اثر تنظیم‌کننده‌های رشد و نانوذره آهن بر میزان رشد گیاه دارویی استویا (*Stevia rebaudiana*Bertoni) در شرایط درون شیشه‌ای

مریم چاله‌چاله[۱]، عاطفه پورجبار*[۲]، فرشاد فلاح[۳]، شهاب خوش‌خوی[۴]

[۱]دانش‌آموخته کارشناسی ارشد گیاهان دارویی، مؤسسه عالی جهاد دانشگاهی کرمانشاه

[۲] استادیار گروه گیاهان دارویی مؤسسه عالی جهاد دانشگاهی کرمانشاه

[۳] استادیار گروه گیاهان دارویی مؤسسه عالی جهاد دانشگاهی کرمانشاه

[۴] مدیرگروه گیاهان دارویی مؤسسه عالی جهاد دانشگاهی کرمانشاه

نویسنده مسئول: Atefeh_pourjabar@yahoo.com

چکیده

به‌منظور بررسی اثر تنظیم‌کننده‌های رشد و نانوذره آهن بر صفات مورفولوژی در گیاه دارویی استویا (*Stevia rebaudiana* Bertoni) در شرایط درون شیشه‌ای آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار در آزمایشگاه کشت بافت گیاهی مؤسسه آموزش عالی جهاد دانشگاهی کرمانشاه اجرا شد. تیمارها شامل نانوذره آهن در سه سطح (شاهد، ۵ و ۱۵ میلی‌گرم بر لیتر) و محیط کشت با سطوح مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد IAA و Kin در چهار محیط کشت مختلف (۱ میلی‌گرم بر لیتر Kin و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر IAA)، (۱ میلی‌گرم بر لیتر Kin و ۱ میلی‌گرم بر لیتر IAA)، (۱ میلی‌گرم بر لیتر Kin و ۲ میلی‌گرم بر لیتر IAA) و (۲ میلی‌گرم بر لیتر Kin و ۲ میلی‌گرم بر لیتر (IAA) بودند. صفات مورد ارزیابی در این آزمایش وزن تر و خشک گیاهچه اندازه‌گیری شد. بررسی مقایسات میانگین اثرات متقابل این دو تیمار نشان داد که بیشترین وزن تر گیاهچه (۱/۷۳ گرم) در محیط کشت M1 (۱ میلی‌گرم بر لیتر کینیتین و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر اندول استیک اسید) همراه با تیمار ۱۵ میلی‌گرم بر لیتر نانوذره آهن مشاهده شد.

واژه‌های کلیدی: استویا، تنظیم‌کننده، رشد، متابولیت ثانویه

مقدمه

گیاهان دارویی به دلیل توأم بودن ماهیت طبیعی و وجود ترکیبات همولوگ دارویی در آن‌ها، با بدن انسان سازگاری بهتری داشته و معمولاً فاقد عوارض ناخواسته داروهای شیمیایی هستند؛ لذا شناسایی و بررسی ترکیبات شیمیایی این گیاهان به درمان آسان‌تر و ارزان‌تر بیماری‌ها کمک نموده و نیز از خارج شدن بخشی از ثروت کشور برای وارد ساختن این‌گونه کالاها یا فرآورده‌های آن‌ها، جلوگیری به عمل می‌آید .استویا با نام علمی (*Stevia rebaudiana*Bertoni) گیاهی بوته‌ای، کوتاه قد، پایا و چندساله متعلق به خانواده آفتاب‌گردان[۸] است. برگ‌ها حاوی ترکیبات استویوزید، ربادیوزید A، B، C، D، E، F، دایکوزید A، استویول‌بیوزید و روبوزوزاید می‌باشند و در بین گلیکوزیدهای دی‌ترپنوئید، استویوزید و ربادیوزید A از اهمیت بیشتری برخوردار می‌باشند (مهرگان و همکاران، ۱۳۹۶). کشت بافت در حقیقت دست‌کاری رشد گیاه در شرایط دقیقاً کنترل شده است و اکسین‌ها و سیتوکنین‌ها از اهمیت ویژه‌ای در این دست‌کاری برخوردار هستند (معینی و کهریزی، ۱۳۸۲). ازآنجاکه تولید استویا از طریق بذر، نشاکاری، قلمه و کشت بافت انجام می‌شود، بنابراین، مقایسه‌ی ترکیبات این گیاه ارزشمند در شرایط مختلف رشدی از اهمیت و جایگاه ویژه‌ای برخوردار است (زارعی و همکاران، ۱۳۹۷). براین‌اساس، باتوجه‌به اهمیت گیاه دارویی استویا ازیک‌طرف و نظر به اینکه کشت بافت گیاهی روشی مفید و مؤثر در تولید این گیاه است از طرف دیگر و همچنین با درنظرگرفتن اهمیت بسیار زیاد اکسین‌ها، سیتوکنین‌ها و نیز نانوالیسیتورها برای پیشبرد اهداف کشت بافت گیاهی، در این پژوهش، اثر تنظیم‌کننده‌های رشد کینیتین و ایندول استیک اسید و نیز نانوذره آهن بر میزان رشد و ترکیبات ثانویه در گیاه دارویی استویا (*Stevia rebaudianaBertoni*) در شرایط درون شیشه‌ای مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش

[8] **Asteraceae**

این تحقیق به‌منظور تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد و الیسیتور نانوذره آهن بر صفات مورفولوژی گیاه استویا در سال ۱۳۹۸ در آزمایشگاه کشت بافت پارک علم و فناوری کرمانشاه به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار و دو فاکتور تنظیم‌کننده‌های رشد IAA و kin به شرح جدول ۱ به اجرا درآمد. تیمارها شامل نانوذره آهن در سه سطح (شاهد، ۵ و ۱۵ میلی‌گرم بر لیتر) و محیط کشت با سطوح مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد IAA و Kin در چهار محیط کشت مختلف (۱ میلی‌گرم بر لیتر Kin و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر IAA)، (۱ میلی‌گرم بر لیتر Kin و ۱ میلی‌گرم بر لیتر IAA)، (۱ میلی‌گرم بر لیتر Kin و ۲ میلی‌گرم بر لیتر IAA) و (۲ میلی‌گرم بر لیتر Kin و ۲ میلی‌گرم بر لیتر IAA) بودند. برای تهیه ریز نمونه‌ها از سرشاخه‌های جوان گیاهان گلدانی استفاده شد. ضدعفونی ریز نمونه‌ها به ترتیب با الکل ۷۰ درصد به مدت ۳۰ ثانیه و در ادامه با هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد به مدت ۱۵ دقیقه و حداقل سه بار شستشو انجام گرفت. از ریز نمونه تک گره به‌منظور کشت بافت استفاده شد و ریز نمونه‌ها در محیط کشت MS به همراه ساکارز به میزان ۳۰ گرم در لیتر و آگار به میزان ۸ گرم در لیتر با غلظت‌های ارائه شده در جدول ۱ کشت شد. pH تمام محیط‌های کشت بین ۵/۶ تا ۵/۸ تنظیم شده و در اتوکلاو با دمای ۱۲۱ درجه‌ی سانتی‌گراد برای مدت ۲۰ دقیقه سترون شد. صفات مورد بررسی شامل وزن تر و خشک گیاهچه بود. برای اندازه‌گیری وزن تر، پس از توزین گیاهچه‌های موجود در شیشه‌های مختلف توسط ترازوی دیجیتالی، میانگین وزن آن‌ها به‌عنوان وزن تر گیاهچه در هر تکرار ثبت گردید. جهت اندازه‌گیری وزن خشک گیاهچه ابتدا گیاهچه‌های تر در آون با دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت خشک شده و سپس وزن خشک آن‌ها توسط ترازوی دیجیتالی اندازه‌گیری و ثبت شد. میانگین وزن آن‌ها به‌عنوان وزن خشک گیاهچه در هر تکرار ثبت گردید. پس از اطمینان از نرمال بودن داده‌ها، تجزیه واریانس با استفاده از نرم‌افزار spss و مقایسات میانگین داده‌ها آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال یک و پنج درصد صورت پذیرفت. رسم نمودارها و جداول به ترتیب در محیط Excel و Word رسم گردید.

جدول ۱- ترکیب محیط‌های کشت مورداستفاده

محیط کشت	ترکیبات هورمونی	
	کینیتین (mg/lit)	ایندول استیک اسید (mg/lit)
A	۱	۰/۵
B	۱	۱
C	۲	۱
D	۲	۲

نتایج و بحث

وزن تر و خشک گیاهچه

باتوجه‌به جدول تجزیه واریانس (جدول ۱) اثر غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد (کینیتین و اندول استیک اسید) و اثر نانوذره آهن بر روی وزن تر گیاهچه در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار می‌باشد و همچنین اثر متقابل این دو بر روی این صفت در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار بود. اثر این دو تیمار بر روی صفت وزن خشک گیاهچه معنی‌دار نبود.

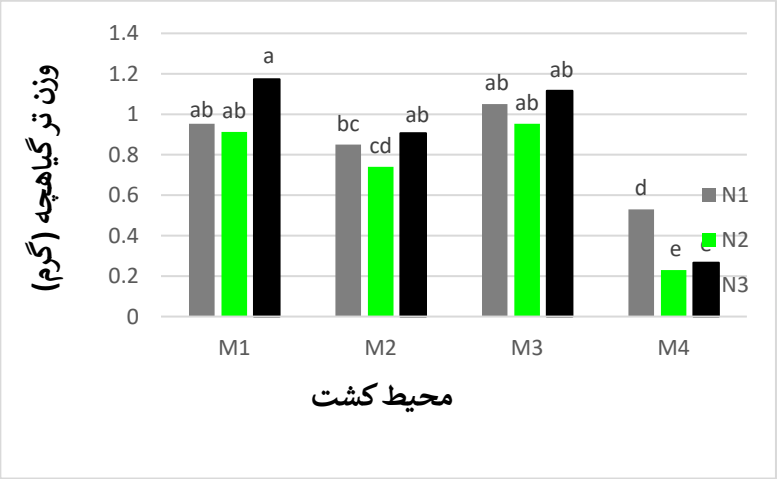
بررسی مقایسات میانگین اثرات متقابل این دو تیمار نشان داد که بیشترین وزن تر گیاهچه (۱/۷۳ گرم) در محیط کشت M1 (۱ میلی‌گرم بر لیتر کینیتین و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر اندول استیک اسید) همراه با تیمار ۱۵ میلی‌گرم بر لیتر نانوذره آهن مشاهده شد (شکل ۱) و کمترین وزن تر (۰/۲۳ گرم) در تیمار ۲ میلی‌گرم بر لیتر کینیتین و ۲ میلی‌گرم بر لیتر اندول استیک اسید همراه با ۵ میلی‌گرم بر لیتر نانوذره آهن به دست آمد. آهن یکی از عناصر ضروری و کم‌مصرف موردنیاز گیاهان بوده و از فراوان‌ترین عناصر پوسته‌ی زمین به شمار می‌رود. pH خاک مهم‌ترین عامل مؤثر بر قابلیت جذب آهن است. گیاهان در بین همه‌ی ریزمغذی‌ها، بیشترین نیاز را به آهن دارند. آهن بخشی از گروه کاتالیزوری بسیاری از آنزیم‌های اکسیداسیون و احیاء است و برای سنتز کلروفیل موردنیاز است. اگرچه آهن در ساختار کلروفیل نقش مستقیمی ندارد ولی وجود آهن کافی، سبب بهبود کلروفیل سازی در گیاه می‌گردد و وضعیت کلروفیل گیاه نیز

می‌تواند بر میزان فتوسنتز آن تأثیر بگذارد (پیوندی و همکاران، ۱۳۹۳). کمبود آهن موجب کاهش میزان کلروفیل شده، درنهایت رنگ سبز برگ‌ها به زردی متمایل می‌شود که این پدیده کلروز نام دارد. اولین علائم کمبود آهن در برگ‌های جوان ایجاد می‌شود. آهن عنصری کم‌تحرک است بنابراین، در برگ‌های پایینی گیاه تجمع می‌یابد؛ لذا برگ‌های پایینی سبز و براق هستند. افزایش آهن ممکن است با کاهش محتوای کلروفیل و یا فتوسنتز همراه شده باشد و بدین ترتیب به کاهش رشد منتهی گردد (پیوندی و همکاران، ۱۳۹۰).

در تحقیقی که درویش‌زاده و همکاران (۱۳۹۴) در خصوص تأثیر نانوذره‌های بر جوانه‌زنی ریحان انجام دادند، نتایج حاصله نشان داد که کاربرد نانوذرات نقره در بهبود صفات جوانه‌زنی و رشد گیاهچه گیاه دارویی ریحان تأثیر مثبتی داشته است. همچنین، عیسوند و همکاران (2010) گزارش دادند که هورمون پرایمینگ با جیبرلین، اکسین و سیتوکینین منجر به افزایش صفات جوانه‌زنی و رشد گیاهچه بروموس شد.

جدول ۱- تجزیه واریانس صفات اندازه‌گیری شده

منابع تغییر	درجه آزادی	وزن تر گیاهچه (گرم)	وزن خشک گیاهچه (گرم)
تکرار	۲	0.019^{ns}	0.042^{ns}
محیط کشت	۳	0.938^{**}	0.012^{ns}
نانوذره آهن	۲	0.088^{**}	0.017^{ns}
محیط کشت*نانوذره آهن	۶	0.32^{*}	0.024^{ns}
اشتباه آزمایشی	۲۲۰	۰,۰۱۱	۰,۰۲۲
ضریب تغییرات Cv%		۱۲,۹	۲۵



شکل ۱- میانگین اثرات متقابل غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد (کینیتین و اندول استیک اسید) و نانوذره آهن بر روی صفت وزن تر گیاهچه.

نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج مطالعه‌ی حاضر اثر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی (کینیتین و اسید ایندول استیک) بر همه‌ی صفات مورد ارزیابی در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار می‌باشد. نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان بیشترین وزن تر گیاهچه، در محیط کشت حاوی (۱ میلی‌گرم بر لیتر Kin و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر IAA) همراه با ۱۵ میلی‌گرم بر لیتر نانوذره آهن مشاهده شد. درنهایت این اثرات به ترکیب، غلظت، اندازه، خواص فیزیکی و شیمیایی نانوذرات و همچنین گونه‌ی گیاهی، مرحله‌ی رشدی گیاه، روش و مدت‌زمان قرارگرفتن در معرض آن‌ها بستگی دارد.

منابع

پیوندی، م.، پرنده، ه. و میرزا، م. ۱۳۹۰. تأثیر نانو کلات آهن با کلات آهن بر پارامترهای رشد و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان ریحان (*Ocimum Basilicum*). مجله تازه‌های بیوتکنولوژی سلولی – مولکولی. ۱ (۴): ۸۹-۹۸.

درویش زاده، ف.، نجات زاده، ف. و ایرانبخش، ع.۱۳۹۴ .تأثیر نانو ذره نقره بر تحمل به شوری گیاه ریحان (*Ocimum basilicum*)در مراحل جوانه زنی در شرایط آزمایشگاهی مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی – مولکولی. ۵ (۲۰): ۷۰-۶۳.

زارعی، م.، دژستان، س. و بهنامیان، م. ۱۳۹۷. بهینه‌سازی ریزازدیادی گیاه دارویی تجاری استویا (Steviav rebaudiana) از طریق کشت درون شیشه‌ای ریز نمونه رأس شاخه، نشریه پژوهش‌های تولید گیاهی، ۲۵ (۳): ۴۰-۲۷.

معینی ا. و کهریزی، د. ۱۳۸۲. کشت بافت گیاهی. انتشارات بسیج دانشجویی تهران.

مهرگان، محمد.، مهرآفرین، ع.، لبافی، م. و نقدی‌بادی، ح. ۱۳۹۶. اثر غلظت‌های مختلف محرک زیستی کیتوزان بر خصوصیات بیوشیمیایی و مورفوفیزیولوژیکی گیاه استویا (*Stevia rebaudiana* Bertoni). فصلنامه گیاهان دارویی، ۱۶ (۲):۱۸۲-۱۶۹.

The effect of growth regulators and iron nanoparticle Growth of *Stevia rebaudiana*Bertoni under *invitro* condition

Maryam Chalechale, Atefe Pourjabar*[1], Farshad Fallah, Shahab Khoshkhoy
[1]*Corresponding Author: Atefeh_pourjabar@yahoo.com*

Abstract

To investigate the effect of growth regulators and iron nanoparticles on growth and secondary metabolites of *Stevia rebaudiana* Bertoni under invitro condition, a factorial experiment based on a Random, completely blocked design with three replications was implemented in the plant tissue culture laboratory at Kermanshah Science & Technology Park. Treatments included iron nanoparticle at tree levels (control, 5, 10 mg/l Iron nano elicitor) and four different levels of growth regulators IAA and Kin [(1mg/l Kin and 0.5 mg/l IAA), (1mg/l Kin and 1 mg/l IAA), (1mg/l Kin and 2 mg/l IAA), (2mg/l Kin and 2 mg/l IAA)] in Morashik and Skog media. seedling fresh and dry weight was measured. Comparison of means showed that most of the studied traits had better results in media culture with (1mg/l Kin and 0.5 mg/l IAA) the highest fresh weight of seedlings in media culture with (1mg/l Kin and 0.5 mg/l IAA) with 15 mg /l iron nanoparticles.
Keywords: Growth, Regulator, Secondary metabolites and Stevia.