

بررسی تولید کالوس و باززایی در گیاه دارویی استویا

نسرین نصر^{۱*}، سیده نفیسه عقیلی^۲ و سید کمال کاظمی تبار^۳

چکیده

استویا با نام علمی *Stevia rebaudiana* Bertoni دارای منبع گلیکوزیدهای دی‌ترین از جمله استویوزید و گلیکوزید بوده که حدود ۱۰۰ تا ۳۰۰ برابر شیرین‌تر از شکر می‌باشد. به علت درصد جوانه‌زنی پایین بذور استویا، می‌توان از تکنیک کشت بافت، 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 سال ۹۴-۱۳۹۳ به اجرا در آمد. تیمارهای آزمایش القای کالوس شامل سه اکسین 2,4-D, IBA 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 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 متأثر از تنظیم کننده‌های رشد گیاهی باشند.

واژه های کلیدی: استویا، اکسین، باززایی، سیتوکینین، کالوس

۱- * استادیار گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران، nasr_na2002@yahoo.com

۲- دانشجوی کارشناسی ارشد گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران.

۳- دانشیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ایران.

مقدمه

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 (آذریپور و همکاران، ۱۳۹۲).

در پژوهشی، Janarthanam و همکاران (۲۰۰۹) 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 غلظت‌های مختلف 2,4-D و نفتالین استیک اسید در ترکیب با ۲/۲۲ میکرومولار ۶-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 نمونه‌های به دست آمده از برگ بالاتر از ریز نمونه‌های حاصل از قطعات گره است. لذا بهتر است جهت کالوس زایی از ریز نمونه‌های برگ گیاه بهره گرفته شود. طی آزمایشی، Mehta و همکاران (۲۰۱۲) غلظت‌های مختلف هورمون‌های سیتوکینین (۶-بنزیل آمینوپورین و کینتین) و اکسین (ایندول بوتیریک اسید و 2,4-D) را بر روی ریزازدیادی گیاه استویا از طریق نمونه‌های تهیه شده از گره ساقه در محیط کشت MS مورد ارزیابی قرار دادند. مقایسه میانگین داده‌های حاصل از آزمایش مربوط به اثر کاربرد هورمون‌های سیتوکینین بر شاخساره زایی گیاه استویا نشان داد که کاربرد ۲ میلی‌گرم در لیتر ۶-بنزیل آمینوپورین با افزایش ۸۰ درصدی میزان شاخساره زایی و حاصل نمودن بیشترین تعداد شاخساره در ریز نمونه‌ها عملکرد بهتری را در مقایسه با هورمون کینتین حاصل نمود. از طرف دیگر اثر متقابل کاربرد هورمون‌های سیتوکینین بر شاخساره زایی ریزنمونه‌های استویا پس از واکشت نشان داد که اثر متقابل کاربرد ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر ۶-بنزیل آمینوپورین و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر کینتین در

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 جایگزین نمودن شکر با موادی است که سلامتی را همراه با برآورده نمودن نیاز به ادامه رژیم غذایی روزانه تامین نماید و در این میان بیمارانی 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 متعلق به جنس *Stevia* و از گیاهان بومی کشور پاراگوئه است. این گیاه به علت ویژگی‌های حائز اهمیت خود که دارای 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

الف) تنظیم کننده رشد 2,4-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 پتری دیش‌ها درون اتاقت 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 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.

مقایسه با سایر تیمارها برتر بود. با توجه به نتایج این 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 گیاهان ارائه شده است ولی عموماً از محیط کشت MS (Murashige and Skoog, 1962) برای کشت اکثر گونه‌ها استفاده می‌شود و با اعمال تغییرات لازم و جزئی در این محیط کشت توانسته‌اند آن را برای دستیابی به اهداف ریزازدیادی سایر گیاهان به کار ببرند. 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 (Bajaj et al., 1998).

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. محیط کشت MS شامل سه دسته مواد اصلی مواد غذایی پر مصرف مواد غذایی کم مصرف 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.

آزمایش القای کالوس به منظور بررسی و مقایسه کالوس‌زایی در ریزنمونه 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:

نتایج تجزیه واریانس صفات مرتبط با القای کالوس تحت تاثیر تنظیم کننده‌های رشد 2,4-D و BAP در گیاه استویا نشان داد که اثر ترکیب هورمونی روی تمامی صفات اندازه گیری شده شامل درصد القای کالوس، وزن تر کالوس و قطر کالوس در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود (جدول ۱).

قبل از انجام تجزیه واریانس، ابتدا نرمال بودن توزیع داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۹ (آزمون کولموگروف - اسمیرنوف) بررسی شد. سپس تجزیه واریانس و مقایسه میانگین به روش دانکن با استفاده از نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۱ انجام شد.

نتایج

تاثیر تنظیم کننده‌های رشد 2,4-D و BAP

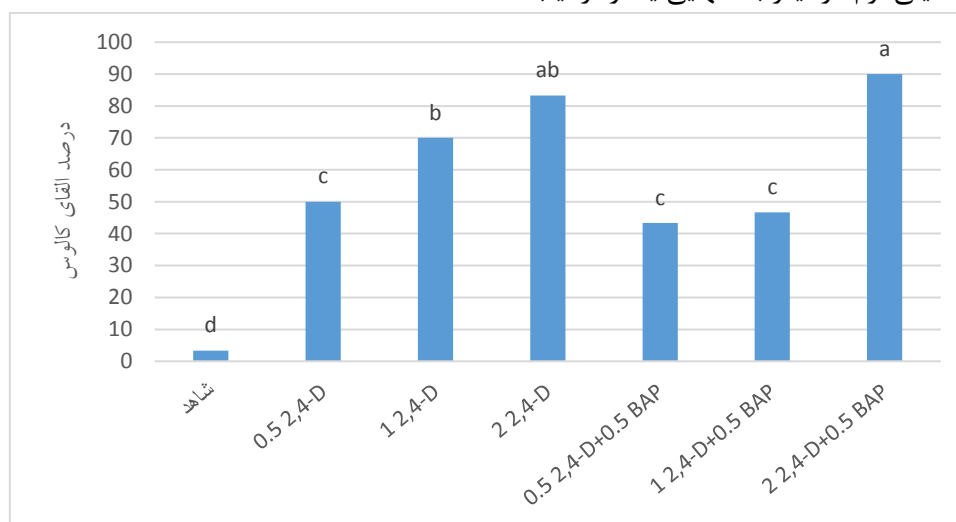
جدول ۱- تجزیه واریانس صفات مرتبط با القای کالوس تحت تاثیر تنظیم کننده‌های رشد 2,4-D و BAP در گیاه استویا

منابع تغییرات	درجه آزادی	درصد القای کالوس	وزن تر کالوس	قطر کالوس
تیمار هورمونی	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

** : معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد

با BAP به ترتیب با میانگین ۸۳/۳۳ و ۹۰ درصد، دارای حداکثر میزان القای کالوس بود که اختلاف آماری معنی‌داری با هم نداشتند. همچنین کمترین میزان این صفت در تیمار شاهد (MS پایه) بود.

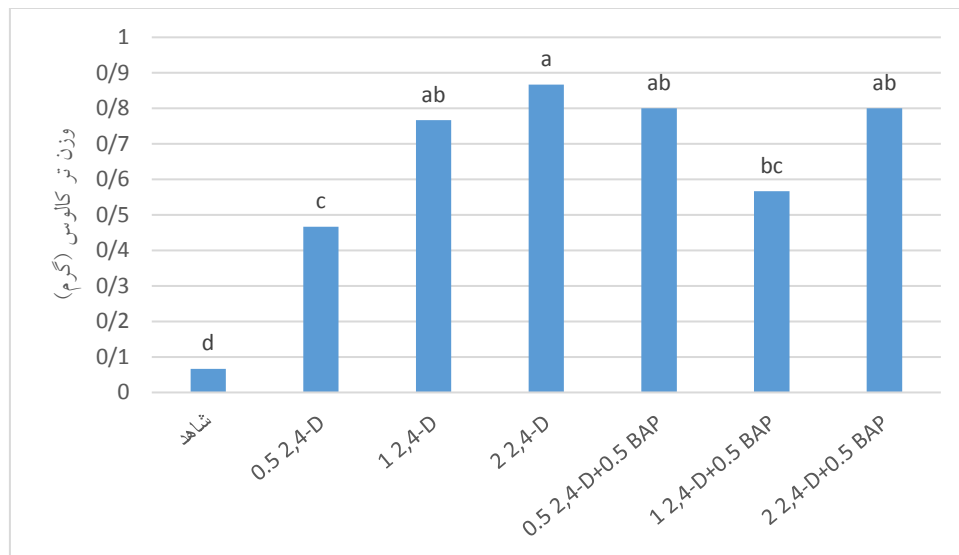
نتایج مقایسه میانگین صفت درصد القای کالوس تحت تاثیر تنظیم کننده‌های رشد 2,4-D و BAP در گیاه استویا در شکل (۱) نشان داده شده است. همانطور که در این شکل دیده می‌شود، تنظیم کننده رشد 2,4-D به میزان ۲ میلی‌گرم در لیتر به تنهایی یا در ترکیب



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

لیتر 2,4-D، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D + ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D + ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP اختلاف آماری معنی‌داری نشان نداد. کمترین میزان این صفت در تیمار شاهد (MS پایه) مشاهده شد.

مقایسه میانگین وزن تر کالوس تحت تاثیر تنظیم کننده‌های رشد 2,4-D و BAP در گیاه استویا به صورت نمودار در شکل شماره ۲ آورده شده است. همانطور که در این شکل دیده می‌شود، تنظیم کننده رشد 2,4-D به میزان ۲ میلی‌گرم در لیتر با میانگین ۰/۸۷ گرم، دارای حداکثر وزن تر کالوس بود که با ۱ میلی‌گرم در



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

گذاشت که با نتایج این پژوهش همخوانی دارد. با توجه به نتایج پژوهش حاضر به نظر می‌رسد که سیتوکینین BAP تاثیر اکسین 2,4-D را در برخی موارد کاهش داده است. علت این پدیده می‌تواند وجود سیتوکینین داخلی گیاه باشد.

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، اثر ترکیب هورمونی روی تمامی صفات اندازه‌گیری شده در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود.

نتایج مقایسه میانگین قطر کالوس تحت تاثیر تنظیم کننده رشد 2,4-D به میزان ۲ میلی‌گرم در لیتر با میانگین ۱/۹۳ سانتی‌متر، دارای بیشترین قطر کالوس بود که با ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D + ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 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 2,4-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. در این رابطه Gauchan و همکاران (۲۰۱۴) گزارش کردند که از بین غلظت‌های ۱ تا ۶ میلی‌گرم در لیتر، درصد القای کالوس از غلظت ۱ تا ۳ افزایش یافت و سپس رو به کاهش

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

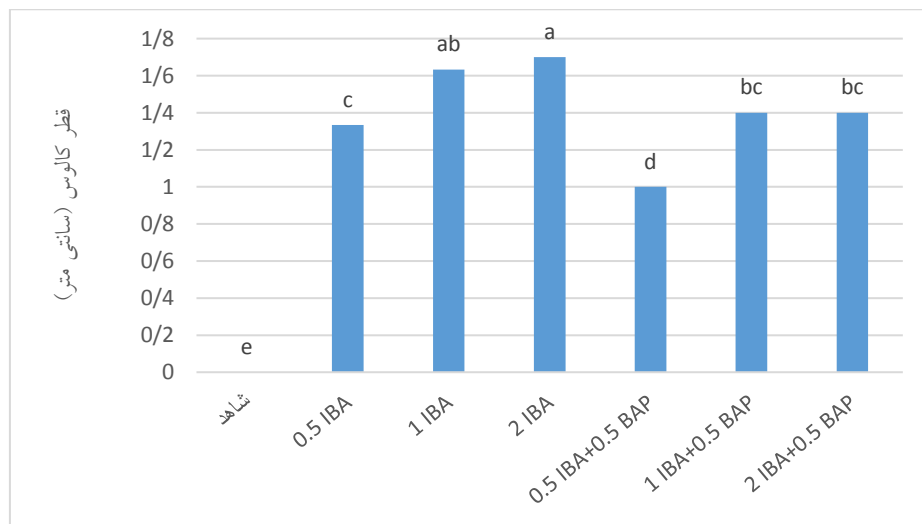
منابع تغییرات	درجه آزادی	درصد القای کالوس	وزن تر کالوس	قطر کالوس
تیمار هورمونی	۶	۲۸۶۰/۳**	۰/۲۲۳**	۱/۰۱**
خطا	۱۴	۴۷/۶۱	۰/۰۱۵	۰/۰۲۳
CV ضریب تغییرات (%CV)		۱۰/۹۷	۲۲/۳۴	۱۲/۷۵

** : معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد

بود که با ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA + ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP 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 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 میلی‌گرم در لیتر IBA اختلاف آماری معنی‌داری نداشت. افزودن سیتوکینین BAP به غلظت‌های مختلف IBA موجب کاهش قطر کالوس نسبت به حالت بدون سیتوکینین شد.

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 ۳ 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



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

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

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

تنظیم کننده رشد را می‌رساند.

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 ۱ درصد معنی‌دار بود (جدول ۳).

موجب کالوس‌هایی با وزن تر بالا و قطر کمتر شد. یعنی کالوس‌های متراکم‌تر که به نظر می‌رسد برای اهداف بازیابی مناسب‌تر باشد. زیرا در کالوس‌های غیر متراکم به دلیل وجود غلظت بالای اکسین درونی، معمولاً بازیابی کمتری رخ می‌دهد. همچنین نتایج نشان داد که BAP تاثیر بر درصد القای کالوس و وزن تر آن تحت تاثیر غلظت‌های مختلف اکسین IBA بر خلاف اکسین 2,4-D نداشت که این امر می‌تواند نشان از واکنش بافت گیاه به نوع اکسین باشد و اهمیت نوع

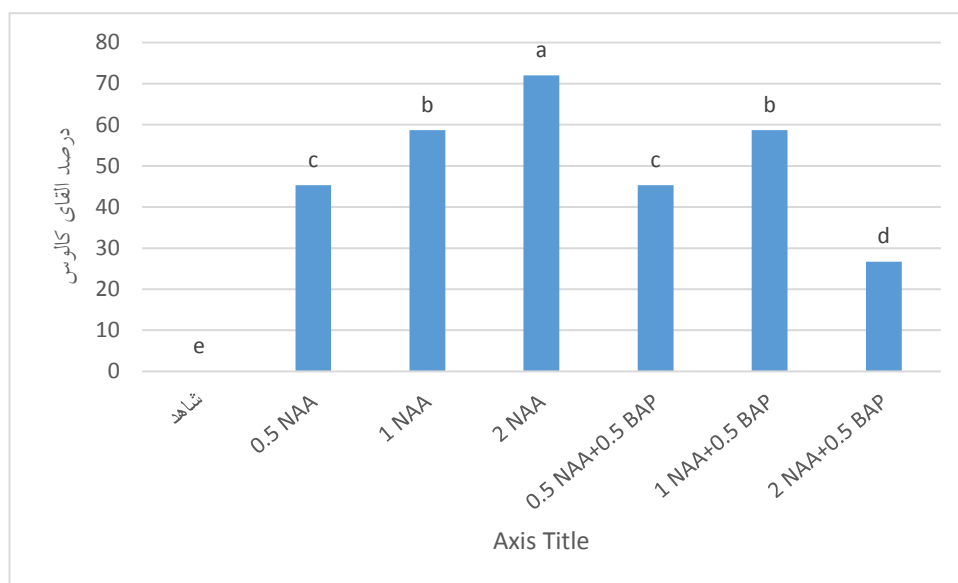
جدول ۳- تجزیه واریانس صفات مرتبط با القای کالوس تحت تاثیر تنظیم کننده‌های رشد NAA و BAP در گیاه استویا

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

** : معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد

معنی‌داری با سایر تیمارها داشت. همچنین محیط کشت حاوی ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA درصد کالوس بیشتری نسبت به اضافه نمودن مقدار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP تولید نمود. هرچند در تیمار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA تفاوتی بین افزودن ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP یا بدون BAP وجود نداشت.

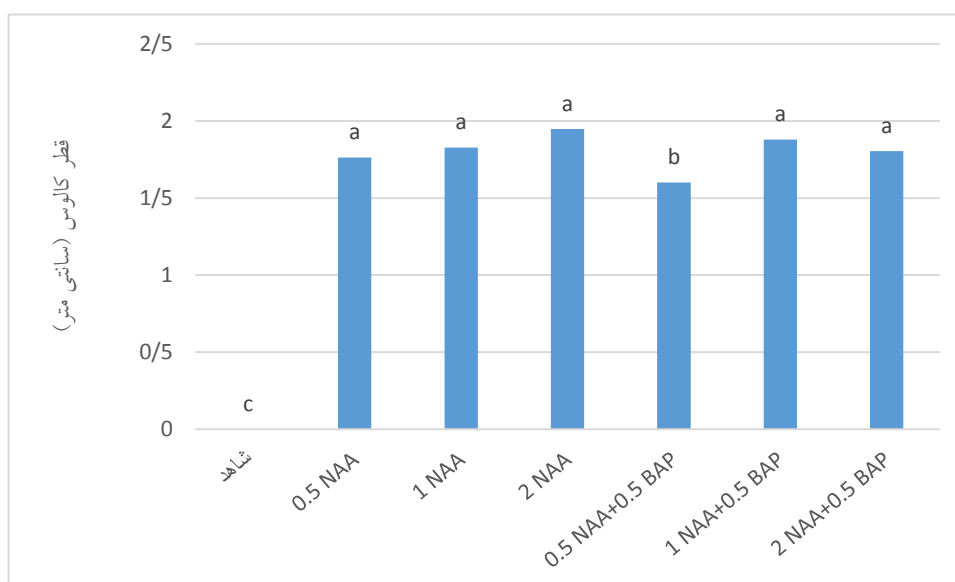
نتایج مقایسه میانگین صفت درصد القای کالوس تحت تاثیر تنظیم کننده‌های رشد NAA و BAP در گیاه استویا در شکل ۴ نشان داده شده است. همانطور که در این شکل دیده می‌شود، تنظیم کننده رشد NAA به میزان ۲ میلی‌گرم در لیتر با میانگین ۷۲ درصد، دارای حداکثر میزان القای کالوس بود که اختلاف آماری



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

افزایش میزان NAA میزان وزن کالوس نیز افزایش یافت. شکل ۵ نمودار مقایسه میانگین قطر کالوس تحت تاثیر تنظیم کننده‌های رشد NAA و BAP را در گیاه استویا نشان می‌دهد. همانطور که در این شکل دیده می‌شود، قطر کالوس در تمامی تیمارها به غیر از شاهد و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA + ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP به یک اندازه بود.

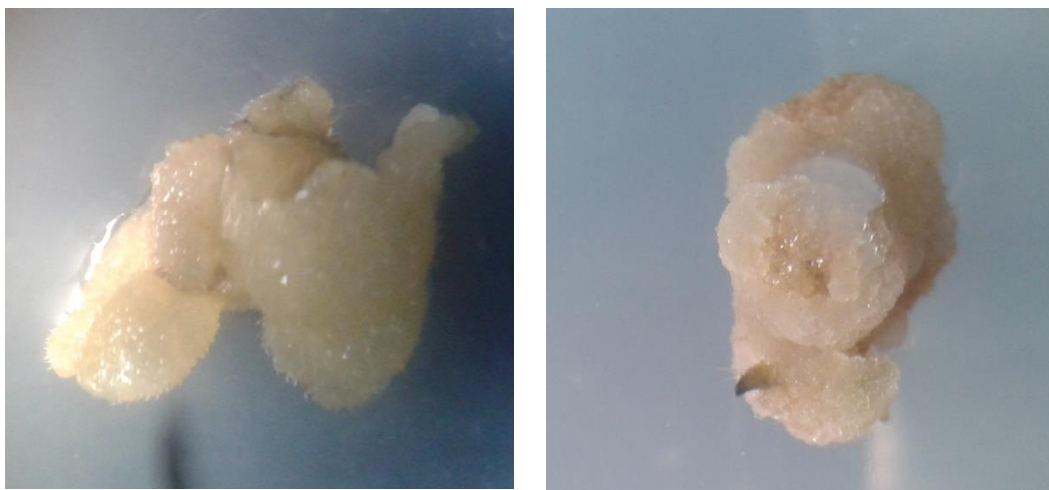
نتایج مقایسه میانگین وزن تر کالوس تحت تاثیر تنظیم کننده رشد NAA به میزان ۲ میلی‌گرم در لیتر به تنهایی با میانگین ۰/۶۴ گرم، دارای بیشترین وزن تر کالوس بود که اختلاف آماری معنی‌داری با ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA، ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA + ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA + ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP نداشتند. به علاوه، با



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

(۲۰۰۹) گزارش کردند که محیط کشت MS با غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA به همراه BAP در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر نسبت به غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA به همراه ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP کالوس بیشتری را تولید کرد که با نتایج پژوهش حاضر همخوانی داشت. فیلهو و هاتوروی (۱۹۹۷) ادعا کردند که کالوس‌های جنین‌زا 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 ۶ 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 جنین‌های سوماتیکی را دارند.

به غیر از حداکثر غلظت NAA یعنی ۲ میلی‌گرم در لیتر 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 تقریباً یکسانی تولید شد که می‌تواند دلیل احتمالی آن انتشار بهتر و یکنواخت‌تر این اکسین در بافت‌های این گیاه باشد. میرنیام (۱۳۸۹) از تیمار هورمونی BAP با غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر در ترکیب با دو نوع اکسین 2,4-D و NAA با غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲، ۲/۵ و ۳ میلی‌گرم در لیتر جهت القای کالوس در استویا استفاده نمود و گزارش کرد که از بین تیمارهای مورد استفاده بالاترین میزان کالوس در تیمار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA به دست آمد. در این تیمار درصد کالوس‌زایی ۱۰۰ درصد و میانگین نسبی وزن کالوس در آن ۵۸۵۶ میلی‌گرم بود. اما کالوس‌های حاصل دارای بازایی 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 Patel and Shah



شکل ۶- نمونه‌ای از کالوس تولید شده گیاه استویا

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 ترکیبات محیط کشت بر مسیرهای مختلف ریختزایی تاثیرگذار است یعنی احتمال دارد که دو گونه گیاهی در یک نسبت از سیتوکینین به اکسین (مثلا ۱ به ۲) 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 Kin و NAA در گیاه استویا نشان داد که ترکیب هورمونی روی صفات اندازه گیری شده فوق در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود (جدول ۴).

تشکیل کالوس نقطه آغاز بسیاری از مسیرهای کشت بافت از جمله ساقه‌زایی مبتنی بر کالوس و جنین‌زایی رویشی غیرمستقیم می‌باشد (ابراهیمی، ۱۳۸۶). بنابراین مطالعه القای کالوس در گیاهان مختلف تحت تاثیر شرایط مختلف ضروری است. 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 (Patel and Shah) و همکاران (۲۰۰۹). قطعات گره و برگ گیاهان مادری به عنوان ریز نمونه در محیط کشت MS تیمار شده با غلظت‌های مختلف 2,4-D و NAA در ترکیب با ۲/۲۲ 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 نمونه‌های به دست آمده از برگ بالاتر از ریز نمونه‌های حاصل از قطعات گره است. لذا پیشنهاد کردند که جهت کالوس‌زایی از برگ گیاه به عنوان ریزنمونه استفاده شود.

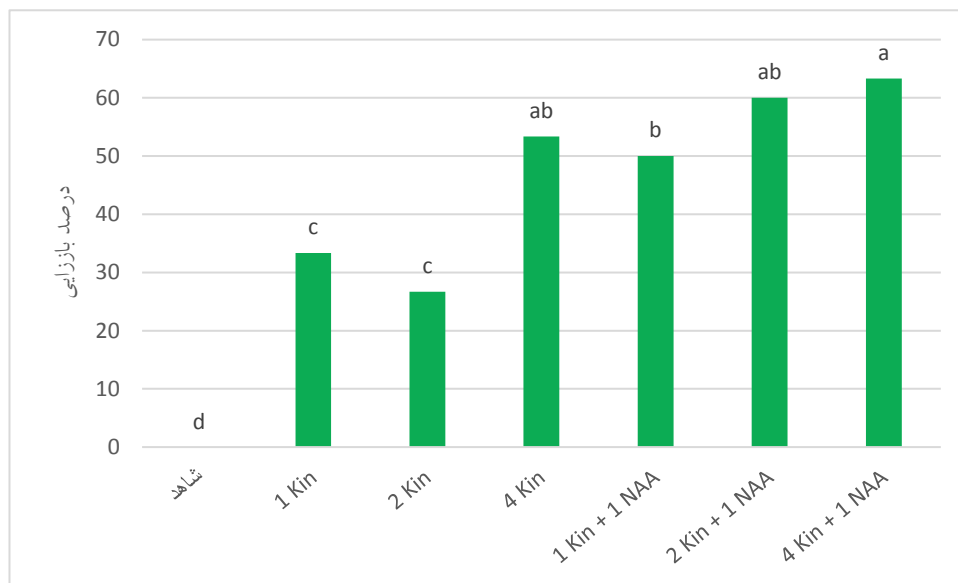
جدول ۴- تجزیه واریانس صفات مرتبط با باززایی از طریق کالوس با استفاده از تنظیم کننده‌های رشد Kin و NAA در گیاه استویا

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

** معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد

تیمارها بود که اختلاف آماری معنی‌داری با ۲ میلی گرم در لیتر + Kin ۱ میلی گرم در لیتر NAA و ۴ میلی گرم در لیتر Kin نداشت. به طور کلی در بیشتر تیمارها، افزودن مقدار ۱ میلی گرم در لیتر NAA به محیط کشت حاوی کاینترین موجب افزایش درصد باززایی شد.

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 ۴ میلی گرم در لیتر در ترکیب با ۱ میلی گرم در لیتر NAA دارای حداکثر میزان باززایی (۶۳/۳۳ درصد) در بین



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

اسید (NAA) در کنار کاینترین تاثیر مثبتی روی درصد باززایی و نیز تعداد نوساقه تولید شده گذاشت.

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 معنی‌دار بود (جدول ۵).

در مقایسه میانگین تعداد نوساقه تولید شده تحت تاثیر تنظیم کننده‌های رشد Kin و NAA در گیاه استویا ترکیب هورمونی ۲ میلی‌گرم در لیتر Kin + ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA دارای بیشترین تعداد نوساقه تولید شده (۴/۶۷ نوساقه) در بین تیمارها بود که اختلاف آماری معنی‌داری با ۴ میلی‌گرم در لیتر Kin + ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA نداشت. به طور کلی روند مشخصی در بین تیمارها برای تعداد نوساقه تولید شده مشاهده نشد. در کل، کاربرد اکسین نفتالین استیک

جدول ۵- تجزیه واریانس 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	۶	۱۹۹۸/۴۱**	۱۳/۹۳**
خطا	۱۴	۶۱/۹۰	۰/۵۲۳
CV ضریب تغییرات (CV)		۱۵/۲۹	۱۸/۳۱

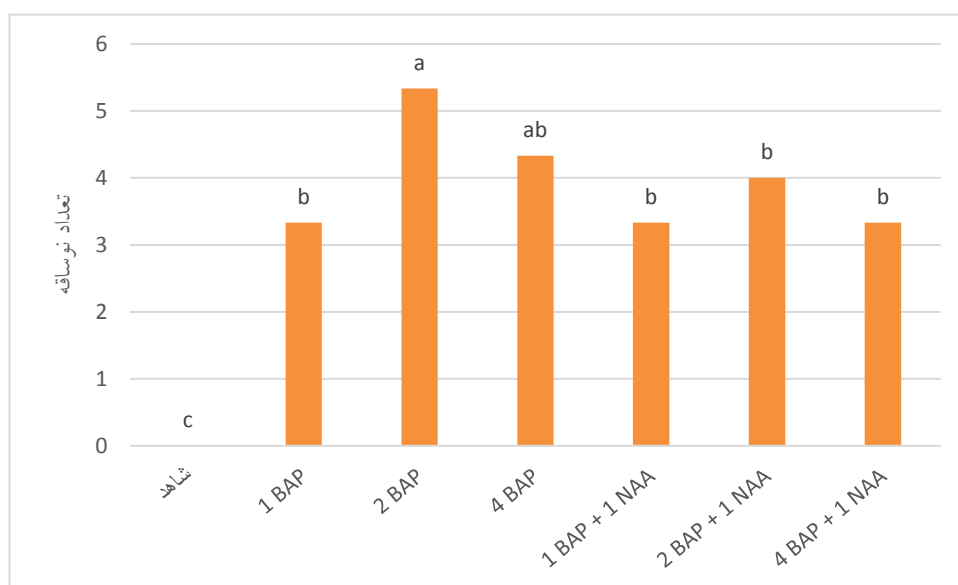
** : معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد

۱ میلی‌گرم در لیتر 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.

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 ۲ میلی‌گرم در لیتر حداکثر میزان باززایی (۸۶/۶۷ درصد) در بین تیمارها بود که اختلاف آماری معنی‌داری با ۴ میلی‌گرم در لیتر BAP، ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP + ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۴ میلی‌گرم در لیتر BAP +

در بین تیمارها بود که اختلاف آماری معنی داری با تیمار ۴ میلی گرم در لیتر BAP نداشت.

تنظیم کننده رشد گیاهی ۲ میلی گرم در لیتر BAP دارای بیشترین تعداد نوساقه تولید شده (۵/۳۳ نوساقه)



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

تعداد نوساقه را تولید نمود. دلیل احتمالی این پدیده را منبع ریزنمونه و سطوح هورمونی استفاده شده جهت تولید کالوس ذکر کرده اند (Patel and Shah, 2009).

تاثیر تنظیم کننده های رشد TDZ و NAA

نتایج تجزیه واریانس صفات درصد باززایی و تعداد نوساقه تشکیل شده تحت تاثیر تنظیم کننده های رشد سیتوکینین (TDZ) و اکسین (NAA) در گیاه استویا در جدول ۶ نشان داده شده است. همانطور که در این جدول دیده می شود، اثر ترکیب هورمونی روی تمامی صفات اندازه گیری شده در سطح احتمال ۱ درصد معنی دار بود.

محیط کشت حاوی غلظت ۲ میلی گرم در لیتر Kin دارای درصد باززایی و تعداد نوساقه بیشتری بود. بنابراین به نظر می رسد که BAP در غلظت های پایین و بالا (یعنی ۱ و ۴ میلی گرم در لیتر) با کاهش درصد باززایی و تعداد نوساقه مواجه است. Patel and Shah (۲۰۰۹) گزارش کردند که حداکثر باززایی در غلظت بالای BAP و غلظت پایین NAA یعنی ۲ میلی گرم در لیتر BAP + ۰/۲ میلی گرم در لیتر NAA رخ داد که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد. نتایج برخی تحقیقات گذشته با یافته های پژوهش حاضر مطابقت نداشت. مثلا Tadhani و همکاران (۲۰۰۶) گزارش کردند که محیط کشت MS همراه با ۰/۶ میلی گرم در لیتر BA حداکثر

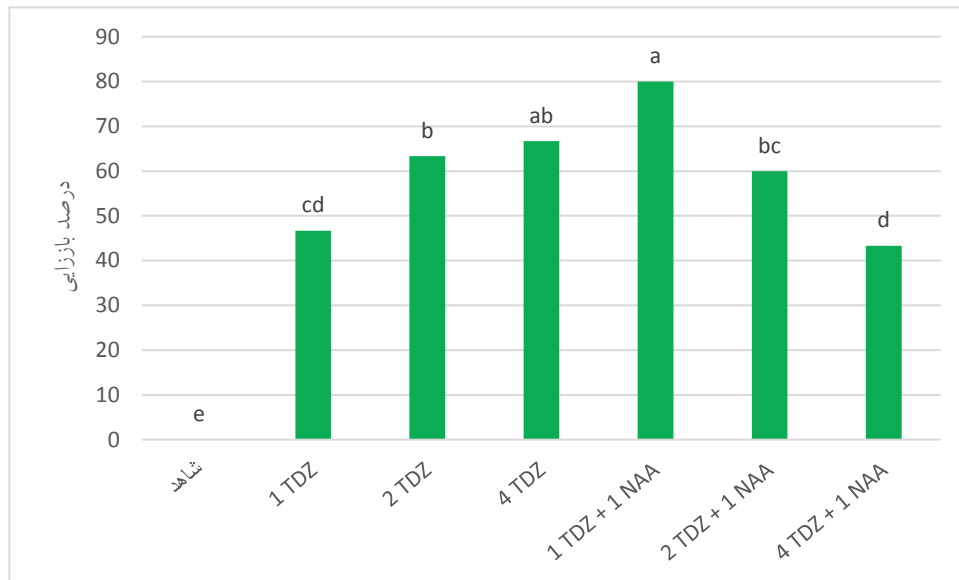
جدول ۶- تجزیه واریانس صفات مرتبط با باززایی از طریق کالوس با استفاده از تنظیم کننده های رشد TDZ و NAA در گیاه استویا

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

** : معنی دار در سطح احتمال ۱ درصد

در ترکیب با ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA دارای حداکثر میزان باززایی (۸۰ درصد) در بین تیمارها بود که اختلاف آماری معنی‌داری با ۴ میلی‌گرم در لیتر TDZ نداشت.

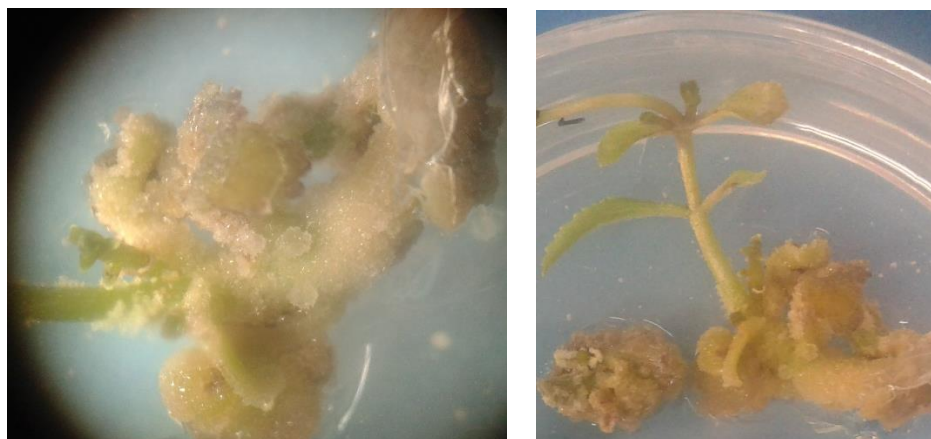
نتایج مقایسه میانگین درصد باززایی تحت تاثیر تنظیم‌کننده‌های رشد TDZ و NAA در گیاه استویا در شکل ۹ نشان داده شده است. طبق نتایج این نمودار، تنظیم‌کننده رشد TDZ به میزان ۱ میلی‌گرم در لیتر



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

نوساقه) در بین تیمارها بود که اختلاف آماری معنی‌داری با ۴ میلی‌گرم در لیتر TDZ و ۴ میلی‌گرم در لیتر TDZ + 1 میلی‌گرم در لیتر NAA نداشت. نمونه‌هایی از نوساقه‌های تولید شده در شکل ۱۰ نشان داده شده است.

در مقایسه میانگین تعداد نوساقه تولید شده تحت تاثیر تنظیم‌کننده‌های رشد TDZ و NAA در گیاه استویا تنظیم‌کننده رشد TDZ به میزان ۲ میلی‌گرم در لیتر دارای بیشترین تعداد نوساقه تولید شده (۶/۳۳)



شکل ۱۰- نمونه‌ای از نوساقه‌های تولید شده گیاه استویا

همکاران (۲۰۱۳) از تنظیم کننده‌های رشد TDZ، BA و Kn 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.

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. در محیط کشت حاوی تنظیم کننده رشد NAA کالوس‌هایی 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

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. Lata و

نتیجه‌گیری کلی

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 2,4-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 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.

منابع

Advanced Laboratory Research in Biology, 5 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). 117-128.

Mehta J, Khan S., Bisht V., Syedy, M., Rathore, R., and bagari, L. (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.

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.

آذریپور، معتمد م، بزرگی ح. (۱۳۹۲). زراعت و ترویج استویا، انتشارات دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، چاپ اول.

ابراهیمی، ا. (۱۳۸۶). بررسی برخی فاکتورهای آغازکننده مسیرهای مختلف ریخت زایی درون شیشه‌ای (کشت بافت). رساله دکترای اصلاح نباتات گرایش ژنتیک مولکولی و مهندسی ژنتیک. پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران.

باقری، 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. (۱۳۸۹). بررسی اثر 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 Productivity. Biotechnology Intelligence Unit*, 209–25.