

## 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 ۹ 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 کاملاً تصادفی در آزمایشگاه اصلاح نباتات دانشگاه علوم کشاورزی ساری در سال ۹۴-۱۳۹۳ به اجرا در آمد. تیمارهای آزمایش القای کالوس شامل سه اکسین ۲،۴-IBA، D 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 ریزه‌نونه، می‌توانند تأثیرات متفاوتی از تنظیم کننده‌های رشد گیاهی بگیرند.

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

### مقدمه

متعلق به جنس *Stevia* و از نباتات بومی کشور پاراگوئه است. این گیاه به علت ویژگی‌های 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).

جانارثانام و همکاران (Janarthanam et al.) (2009) به باززایی گیاه استویا از طریق کالوس‌های به دست آمده از ریزه‌نونه‌های برگ پرداختند. در مرحله نخست، قطعات گره و برگ گیاهان مادری به عنوان ریزه‌نونه در محیط کشت MS تیمار شده با غلظت‌های مختلف ۲،۴-D و نفتالین استیک اسید در ترکیب با ۲/۲۲ میکرومولار ۶-بنزیل آمینوپورین جهت ارزیابی میزان کالوس‌زایی 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 کالوس‌زایی از ریزه‌نونه‌های به دست آمده از برگ بالاتر از ریزه‌نونه‌های حاصل از قطعات گره است. لذا بهتر است جهت کالوس‌زایی از ریزه‌نونه‌های برگ گیاه بهره گرفته شود.

امروزه در سرتاسر جهان تمایل افراد برای استفاده از محصولات طبیعی در حال افزایش است. همچنین امروزه سبک زندگی نیز تغییر نموده و در چهار یا پنج دهه اخیر شیرین کننده‌ها (شیرین کننده‌های با کالری پایین و با قدرت بالا مثل آسپارتام و یا با کالری بالای طبیعی ناشی از شکرها) و شیرینی‌ها بخش عمده رژیم غذایی روزانه و طبیعی ما را تشکیل می‌دهند. از طرف دیگر طبق آمار وزارت بهداشت دو میلیون نفر از افراد ۲۵ تا ۶۵ سال در ایران دچار بیماری دیابت هستند. بر اساس این گزارش، سن ابتلا به این بیماری در ایران ۱۰ تا ۱۵ سال کمتر از استاندارد جهانی بوده و بین ۴۵ تا ۵۵ سال است. در حالی که دیابت ششمین علت مرگ و میر در دنیاست و به میزان ۵ تا ۱۰ سال از عمر افراد کم می‌کند. بنابراین امروزه بشر در پی جایگزینی شکر با موادی است که سلامتی را همراه با برآورده نمودن نیازش به ادامه رژیم غذایی روزانه تامین نماید و در این میان بیماری‌هایی که با این مشکل دست و پنجه نرم می‌کنند نیز در جستجوی دارویی طبیعی برای رفع همیشگی این مشکل می‌باشند. در این میان استفاده از ترکیبات دارویی مشتق از گیاهان، نه تنها قدمت زیادی دارد، بلکه به دلیل عوارض جانبی بی‌شمار داروهای شیمیایی از یک سو و نارسایی‌های متعدد طب نوین در درمان برخی از بیماری‌ها با گذشت زمان، بار دیگر پرورش و تولید گیاهان دارویی را با رشد قابل توجهی مواجه ساخته است (امید بیگی، ۱۳۷۹).

گیاه استویا (*Stevia rebaudiana*) یکی از ۱۵۴ تا بیش از ۲۰۰ گونه گیاهی

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 ۱، ۲ و ۴ میلی گرم در لیتر به تنهایی و در ترکیب با ۱ میلی گرم در لیتر NAA ب) تنظیم کننده رشد BAP در سه غلظت ۱، ۲ و ۴ میلی گرم در لیتر به تنهایی و در ترکیب با ۱ میلی گرم در لیتر NAA ج) تنظیم کننده رشد TDZ در سه غلظت ۱، ۲ و ۴ میلی گرم در لیتر به تنهایی و در ترکیب با ۱ میلی گرم 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 نرم افزار SPSS نسخه ۱۹ (آزمون کلموگروف- اسمیرنوف) بررسی شد. در صورت نرمال بودن توزیع داده‌ها، تجزیه واریانس و مقایسه میانگین به روش دانکن با استفاده از نرم افزار SAS نسخه ۹/۱ انجام شد. اما چنانچه توزیع داده‌ها با توزیع نرمال تفاوت معنی داری 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 ۲،۴-D و BAP

نتایج تجزیه واریانس صفات مرتبط با القای کالوس تحت تاثیر تنظیم کننده‌های رشد ۲،۴-D 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 ۱ درصد معنی دار بود (جدول ۱).

نتایج مقایسه میانگین صفت درصد القای کالوس تحت تاثیر تنظیم کننده‌های رشد ۲،۴-D و BAP در گیاه استویا در شکل ۱-۴ نشان داده شده است. همانطور که در این شکل دیده می شود، تنظیم کننده رشد ۲،۴-D به میزان ۲ میلی گرم در لیتر به تنهایی یا در ترکیب با BAP به ترتیب با میانگین ۸۳/۳۳ و ۹۰ 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 ۲،۴-D و BAP در گیاه استویا به صورت نمودار در شکل شماره ۲ آورده شده است. همانطور که در این شکل دیده می شود، تنظیم کننده رشد ۲،۴-D به میزان ۲ میلی گرم در لیتر با میانگین ۰/۸۷ گرم، دارای حداکثر وزن تر کالوس بود که 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 ۲،۴-D به میزان ۲ میلی گرم در لیتر با میانگین ۱/۹۳ سانتی متر، دارای بیشترین قطر کالوس بود که با ۲mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l BAP اختلاف آماری معنی داری نشان نداد. کمترین میزان قطر کالوس در تیمار شاهد (MS پایه) مشاهده شد.

مهتا و همکاران (2012) (Mehta et al) غلظت های مختلف هورمون های سیتوکینین (۶-بنزیل آمینوپورین و کیتین) و اکسین (ایندول بوتیریک اسید و ۲،۴-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 داده های حاصل از آزمایش مربوط به اثر کاربرد هورمون های سیتوکینین بر شاخساره زایی گیاه استویا نشان داد که کاربرد ۲ میلی گرم در لیتر ۶-بنزیل آمینوپورین با افزایش ۸۰ درصدی میزان شاخساره زایی و حاصل نمودن بیشترین تعداد شاخساره در ریز نمونه ها عملکرد بهتری را در مقایسه با هورمون کیتین حاصل نمود. از طرف دیگر اثر متقابل کاربرد هورمون های سیتوکینین بر شاخساره زایی ریزنونه های استویا پس از واکشت نشان داد که اثر متقابل کاربرد ۰/۵ میلی گرم در لیتر ۶-بنزیل آمینوپورین و ۰/۵ میلی گرم در لیتر کیتین در مقایسه با سایر تیمارها برتر بود. با توجه به نتایج آزمایش بالاترین درصد ریشه زایی در ریز نمونه ها از تیمار ۰/۵ میلی گرم در لیتر ایندول بوتیریک اسید به دست آمد.

اگر چه تاکنون بیش از ۵۰ فرمول برای محیط کشت ارائه شده است ولی عموماً از محیط کشت MS (موراشیگ و اسکوگ، ۱۹۶۲) (Murashige and Skoog) برای اکثر گونه‌ها استفاده می شود و با اعمال تغییرات لازم و جزئی در این محیط کشت توانسته‌اند آن را برای دستیابی به اهداف ریزازدیادی سایر گیاهان به کار برند. دو گروه مهم شامل اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها نقش اساسی را در مراحل مختلف بر عهده دارند و از ترکیبات مختلف این دو هورمون برای اعمال تغییرات مورد نظر در محیط کشت استفاده می‌گردد (باجاج، ۱۹۹۸) (Bajaj et al).

#### مواد و روش‌ها

این پژوهش در آزمایشگاه اصلاح نباتات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری از آبان ماه سال ۱۳۹۳ تا تیر ماه سال ۱۳۹۴ 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 ۱-۳).

محیط کشت MS (موراشیگ و اسکوگ، ۱۹۶۲) (Murashige and Skoog) یکی از مناسب ترین محیط‌های کشتی است که در کشت بافت گیاهی استفاده می‌شود. به منظور سهولت در تهیه محیط کشت MS از محلول‌های مادری ذخیره‌ای استفاده گردید. محیط کشت MS شامل سه دسته مواد اصلی مواد غذایی پر مصرف (Macronutrients) مواد غذایی کم مصرف (Micronutrients) و ویتامین‌ها می‌باشد. هر کدام از این سه دسته مواد به صورت محلول مادری و با غلظت خاص آماده و جهت تهیه محیط کشت در یخچال نگهداری شد (جدول ۱-۳).

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

الف) تنظیم کننده رشد ۲،۴-D در سه غلظت ۰/۵، ۱ و ۲ میلی گرم در لیتر به تنهایی و در ترکیب با ۰/۵ میلی گرم در لیتر BAP

ب) تنظیم کننده رشد IBA در سه غلظت ۰/۵، ۱ و ۲ میلی گرم در لیتر به تنهایی و در ترکیب با ۰/۵ میلی گرم در لیتر BAP

ج) تنظیم کننده رشد NAA در سه غلظت ۰/۵، ۱ و ۲ میلی گرم در لیتر به تنهایی و در ترکیب با ۰/۵ میلی گرم 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.

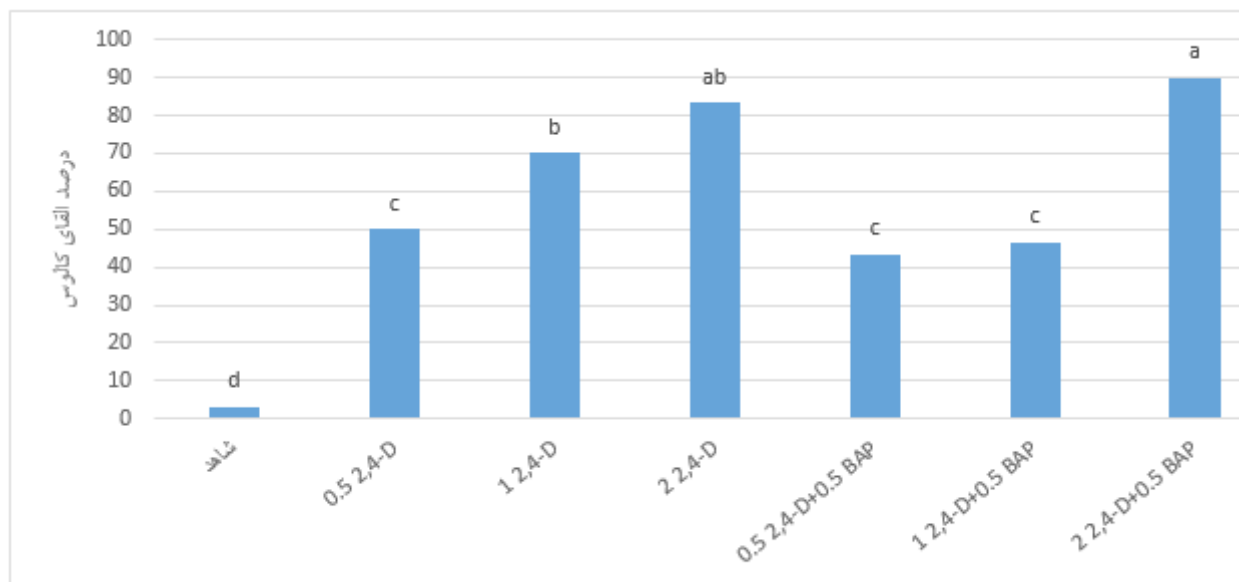
یافت و سپس رو به کاهش گذاشت که با نتایج این پژوهش همخوانی دارد. با توجه به نتایج پژوهش حاضر به نظر می رسد که سیتوکینین BAP تاثیر اکسین ۲،۴-D را در برخی موارد کاهش داده است. علت این پدیده می تواند وجود سیتوکینین داخلی گیاه باشد.

که با بقیه تیمارها اختلاف آماری نشان داد. کاربرد اکسین ۲،۴-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 می یافت. در این رابطه گوچان و همکاران (2014) (Gauchan et al) گزارش کردند که از بین غلظت های ۱ تا ۶ میلی گرم در لیتر، درصد القای کالوس از غلظت ۱ تا ۳ افزایش

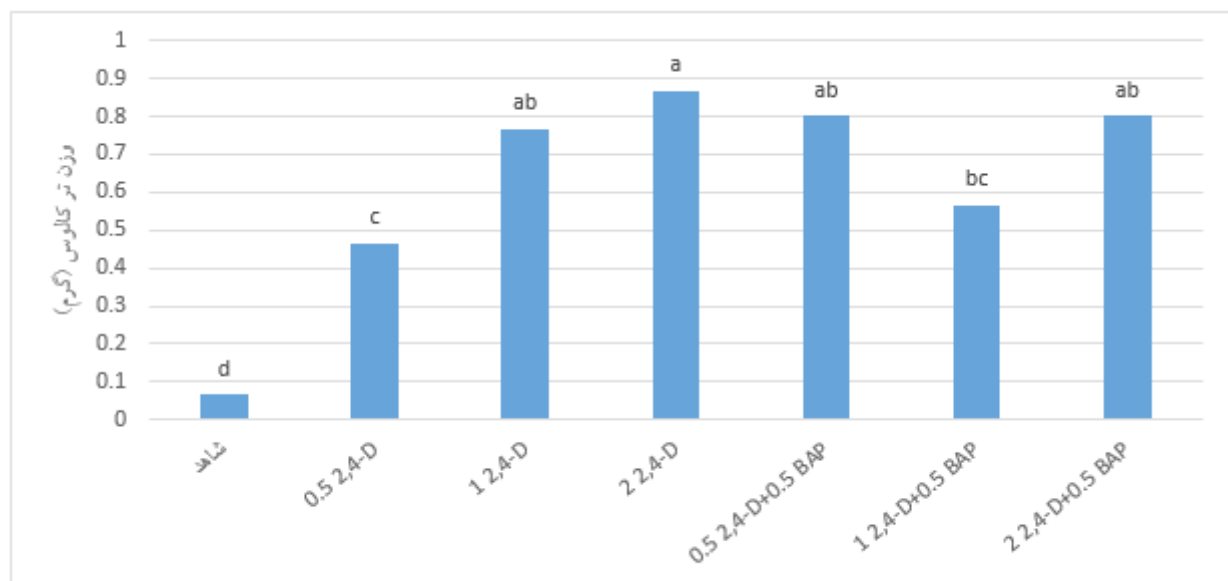
جدول ۱- تجزیه واریانس (میانگین مربعات) صفات مرتبط با القای کالوس تحت تاثیر تنظیم کننده های رشد 2,4-D و BAP در گیاه استویا

منابع تغییرات	درجه آزادی	درصد القای کالوس	وزن تر کالوس	قطر کالوس
تیمار هورمونی	۶	۲۵۷۶/۲**	۰/۲۳۹**	۰/۹۲۸**
خطا	۱۴	۶۱/۹	۰/۰۲۴	۰/۰۵۶
CV ضریب تغییرات (%CV)		۱۴/۲۴	۲۴/۹۲	۱۹/۱۱

\*\* : معنی دار در سطح احتمال ۱ درصد



شکل ۱- نمودار مقایسه میانگین درصد القای کالوس تحت تاثیر تنظیم کننده های رشد 2,4-D و BAP در گیاه استویا



شکل ۲- نمودار مقایسه میانگین وزن تر کالوس تحت تاثیر تنظیم کننده های رشد 2,4-D و BAP در گیاه استویا

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 معنی‌داری 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 بازرایی مناسب‌تر باشد. زیرا در کالوس‌های غیر متراکم به دلیل وجود غلظت بالای اکسین درونی، معمولا بازرایی کمتری رخ می‌دهد. همچنین نتایج نشان داد که BAP تاثیری بر درصد القای کالوس و وزن تر آن تحت تاثیر غلظت‌های مختلف اکسین IBA بر خلاف اکسین ۲،۴-D نداشت که این امر می‌تواند نشان از واکنش بافت گیاه به نوع اکسین باشد و اهمیت نوع تنظیم کننده رشد را می‌رساند.

### 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 می‌شود، 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 معنی‌داری 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.

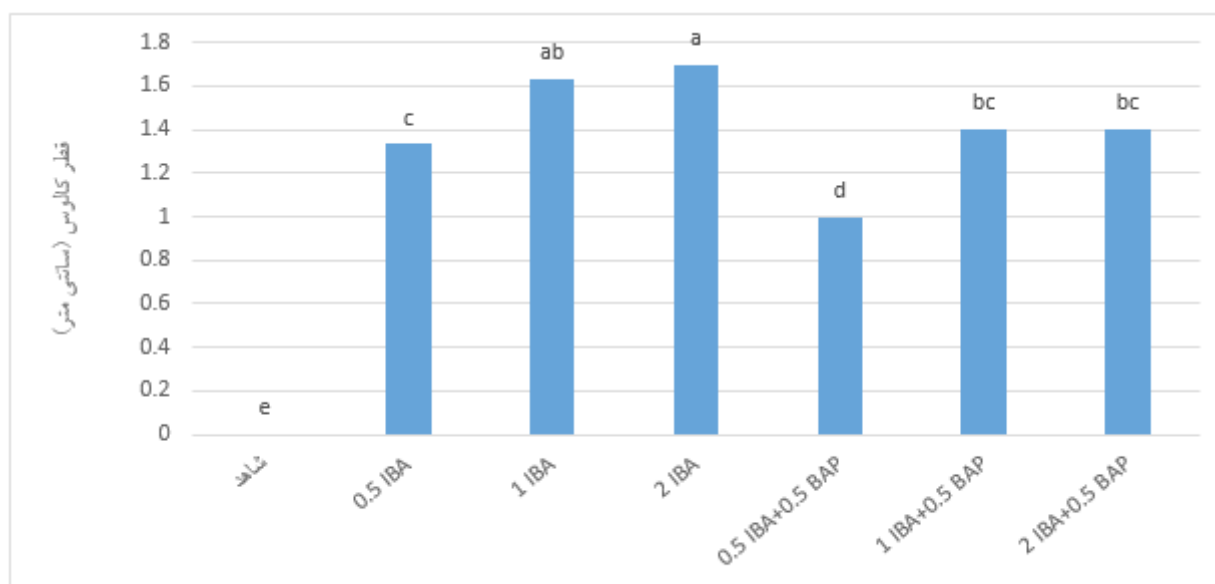
مقایسه میانگین وزن تر کالوس تحت تاثیر تنظیم کننده‌های رشد IBA و BAP در گیاه استویا در شکل ۲ نشان داده شده است. همانطور که در این شکل دیده می‌شود، تنظیم کننده رشد IBA به میزان ۲ میلی‌گرم در لیتر بدون یا به همراه BAP با میانگین ۰/۸ گرم، دارای حداکثر وزن تر کالوس بود که با 1mg/l IBA + 0.5mg/l BAP و 1mg/l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

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	۶	۲۸۶۰/۳**	۰/۲۲۳**	۱/۰۱**
خطا	۱۴	۴۷/۶۱	۰/۰۱۵	۰/۰۲۳
CV ضریب تغییرات (%CV)		۱۰/۹۷	۲۲/۳۴	۱۲/۷۵

\*\* : 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

تولید شد که می تواند دلیل احتمالی آن انتشار بهتر و یکنواخت تر این اکسین در بافت های این گیاه باشد. میرنیام (۱۳۸۹) از تیمار هورمونی BAP با غلظت های ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی گرم در لیتر در ترکیب با دو نوع اکسین ۲،۴-D و NAA با غلظت های ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲، ۳ و ۴ میلی گرم در لیتر جهت القای کالوس در استویا استفاده نمود و گزارش کرد که از بین تیمارهای مورد استفاده بالاترین میزان کالوس در تیمار BAP 0.5mg/l و NAA 1.5mg/l به دست آمد. در این تیمار درصد کالوس زایی ۱۰۰ درصد و میانگین نسبی وزن کالوس در آن ۵۸۵۶ میلی گرم بود. اما کالوس های حاصل دارای باززایی مناسبی نبودند. همچنین طاهریان مقدم (۱۳۹۱) 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) (۲۰۰۹) گزارش کردند که محیط کشت MS با غلظت 2mg/l NAA به همراه BAP در غلظت 1mg/l نسبت به غلظت 2mg/l NAA به همراه BAP 2mg/l کالوس بیشتری را تولید کرد که با نتایج پژوهش حاضر همخوانی داشت. فیلهو و هاتوری (۱۹۹۷) ادعا کردند که کالوس های جنین زا در محیط کشت، به رنگ سبز روشن یا زرد روشن قابل تشخیص بودند. این کالوس ها ساختاری فشرده داشتند و جنین های سوماتیک کروی شکل روی سطح آن ها قابل مشاهده بود. آن ها در نتایج از حاصل بررسی های خود بیان نمودند که سیر تکاملی و نمو جنین های سوماتیک استویا زمانی آغاز می شود که یک تک سلول جنین زا تقسیم می شود تا یک پیش جنین رشته ای شکل را تشکیل دهد. سلول های قاعده ای این پیش جنین تشکیل ساختار آویز شکل را می دهند در حالی که سلول های فوقانی آن موجب به وجود آمدن جنین کروی شکل می شوند.

شکل ۶ نمونه ای از کالوس های تولید شده در آزمایش حاضر را نشان می دهد. با توجه به مطالب فوق، همانگونه که در این شکل دیده می شود، می توان گفت که کالوس های تولید شده در آزمایش حاضر توانایی تولید جنین های سوماتیکی را دارند.

### تاثیر تنظیم کننده های رشد NAA و BAP

تجزیه واریانس صفات درصد القای کالوس، وزن تر کالوس و قطر کالوس تحت تاثیر تنظیم کننده های 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 ۱ درصد معنی دار بود (جدول ۳).

نتایج مقایسه میانگین صفت درصد القای کالوس تحت تاثیر تنظیم کننده های رشد NAA و BAP در گیاه استویا در شکل ۴ نشان داده شده است. همانطور که در این شکل دیده می شود، تنظیم کننده رشد NAA به میزان ۲ میلی گرم در لیتر با میانگین ۷۲ درصد، دارای حداکثر میزان القای کالوس بود که اختلاف آماری معنی داری با سایر تیمارها داشت. همچنین محیط کشت حاوی ۱ و ۲ میلی گرم در لیتر NAA درصد کالوس بیشتری نسبت به اضافه نمودن مقدار ۰/۵ میلی گرم در لیتر BAP تولید نمود. هرچند در تیمار ۰/۵ میلی گرم در لیتر NAA تفاوتی بین افزودن ۰/۵ میلی گرم در لیتر BAP یا بدون BAP وجود نداشت.

نتایج مقایسه میانگین وزن تر کالوس تحت تاثیر تنظیم کننده رشد NAA به میزان ۲ میلی گرم در لیتر به تنهایی با میانگین ۰/۶۴ گرم، دارای بیشترین وزن تر کالوس بود که اختلاف آماری معنی داری با 0.5 mg/l NAA، 1mg/l NAA + mg/l BAP و 2mg/l NAA + 0.5 mg/l BAP نداشتند. به علاوه، با افزایش میزان NAA میزان وزن کالوس نیز افزایش یافت.

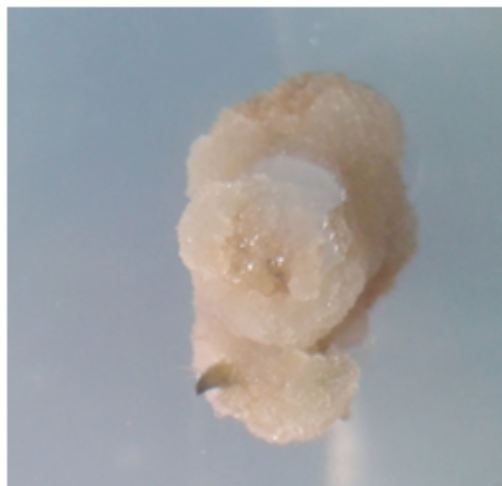
شکل ۵ نمودار مقایسه میانگین قطر کالوس تحت تاثیر تنظیم کننده های رشد NAA و BAP را در گیاه استویا نشان می دهد. همانطور که در این شکل دیده می شود، قطر کالوس در تمامی تیمارها به غیر از شاهد و 0.5 mg/l BAP + 0.5mg/l NAA به یک اندازه بود.

به غیر از حداکثر غلظت NAA یعنی 2mg/l در بقیه غلظت ها، 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 کالوس های با قطر تقریباً یکسانی

جدول ۳- تجزیه واریانس (میانگین مربعات) صفات مرتبط با القای کالوس تحت تاثیر تنظیم کننده های رشد NAA و BAP در گیاه استویا

منابع تغییرات	درجه آزادی	درصد القای کالوس	وزن تر کالوس	قطر کالوس
تیمار هورمونی	۶	۱۷۲۶/۹**	۰/۱۳۱**	۱/۴۴**
حفظ	۱۴	۲۶/۰۹	۰/۰۱۰	۰/۰۴۲
CV ضریب تغییرات (%)		۱۱/۶۶	۲۳/۵۷	۱۳/۱۴

\*\* : یعنی معنی دار در سطح احتمال ۱ درصد



شکل ۶- نمونه ای از کالوس تولید شده گیاه استویا



رشد Kin و NAA در گیاه استویا ترکیب هورمونی 2mg/l Kin + 1mg/l NAA دارای بیشترین تعداد نوساقه تولید شده (۴/۶۷) 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.

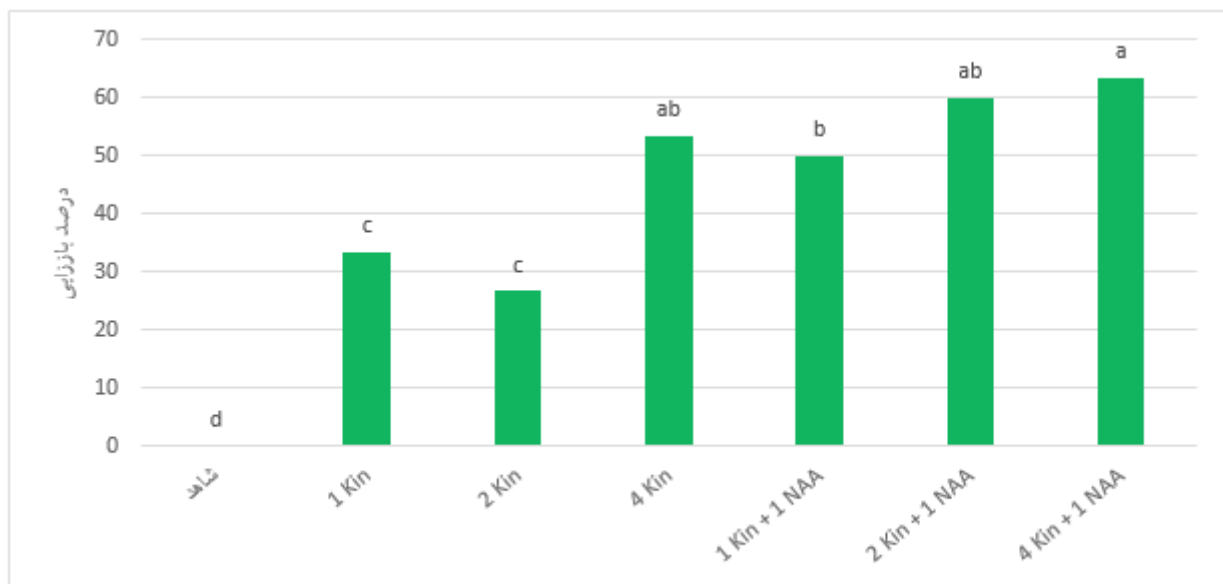
در کل، کاربرد اکسین نفتالین استیک اسید (NAA) در کنار کاینترین تاثیر مثبتی روی درصد باززایی و نیز تعداد نوساقه تولید شده گذاشت.

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 (۶۳/۳۳ درصد) در بین تیمارها بود که اختلاف آماری معنی داری با 4mg/l Kin + 2mg/l NAA نداشت. به طور کلی در بیشتر تیمارها، افزودن مقدار ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA به محیط کشت حاوی کاینترین موجب افزایش درصد باززایی شد. در مقایسه میانگین تعداد نوساقه تولید شده تحت تاثیر تنظیم کننده‌های

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

منابع تغییرات	درجه آزادی	درصد باززایی	تعداد نوساقه
تیمار هورمونی	۶	۱۵۱۹/۰۴**	۸/۴۳**
خطا	۱۴	۴۷/۶۲	۰/۲۸۶
CV ضریب تغییرات (%CV)		۱۶/۸۵	۱۸/۷۰

\*\*؛ یعنی معنی دار در سطح احتمال ۱ درصد



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

کننده رشد گیاهی 2mg/l BAP دارای بیشترین تعداد نوساقه تولید شده (۵/۳۳) 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 ۴ 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 و همکاران (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 ریزفونونه و سطوح هورمونی استفاده شده جهت تولید کالوس ذکر کرده‌اند (پاتل و شاه، ۲۰۰۹)

#### 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 ۵).

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 (۸۶/۶۷ درصد) در بین تیمارها بود که اختلاف آماری معنی داری با 4mg/l BAP، 2mg/l BAP + 1mg/l NAA و 4mg/l BAP + 1mg/l NAA نداشت. به طور کلی محیط کشت حاوی غلظت‌های بالای کاینترین یعنی ۲ و ۴ 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

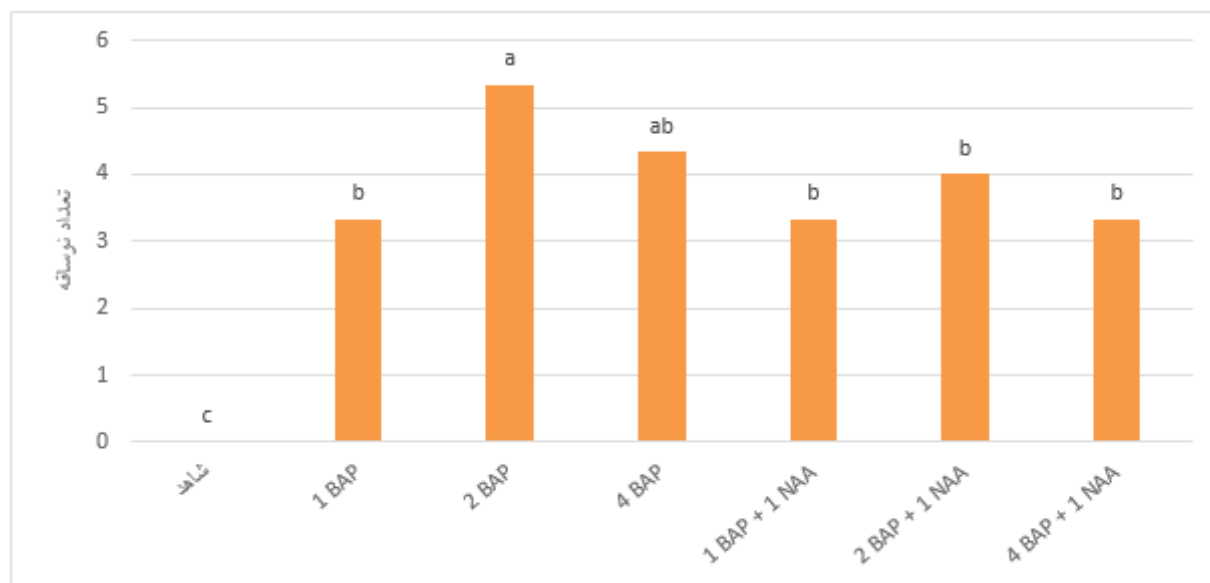


### جدول ۵- تجزیه واریانس (میانگین مربعات) صفات مرتبط با باززایی از طریق کالوس یا استفاده از تنظیم کننده‌های

#### رشد BAP و NAA در گیاه استویا

منابع تغییرات	درجه آزادی	درصد باززایی	تعداد نوساقه
تیمار هورمونی	۶	۱۹۹/۴۱ <sup>**</sup>	۱۳/۹۳ <sup>**</sup>
خطا	۱۴	۶۱/۹۰	۰/۵۲۳
CV ضریب تغییرات (%CV)		۱۵/۲۹	۱۸/۳۱

\*\* : یعنی معنی دار در سطح احتمال ۱ درصد



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

بین تیمارها بود که اختلاف آماری معنی داری با 4mg/l TDZ و 4mg/l TDZ + 1mg/l NAA نداشت. نمونه‌هایی از نوساقه‌های تولید شده در شکل ۱۰ 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) (۲۰۱۳) از تنظیم کننده‌های رشد BA، TDZ، Kn و با غلظت ۱ تا ۹ میکرومولار جهت باززایی مستقیم استویا استفاده نمودند و گزارش کردند که TDZ در غلظت ۱ میکرومولار بیشترین درصد باززایی (۹۶ درصد) را نشان داد.

همچنین سینگ و دیوودی (۲۰۱۴) گزارش کردند که تنظیم کننده‌های رشد TDZ با غلظت ۰/۵ میلی گرم در لیتر از بین تنظیم کننده‌های رشد مورد استفاده یعنی BA، TDZ، Kn بیشترین درصد باززایی را نشان داد.

### 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 ۶ نشان داده شده است. همانطور که در این جدول دیده می‌شود، ترکیب هورمونی روی تمامی صفات اندازه گیری شده در سطح احتمال ۱ درصد معنی دار بود.

نتایج مقایسه میانگین درصد باززایی تحت تاثیر تنظیم کننده‌های رشد TDZ و NAA در گیاه استویا در شکل ۹ 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 (۸۰ درصد) در بین تیمارها بود که اختلاف آماری معنی داری 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 ۲ میلی‌گرم در لیتر دارای بیشترین تعداد نوساقه تولید شده (۶/۳۳ نوساقه) در

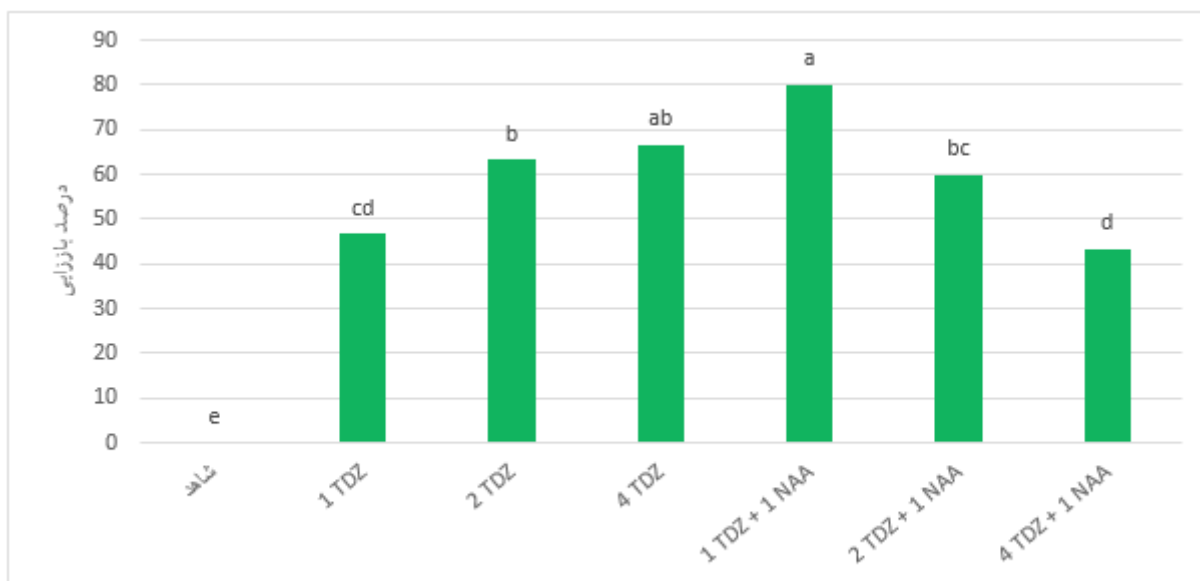
### جدول ۶- تجزیه واریانس (میانگین مربعات) صفات مرتبط با باززایی از طریق کالوس یا استفاده از تنظیم کننده‌های

#### رشد TDZ و NAA در گیاه استویا

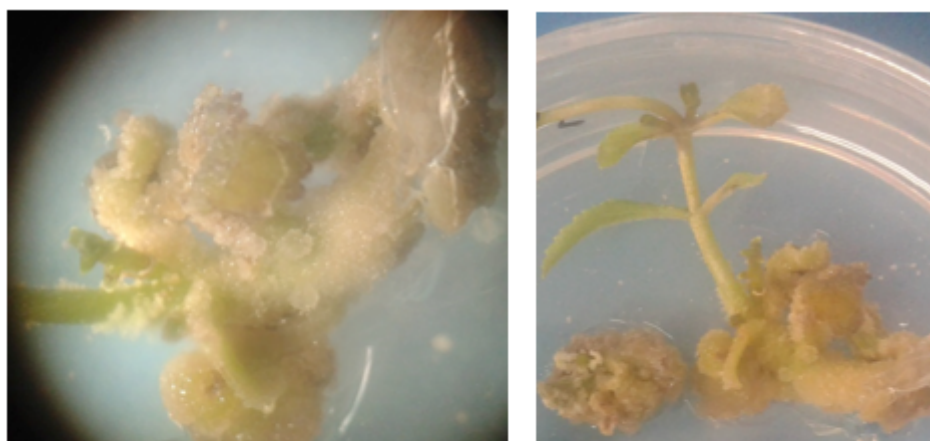
منابع تغییرات	درجه آزادی	درصد باززایی	تعداد نوساقه
تیمار هورمونی	۶	۱۵۱۹/۰۴ <sup>**</sup>	۸/۴۳ <sup>**</sup>
خطا	۱۴	۴۷/۶۲	۰/۲۸۶
CV ضریب تغییرات (%CV)		۱۶/۸۵	۱۸/۷۰

\*\* : یعنی معنی دار در سطح احتمال ۱ 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

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 تقریباً یکسانی تولید شد که می‌تواند دلیل احتمالی آن انتشار بهتر و یکنواخت تر این اکسین در بافت های این گیاه باشد. کاربرد اکسین نفتالین استیک اسید (NAA) در کنار کاینترین تاثیر مثبتی روی درصد باززایی و نیز تعداد نوساقه تولید شده گذاشت. به نظر می‌رسد که BAP در غلظت‌های پایین و بالا (یعنی ۱ و ۴ 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.

### 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 ریزمونه، می‌تواند تاثیرات متفاوتی از تنظیم کننده‌های رشد گیاهی بگیرند. کاربرد اکسین ۲،۴-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

### منابع

- 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 medicinal plant genetic resources and biotechnology applications. *Plant Biotechnology and Plant Genetic resources for Sustainability and Productivity.* 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
- ابراهیمی، ا. ۱۳۸۶. بررسی برخی فاکتورهای آغازکننده مسیرهای مختلف ریخت زایی درون شیشه‌ای (کشت بافت). رساله دکتری اصلاح نباتات گرایش ژنتیک مولکولی و مهندسی ژنتیک. پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران.
۲. آذرپور، معتمد م، بزرگی ح. ۱۳۹۲. زراعت و ترویج استویا، انتشارات دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، چاپ اول.
- باقری ه، آزادی پ. ۱۳۸۵. روش‌های آماری در پژوهش‌های درون شیشه‌ای. انتشارات دانشگاه بوعلی سینا، همدان.
- طاهریان مقدم ز. ۱۳۹۱. مطالعه نقش محیط کشت بر میزان کالوس زایی و برخی متابولیت‌های ثانویه گیاه استویا (*Stevia rebaudiana*). پایان‌نامه کارشناسی ارشد باغبانی. دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.
- میرنیام، ا. ۱۳۸۵. بررسی تنظیم برخی تنظیم‌کننده‌های رشد بر اندام‌زایی گیاه استویا (*Stevia rebaudiana* Bertoni). پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشته فیزیولوژی گیاهی. دانشگاه شهرکرد.
- 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