Journal of Medicinal Plants, 4(3): 311-318: Summer 2015
DOI: doi/code

زیست فناوری گیاهان داروئی
جلد٤، شماره ٣، سال ٢٠١٥

بررسی اثرات هورمون‌های رشد اکسین و سیتوکینین برای تولید کالوس و باززایی گیاه دارویی استویا

اسامی نویسندگان: عقیلی سیده نفیسه ، دکتر نصر نسرین ، دکتر کاظمی تبار سید کمال
آدرس نویسندگان: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری - کیلومتر 9 جاده فرح آباد
* نویسنده مسئول: عقیلی سیده نفیسه

چکیده

استویا با نام علمی Stevia rebaudiana Bertoni دارای منبع گلیکوزیدهای دی‌ترپن از جمله استویوزید و گلیکوزید که حدود ۱۰۰ تا ۳۰۰ برابر شیرین‌تر از شکر می‌باشد. به علت درصد جوانه‌زنی پایین بذور استویا، می‌توان از تکنیک کشت بافت را برای تکثیر این گیاه با ارزش کمک گرفت. پژوهش حاضر با هدف مطالعه تاثیر تنظیم کننده‌های رشد گیاهی اکسین و سیتوکینین بر کالوس‌زایی و باززایی گیاه استویا به صورت آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح کاملا تصادفی در آزمایشگاه اصلاح نباتات دانشگاه علوم کشاورزی ساری در سال ۹٤-۱۳۹۳ به اجرا در آمد. تیمارهای آزمایش القای کالوس شامل سه اکسین D، IBA-۲,٤ و NAA به همراه سیتوکینین BAP بود. تیمارهای آزمایش باززایی مبتنی بر کالوس شامل سه سیتوکینین BAP، Kin و TDZ به همراه اکسین NAA بود. نتایج نشان داد که ترکیب، نسبت و غلظت تنظیم کننده‌های رشد روی صفات مختلف در کالوس‌زایی و باززایی گیاه استویا ربادیانا موثر است. همچنین نتایج این تحقیق نشان داد که صفات مختلف کالوس‌زایی و باززایی مانند درصد القای کالوس، وزن تر کالوس، قطر کالوس، درصد باززایی و تعداد نوساقه تولید شده در هر ریزنمونه، می‌توانند تاثیرات متفاوتی از تنظیم کننده‌های رشد گیاهی بگیرند.

کلید واژه‌ها: استویا، کالوس، باززایی، سیتوکینین، اکسین

مقدمه

امروزه در سرتاسر جهان تمایل افراد براي استفاده از محصولات طبيعي در حال افزايش است. همچنين امروزه سبک زندگي نيز تغيير نموده و در چهار يا پنج دهه اخير شيرين کننده‌ها (شيرين کننده‌هاي با کالري پايين و با قدرت بالا مثل آسپارتام و يا با کالري بالاي طبيعي ناشي از شکرها) و شيريني‌ها بخش عمده رژيم غذايي روزانه و طبيعي ما را تشکيل مي‌دهند. از طرف ديگر طبق آمار وزارت بهداشت دو ميليون نفر از افراد ۲۵ تا ۶۵ سال در ايران دچار بيماري ديابت هستند. بر اساس اين گزارش، سن ابتلا به اين بيماري در ايران ۱۰ تا ۱۵ سال کمتر از استاندارد جهاني بوده و بين ۴۵ تا ۵۵ سال است. در حالي که ديابت ششمين علت مرگ و مير در دنياست و به ميزان ۵ تا ۱۰ سال از عمر افراد کم مي‌کند. بنابراين امروزه بشر در پي جايگزيني شکر با موادي است که سلامتي را همراه با برآورده نمودن نيازش به ادامه رژيم غذايي روزانه تامين نمايد و در اين ميان بيماراني که با اين مشکل دست و پنجه نرم مي‌کنند نيز در جستجوي دارويي طبيعي براي رفع هميشگي اين مشکل مي باشند. در اين ميان استفاده از ترکيبات دارويي مشتق از گياهان، نه تنها قدمت زيادي دارد، بلکه به دليل عوارض جانبي بي‌شمار داروهاي شيميايي از يک سو و نارسايي‌هاي متعدد طب نوين در درمان برخي از بيماري‌ها با گذشت زمان، بار ديگر پرورش و توليد گياهان دارويي را با رشد قابل توجهي مواجه ساخته است (اميد بيگي، ۱۳۷۹).

گیاه استویا (Stevia rebaudiana) یکی از ۱۵٤ تا بیش از ۲۰۰ گونه گیاهی متعلق به جنس Stevia و از نباتات بومی کشور پاراگوئه است. این گیاه به علت ویژگی حائز اهمیت خود که در برداشتن شیرین کننده‌های طبیعی عاری از کالری است، می‌تواند ارائه دهنده راه حل موثر 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. اجرای گرده افشانی مصنوعی به عملکرد تولید بذر کمک می‌کند. در صورت در دست داشتن ارقام مرغوب می‌توان گیاه را به صورت قلمه یا ازدیاد کلونی در شرایط درون‌شیشه (in vitro) تکثیر نمود (آذرپور و همکاران، ۱۳۹۲).

جانارتانام و همکاران(2009) (Janarthanam et al.) به باززایی گیاه استویا از طریق کالوس‌های به دست آمده از ریزنمونه‌های برگ پرداختند. در مرحله نخست، قطعات گره و برگ گیاهان مادری به عنوان ریز نمونه در محیط کشت MS تیمار شده با غلظت های مختلف D-۲,٤ و نفتالین استیک اسید در ترکیب با ۲/۲۲ میکرومولار ٦-بنزیل آمینوپورین جهت ارزیابی میزان کالوس زایی قرار داده شدند. نتایج نشان داد که کاربرد هر دو تنظیم کننده رشد مذکور در القای تشکیل کالوس مؤثر است. همچنین مشخص شد که درصد کالوس زایی از ریز نمونه های به دست آمده از برگ بالاتر از ریز نمونه های حاصل از قطعات گره است. لذا بهتر است جهت کالوس زایی از ریز نمونه های برگ گیاه بهره گرفته شود.

مهتا و همکاران (Mehta et al 2012) غلظت های مختلف هورمون های سیتوکینین (٦-بنزیل آمینوپورین و کینتین) و اکسین (ایندول بوتیریک اسید و ٢,٤-D) را بر روی ریزازدیادی گیاه استویا از طریق نمونه های تهیه شده از گره ساقه در محیط کشت MS مورد ارزیابی قرار دادند. مقایسه میانگین داده‌های حاصل از آزمایش مربوط به اثر کاربرد هورمون های سیتوکینین بر شاخساره زایی گیاه استویا نشان داد که کاربرد ٢ میلی‌گرم در لیتر ٦-بنزیل آمینوپورین با افزایش ٨٠ درصدی میزان شاخساره زایی و حاصل نمودن بیشترین تعداد شاخساره در ریز نمونه ها عملکرد بهتری را در مقایسه با هورمون کینتین حاصل نمود. از طرف دیگر اثر متقابل کاربرد هورمون های سیتوکینین بر شاخساره زایی ریزنمونه های استویا پس از واکشت نشان داد که اثر متقابل کاربرد ٠/٥ میلی‌گرم در لیتر ٦-بنزیل آمینوپورین و ٠/٥ میلی‌گرم در لیتر کینتین در مقایسه با سایر تیمارها برتر بود. با توجه به نتایج آزمایش بالاترین درصد ریشه زایی در ریز نمونه ها از تیمار ٠/٥ میلی‌گرم در لیتر ایندول بوتیریک اسید به دست آمد.

اگر چه تاکنون بیش از ٥٠ فرمول براي محیط کشت ارائه شده است ولي عموما از محیط کشت MS (موراشیگ و اسکوگ، ١٩٦٢)(Murashige and Skoog) براي اکثر گونه‌ها استفاده مي‌شود و با اعمال تغییرات لازم و جزیی در این محیط کشت توانسته‌اند آن را براي دستیابی به اهداف ریزازدیادي سایر گیاهان به کار ببرند. دو گروه مهم شامل اکسین‌ها و سیتوکنین‌ها نقش اساسي را در مراحل مختلف بر عهده دارند و از ترکیبات مختلف این دو هورمون براي اعمال تغییرات مورد نظر در محیط کشت استفاده مي‌گردد (باجاج ، ١٩٩٨)(Bajaj et al).

مواد و روش‌ها

این پژوهش در آزمایشگاه اصلاح نباتات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری از آبان ماه سال ١٣٩٣ تا تیر ماه سال ١٣٩٤ به اجرا در آمد. مواد گیاهی مورد استفاده در این پژوهش شامل بوته‌های استویای رشد یافته در گلخانه آموزشی-پژوهشی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری بود (شکل ٣-١).

محیط کشت MS (موراشیگ و اسکوگ، ١٩٦٢) (Murashige and Skoog) یکي از مناسب‌ترین محیط‌هاي کشتي است که در کشت بافت گیاهي استفاده مي‌شود. به منظور سهولت در تهیه محیط کشت MS از محلول‌هاي مادري ذخیره‌اي استفاده گردید. محیط کشت MS شامل سه دسته مواد اصلي مواد غذایي پر مصرف (Macronutrients) مواد غذایي کم مصرف (Micronutrients) و ویتامین‌ها می‌باشد. هر کدام از این سه دسته مواد به صورت محلول مادري و با غلظت خاص آماده و جهت تهیه محیط کشت در یخچال نگهداری شد (جدول ٣-١).

آزمایش القای کالوس به منظور بررسی و مقایسه کالوس‌زایی در ریزنمونه میانگره حاصل از گیاه استویا تحت تاثیر سطوح مختلف تنظیم کننده های رشد گیاهی اکسین و سیتوکینین به صورت سه آزمایش جداگانه در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار اجرا شد:

الف) تنظیم کننده رشد D-٢,٤ در سه غلظت ٠/٥، ١ و ٢ میلی‌گرم در لیتر به تنهایی و در ترکیب با ٠/٥ میلی‌گرم در لیتر BAP

ب) تنظیم کننده رشد IBA در سه غلظت ٠/٥، ١ و ٢ میلی‌گرم در لیتر به تنهایی و در ترکیب با ٠/٥ میلی‌گرم در لیتر BAP

ج) تنظیم کننده رشد NAA در سه غلظت ٠/٥، ١ و ٢ میلی‌گرم در لیتر به تنهایی و در ترکیب با ٠/٥ میلی‌گرم در لیتر BAP

از محیط کشت MS بدون تنظیم کننده رشد به عنوان شاهد آزمایش استفاده شد. همچنین قابل ذکر است که آزمایش القای کالوس در شرایط تاریکی انجام شد. به همین منظور پتری‌دیش‌ها درون اتاقک رشد داخل فویل آلومینیومی قرار داده شدند تا از نفوذ نور به داخل آن جلوگیری شود.

صفات مورد اندازه گیری در آزمایش القای کالوس شامل درصد القای کالوس، وزن تر کالوس و قطر کالوس بودند.

به منظور باززایی غیر مستقیم (از طریق کالوس) سه آزمایش مختلف در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با سه تکرار به صورت زیر اجرا شد:

الف) تنظیم کننده رشد Kin در سه غلظت ١، ٢ و ٤ میلی‌گرم در لیتر به تنهایی و در ترکیب با ١ میلی‌گرم در لیتر NAA

ب) تنظیم کننده رشد BAP در سه غلظت ١، ٢ و ٤ میلی‌گرم در لیتر به تنهایی و در ترکیب با ١ میلی‌گرم در لیتر NAA

ج) تنظیم کننده رشد TDZ در سه غلظت ١، ٢ و ٤ میلی‌گرم در لیتر به تنهایی و در ترکیب با ١ میلی‌گرم در لیتر NAA

از محیط کشت بدون هورمون نیز به عنوان شاهد در آزمایش استفاده شد. صفات مورد بررسی در آزمایش باززایی شامل درصد باززایی و تعداد نوساقه باززا شده بودند.

قبل از انجام تجزیه واریانس، ابتدا نرمال بودن توزیع داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ١٩ (آزمون کلوموگروف- اسمیرنوف) بررسی شد. در صورت نرمال بودن توزیع داده‌ها، تجزیه واریانس و مقایسه میانگین به روش دانکن با استفاده از نرم‌افزار SAS نسخه ٩/١ انجام شد. اما چنانچه توزیع داده‌ها با توزیع نرمال تفاوت معنی‌داری داشته باشد، ابتدا آن‌ها را با استفاده از تبدیل داده رادیکالی، توزیع را تبدیل نموده و سپس تجزیه‌های بعدی بر روی آن‌ها صورت گرفت.

نتایج

مطالعه القای کالوس

در این بخش از پژوهش به مطالعه ترکیب و میزان تنظیم کننده‌های مختلف رشد سیتوکینین و اکسین بر صفات مختلف القای کالوس در گیاه استویا ربادیانا مورد مطالعه قرار گرفت که نتایج آن به تفکیک در ادامه ذکر شده است.

تاثیر تنظیم کننده‌های رشد D-٢,٤ و BAP

نتایج تجزیه واریانس صفات مرتبط با القای کالوس تحت تاثیر تنظیم کننده‌های رشد D-٢,٤ و BAP در گیاه استویا نشان داد که ترکیب هورمونی روی تمامی صفات اندازه گیری شده شامل درصد القای کالوس، وزن تر کالوس و قطر کالوس در سطح احتمال ١ درصد معنی دار بود (جدول ١).

نتایج مقایسه میانگین صفت درصد القای کالوس تحت تاثیر تنظیم کننده‌های رشد D-٢,٤ و BAP در گیاه استویا در شکل ٤-١ نشان داده شده است. همانطور که در این شکل دیده می شود، تنظیم کننده رشد D-٢,٤ به میزان ٢ میلی‌گرم در لیتر به تنهایی یا در ترکیب با BAP به ترتیب با میانگین ٨٣/٣٣ و ٩٠ درصد، دارای حداکثر میزان القای کالوس بود که اختلاف آماری معنی داری با هم نداشتند. همچنین کمترین میزان این صفت در تیمار شاهد (MS پایه) بود.

مقایسه میانگین وزن تر کالوس تحت تاثیر تنظیم کننده‌های رشد D-٢,٤ و BAP در گیاه استویا به صورت نمودار در شکل شماره ٢ آورده شده است. همانطور که در این شکل دیده می‌شود، تنظیم کننده رشد D-٢,٤ به میزان ٢ میلی‌گرم در لیتر با میانگین ٠/٨٧ گرم، دارای حداکثر وزن تر کالوس بود که 1mg/l 2,4-D, 0.5mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l BAP و 2mg/l 2,4-D + 0.5 mg/lBAP با اختلاف آماری معنی داری نشان نداد. کمترین میزان این صفت در تیمار شاهد (MS پایه) مشاهده شد.

نتایج مقایسه میانگین قطر کالوس تحت تاثیر تنظیم کننده رشد 2,4-D به میزان ٢ میلی‌گرم در لیتر با میانگین ١/٩٣ سانتی متر، دارای بیشترین قطر کالوس بود که با 2mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l BAP اختلاف آماری معنی‌داری نشان نداد. کمترین میزان قطر کالوس در تیمار شاهد (MS پایه) مشاهده شد

که با بقیه تیمارها اختلاف آماری نشان داد.

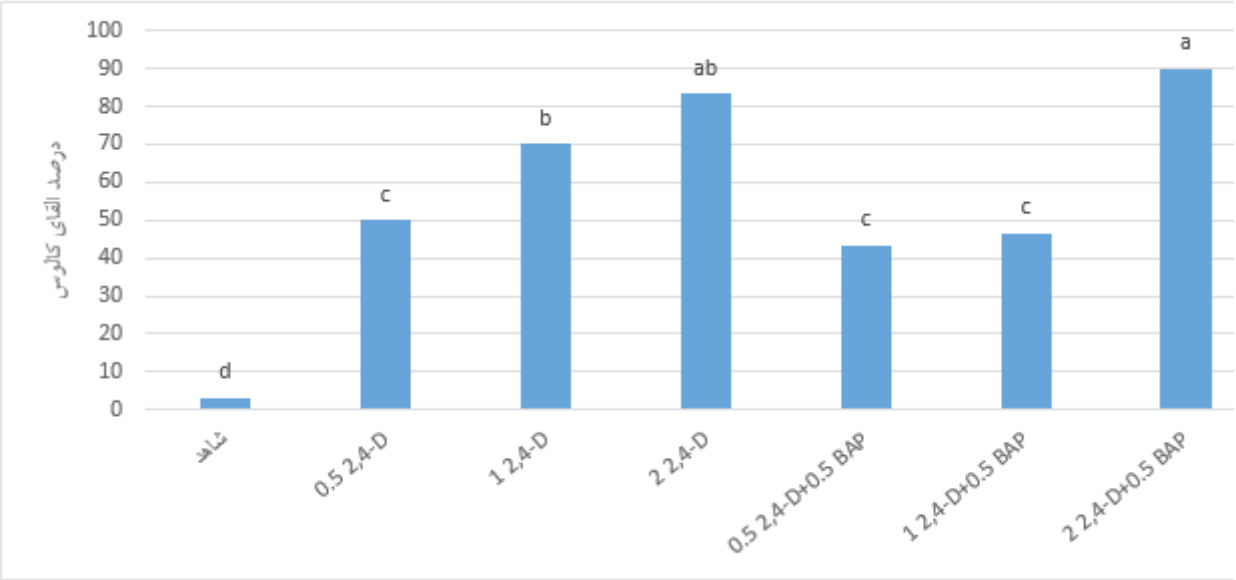
کاربرد اکسین D-٢,٤ تاثیر مثبتی روی ایجاد کالوس و حتی وزن تر و قطر کالوس نشان داد. تا جایی که با افزایش غلظت این اکسین، درصد القای کالوس و حتی وزن تر و قطر کالوس نیز افزایش می‌یافت. در این رابطه گوچان و همکاران(Gauchan et al)(2014) گزارش کردند که از بین غلظت های ١ تا ٦ میلی‌گرم در لیتر، درصد القای کالوس از غلظت ١ تا ٣ افزایش یافت و سپس رو به کاهش گذاشت که با نتایج این پژوهش همخوانی دارد.

با توجه به نتایج پژوهش حاضر به نظر می رسد که سیتوکینین BAP تاثیر اکسین D-٢,٤ را در برخی موارد کاهش داده است. علت این پدیده می‌تواند وجود سیتوکینین داخلی گیاه باشد.

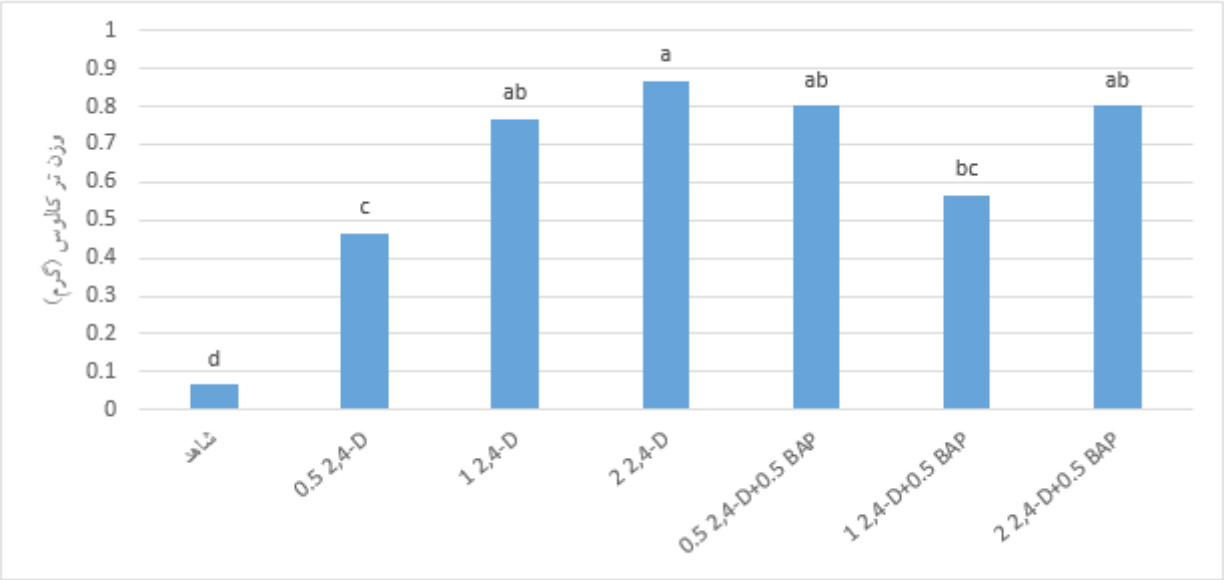
جدول ١- تجزیه واریانس (میانگین مربعات) صفات مرتبط با القای کالوس تحت تاثیر تنظیم کننده‌های رشد 2,4-D و BAP در گیاه استویا

منابع تغییرات	درجه آزادی	درصد القای کالوس	وزن تر کالوس	قطر کالوس
تیمار هورمونی	٦	٢٥٧٦/٢**	٠/٢٣٩**	٠/٩٢٨**
خطا	١٤	٦١/٩	٠/٠٢٤	٠/٠٥٦
CV ضریب تغییرات (٪CV)		١٤/٢٤	٢٤/٩٢	١٩/١١

** : معنی‌دار در سطح احتمال ١ درصد



شکل ١- نمودار مقایسه میانگین درصد القای کالوس تحت تاثیر تنظیم کننده‌های رشد 2,4-D و BAP در گیاه استویا



شکل ٢- نمودار مقایسه میانگین وزن تر کالوس تحت تاثیر تنظیم کننده‌های رشد 2,4-D و BAP در گیاه استویا

تاثیر تنظیم کننده‌های رشد IBA و BAP

نتایج تجزیه واریانس صفات درصد القای کالوس، وزن تر کالوس و قطر کالوس تحت تاثیر تنظیم کننده‌های رشد اکسین (IBA) و سیتوکینین (BAP) در گیاه استویا در جدول ۲ نشان داده شده است. همانطور که در جدول دیده می شود، ترکیب هورمونی روی تمامی صفات اندازه‌گیری شده در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود.

نتایج مقایسه میانگین درصد القای کالوس تحت تاثیر تنظیم کننده رشد IBA به میزان ۲ میلی‌گرم در لیتر به تنهایی یا در ترکیب با BAP با میانگین ۹۰ درصد، دارای حداکثر میزان القای کالوس بود که اختلاف آماری معنی داری با سایر تیمارها داشتند. همچنین در تیمار شاهد (MS پایه) هیچگونه کالوسی مشاهده نشد. به علاوه، با افزایش میزان IBA به همراه یا بدون BAP میزان القای کالوس افزایش یافت.

مقایسه میانگین وزن تر کالوس تحت تاثیر تنظیم کننده‌های رشد IBA و BAP در گیاه استویا در شکل ۲ نشان داده شده است. همانطور که در این شکل دیده می‌شود، تنظیم کننده رشد IBA به میزان ۲ میلی‌گرم در لیتر بدون یا به همراه BAP با میانگین ۰/۸ گرم، دارای حداکثر وزن تر کالوس بود که با 1mg/l IBA و 1mg/l IBA + 0.5mg/l BAP اختلاف آماری معنی داری نشان نداد. کمترین میزان این صفت در تیمار شاهد (MS پایه) مشاهده شد.

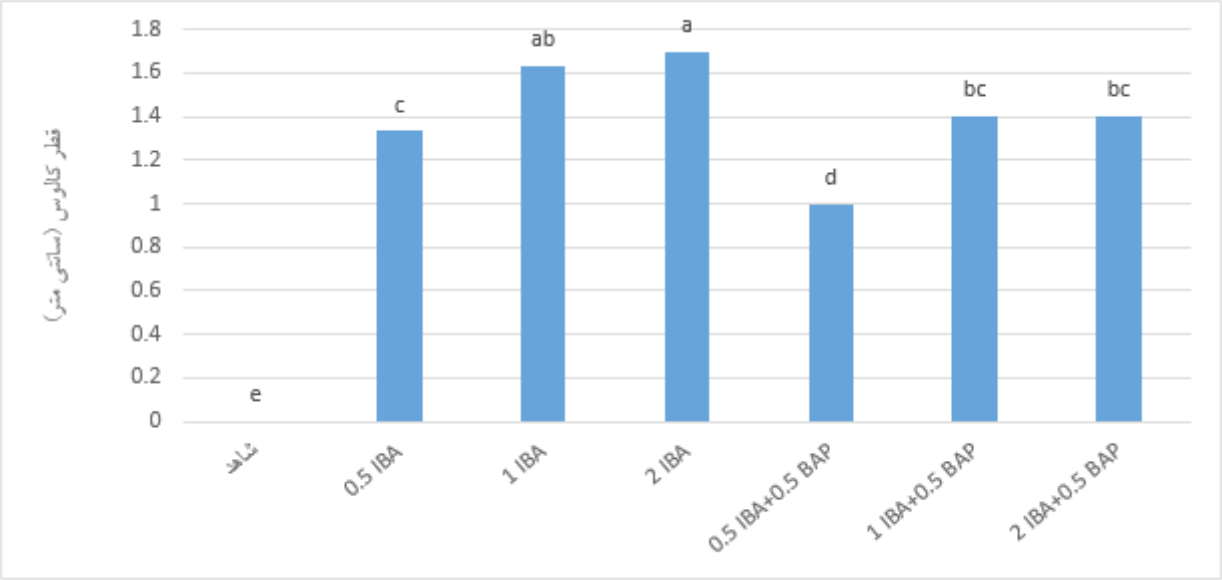
نتایج مقایسه میانگین صفت قطر کالوس تحت تاثیر تنظیم کننده‌های رشد IBA و BAP در گیاه استویا در شکل شماره ۳ آورده شده است. همان گونه که در این شکل دیده می‌شود، تنظیم کننده رشد IBA به میزان ۲ میلی‌گرم در لیتر با میانگین ۱/۷ سانتی‌متر، دارای بیشترین قطر کالوس بود که با ۱ mg/l IBA اختلاف آماری معنی‌داری نداشت. افزودن سیتوکینین BAP به غلظت‌های مختلف IBA موجب کاهش قطر کالوس نسبت به حالت بدون سیتوکینین شد.

استفاده از IBA به عنوان یک اکسین تاثیر مثبت و معنی داری روی درصد القای کالوس و وزن تر کالوس داشت. به طوری که با افزایش غلظت این اکسین، درصد القای کالوس و وزن تر نیز افزایش یافت. در حالی که افزودن BAP به غلظت‌های مختلف IBA موجب کاهش قطر کالوس نسبت به حالت بدون سیتوکینین شد که موجب کالوس‌هایی با وزن تر بالا و قطر کمتر شد. یعنی کالوس‌های متراکم‌تر که به نظر می‌رسد برای اهداف باززایی مناسب‌تر باشد. زیرا در کالوس‌های غیر متراکم به دلیل وجود غلظت بالای اکسین درونی، معمولا باززایی کمتری رخ می‌دهد. همچنین نتایج نشان داد که BAP تاثیری بر درصد القای کالوس و وزن تر آن تحت تاثیر غلظت های مختلف اکسین IBA بر خلاف اکسین D-۲,٤ نداشت که این امر میتواند نشان از واکنش بافت گیاه به نوع اکسین باشد و اهمیت نوع تنظیم کننده رشد را می‌رساند.

جدول ۲- تجزیه واریانس (میانگین مربعات) صفات مرتبط با القای کالوس تحت تاثیر تنظیم کننده‌های رشد IBA و BAP در گیاه استویا

منابع تغییرات	درجه آزادی	درصد القای کالوس	وزن تر کالوس	قطر کالوس
تیمار هورمونی	٦	٢٨٦٠/٣**	٠/٢٢٣**	١/٠١**
خطا	١٤	٤٧/٦١	٠/٠١٥	٠/٠٢٣
CV ضریب تغییرات (٪CV)		١٠/٩٧	٢٢/٣٤	١٢/٧٥

** : یعنی معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد



شکل ۳- نمودار مقایسه میانگین قطر کالوس تحت تاثیر تنظیم کننده‌های رشد IBA و BAP در گیاه استویا

تاثیر تنظیم کننده‌های رشد NAA و BAP

تجزیه واریانس صفات درصد القای کالوس، وزن تر کالوس و قطر کالوس تحت تاثیر تنظیم کننده‌های رشد اکسین (NAA) و سیتوکینین (BAP) در گیاه استویا نشان داد که ترکیب تنظیم کننده رشد روی تمامی صفات اندازه گیری شده در سطح احتمال ١ درصد معنی دار بود (جدول ٣).

نتایج مقایسه میانگین صفت درصد القای کالوس تحت تاثیر تنظیم کننده‌های رشد NAA و BAP در گیاه استویا در شکل ٤ نشان داده شده است. همانطور که در این شکل دیده می‌شود، تنظیم کننده رشد NAA به میزان ٢ میلی‌گرم در لیتر با میانگین ٧٢ درصد، دارای حداکثر میزان القای کالوس بود که اختلاف آماری معنی داری با سایر تیمارها داشت. همچنین محیط کشت حاوی ١ و ٢ میلی‌گرم در لیتر NAA درصد کالوس بیشتری نسبت به اضافه نمودن مقدار ٠/٥ میلی‌گرم در لیتر BAP تولید نمود. هرچند در تیمار ٠/٥ میلی‌گرم در لیتر NAA تفاوتی بین افزودن ٠/٥ میلی‌گرم در لیتر BAP یا بدون BAP وجود نداشت.

نتایج مقایسه میانگین وزن تر کالوس تحت تاثیر تنظیم کننده رشد NAA به میزان ٢ میلی‌گرم در لیتر به تنهایی با میانگین ٠/٦٤ گرم، دارای بیشترین وزن تر کالوس بود که اختلاف آماری معنی‌داری با 0.5 mg/l BAP و 1mg/l NAA، 1mg/l NAA + 2mg/l NAA + 0.5 mg/l BAP نداشتند. به علاوه، با افزایش میزان NAA میزان وزن کالوس نیز افزایش یافت.

شکل ٥ نمودار مقایسه میانگین قطر کالوس تحت تاثیر تنظیم کننده‌های رشد NAA و BAP را در گیاه استویا نشان می دهد. همانطور که در این شکل دیده می شود، قطر کالوس در تمامی تیمارها به غیر از شاهد و 0.5mg/l NAA + 0.5 mg/l BAP به یک اندازه بود.

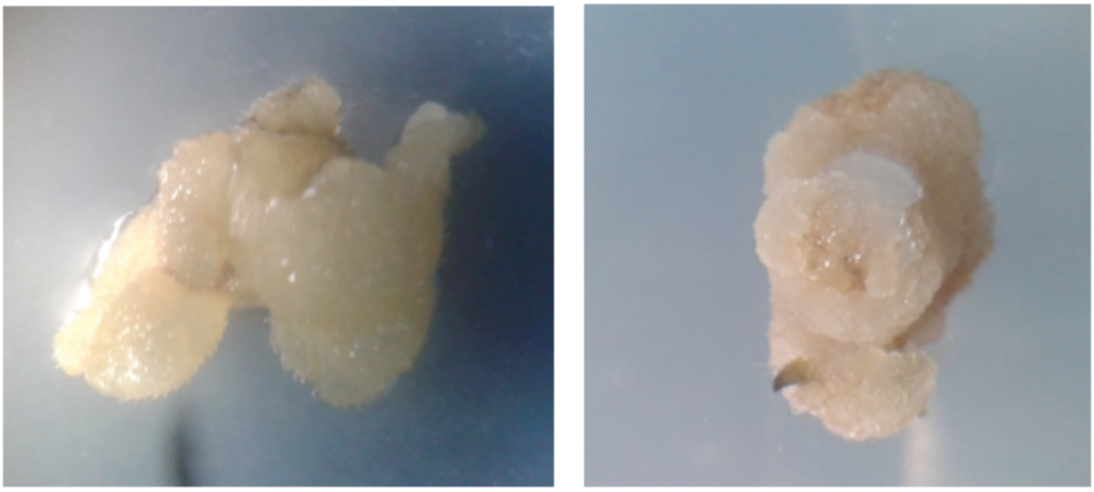
به غیر از حداکثر غلظت NAA یعنی 2mg/l در بقیه غلظت‌ها، افزودن BAP تاثیری بر درصد القای کالوس نداشت. بنابراین علاوه بر نوع اکسین، غلظت آن نیز جهت دستیابی به حداکثر درصد کالوس، از اهمیت خاصی برخوردار است. در محیط کشت حاوی تنظیم کننده رشد NAA کالوس‌های با قطر تقریبا یکسانی تولید شد که می تواند دلیل احتمالی آن انتشار بهتر و یکنواخت تر این اکسین در بافت های این گیاه باشد. میرنیام (١٣٨٩) از تیمار هورمونی BAP با غلظت‌های ٠/٥، ١، ١/٥ و ٢ میلی‌گرم در لیتر در ترکیب با دو نوع اکسین D-٢,٤ و NAA با غلظت های ٠/٥، ١، ١/٥، ٢، ٢/٥ و ٣ میلی‌گرم در لیتر جهت القای کالوس در استویا استفاده نمود و گزارش کرد که از بین تیمارهای مورد استفاده بالاترین میزان کالوس در تیمار 0.5mg/l BAP و 1.5mg/l NAA به دست آمد. در این تیمار درصد کالوس زایی ١٠٠ درصد و میانگین نسبی وزن کالوس در آن ٥٨٥٦ میلی گرم بود. اما کالوس‌های حاصل دارای باززایی مناسبی نبودند. همچنین طاهریان مقدم (١٣٩١) بیان کردند که ریزنمونه ریشه و برگ استویا در محیط کشت MS حاوی ترکیبات هورمونی NAA+BAP بیشترین توانمندی را نشان داد. در این رابطه پاتل و شاه (Patel and Shah)(٢٠٠٩) گزارش کردند که محیط کشت MS با غلظت 2mg/l NAA به همره BAP در غلظت 1mg/l نسبت به غلظت 2mg/l NAA به همراه 2mg/l BAP کالوس بیشتری را تولید کرد که با نتایج پژوهش حاضر همخوانی داشت. فیلهو و هاتوری (١٩٩٧) ادعا کردند که کالوس‌های جنین زا در محیط کشت، به رنگ سبز روشن یا زرد روشن قابل تشخیص بودند. این کالوس‌ها ساختاری فشرده داشتند و جنین‌های سوماتیک کروی شکل روی سطح آن‌ها قابل مشاهده بود. آن‌ها در نتایج از حاصل بررسی‌های خود بیان نمودند که سیر تکاملی و نمو جنین‌های سوماتیک استویا زمانی آغاز می‌شود که یک تک سلول جنین‌زا تقسیم می‌شود تا یک پیش جنین رشته‌ای شکل را تشکیل دهد. سلول‌های قاعده‌ای این پیش جنین تشکیل ساختار آویز شکل را می‌دهند در حالی که سلول‌های فوقانی آن موجب به وجود آمدن جنین کروی شکل می‌شوند.

شکل ٦ نمونه‌ای از کالوس‌های تولید شده در آزمایش حاضر را نشان می‌دهد. با توجه به مطالب فوق، همانگونه که در این شکل دیده می‌شود، می‌توان گفت که کالوس‌های تولید شده در آزمایش حاضر توانایی تولید جنین های سوماتیکی را دارند.

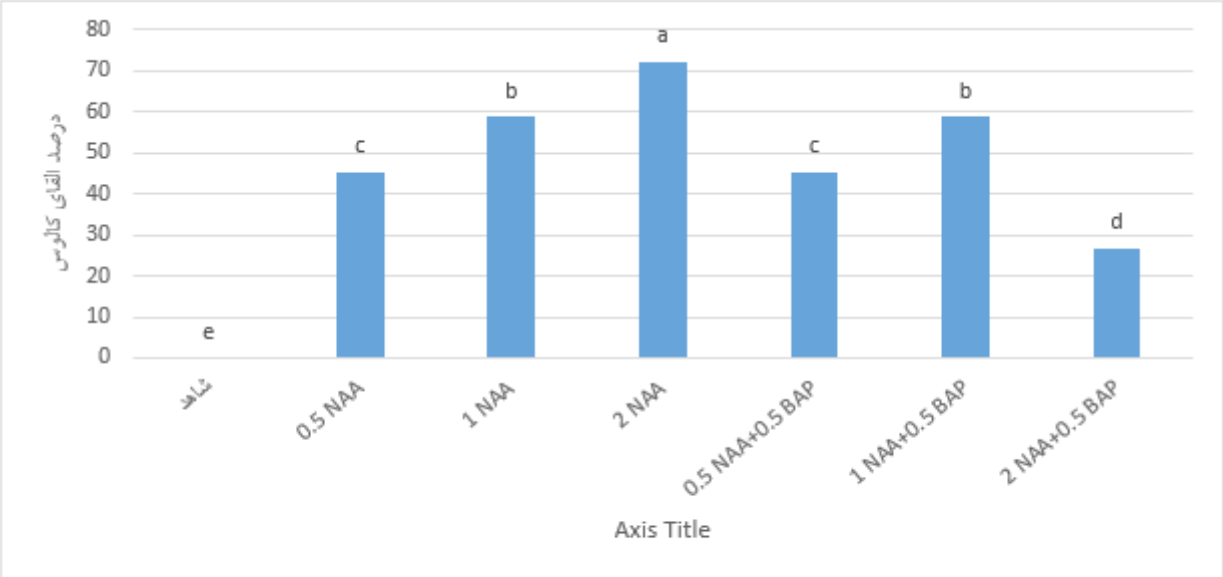
جدول ٣- تجزیه واریانس (میانگین مربعات) صفات مرتبط با القای کالوس تحت تاثیر تنظیم کننده‌های رشد NAA و BAP در گیاه استویا

منابع تغییرات	درجه آزادی	درصد القای کالوس	وزن تر کالوس	قطر کالوس
تیمار هورمونی	٦	١٧٢٦/٩**	٠/١٣١**	١/٤٤**
خطا	١٤	٢٦/٠٩	٠/٠١٠	٠/٠٤٢
CV ضریب تغییرات (CV٪)		١١/٦٦	٢٣/٥٧	١٣/١٤

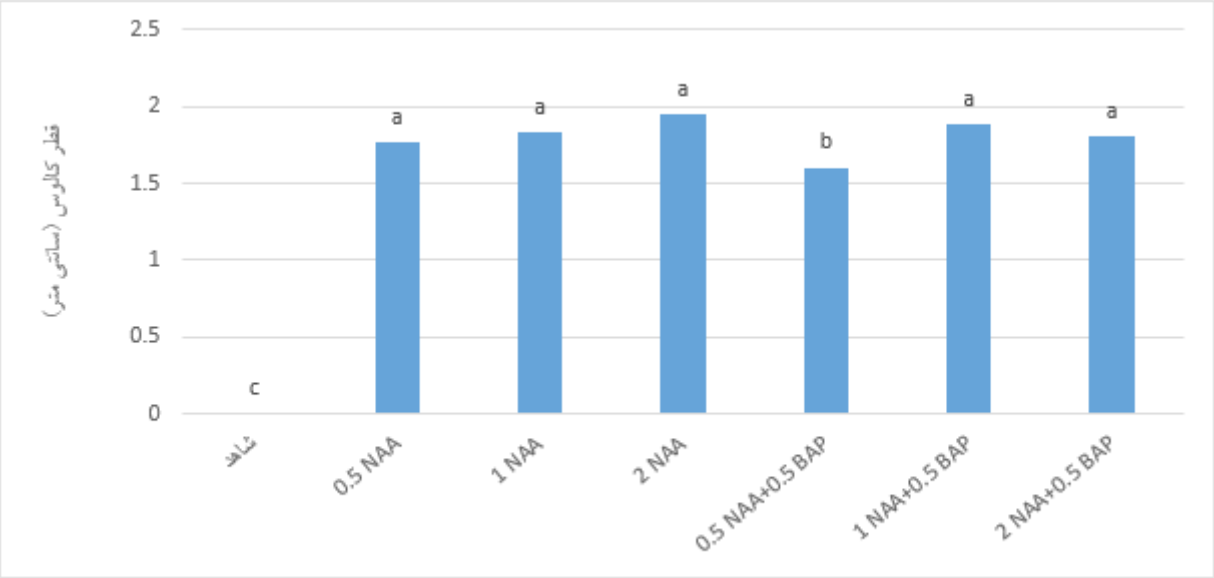
** : یعنی معنی‌دار در سطح احتمال ١ درصد



شکل ۶- نمونه‌ای از کالوس تولید شده گیاه استویا



شکل ۴- نمودار مقایسه میانگین درصد القای کالوس تحت تاثیر تنظیم کننده‌های رشد NAA و BAP در گیاه استویا



شکل ۵- نمودار مقایسه میانگین قطر کالوس تحت تاثیر تنظیم کننده‌های رشد NAA و BAP در گیاه استویا

تشکیل کالوس نقطه آغاز بسیاری از مسیرهای کشت بافت از جمله ساقه‌زایی مبتنی بر کالوس و جنین‌زایی رویشی غیرمستقیم می‌باشد (ابراهیمی، ١٣٨٦). بنابراین مطالعه القای کالوس در گیاهان مختلف تحت تاثیر شرایط مختلف مفید به نظر می‌رسد.

در شرایط درون شیشه‌ای عوامل متعددی بر القای کالوس تاثیرگذار هستند که تنظیم کننده‌های رشد از مهم‌ترین این عوامل به حساب می‌آیند. به همین منظور، در این بخش از آزمایش تاثیر ترکیبات مختلف اکسین و سیتوکینین بر صفات مرتبط با القای کالوس در گیاه استویا ارزیابی شد. جانارتانام و همکاران (Janarthanam et al) (2009) قطعات گره و برگ گیاهان مادری به عنوان ریز نمونه در محیط کشت MS تیمار شده با غلظت های مختلف ٢,٤-D و NAA در ترکیب با ٢/٢٢ میکرومولار BAP جهت ارزیابی میزان کالوس زایی قرار دادند و گزارش کردند که کاربرد هر دو تنظیم کننده رشد مذکور در القای کالوس مؤثر است. همچنین مشخص شد که درصد کالوس زایی از ریز نمونه های به دست آمده از برگ بالاتر از ریز نمونه های حاصل از قطعات گره است. لذا پیشنهاد کردند که جهت کالوس‌زایی از بر گیاه به عنوان ریزنمونه استفاده شود.

مطالعه باززایی در استویا

باززایی از طریق کالوس یکی از روش‌های تکثیر با تعداد بالا در بسیاری از گیاهان است. در این پژوهش اثر ترکیبات مختلف تنظیم کننده‌های رشد روی کالوس گیاه استویا مورد بررسی قرار گرفت.

هم غلظت و هم نسبت محیط کشت بر مسیرهای مختلف ریخت‌زایی تاثیرگذار است یعنی احتمال دارد که دو گونه گیاهی در یک نسبت از سیتوکینین به اکسین (مثلا ١ به ٢) باززا شوند اما یکی از آن‌ها در غلظت بالا و دیگری در غلظت پایین‌تری وارد مرحله باززایی شود. به همین منظور در کنار ترکیب، از غلظت‌های مختلف تنظیم کننده‌های رشد استفاده می‌کنند.

تاثیر تنظیم کننده‌های رشد Kin و NAA روی باززایی

نتایج تجزیه واریانس صفات درصد باززایی و تعداد نوساقه تشکیل شده تحت تاثیر تنظیم کننده‌های رشد Kinetin و NAA در گیاه استویا نشان داد که ترکیب هورمونی روی صفات اندازه گیری شده فوق در سطح احتمال ١ درصد معنی دار بود (جدول ٤).

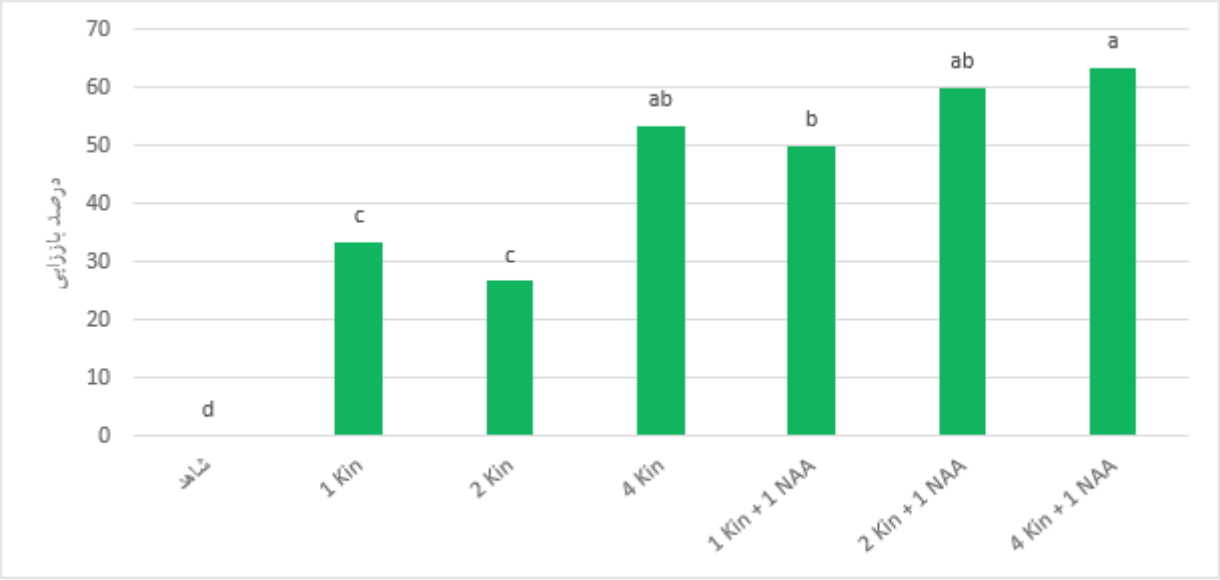
نتایج مقایسه میانگین درصد باززایی تحت تاثیر تنظیم کننده‌های رشد Kin و NAA در گیاه استویا در شکل ۷ نشان داده شده است. همانطور که در این شکل دیده می‌شود، تنظیم کننده رشد Kin به میزان 4mg/l در ترکیب با 1mg/l NAA دارای حداکثر میزان باززایی (٦٣/٣٣ درصد) در بین تیمارها بود که اختلاف آماری معنی داری با 2mg/l Kin + 1mg/l NAA و 4mg/l Kin نداشت. به طور کلی در بیشتر تیمارها، افزودن مقدار ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA به محیط کشت حاوی کاینتین موجب افزایش درصد باززایی شد. در مقایسه میانگین تعداد نوساقه تولید شده تحت تاثیر تنظیم کننده‌های رشد Kin و NAA در گیاه استویا ترکیب هورمونی 2mg/l Kin + 1mg/l NAA دارای بیشترین تعداد نوساقه تولید شده (٤/٦٧ نوساقه) در بین تیمارها بود که اختلاف آماری معنی داری با 4mg/l Kin + 1mg/l NAA نداشت. به طور کلی روند مشخصی در بین تیمارها برای تعداد نوساقه تولید شده مشاهده نشد.

در کل، کاربرد اکسین نفتالین استیک اسید (NAA) در کنار کاینتین تاثیر مثبتی روی درصد باززایی و نیز تعداد نوساقه تولید شده گذاشت.

جدول ۴- تجزیه واریانس (میانگین مربعات) صفات مرتبط با باززایی از طریق کالوس با استفاده از تنظیم کننده‌های رشد Kin و NAA در گیاه استویا

منابع تغییرات	درجه آزادی	درصد باززایی	تعداد نوساقه
تیمار هورمونی	٦	١٥١٩/٠٤**	٨/٤٣**
خطا	١٤	٤٧/٦٢	٠/٢٨٦
CV ضریب تغییرات (٪CV)		١٦/٨٥	١٨/٧٠

**: یعنی معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد



شکل ۷ - نمودار مقایسه میانگین درصد باززایی تحت تاثیر تنظیم کننده‌های رشد Kin و NAA در گیاه استویا

تاثیر تنظیم کننده‌های رشد BAP و NAA

تجزیه واریانس صفات درصد باززایی و تعداد نوساقه تشکیل شده در گیاه استویا تحت تاثیر تنظیم کننده‌های رشد سیتوکینین (BAP) و اکسین (NAA) در گیاه استویا نشان داد که ترکیب تنظیم کننده رشد روی صفات اندازه گیری شده در سطح احتمال ۱ درصد معنی دار بود (جدول ٥).

نتایج مقایسه میانگین درصد باززایی تحت تاثیر تنظیم کننده‌های رشد BAP و NAA را در گیاه استویا نشان داد تنظیم کننده رشد BAP به میزان 2mg/l دارای حداکثر میزان باززایی (٨٦/٦٧ درصد) در بین تیمارها بود که اختلاف آماری معنی داری با 2mg/l BAP + 1mg/l NAA، 4mg/l BAP و 4mg/l BAP+ 1mg/l NAA نداشت. به طور کلی محیط کشت حاوی غلظت های بالای کاینتین یعنی ۲ و ٤ میلی‌گرم در لیتر دارای درصد باززایی بیشتری نسبت به غلظت‌های پایین بودند .

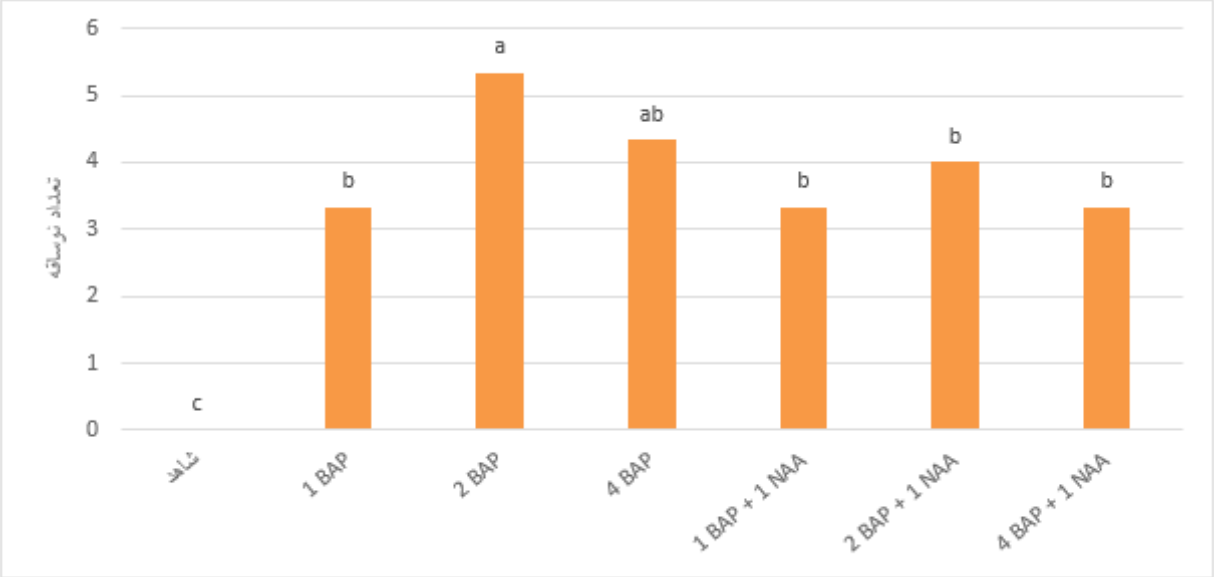
مقایسه میانگین تعداد نوساقه تولید شده تحت تاثیر تنظیم کننده‌های رشد BAP و NAA در گیاه استویا در شکل ۸ نشان داده شده است. تنظیم کننده رشد گیاهی 2mg/l BAP دارای بیشترین تعداد نوساقه تولید شده (٥/٣٣ نوساقه) در بین تیمارها بود که اختلاف آماری معنی داری با تیمار 4mg/l BAP نداشت.

محیط کشت حاوی غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر Kin دارای درصد باززایی و تعداد نوساقه بیشتری بود. بنابراین به نظر می‌رسد که BAP در غلظت‌های پایین و بالا (یعنی ۱ و ٤ میلی‌گرم در لیتر) با کاهش درصد باززایی و تعداد نوساقه مواجه است. پاتل و شاه (۲۰۰۹) گزارش کردند که حداکثر باززایی در غلظت بالای BAP و غلظت پایین NAA یعنی 2mg/l BAP + 0.2mg/l NAA رخ داد که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد. نتایج برخی تحقیقات گذشته با یافته‌های پژوهش حاضر مطابقت نداشت. مثلا تادهانی وهمکاران (2006) (Tadhani et al) گزارش کردند که محیط کشت MS همراه با 0.6mg/l BA حداکثر تعداد نوساقه را تولید نمود. دلیل احتمالی این پدیده را منبع ریزنمونه و سطوح هورمونی استفاده شده جهت تولید کالوس ذکر کرده‌اند (پاتل و شاه، ۲۰۰۹)

جدول ۵- تجزیه واریانس (میانگین مربعات) صفات مرتبط با باززایی از طریق کالوس با استفاده از تنظیم کننده‌های رشد BAP و NAA در گیاه استویا

منابع تغییرات	درجه آزادی	درصد باززایی	تعداد نوساقه
تیمار هورمونی	٦	١٩٩٨/٤١**	١٣/٩٣**
خطا	١٤	٦١/٩٠	٠/٥٢٣
CV ضریب تغییرات (٪CV)		١٥/٢٩	١٨/٣١

** : یعنی معنی‌دار در سطح احتمال ١ درصد



شکل ۸- نمودار مقایسه میانگین تعداد نوساقه تحت تاثیر تنظیم کننده‌های رشد BAP و NAA در گیاه استویا

تاثیر تنظیم کننده‌های رشد TDZ و NAA

نتایج تجزیه واریانس صفات درصد باززایی و تعداد نوساقه تشکیل شده تحت تاثیر تنظیم کننده‌های رشد سیتوکینین (TDZ) و اکسین (NAA) در گیاه استویا در جدول ٦ نشان داده شده است. همانطور که در این جدول دیده می‌شود، ترکیب هورمونی روی تمامی صفات اندازه گیری شده در سطح احتمال ١ درصد معنی دار بود.

نتایج مقایسه میانگین درصد باززایی تحت تاثیر تنظیم کننده‌های رشد TDZ و NAA در گیاه استویا در شکل ٩ نشان داده شده است. طبق نتایج این نمودار، تنظیم کننده رشد TDZ به میزان 1mg/l در ترکیب با 1mg/l NAA دارای حداکثر میزان باززایی (٨٠ درصد) در بین تیمارها بود که اختلاف آماری معنی‌داری با 4mg/l TDZ نداشت.

درمقایسه میانگین تعداد نوساقه تولید شده تحت تاثیر تنظیم کننده‌های رشد TDZ و NAA در گیاه استویا تنظیم کننده رشد TDZ به میزان ٢ میلی‌گرم در لیتر دارای بیشترین تعداد نوساقه تولید شده (٦/٣٣ نوساقه) در بین تیمارها بود که اختلاف آماری معنی‌داری با 4mg/l TDZ و 4mg/l TDZ+ 1mg/l NAA نداشت.نمونه‌هایی از نوساقه‌های تولید شده در شکل ١٠ نشان داده شده است.

کاربرد سیتوکینین NAA در ترکیب با TDZ بر میزان باززایی و تولید تعداد نوساقه موثر بود. بنابراین نتیجه گرفته می‌شود که تنظیم کننده رشد TDZ نیز می‌تواند در کنار سایر تنظیم کننده‌ها در جهت باززایی مبتنی بر کالوس در گیاه استویا به کار گرفته شود.

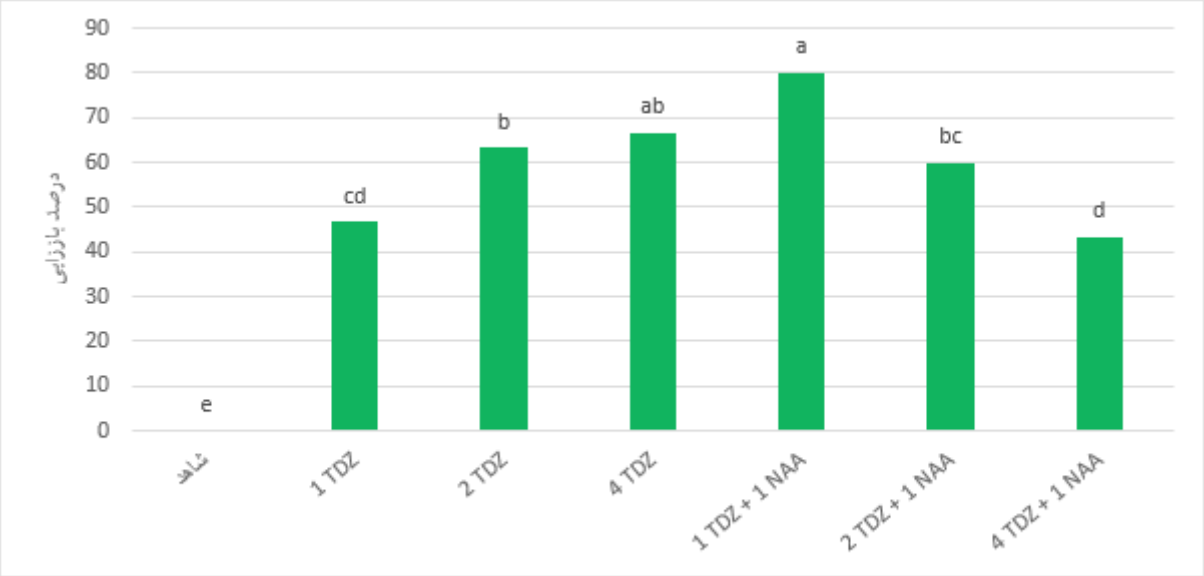
لاتا و همکاران(Lata et al) (٢٠١٣) از تنظیم کننده‌های رشد BA، TDZ و Kn با غلظت ١ تا ٩ میکرومولار جهت باززایی مستقیم استویا استفاده نمودند و گزارش کردند که TDZ در غلظت ١ میکرومولار بیشترین درصد باززایی (٩٦ درصد) را نشان داد.

همچنین سینگ و دویودی (٢٠١٤) گزارش کردند که تنظیم کننده‌های رشد TDZ با غلظت ٠/٥ میلی گرم در لیتر از بین تنظیم کننده‌های رشد مورد استفاده یعنی BA، TDZ و Kn بیشترین درصد باززایی را نشان داد.

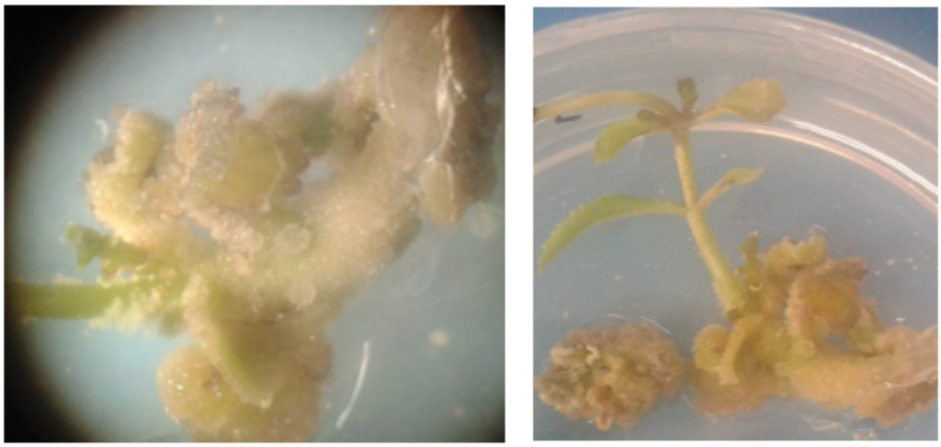
جدول ۶- تجزیه واریانس (میانگین مربعات) صفات مرتبط با باززایی از طریق کالوس با استفاده از تنظیم کننده‌های رشد TDZ و NAA در گیاه استویا

منابع تغییرات	درجه آزادی	درصد باززایی	تعداد نوساقه
تیمار هورمونی	٦	١٥١٩/٠٤**	٨/٤٣**
خطا	١٤	٤٧/٦٢	٠/٢٨٦
CV ضریب تغییرات (٪CV)		١٦/٨٥	١٨/٧٠

** : یعنی معنی‌دار در سطح احتمال ١ درصد



شکل ۹- نمودار مقایسه میانگین درصد باززایی تحت تاثیر تنظیم کننده‌های رشد TDZ و NAA در گیاه استویا



شکل ۱۰- نمونه‌ای از نوساقه‌های تولید شده گیاه استویا

نتیجه‌گیری

نتایج پژوهش حاضر به طور کلی نشان داد که ترکیب، نسبت و غلظت تنظیم کننده‌های رشد روی صفات مختلف در کالوس‌زایی و باززایی گیاه استویا ربادیانا تاثیرگذار است. همچنین این تحقیق نشان داد که صفات مختلف کالوس‌زایی و باززایی مانند درصد القای کالوس، وزن تر کالوس، قطر کالوس، درصد باززایی و تعداد نوساقه تولید شده در هر ریزنمونه، می‌توانند تاثیرات متفاوتی از تنظیم کننده‌های رشد گیاهی بگیرند. کاربرد اکسین ٢,٤-D تاثیر مثبتی روی ایجاد کالوس و حتی وزن تر و قطر کالوس نشان داد. تا جایی که با افزایش غلظت این اکسین، درصد القای کالوس و حتی وزن تر و قطر کالوس نیز افزایش می‌یافت. استفاده از IBA به عنوان یک اکسین تاثیر مثبت و معنی داری روی درصد القای کالوس و وزن تر کالوس داشت. به طوری که با افزایش غلظت این اکسین، درصد القای کالوس و وزن تر نیز افزایش یافت. در حالی که افزودن BAP به غلظت‌های مختلف IBA موجب کاهش قطر کالوس نسبت به حالت بدون سیتوکینین شد که موجب کالوس‌هایی با وزن تر بالا و قطر کمتر شد. یعنی کالوس‌های متراکم‌تر که به نظر می‌رسد برای اهداف باززایی مناسب‌تر باشد. در محیط کشت حاوی تنظیم کننده رشد NAA کالوس‌های با قطر تقریبا یکسانی تولید شد که می تواند دلیل احتمالی آن انتشار بهتر و یکنواخت تر این اکسین در بافت های این گیاه باشد. کاربرد اکسین نفتالین استیک اسید (NAA) در کنار کاینتین تاثیر مثبتی روی درصد باززایی و نیز تعداد نوساقه تولید شده گذاشت. به نظر می‌رسد که BAP در غلظت‌های پایین و بالا (یعنی ١ و ٤ میلی‌گرم در لیتر) با کاهش درصد باززایی و تعداد نوساقه مواجه است. کاربرد سیتوکینین NAA در ترکیب با TDZ بر میزان باززایی و تولید تعداد نوساقه موثر بود. بنابراین نتیجه گرفته می‌شود که تنظیم کننده رشد TDZ نیز می‌تواند در کنار سایر تنظیم کننده‌ها در جهت باززایی مبتنی بر کالوس در گیاه استویا به کار گرفته شود.

منابع

ابراهیمی، ا. ١٣٨٦. بـررسي برخـي فاکتورهـاي آغازکننـده مسـيرهاي مختلـف ريخـت زايـي درون شيشـه‌اي (کشـت بافـت). رسـاله دکـترای اصـلاح نباتـات گرايـش ژنتيـک مولکولـی و مهندسـی ژنتيـک. پرديـس کشـاورزی و منابـع طبيعـی دانشـگاه تهـران.

٢. آذرپـور ا، معتمـد م، بزرگـی ح. ١٣٩٢. زراعـت و ترويـج اسـتويا ، انتشـارات دانشـگاه آزاد اسـلامی واحـد لاهيجـان، چـاپ اول.

باقـری ه، آزادی پ. ١٣٨٥. روش‌هـای آمـاری در پژوهـش هـای درون شيشـه ای. انتشـارات دانشـگاه بوعلـی سـينا، همـدان.

طاهريـان مقـدم ز. ١٣٩١. مطالعـه نقـش محيـط کشـت بـر ميـزان کالـوس زايـی و برخـی متابوليت‌هـای ثانويـه گيـاه اسـتويا (Stevia rebaudiana). پايان‌نامـه کارشناسـی ارشـد باغبانـی. دانشـگاه علـوم کشـاورزی و منابـع طبيعـی گـرگان.

ميرنيـام، ا. ١٣٨٩. بررسـی تنظيـم برخـی تنظيـم کننده‌هـای رشـد بـر اندام‌زايـی گيـاه اسـتويا (Stevia rebaudiana Bertoni). پايـان نامـه کارشناسـی ارشـد رشـته فيزيولـوژی گياهـی. دانشـگاه شـهرکرد.

Bajaj Y, Furmanowa PS, Olszowska O. 1998. Biotechnology of the micropropagation of medicinal and aromatic plants. In: Bajaj YPS, editor. Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 4. New York: Springer Verlag, pp. 60–103

Gauchan, D.P., Dhakal, A., Sharma, N., Bhandari, S., Maskey, E., Shrestha, N., Gautam, R., Giri, S., Gurung, S. (2014). Regenerative callus induction and biochemical analysis of Stevia rebaudiana Bertoni. Journal of Advanced Laboratory Research in Biology, 5 (3), 41-45

Janarthanam B, Gopalakrishnan M, Lakshmi Sai G, Sekar T. 2009. Plant Regeneration from Leaf Derived Callus of Stevia rebaudiana Bertoni. Plant Tissue Cult. & Biotech. 19(2): 133-141

Lata H, Chandra S, Wang Y, Raman V, Khan I. 2013. TDZ-Induced High Frequency Plant Regeneration through Direct Shoot Organogenesis in Stevia rebaudiana Bertoni: An Important Medicinal Plant and a Natural Sweetener. American Journal of Plant Sciences. 4(1). pp. 117-128

Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant, 15: 473–97

Patel RM, Shah RR. 2009. Regeneration of stevia plant through callus culture. Indian J Pharm Sci.71:46-50

Rout GR, Samantaray S, Das P. 2000. In vitro manipulation and propagation of medicinal plants. Biotechnology Advances, 18: 91–120

Shimomura K, Yoshimatsu K, Jaziri M, Ishimaru K. 1997. Traditional .13 medicinal plant genetic resources and biotechnology applications. Plant Biotechnology and Plant Genetic resources for Sustainability and Pro-.ductivity. Biotechnology Intelligence Unit, pp. 209–25

Tadhani MB, Jadeja RP, Rena S. 2006. Micropropagation of Stevia rebaudiana Bertoni using multiple shoot culture. J Cell Tiss Res. 6: 545–8

Mehta J, Khan S., Bisht V., Syedy, M., Rathore, R., and bagari, L. .15 (2012). High frequency multiple shoots regeneration and callus induction and anti diabetic plant – Stevia rebaudiana Bertoni. – An important medicinal plant. Am. J. pharmTech Res. 2(6):19-27