فیزیولوژیکی ،ریختی و آناتومی، خود را با محیط بیرون سازگار کند. هدف پژوهش حاضر، مقایسه ترکیب‌های گوناگون تنظیم کننده رشد گیاهی برای بهینه سازی تولید انبوه گیاه دارویی استویا از طریق کشت بافت و نحوه سازگار نمودن گیاهچه‌ها با محیط هوای آزاد می باشد.

مواد و روش ها

این آزمایش در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری در سال 1391به منظور تولید انبوه گیاهچه های استویا از طریق کشت بافت انجام شد.گیاهچه های مادری استویا به کمک خانم مهندس ستاره زنگی از شرکت سبزآوران خزر (محمودآباد، مازندران)تهیه شدند. برای ازدیاد شاخساره ها از محیط کشت بافت گیاهی موراشیگی و اسکوک (MS) حاوی 1 mg/l ژیبرلیک اسید (GA3)،5 mg/l بنزل آمینو پورین (BAP) و 0/ 5 mg/l از یکی از اکسین‌های ایندول بوتریک اسید (IBA) و یا نفتالیک استیک اسید (NAA)، به اضافه 30 گرم در لیتر ساکاروز که با 7 گرم در لیتر آگار جامد شده بود استفاده شد. از محیط MS 1/2 و بدون هیچگونه تنظیم کننده رشد برای ریشه زایی شاخه های تولید شده استفاده شد. پس از اینکه طول شاخه ها به 4 تا 5 cm رسیدند، به محیط حاوی ریشه زایی منتقل شدند. زمانی‌که ریشه‌ها تا حدی قهوه‌ای رنگ شدند، گیاهچه‌های ریشه‌دار شده از شیشه‌های کشت به آرامی بیرون آورده شده و پس از شستشو با آب مقطر برای حذف آگار باقی مانده روی ریشه‌ها به گلدان های پلاستیکی حاوی پیت و پرلایت با نسبت (1:1) منتقل شدند. آبیاری همراه با کوددهی (Fertigation) به میزان نیم گرم در لیتر کود سوپر گرین (20-20-20)NPK تا حد اشباع صورت گرفت. گلدان‌ها برای حفظ رطوبت بیشتر با کیسه‌های پلاستیکی پوشانده شدند. این گیاهان در اتاقی با دمای 25c، رطوبت نسبی 60-80٪ ، فتوپریود 16 ساعت روشنایی و 8ساعت تاریکی و با شدت نور بین 2000-3000 لوکس نور سفید فلورسنت نگه‌داری شدند. در پایان هفته اول کیسه‌های پلاستیکی به منظور تبادل رطوبت با محیط بیرون باز شدند و در هفته دوم پلاستیک‌ها هر دو روز در میان به مدت 1یا2 ساعت باز شده تا گیاهان به آرامی با شرایط بیرون سازگار گردند. در پایان هفته دوم، پلاستیک‌ها به طور کامل برداشته شدند و گیاهان به رشد خود در اتاق کشت ادامه دادند. بعد از 4هفته گیاهان به گلدان‌های 4لیتری که حاوی خاک باغچه، خاک برگ و ماسه بادی با نسبت (1:1:1) و شرایط محیطی گلخانه منتقل شدند.

نتایج و بحث

طبق نتایج بدست آمده، بیشترین شاخه‌های تولید شده و بیشترین میزان زنده بودن انها (90٪) از ریز نمونه ها کشت شده در محیط کشت MS حاوی 5 mg/l بنزل آمینو پورین (BAP)، 0/ 5 mg/l ایندول بوتریک اسید (IBA) و 1 mg/l ژیبرلیک اسید (GA3) بدست آمد (شکل 1). در بین تیمارها، بیشترین تعداد شاخه تولید شده از هر ریز نمونه، طول شاخه‌ها و تعداد برگ های تولید شده مشابه نتایج Satpathy و همکاران (2010) بود. بیشترین میزان تشکیل ریشه ها در تیمار 5 میلی گرم در لیتر بنزل آمینو پورین بود و کاربرد نفتالین استیک اسید باعث کاهش القای ریشه ها گردید. در این آزمایش کاربرد اکسین IBA برای ریشه دهی بیشتر از NAA در ریشه زایی و رشد ریشه در استویا موثر بود. در پژوهشی دیگر، Srivastava (2005) نشان داد که وجود نیم میلی گرم در لیتر ژیبرلیک اسید در محیط کشت باعث طویل شدن ساقه و تعداد برگ در استویا شد. با توجه به یافته های این پژوهش و گزارش های سایر محققان پیشنهاد می شود که در جهت بهتر شدن ریشه زایی و افزایش طول شاخه ها در گیاه استویا از اکسین IBA همراه با تیمار ژیبرلیک اسید استفاده شود.

شکل 1. ریزازدیادی گیاه دارویی استویا، از راست به چپ: (A) گیاهچه‌های تولید شده در محیط حاوی اکسین IBA، (B) گیاهچه-های تولید شده در حضور NAA، (C) گیاهچه‌های قرار گرفته شده در محیط ریشه‌زایی ،(D) گیاهچه‌های منتقل شده به گلدان پلاستیکی همراه با پوشش پلاستیکی ، (E) گیاهان سازگارشده در محیط بیرون و (F) انتقال به گلدان 4لیتری .

گیاهچه‌های ریشه دار شده به گلدان پلاستیکی محتوی پیت و پرلایت با نسبت (1:1) منتقل شدند و کوددهی به میزان نیم گرم در لیتر همراه با آبیاری انجام شد و 95٪ گیاهان با موفقیت سازگار شدند. گیاهان سپس به گلدان‌های 4لیتری که حاوی نسبت مساوی خاک باغچه ، خاک برگ و ماسه بادی بودند به گلخانه منتقل شدند و همه گیاهان در شرایط گلخانه‌ای زنده ماندند. این گیاهان دارای رشد قوی و بدون تنوع فنوتیپی بودند. در بسیاری از گونه‌ها کاهش زنده ماندن گیاهان در طول مرحله سازگار شدن مربوط به استفاده از غلظت بالای IBA و NAA در محیط ریشه زایی می‌باشد (Al- Maarri et al., 1994). زمانی که گیاهان در خارج از محیط کشت بافت و در شرایط رطوبت بالا قرار می‌گیرند، سنتز لایه مومی اپی کوتیکول زیاد می‌شود که باعث افزایش بقای گیاهان در طول مرحله سازگارشدن می‌گردد. در مدت سازگاری گیاهچه‌ها باید جذب آب و املاح را به همراه افزایش سرعت فتوسنتز بالا رفته و میزان رطوبت به تدریج کاهش یابد که گیاهان بتوانند تولید برگ‌های نو نموده و لایه مومی خود را توسعه دهند و از دست دادن آب کاهش یابد (Hazarika.,2003). در این پژوهش، به کمک بهینه سازی شرایط محیط کشت بافت و سازگارسازی به محیط طبیعی، تولید انبوه گیاه دارویی استویا با موفقیت انجام شد.

منابع

Al-Maarri, K., Y. Arnaud and E. Miginiac. 1994. Micropropagation of Pyrus communis cultivar Passe Crassane seedlings and cultivar Williams: factors affecting root formation In vitro and Ex vitro. Sci. Hortic. Amsterdam, 58: 207-214.

Gardana, Claudio., Scaglianti, Martina., Simonetti, Paolo. (2010). Evaluation of steviol and its glycosides in Stevia rebaudiana leaves and commercial sweetener by ultra-high-performance liquidchromatography-mass spectrometry. Journal of Chromatography A. 1217. 1463-1470

Hazarika, B.N., 2003. Acclimatization of tissue-cultured plants. Current Sci., 85: 1704-1712.

Hwang S.J. 2006. Rapid in Vitro Propagation and Enhanced Stevioside Accumulation in Stevia rebaudiana Bert. Journal of Plant Biology; 49(4) : 267-270.

Satpathy S. and M. Das. 2010. In vitro shoot multiplication in stevia rebaudiana.,a medicinally important. General and Applied Plant Physiology –, Volume 36 (3–4), pp. 167–175.

Srivastava, L.M., 2005. Plant Growth andDevelopment: Hormones and Environment. Academic, Press, An imprint of Elsevier, San Diego, pp: 172-188.

Micropropagation of medicinal plant Stevia (Stevia rebaudiana Bertoni) for mass production

S.M. Yosefi1, V. Chalavi2*, S. Zangi3

1, 2, Departmet of Horticulture, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University,Sari, Iran, PO-Box 578.

3, Avalin Sabz-Avaran Khazar Co. Mahmoud-Abad, Iran.

v.chalavi@sanru.ac.ir

Abstract:

Based on available statistics, type 2 diabetic diseases are increasing worldwide due to people's life style and diets. Stevioside, a natural calorieless sweetener obtained from the leaves of medicinal plant stevia (Stevia rebaudiana Bertoni.) Asteraceae family, could be a good substitute for regular sugar in diabetic patients diets. Stevia seeds germination rate is very low, therefore, the best propagation method for Stevia is using plant tissue culture. In the present study, the effect of different combinations of plant growth regulators on Stevia shoot and root formation was evaluated. The results showed that medium containing 5 mg/l Bnzl amino purine (BAP), 0,5 mg/l indole butric acid (IBA) and 1 mg/l giberlic acid (GA3), was optimum for shoot formation. After one month on this medium, each explants produced 10 to 15 shoots. On the other hand, when IBA was replaced by naphthaline acetic acid (NAA), each explant produced only 2 to 5 shoots. Produced shoots were cultured on 1/2 strength MS medium without any growth regulators and rooted after 10 days. For acclimatization, these plants were transferred to medium containing 50% peat and 50% perlite and covered with plastic bags. Plastic covers were opened after the first week, and they were completely removed at the end of second week. More than 95% of acclimatized plants continued to grow in growth chamber.

Keywords; stevia, micropropagation, plant growth regulators.