دوماهنامه علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/ijmapr.2017.107061.1828
جلد ۳۳، شماره ۳، صفحه ۳۸۵-۳۷۳ (۱۳۹۶)

بررسی تأثیر محیط کشت و پارامترهای فیزیکی نور و دما بر تکثیر درون شیشه‌ای گیاه استویا (*Stevia rebaudiana* Bertoni)

مرتضی ابراهیمی[1*]، آرش مختاری[2] و رسول امیریان[3]

۱*- نویسنده مسئول، استادیار، بخش تحقیقات کشت بافت گیاهی، مدیریت بیوتکنولوژی کشاورزی منطقه مرکزی کشور- اصفهان، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران، پست الکترونیک: m.ebrahimi@abrii.ac.ir

۲- کارشناس ارشد، بخش تحقیقات کشت بافت گیاهی، مدیریت بیوتکنولوژی کشاورزی منطقه مرکزی کشور- اصفهان، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

۳- کارشناس ارشد، بخش تحقیقات ژنومیکس، مدیریت بیوتکنولوژی کشاورزی منطقه مرکزی کشور- اصفهان، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: مرداد ۱۳۹۵ تاریخ اصلاح نهایی: بهمن ۱۳۹۵ تاریخ پذیرش: اسفند ۱۳۹۵

چکیده

به‌منظور دستیابی به روشی اقتصادی برای تکثیر گیاه استویا (*Stevia rebaudiana* Bertoni) با استفاده از کشت بافت، تأثیر محیط کشت پایه و تنظیم‌کننده‌های رشد بر تکثیر درون شیشه گیاه استویا مطالعه شد. ریزنمونه‌های تک گره بدون برگ در محیط‌های کشت پایه MS، B5 و LS حاوی غلظت‌های مختلف بنزیل آمینو پورین به همراه ایندول استیک اسید و یا ایندول بوتریک اسید کشت شدند. تأثیر تیمارهای فیزیکی دما (۲۲، ۲۵ و ۲۷ درجه سانتی‌گراد) و شدت نور ($55 \mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$ و ۱۱۰) در این آزمایش ارزیابی شد. نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که تیمارهای مورد بررسی تفاوت معنی‌داری بر ریزازدیادی گیاه استویا داشته‌اند. سپس در آزمایشی دیگر، تأثیر غلظت‌های مختلف متاتوپولین بر تکثیر استویا، با بهترین ترکیب از تیمارهای آزمایش اول، مقایسه گردید. مقایسه میانگین‌ها در این آزمایش نشان داد که غلظت بهینه متاتوپولین ۱ میلی‌گرم بوده‌است. در ارزیابی تنوع ژنتیکی با استفاده از نشانگر مولکولی AFLP، ۱۲ ترکیب پرایمری بر روی دو نمونه از والدین اولیه با ۶ نمونه از نتاج بررسی شد. در این مطالعه ۲۳۱ باند در محدوده ۵۰۰-۵۰ جفت باز مشاهده گردید که نتایج آنالیز آنها بیانگر شباهت کامل نتاج با والدین اولیه بود.

واژه‌های کلیدی: استویا (*Stevia rebaudiana* Bertoni)، کشت بافت، متا-توپولین، BAP، زغال فعال، نور.

مقدمه

دیابت ششمین علت مرگ و میر در دنیا می باشد. با افزایش روزافزون افراد دیابتی در جهان توجه به استویا به‌عنوان یک محصول طبیعی، بدون عوارض ناشی از مصرف شیرین‌کننده‌های مصنوعی، در حال افزایش است (Ramakrishna & Ravishankar, 2013). با وجود شیرین‌کننده هایی همانند آسپارتام، سدیم ساخارین و یا ایزومالت، قند حاصل از استویا به‌دلیل داشتن دو مشخصه طبیعی بودن و کالری کم بسیار مورد توجه قرار گرفته است. استویا با نام علمی *Stevia rebaudiana* Bertoni متعلق به

خـــانواده Asteraceae (Composite) اســـت (Tanaka, 1982). برگ‌های این گیاه بـه‌شـدت شـیرین اسـت و منبـع گلیکوزیـدهای دی‌تـرپن هماننـد اسـتویوزاید و ربادیوزایـد می‌باشد (Hanson & De Oliveira, 1993).

استویا گیاهی دگرگشن است (Goettemoeller & Ching, 1999). میزان خودگشنی، ۰/۵-۰ درصد و دگرگشنی ۶۸/۷-۰/۷ درصد گزارش شده که مبین وجود یک سیستم خودناسازگاری است (Maiti & Purohit, 2008). بررسی اسپوروژنز در استویا، بی‌نظمی‌هایی را نشان داده که می‌تواند منجر به تشکیل گامت‌های غیرزیست‌پذیر گردد (Yadav *et al.*, 2011). بذر استویا به‌سختی سبز می‌شود (Goettemoeller & Ching, 1999) و استفاده از آن سبب طولانی‌تر شدن زمان شروع برداشت در سال اول می‌گردد. به‌علاوه تکثیر توسط بذر اجازه تولید جمعیت‌های هموژن را نمی‌دهد (Nakamura & Tamura, 1985). بنابراین، بهترین انتخاب استفاده از روش‌های رویشی تکثیر مانند قلمه و کشت بافت می‌باشد. تکثیر درون شیشه به‌فراوانی برای تکثیر کلون‌های انتخابی یا اصلاحی موفق بوده‌است. رشد گیاه و محتوی استویوزاید برگ گیاهان درون شیشه بسیار یکنواخت‌تر از گیاهان بذری است. در تکثیر رویشی، تعداد ریشه، بیوماس شاخه و محتوی استویوزاید بیشتر از گیاهان حاصل از بذر می‌باشد (Yadav *et al.*, 2011). در کشت بافت استویا از ریزنمونه‌های مختلفی مانند گره (Ahmed *et al.*, 2007؛ Ibrahim *et al.*, 2008)، برگ (Sreedhar *et al.*, 2008)، نوک شاخساره (Latha & Usha, 2003؛ Hossain *et al.*, 2008)، روش‌های کشت سوسپانسیون سلولی (Ferreira & Walter, 1988) و تولید انبوه در بیورآکتور (Akita *et al.*, 1994) استفاده شده‌است. تکثیر استویا از طریق جنین‌زایی رویشی با استفاده از سیتوکینین N-4-(Pyridyl)-N0-phenylurea (4-PU) (Wada *et al.*, 1981) و 2,4-D (Filho *et al.*, 1997) بر روی ریزنمونه برگ نیز گزارش شده‌است. نتایج نشان داده‌اند که جمعیت‌های گیاهی تولید شده توسط اندام‌زایی مستقیم از مریستم‌های نوک ساقه و ریزنمونه‌های برگی هموژن بوده و کشت بافت می‌تواند جایگزین مناسبی برای تکثیر سنتی باشد (Czechowiak *et al.*, 1984؛ Tamura *et al.*, 1984). اگرچه در بیشتر این تحقیقات، محیط کشت پایه MS و BAP (Kumar *et al.*, 2009؛ Ibrahim *et al.*, 2008؛ Sivaram & Mukundan, 2003) به‌عنوان مناسب‌ترین تنظیم‌کننده رشد در باززایی شاخساره گزارش شده‌اند اما از محیط کشت پایه دیگری نیز مانند LS (El-Zaidy *et al.*, 2014) و یا انواع دیگر تنظیم‌کننده رشد مانند Kin و یا 2,4-D (Morini *et al.*, 2003) توسط محققان استفاده شده‌است. در این بررسی سعی شده است تا تأثیر غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده رشد و پارامترهای فیزیکی مؤثر بر رشد شامل دما و نور، بر پرآوری و ریشه‌زایی درون شیشه‌ای استویا مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

تهیه ریزنمونه و ضدعفونی

برای تهیه ریزنمونه از سرشاخه‌های جوان گیاهان گلدانی استفاده شد. ضدعفونی ریزنمونه‌ها به‌ترتیب با الکل ۷۰٪ به مدت ۳۰ ثانیه و در ادامه با هیپوکلریت سدیم ۰/۵٪ و قطره‌ای توین ۲۰ به مدت ۱۵ دقیقه و حداقل سه بار شستشو با آب مقطر استریل انجام شد. از ریزنمونه تک‌گره پس از حذف برگ، به‌منظور کشت بافت استفاده شد.

محیط کشت پرآوری: این مرحله در دو آزمایش مجزا اجرا شد. ابتدا ریزنمونه‌های تک‌گره بدون برگ از مرحله قبل به صورت جداگانه در محیط‌های کشت پایه MS، B5 و LS به همراه تیمارهای هورمونی BAP1mg/l+IAA0.5mg/l، BAP2mg/l+IAA1mg/l، BAP1mg/l+IBA0.5mg/l و BAP2mg/l+IBA1mg/l و نیز محیط بدون تنظیم‌کننده رشد (شاهد)، کشت شده و به‌منظور بررسی تأثیر شرایط فیزیکی دما و نور به اتاق‌های رشد با دمای ۲۲، ۲۵ و ۲۷ درجه سانتی‌گراد و شدت نور ۵۵μmol m^{-2} s^{-1} و ۱۱۰μmol m^{-2} s^{-1} انتقال داده شد. ریزنمونه‌های کشت شده به مدت دو ماه تحت چنین شرایطی و با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری و هر ماه

سرشاخه‌های ایجاد شده بر روی هر ریزنمونه به‌صورت تک‌گره به محیط کشت تازه بازکشت گردید. در این مرحله تعداد و طول شاخساره اصلی، تعداد و طول شاخساره جانبی، تعداد و طول میانگره، تعداد ریزنمونه‌هایی که پایه کالوسی تولید کرده‌اند و میانگین قطر کالوس پس از چهار هفته و به‌ازای هر ریزنمونه ثبت شد. پس از آنالیز داده‌ها، بهترین ترکیب محیط کشت از آزمایش اول (تیمار شماره ۳) انتخاب شده و در آزمایش دوم با نتایج تیمارهایی از تنظیم‌کننده رشد متا-توپولین (*mT*) با غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر به همراه ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر IBA مقایسه گردید. طرز تهیه نمونه، مشابه مرحله قبل انجام شد. در این آزمایش، شرایط نگهداری نمونه‌ها در اتاق رشد براساس نتایج حاصل از مرحله قبل انجام گردید. شاخص‌های اندازه‌گیری مانند مرحله قبل لحاظ شد.

ریشه‌زایی، انتقال به خاک و مقاوم‌سازی

به‌منظور بررسی تأثیر تیمارهای مرحله پرآوری بر ریشه‌زایی، شاخساره‌های حاصل از بهترین تیمارهای پرآوری مربوط به آزمایش اول و دوم مرحله قبل به محیط کشت پایه MS حاوی یکی از تنظیم‌کننده‌های رشد NAA، IBA و IAA با غلظت‌های ۰، ۱ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر به‌صورت جداگانه کشت شدند. هر یک از محیط‌های کشت فوق به همراه ۴ گرم بر لیتر زغال فعال و یا بدون زغال فعال تهیه شد. نمونه‌های کشت شده به مدت ۱ ماه در اتاق‌های رشد در شرایط دما و نور مناسب نتیجه‌گیری شده از آزمایش مرحله قبل نگهداری شدند. پس از مدت یک‌ماه درصد ریشه‌زایی، تعداد و طول ریشه در تیمارهای فوق اندازه‌گیری شده و در نهایت بهترین محیط ریشه‌زایی مشخص گردید. گیاهچه‌های درون شیشه‌ای حاصل، به گلدان حاوی خاک زراعی و پیت ماس (۱:۱) منتقل شده و در فیتوترون با رطوبت نسبی ۸۵٪، دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و شدت نور حدود ۲۵۰μmol m^{-2} s^{-1} قرار گرفتند. رطوبت نسبی اتاق از هفته دوم به‌تدریج و طی یک دوره ده روزه به حدود ۶۰٪ کاهش داده شد. رژیم نوری فوق با دوره نوری مشابه اتاق رشد اعمال گردید. گلدان‌ها پس از اجرای موفق عملیات مقاوم‌سازی در گلخانه تحقیقاتی قرار داده شدند.

تجزیه و تحلیل آماری

در این بررسی آزمایش‌ها به‌صورت فاکتوریل با طرح پایه کاملاً تصادفی و با حداقل ۳ تکرار ۱۰ شیشه‌ای هر یک حاوی ۱۰ ریزنمونه اجرا شد. تجزیه واریانس داده‌های حاصل و مقایسه میانگین‌ها به‌ترتیب با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS ver. 9.2 و با آزمون چند دامنه دانکن (Duncan's Multiple range test, $P \leq 0.05$) انجام شد.

بررسی تنوع ژنتیکی با استفاده از نشانگرهای مولکولی AFLP

برای بررسی تفاوت ژنتیکی بین نمونه‌های تکثیر شده در محیط *in vitro* با گیاه مادری، ۶ نمونه تصادفی از نتاج تکثیر شده همراه با دو نمونه از والد اولیه توسط نشانگرهای مولکولی AFLP مورد مقایسه قرار گرفتند. استخراج DNA از برگ با استفاده از کیت DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) انجام شد. برای ارزیابی توسط نشانگر AFLP، مقدار ۴۰ نانوگرم از DNA استخراج شده برای مرحله برش با آنزیم‌های برشی استفاده شد. نتایج حاصل از تکثیر در مرحله انتخابی بر روی ژل پلی‌اکریلامید مورد بررسی قرار گرفتند. آنالیز ژل‌ها برای شناسایی باندها به‌وسیله نرم‌افزار CLIQS 1D PRO (Totallab) انجام گردید.

نتایج

مرحله پرآوری

بررسی تأثیر محیط کشت پایه

نتایج تجزیه واریانس داده‌های مربوط به آزمایش مرحله اول و دوم مرحله پرآوری نشان داد که تأثیر محیط کشت پایه بر همه متغیرهای اندازه‌گیری شده تأثیر معنی‌داری داشته است (جدول ۱). محیط کشت پایه MS تأثیر

معنی‌داری نسبت به دو محیط دیگر بر افزایش طول شاخساره‌های اصلی (۲۳/۵ میلی‌متر) و فرعی (۱۰/۴ میلی‌متر) ایجاد شده و نیز طول میانگره‌های حاصل (۶/۳۸ میلی‌متر) داشته است. در مقابل محیط کشت پایه B5 سبب تولید بیشترین تعداد شاخه اصلی (۲/۰۶)، فرعی (۱/۹۳) و میانگره (۲/۸۴) شده‌است. این در حالیست که در محیط LS، تمامی پارامترها اعم از تعداد و طول شاخه، میانگین قطر کالوس و درصد ریزنمونه‌های کالوسی در کمترین مقدار بوده است (جدول ۱). از نظر طول شاخه فرعی بین محیط کشت پایه MS و B5 تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. در محیط کشت پایه MS ۶۶٪ ریزنمونه‌ها قائده کالوسی تولید کرده‌اند. میانگین قطر این کالوس‌ها ۶/۳ میلی‌متر بود. در مجموع با توجه به نتایج و شرایط ظاهری، محیط کشت MS از شرایط مطلوب‌تری از نظر تولید گیاهچه برخوردار بود.

بررسی تیمارهای تنظیم‌کننده رشد

این تیمارها تأثیر معنی‌داری بر متغیرهای اندازه‌گیری شده نشان دادند (جدول ۲). تیمار هورمونی BAP 1mg/l+ IBA 0.5mg/l با ۲/۰۸ عدد، سبب تولید بیشترین تعداد شاخه اصلی شده‌است. در این تیمار تعداد شاخه فرعی (۲ عدد) و تعداد میانگره (۳/۱ عدد) نیز بیش از سایر ترکیب‌های تنظیم‌کننده رشد بود. نوع اکسین نیز از اهمیت بالایی در پرآوری استویا برخوردار بود. تغییر نوع اکسین به IAA سبب کاهش معنی‌داری در تعداد شاخه اصلی، تعداد میانگره و تعداد شاخه فرعی شد. تیمار BAP 1mg/l+ IBA 0.5mg/l از نظر طول شاخه اصلی (۲۷/۱۳ میلی‌متر)، شاخه فرعی (۱۰/۱۶ میلی‌متر) و میانگره (۶/۷۵ میلی‌متر) نیز از شرایط بهتری برخوردار بود. طبق جدول ۲، تیمارهای هورمونی موجب افزایش نسبت ریزنمونه‌های کالوسی شده است. این وضعیت در مورد میانگین قطر کالوس نیز وجود داشت. کمترین میانگین قطر کالوس مربوط به تیمار شاهد فاقد هورمون بود و تیمارهای مختلف تنظیم‌کننده رشد موجب افزایش معنی‌داری در میانگین قطر کالوس شده‌اند. تیمار BAP 2mg/l+ IBA 1mg/l با نسبت ۰/۵۷ و نیز میانگین قطر کالوس ۵/۸۹ میلی‌متر بیشترین مقدار را داشته است. با بررسی اثر متقابل تیمار ترکیب‌های تنظیم‌کننده‌های رشد با سایر تیمارها و با احتساب کلی متغیرهای مورد بررسی و وضعیت ظاهری گیاهچه‌های حاصل، تیمار BAP 1mg/l+ IBA 0.5mg/l در محیط کشت پایه MS و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و شدت نور ۱۱۰μmol m^{-2} s^{-1} سبب تولید بهترین شاخساره‌ها از نظر کمّی و کیفی شده‌است.

جدول ۱- تأثیر محیط کشت پایه بر مشخصات شاخه، تعداد میانگره، نسبت ریزنمونه‌های کالوس داده و میانگین قطر کالوس حاصل از کشت ریزنمونه جوانه جانبی گیاه استویا در مرحله پرآوری

محیط کشت پایه	تعداد			طول (mm)			میانگین قطر کالوس (mm)	نسبت ریزنمونه‌های کالوس داده
	شاخه اصلی	شاخه فرعی	میانگره	شاخه اصلی	شاخه فرعی	میانگره		
MS	۲/۰۱ a	۱/۶۳ b	۲/۵۶ b	۲۳/۵ a	۱۰/۴ a	۶/۳۸ a	۶/۳۷ a	۰/۶۶۱ a
B5	۲/۰۶ a	۱/۹۳ a	۲/۸۴ a	۲۰/۵۲ b	۱۰/۳ a	۵/۲۵ b	۴/۸۳ b	۰/۴۳ b
LS	۱/۵۸ b	۱/۴۸ c	۲/۰۶ b	۱۵/۴۸ c	۵/۸ b	۳/۹۳ c	۳/۱۸ c	۰/۲۸ c

مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه دانکن (P≤0.05). میانگین‌های دارای حروف مشترک اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ ندارند.

شکل ۱- نمایی از مراحل مختلف تولید گیاهچه‌های کشت بافتی استویا از مرحله استقرار، پرآوری و ریشه‌زایی تا انتقال به خاک در سطح تولید نیمه انبوه

جدول ۲- تأثیر ترکیب هورمونی محیط کشت بر تعداد شاخه اصلی، تعداد شاخه فرعی، تعداد میانگره، طول شاخه اصلی، طول شاخه فرعی و طول میانگره حاصل از کشت ریزنمونه جوانه جانبی گیاه استویا در مرحله پرآوری

تیمار هورمونی	تعداد			طول (mm)			میانگین قطر کالوس (mm)	نسبت ریزنمونه‌های کالوس داده
	شاخه اصلی	شاخه فرعی	میانگره	شاخه اصلی	شاخه فرعی	میانگره		
۱	۱/۷۶ c	۱/۸۵ ab	۲/۱۷ c	۱۸/۶۱ bc	۸/۶۷ bc	۴/۸۰ bc	۵/۴۶ a	۰/۴۹ a
۲	۱/۹۳ b	۱/۵۵ b	۲/۵۴ b	۲۰/۱۰ b	۸/۱۳ c	۵/۴۵ b	۵/۴۹ a	۰/۵۴ a
۳	۲/۰۸ a	۲/۰۳ a	۳/۱۳ a	۲۷/۱۲ a	۱۰/۱۶ a	۶/۷۵ a	۵/۵۱ a	۰/۴۶ a
۴	۱/۹۲ b	۱/۵۲ b	۲/۴۴ b	۱۷/۲۰ cd	۷/۶۸ c	۴/۶۸ bc	۵/۸۸ a	۰/۵۶ a
۵	۱/۷۲ c	۱/۴۵ b	۲/۱۶ c	۱۶/۲۲ d	۹/۶۶ ab	۴/۲۵ c	۱/۶۲ b	۰/۲۲ b

مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه دانکن ($P \leq 0.05$). میانگین‌های دارای حروف مشترک اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ ندارند.

۱- BAP1mg/l+IAA0.5mg/l، ۲- BAP2mg/l+IAA1mg/l، ۳- BAP1mg/l+IBA0.5mg/l، ۴- BAP2mg/l+IBA1mg/l و ۵- محیط بدون تنظیم‌کننده رشد (شاهد)

تأثیر تیمار درجه حرارت بر متغیرهای مورد بررسی

درجه حرارت تأثیر معنی‌داری (در سطح احتمال ۱٪) بر متغیرهای مورد بررسی داشت (جدول ۳). در این آزمایش دمای بهینه رشد استویا ۲۵ درجه سانتی‌گراد نشان داده شده است. از نظر تعداد شاخه فرعی بین تیمار دمایی ۲۲ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد تفاوت معنی‌داری دیده نشد. در هر دوی این تیمارها حدود ۱/۸ عدد شاخه فرعی به ازای هر ریزنمونه تولید شد. در مقابل این دو دما از نظر تعداد شاخه اصلی تفاوت معنی‌دار (در سطح احتمال ۱٪) نشان دادند. با توجه به رشد ظاهری گیاهچه‌ها و بررسی تأثیر دما بر افزایش طول شاخساره (جدول ۳) می‌توان دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد را به‌عنوان دمای بهینه رشد استویا در نظر گرفت. به نظر می‌رسد که افزایش نسبت ریزنمونه‌های کالوسی و قطر کالوس در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد عمدتاً مربوط به سرعت رشد بیشتر نمونه‌ها در این دما بوده‌است.

جدول ۳- تأثیر سطوح مختلف درجه حرارت بر تعداد شاخه اصلی، تعداد شاخه فرعی، طول شاخه اصلی، فرعی و میانگره، نسبت ریزنمونه‌های کالوس داده و میانگین قطر کالوس (mm) حاصل از کشت ریزنمونه جوانه جانبی گیاه استویا در مرحله پرآوری

تیمار دما	تعداد		طول (mm)			میانگین قطر کالوس (mm)	نسبت ریزنمونه‌های کالوس داده
	شاخه اصلی	شاخه فرعی	شاخه اصلی	شاخه فرعی	میانگره		
۲۲°C	۲/۰۱ a	۱/۸۱ a	۲۰/۷۴ a	۱۰/۰۵ a	۵/۲ ab	۵/۰۶ ab	۰/۴۷ a
۲۵°C	۱/۸ b	۱/۸۶ a	۲۲/۰۱ a	۱۰/۴۲ a	۵/۷ a	۵/۶۸ a	۰/۵۳ a
۲۷°C	۱/۸۳ b	۱/۳۹ b	۱۷/۹۵ b	۶/۳۲ b	۴/۶ b	۴/۶۳ b	۰/۳۳ b

مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه دانکن ($P \leq 0.05$). میانگین‌های دارای حروف مشترک اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ ندارند.

تأثیر تیمار شدت نور بر متغیرهای مورد بررسی

در این بررسی تیمار نوری تنها بر طول شاخه اصلی، طول شاخه فرعی و طول میانگره و نیز قطر کالوس تأثیر معنی‌دار (در سطح احتمال ۱٪) داشت. از بین دو شدت نور بکار رفته، شدت نور ۵۵μmol m^{-2} s^{-1} سبب افزایش میزان رشد گیاهچه‌ها شد. در این شدت نور طول شاخه اصلی به‌طور میانگین ۲۲/۲۱ میلی‌متر بود که حدود ۵ میلی‌متر بیشتر از شدت ۱۱۰μmol m^{-2} s^{-1} بود (جدول ۴). در شدت نور ۵۵μmol m^{-2} s^{-1} طول شاخه فرعی ۱۰/۰۷ میلی‌متر و طول میانگره ۵/۹ میلی‌متر بدست آمد. با توجه به افزایش میزان رشد گیاهچه‌ها در این شدت نور، افزایش میانگین رشد کالوس‌ها نیز مشاهده شد. در شدت نور ۵۵μmol m^{-2} s^{-1} میانگین قطر کالوس ۵/۲ میلی‌متر بدست آمد و این مقدار تفاوت معنی‌داری با میانگین قطر کالوس در شدت نور ۱۱۰μmol m^{-2} s^{-1} داشت. همانند دیگر تیمارهای مورد بررسی در این تحقیق، شدت نور نیز دارای اثر متقابل با سایر تیمارها بود.

بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف متا-توپولین (*mT*) بر پرآوری گیاه استویا

پس از بررسی داده‌های حاصل از آزمایش مرحله اول پرآوری و مشخص کردن شدت بهینه نور و دمای مناسب، از تنظیم‌کننده رشد متا-توپولین به‌منظور بررسی تأثیر آن بر پرآوری استویا و مقایسه آن با بهترین ترکیب آزمایش اول استفاده شد.

جدول ۴- تأثیر شدت نور بر طول شاخه اصلی، طول شاخه فرعی، طول میانگره و میانگین قطر کالوس حاصل از کشت ریزنمونه جوانه جانبی گیاه استویا در مرحله پرآوری

تیمار شدت نور	طول (mm)			میانگین قطر
	شاخه اصلی	شاخه فرعی	میانگره	کالوس (mm)
۵۵μmol m^{-2} s^{-1}	۲۲/۲۰ a	۱۰/۰۷ a	۵/۹۰ a	۵/۲۰ a
۱۱۰μmol m^{-2} s^{-1}	۱۷/۵۰ b	۷/۶۵ b	۴/۴۷ b	۴/۳۹ b

مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه دانکن (P≤0.05). میانگین‌های دارای حروف مشترک اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ ندارند.

جدول ۵- مقایسه تیمارهای مختلف تنظیم‌کننده رشد mT با بهینه‌ترین محیط کشت مرحله اول آزمایش و تأثیر آن بر تعداد شاخه اصلی، تعداد شاخه فرعی و تعداد میانگره، طول شاخه اصلی، طول شاخه فرعی و طول میانگره، نسبت ریزنمونه‌های کالوسی و میانگین قطر کالوس (mm) حاصل از کشت ریزنمونه جوانه جانبی گیاه استویا در مرحله پرآوری

تیمار	تعداد			طول (mm)			میانگین قطر	نسبت ریزنمونه‌های
هورمونی	شاخه اصلی	شاخه فرعی	میانگره	شاخه اصلی	شاخه فرعی	میانگره	کالوس (mm)	کالوس داده
۱	۱/۷۵ c	۱/۵۵ c	۲/۴ b	۱۶/۸۸ c	۵/۸۷ c	۴/۴۵ c	۲/۰۲ c	۰/۲۶ c
۲	۲/۰۵ bc	۱/۷۷ c	۲/۹۳ b	۳۳/۲ b	۹/۴۲ b	۶/۴۲ b	۳/۹۷ bc	۰/۲۱ c
۳	۲/۶۲ a	۴/۰۷ a	۴/۲ a	۴۳/۵ a	۱۱/۶۲ b	۶/۵۷ b	۳/۹۷ bc	۰/۲۸ c
۴	۲/۶۲ a	۳/۳۲ b	۳/۷۵ a	۳۸/۵ ab	۱۱/۰۵ b	۴/۷ bc	۵/۰۷ ab	۰/۴۷ b
۵	۲/۶۵ a	۳/۴۵ b	۴/۱۷ a	۳۴ b	۱۰/۱۲ b	۴/۷ bc	۶/۳۲ a	۰/۶۸ a
۶	۲/۲۵ ab	۳/۱۲ b	۳/۷ a	۴۰/۳ ab	۲۲/۱۳ a	۱۰/۳۰ a	۶/۷۲ a	۰/۶۶ a

مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه دانکن (P≤0.05). میانگین‌های دارای حروف مشترک اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ ندارند.

۱- شاهد، ۲- mT 0.5 mg/l + IBA 0.5 mg/l، ۳- mT 1 mg/l + IBA 0.5 mg/l، ۴- mT 1.5 mg/l + IBA 0.5 mg/l، ۵- mT 2 mg/l + IBA 0.5 mg/l و ۶- BAP 1 0.5 mg/l + IBA 0.5 mg/l

بین تیمارهای این آزمایش تفاوت معنی‌داری (سطح احتمال ۱٪) از نظر تعداد و طول شاخساره اصلی، تعداد و طول شاخساره فرعی، تعداد و طول میانگره، نسبت ریزنمونه‌های کالوس داده و میانگین قطر کالوس وجود داشت (جدول ۵). تیمار *mT*1mg/l+IBA0.5mg/l پاسخ بهتری نسبت به دیگر تیمارها نشان داد. اگرچه این تیمار در رابطه با طول و تعداد شاخساره اصلی و تعداد میانگره نسبت به تیمار دارای BAP تفاوت معنی‌داری نداشت، اما میانگین‌های حاصل در این تیمار کمی بالاتر از تیمار حاوی BAP بود. به علاوه این تیمار با تولید ۴ شاخساره فرعی، تعداد قابل توجهی شاخساره نسبت به تیمار حاوی BAP تولید کرد. در مقابل تیمار دارای BAP از نظر طول شاخساره فرعی و طول میانگره تفاوت معنی‌داری نسبت به تیمارهای حاوی *mT* داشت. مقایسه نتایج در جدول ۵ نشان می‌دهد که تیمار *mT*1mg/l+IBA0.5mg/l نه تنها سبب بهبود شاخه‌زایی در استویا شده است بلکه سبب تشکیل نسبت پایین‌تری از شاخساره‌های کالوسی و قطر کالوس گردید.

نتایج مرحله ریشه‌زایی

بین شاخساره‌های تولید شده از دو تیمار هورمونی BAP و *mT* مورد استفاده در مرحله پرآوری تفاوت معنی‌داری از نظر درصد ریشه‌زایی، تعداد و طول ریشه وجود نداشت (جدول ۵). تیمار زغال فعال سبب بهبود متغیرهای مورد بررسی در این

مرحله شد. این تیمار تأثیر معنی‌داری بر درصد ریشه‌زایی (۷۵٪ ریشه‌زایی) و میانگین طول و تعداد ریشه (در سطح احتمال ۱٪) داشته است (جدول ۶). در جدول ۷ مشاهده می‌گردد که تیمار تنظیم‌کننده‌های رشد تأثیر معنی‌داری بر درصد ریشه‌زایی و میانگین تعداد و طول ریشه داشته‌اند. تیمار IAA 1mg/l موجب بیشترین درصد ریشه‌زایی شده‌است. در این تیمار به‌ترتیب ۹۳/۵٪ و ۸۷/۶٪ از شاخساره‌های با منشأ *mT* و BAP ریشه‌زایی کردند. در تیمار تنظیم‌کننده رشد IBA 2mg/l با تولید حدود ۱۳ و ۱۰ عدد ریشه به‌ازای هر ریزنمونه به‌ترتیب برای شاخساره‌های با منشأ *mT* و BAP، بیشترین تعداد ریشه بدست آمده است. در رابطه با تأثیر تیمار تنظیم‌کننده رشد بر میانگین طول ریشه (جدول ۷) تیمار IBA 1mg/l با ۳۸/۷ و ۳۱/۸۹ میلی‌متر بیشترین میانگین طول ریشه را به‌ترتیب برای شاخساره‌های با منشأ *mT* و BAP داشت. عملیات مقاوم‌سازی گیاهچه‌های حاصل پس از انتقال به خاک با کاهش تدریجی رطوبت به مدت ۱۰ روز به طول انجامید. گیاهان مقاوم‌سازی شده به گلخانه انتقال داده شدند. تمامی گیاهان پس از انتقال به گلخانه زنده مانده و به رشد طبیعی خود ادامه دادند (شکل ۱).

نتایج ارزیابی شباهت ژنتیکی نتاج با والد اولیه

در این تحقیق با توجه به استفاده از کشت گره برای ریزازدیادی، عدم وجود تنوع ژنتیکی پیش‌بینی شده بود که نتایج ارزیابی مولکولی نشانگر این مسئله است. در ارزیابی تنوع ژنتیکی با استفاده از ۱۲ ترکیب پرایمری نشانگر مولکولی AFLP بر روی دو نمونه از والدین اولیه با ۶ نمونه از نتاج، ۲۳۱ باند در محدوده ۵۰۰-۵۰ جفت باز مشاهده شدند که آنالیز آنها بیانگر شباهت کامل نتاج با والدین اولیه بود (شکل ۲).

جدول ۶- مقایسه میانگین تأثیر زغال فعال بر درصد ریشه‌زایی، میانگین تعداد ریشه به‌ازای هر ریزنمونه ریشه داده و میانگین طول ریشه

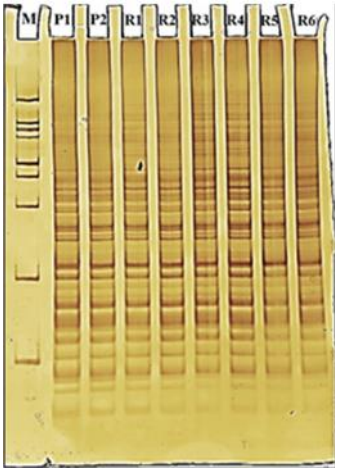
تیمار	درصد ریشه‌زایی	میانگین تعداد ریشه	میانگین طول ریشه
با زغال فعال	۷۵/۴۲ a	۹/۸۷ a	۲۷/۰۹ a
بدون زغال فعال	۶۶/۰۰ b	۸/۴۲ b	۲۳/۴۲ b

مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه دانکن (P≤0.05). میانگین‌های دارای حروف مشترک اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ ندارند.

جدول ۷- تأثیر تیمارهای مختلف تنظیم‌کننده رشد بر درصد ریشه‌زایی، تعداد ریشه و طول ریشه حاصل از کشت شاخساره‌های درون شیشه‌ای منشأ گرفته از بهترین تیمار BAP و *mT* گیاه استویا در محیط ریشه‌زایی

تیمار هورمونی	درصد ریشه‌زایی		تعداد ریشه		طول ریشه	
	BAP	**mT**	**BAP**	**mT**	**BAP**	**mT**
IAA 1 mg/l	۸۷/۶ a	۹۳/۵ a	۸/۷ b	۹/۳۷ b	۲۹/۷ b	۳۳/۹ ab
IAA 2 mg/l	۷۸/۲ b	۸۱/۷ b	۸/۴۷ bc	۷/۶۸ c	۳۰/۳ b	۳۰/۳ b
IBA 1 mg/l	۷۸/۸ b	۷۸/۷ b	۹/۸۸ ab	۱۰/۴۵ b	۳۱/۸۹ a	۳۸/۷ a
IBA 2 mg/l	۶۱/۴ d	۶۲/۴ d	۱۰/۵۵ ab	۱۳/۳۳ a	۲۸/۷۳ c	۲۳/۹ c
NAA 1 mg/l	۷۱ c	۶۸/۹ c	۶/۰۲ cd	۷/۴۶ cd	۲۳/۴ cd	۲۰/۸ cd
NAA 2 mg/l	۵۵/۱ e	۵۵/۱ e	۹/۳۶ ab	۹/۲۵ b	۱۷/۶۶ d	۱۸/۸ d
شاهد	۵۷/۲ e	۵۷/۲ e	۸/۲ b	۸/۲ b	۹ e	۹ e

مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه دانکن (P≤0.05). میانگین‌های دارای حروف مشترک اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ ندارند.



شکل ۲- نتیجه حاصل از بررسی دو نمونه از والدین (P1 و P2) و شش نمونه از نتاج تکثیر شده (R1-R6) با نشانگر AFLP◄

بحث

به‌دلیل اهمیت موضوع تحقیقات نسبتاً زیادی در رابطه با کشت بافت این گیاه ارزشمند انجام شده و گزارش‌های بسیاری از تلاش برای تجاری‌سازی تولید آن وجود دارد (Ibrahim *et al*., 2008؛ Kumar & Singh, 2009؛ Singh *et al*., 2011؛ Javad *et al*., 2012؛ El-Zaidy *et al*., 2014). در تحقیقات مرتبط با تکثیر گیاه استویا عمدتاً از محیط کشت پایه MS و تنظیم‌کننده رشد BAP استفاده شده است. Ahmed و همکاران (۲۰۰۷) نشان دادند که استفاده از BAP به همراه Kin به‌ترتیب با غلظت ۱/۵ و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر در محیط کشت پایه MS سبب تولید بیشتر از ۸ عدد شاخساره به ازای هر ریزنمونه گردیده است. در این تیمار ۸۵٪ از ریزنمونه‌های مورد استفاده تولید شاخساره کرده‌اند. متأسفانه در این تحقیق مدت زمان نگهداری ریزنمونه‌ها برای پرآوری و ثبت داده‌ها ارائه نشده است تا مقایسه کامل‌تری انجام شود. Kumar و همکاران (۲۰۰۹) نیز بهترین غلظت BAP را ۳ میلی‌گرم بر لیتر ذکر کرده و موفق به تولید بیش از ۷ عدد شاخساره به ازای هر ریزنمونه شده‌اند. در این بررسی‌ها ریزنمونه‌ها هر ۲۱ روز به محیط تازه بازکشت شده‌اند و اینکه چند بازکشت انجام شده گزارش نشده است. Anbazhagan و همکاران (۲۰۱۰) نیز باززایی حداکثری استویا را در محیط کشت پایه MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP به همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin گزارش کرده‌اند. در این تحقیق در زمان کشت چهار هفته‌ای ریزنمونه‌ها تا ثبت داده‌ها، مجموع تعداد شاخساره اصلی و فرعی ایجاد شده در تیمار حاوی BAP حدود ۵ شاخساره و در تیمار حاوی *mT* حدود ۷ شاخساره تولید شد. مقایسه ظاهری گیاهچه‌های حاصل از این تحقیق با گزارش‌های قبلی نشان می‌دهد که تیمارهای موجود سبب تولید گیاهچه‌های کشت بافتی قوی و مناسبی شده‌است. به‌علاوه با وجود غلظت‌های بالاتری از BAP که در تحقیقات دیگر محققان به‌عنوان غلظت بهینه گزارش شده‌است، در گزارش فعلی ۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP به همراه ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر IBA به‌عنوان بهترین تیمار در آزمایش اول شاخته شد. این گزارش تأثیر تیماری از غلظت‌های مختلف *mT* را نیز بر پرآوری استویا بررسی کرده‌است. توپولین‌ها به‌عنوان یکی از سیتوکینین‌های آروماتیک بسیار فعال بوده و به‌طور ویژه‌ای mT به‌دلیل اثرات مثبت فراوانی که بر افزایش نسبت تکثیر، کاهش اثرات نامطلوب فیزیولوژیکی، ریشه‌زایی بهتر و مقاوم‌سازی دارد بسیار مورد توجه قرار گرفته است (Bhojwani & Dantu, 2013). بنابراین به نظر می‌رسد که این اولین گزارش از بکارگیری *mT* در پرآوری استویا می‌باشد. اما اثرات مطلوب تیمارهای *mT* در گیاهان دیگر به خوبی نشان داده شده‌است. Kőszeghi و همکاران (۲۰۱۴) اثر تیمارهای *mT* را در ریزازدیادی گیاه ریحان شیرین (*Ocimum basilicum*) با BAP مقایسه کردند. در این تحقیق نشان داده شد که تیمار *mT* سبب بهبود ضریب تکثیر و کیفیت گیاهچه‌های حاصل گردید. در مقایسه با BAP، نسبت تکثیر و کیفیت شاخساره‌های حاصل در گیاه *Baleria greenii* (Amoo *et al*., 2011) و موز (Bairu *et al*., 2008) با استفاده از تیمار *mT* بهبود یافت.

متأسفانه تأثیر پارامترهای فیزیکی مانند شدت نور و دما بر پرآوری درون شیشه‌ای استویا آنچنان مورد مطالعه قرار نگرفته است. در این تحقیق مشاهده شد که تیمارهای نوری

و دمایی تأثیر معنی‌داری بر متغیرهای اندازه‌گیری شده داشته‌اند. در این آزمایش از سه سطح دمایی ۲۲، ۲۵ و ۲۷ درجه سانتی‌گراد استفاده شد. القاء رشد جوانه تحت تأثیر کنش متقابل سیگنال‌های محیطی از قبیل دما، نور و عوامل درون‌زا از قبیل تنظیم‌کننده‌های رشد است. در کشت درون شیشه (*Helleborus niger*)، نمو شاخه‌های جانبی (نرخ تکثیر) و وزن تر به‌طور معنی‌دار تحت تأثیر درجه حرارت، سطوح ساکارز و نمک‌های نیتروژنه بوده‌است (Gabryszewska, 2016). در این تحقیق، نور تأثیر معنی‌دار بر طول شاخه اصلی، شاخه فرعی و میانگره داشته و بیشترین طول شاخه در سطح نوری حدود ۵۵μmol m^{-2} s^{-1} مشاهده گردید. این نتایج با یافته‌های قبلی مبنی بر نیل به بالاترین درصد اندام‌زایی (۸۵٪) استویا در محیط کشت MS حاوی ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA در شرایط نوری ۵۵μmol m^{-2} s^{-1} نیز مطابقت دارد (Mirniam *et al*., 2013). در ریزازدیادی استویا، از سطح نور (۱۸/۵، ۳۷ و ۵۵ μmol m^{-2} s^{-1}) و سه رژیم دمایی (۳۰، ۲۵، ۲۰ درجه سانتی‌گراد) استفاده گردید. نتایج حکایت از آن داشت که شدت نور ۵۵μmol m^{-2} s^{-1} در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد تحت دوره نوری ۱۶/۸ منجر به تولید بالاترین تعداد (۳۵) شاخه در هر ریزنمونه شده‌است. محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP تحت این شرایط نور و دما، بهترین تعداد شاخه را در مرحله تکثیر باعث گردیده است (Mubarak, 2008).

در بررسی فعلی، همانند نتایج Ahmed و همکاران (۲۰۰۷) و Anbazhagan و همکاران (۲۰۱۰) بالاترین درصد ریشه‌زایی در محیط کشت حاوی IAA بدست آمد. اما با وجود این تشابه، غلظت بهینه این تحقیق و گزارش Anbazhagan و همکاران (۲۰۱۰) ۱ میلی‌گرم بر لیتر بود که با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر نتایج Ahmed و همکاران (۲۰۰۷) تفاوت داشت. به‌علاوه برخلاف نتایج بسیاری از محققان که در تیمار بدون هورمون هیچ گزارشی از ریشه‌زایی ارائه نکرده‌اند (Ahmed *et al*., 2007؛ Mitra & Pal, 2007؛ Anbazhagan *et al*., 2010)، در این آزمایش مشاهده شد که در تیمار بدون هورمون حدود ۵۷٪ شاخساره‌ها ریشه‌زایی کرده‌اند. به‌دلیل وجود تعداد فراوانی از منافذ ریز در ساختار زغال فعال، این ماده جاذب خوبی برای مواد فنلی بازدارنده باززایی گیاه می‌باشد. طبق نتایج قبلی، زغال فعال (۴ گرم در لیتر محیط کشت MS) دارای تأثیر واضح و مثبت بر فرایند ریشه‌زایی و رشد گیاهچه‌های حاصل از اندام‌زایی در استویا بوده، به‌نحوی که بیشترین میزان ریشه‌زایی در محیط کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA گزارش شده‌است (Mirniam *et al*., 2013). در ریزازدیادی استویا، استفاده از ۱/۵ گرم در لیتر زغال فعال منجر به افزایش ۲/۵-، ۲/۵- و ۴- برابری به‌ترتیب در ارتفاع گیاه، تعداد برگ و درصد ریشه‌زایی در ریزنمونه‌ها شده‌است (Mehrizadeh & Baghban, 2014). در بررسی تأثیر منبع نیتروژن بر ریشه‌زایی استویا، استفاده از ۰/۵ گرم در لیتر زغال فعال در محیط کشت MS منجر به نتایج بهتر از لحاظ رشد و سلامت شاخه و ریشه و نیز تولید گیاه سبز پررنگ در مقایسه با محیط فاقد زغال فعال شد (Yadav *et al*., 2011).

مشکل عمده در کشت وسیع استویا، فقدان کیفیت مواد گیاهی قابل کشت است. استویا گیاهی خودناسازگار بوده و گیاهان حاصل از بذر از لحاظ رشد، کیفیت و کمّیت گلیکوزیدهای دی‌ترپن و نسبت مطلوب ربودیوزاید-A و استویوزاید متغیر هستند. معمولاً، گیاهان با خصوصیات مطلوب انتخاب شده و به‌صورت رویشی از طریق قلمه ساقه یا کشت بافت تکثیر می‌شوند. قلمه ساقه به‌دلیل تعداد معدود آنها جوابگو نمی‌باشد. البته کشت بافت تنها روش سریع تکثیر انبوه کلون‌های پربازده استویا خواهد بود (Yadav *et al*., 2011). محتوی استویوزاید برگ‌های گیاهان استویا حتی پس از یک برنامه انتخاب طولانی‌مدت نیز بین ۴ تا ۱۶ درصد متغیر است (Nakamura & Tamura, 1985). بخشی از این تنوع طبیعی می‌تواند ناشی از میزان بالای دگرگرده‌افشانی گونه‌ها باشد (Handro *et al*., 1993). تکثیر درون شیشه به‌فراوانی برای تکثیر کلون‌های انتخابی یا اصلاحی موفق بوده‌است. رشد گیاه و محتوی استویوزاید

برگ گیاهان درون شیشه بسیار یکنواخت‌تر از گیاهان بذری است. در تکثیر رویشی، تعداد ریشه، بیوماس شاخه و محتوی استویوزاید بیشتر از گیاهان حاصل از بذر می‌باشد (Yadav *et al.*, 2011). محققان با استفاده از ۹ ترکیب پرایمری نشانگر مولکولی ISSR به بررسی تنوع ژنتیکی در نتاج حاصل از ریزازدیادی استویا پرداختند که نتایج آنان وجود تنوع در نتاج حاصل از کشت بافت و عدم وجود تنوع در نتاج حاصل از تکثیر میانگره را نشان داده بود (Singh *et al.*, 2014). نتایج این تحقیق، منجر به ارائه روشی سریع و بدون ایجاد تنوع، برای تکثیر انبوه درون شیشه‌ای گیاه استویا شده‌است.

منابع مورد استفاده

- Ahmed, M.B., Salahin, M., Karim, R., Razvy, M.A., Hannan, M.M., Sultana, R., Hossain, M. and Islam, R., 2007. An efficient method for *in vitro* clonal propagation of a newly introduced sweetener plant (*Stevia rebaudiana* Bertoni.) in Bangladesh. American-Eurasian Journal of Scientific Research, 2: 121-125.
- Akita, M., Shigeoka, T., Koizumi, Y. and Kawamura, M., 1994. Mass propagation of shoots of *Stevia rebaudiana* using a large scale bioreactor. Plant Cell Reports, 13: 180-183.
- Amoo, S.O., Finnie, J.F. and Van Staden, J., 2011. The role of meta-topolins in alleviating micropropagation problems. Plant Growth Regulation, 63: 197-206.
- Anbazhagan, M., Kalpana, M., Rajendran, R., Natarajan, V. and Dhanave, D., 2010. *In vitro* production of *Stevia rebaudiana* Bertoni. Emirates Journal of Food and Agriculture, 22(3): 216-222.
- Bairu, M.W., Stirk, W.A., Dolezˇal, K. and Van Staden, J., 2008. The role of topolins in micropropagation and somaclonal variation of banana cultivars 'Williams' and 'Grand Naine' (Musa spp. AAA). Plant Cell Tissue and Organ Culture, 95: 373-379.
- Bhojwani, S.S. and Dantu, P.K., 2013. Plant Tissue Culture: An Introductory Text. Springer India, 318p.
- Czechowiak, C., Dubois, J. and Vasseur, J., 1984. Culture in vitro du *Stevia rebaudiana* Bertoni C.R. Seances. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences-Series III-Sciences de la Vie, 298: 173-176.
- El-Zaidy, M.Z., Zayed, M.E., Alharbi, S., Doaigey, A., Al Sahli, A.A. and Ammar, R.A.A., 2014. Micropropagation of seven *Stevia rebaudiana* Bert. genotypes via adult leaf explants. Journal of Pure and Applied Microbiology, 8(2): 1289-1298.
- Ferreira, C.M. and Walter, H., 1988. Production, maintenance and plant regeneration from cell suspension culture of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni. Plant Cell Reports, 7: 123-126.
- Filho, B., João, C. and Kazumi, H., 1997. Embryogenic callus formation and histological studies from *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni floret explant. Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal, 9(3): 185-188.
- Gabryszewska, E. 2016. Efect of diferent sucrose and nitrogen salt levels in the medium and temperature on in vitro propagation of *Helleborus niger* L. Acta Agrobot, 68(2):161-171.
- Goettemoeller, J. and Ching, A., 1999. Seed germination in *Stevia rebaudiana*: 510-511. In: Janick, J., (Ed.). Perspectives on New Crops and New Uses. ASHS Press, 528p.
- Hanson, J.R. and De Oliveira, B.H., 1993. Stevioside and related sweet diterpenoid glycosides. Natural Product Reports, 10: 301-309.
- Handro, W., Ferreira, C.M. and Floh, E.I.S., 1993. Chromosomal variability and growth rate in cell suspension cultures of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni. Plant Science, 93: 169-176.
- Hossain, M.A., Kabir, A.H.M.S., Japhan, T.A. and Hasan, M.N., 2008. Micropropagation of *Stevia rebaudiana*. International Journal of Sustainable Crop Production, 3: 1-9.
- Ibrahim, A.I., Nasr, M.I., Mohammded, B.R. and El-Zefzafi, M.M., 2008. Plant growth regulators affecting in vitro cultivation of *Stevia rebaudiana*. Sugar Technology, 10: 254-259.
- Javad, S., Naz, S., Ilyas, S., Ali, A., Aslam, F. and Munir, N., 2012. Study of the effect of physical state of medium and different concentrations of sucrose, ferric ethylenediamine-tetraacetic acid (FeEDTA) and $CuSO_4$ in enhancing the micropropagation system of *Stevia rebaudiana*. Journal of Medicinal Plant Research, 6: 1800-1805.
- Kőszeghi, S., Bereczki, C., Balog, A. and Benedek, K., 2014. Comparing the effects of benzyladenine and meta-topolin on sweet basil (*Ocimum basilicum*) micropropagation. Notulae Scientia Biologicae, 6(4): 422-427.
- Kumar, A., Jena, A., Panda, M.K. and Nayak S., 2009. Effect of phytoregulators on *in vitro* mass propagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni. International Journal of Integrative Biology, 8(1): 56-59.

- Kumar, S. and Singh, N., 2009. *In vitro* propagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni: An important medicinal sweet herb. Environment Ecology, 27: 459-464.
- Latha, S. and Usha, M., 2003. *In vitro* culture studies on *Stevia rebaudiana*. *In Vitro* Cellular & Developmental Biology-Plant, 39: 520-523.
- Maiti, R.K. and Purohit, S.S., 2008. *Stevia*: A Miracle Plant for Human Health. Agrobios (India) Jodhpur, India, 190p.
- Mehrizadeh, V. and Baghban, B.K., 2014. Rooting effect of active charcoal for high scale micropropagation of stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni). International Journal of Biosciences, 4(11): 234-239.
- Mirniam, A., Roshandel, P., Otroshi, M. and Ebrahimi, M., 2013. A novel protocol for *Stevia rebaudiana* Bert regeneration. Journal of Advanced Laboratory Research in Biology, 4(1): 15-22.
- Mitra, A. and Pal, A., 2007. In vitro regeneration of *Stevia rebaudiana* (Bert.) from nodal explants. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology, 16: 59-62.
- Morini, S., Fiaschi, G., Andolfi, L. and Macchia, M., 2003. *In vitro* propagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni: results with different genotypes. Agricoltura Mediterranea, 133(2): 117-123.
- Mubarak, M., 2008. Micropropagation of *Stevia rebaudiana* In vitro. Meeting the Challenges of Sugar Crops & Integrated Industries in Developing Countries, Al Arish, Egypt, 11-14 September: 293-298.
- Nakamura, S. and Tamura, Y., 1985. Variation in the main glycosides of *Stevia* (*Stevia rebaudiana* Bertoni). Japanese Journal of Tropical Agriculture, 29: 109-116.
- Ramakrishna, A. and Ravishankar, G.A., 2013. Diterpene sweeteners (Steviosides): 3194-3203. In: Ramawat, K.G. and Me´rillon, J.M., (Eds.). Natural Products, Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes, Springer, 4245p.
- Singh, N., Yadav, K., Kumari S. and Renu 2011. Metabolic changes during differentiation in callus cultures of *Stevia rebaudiana* (Bertoni). Journal of Phytology, 3(3): 63-67.
- Singh, P., Dwivedi, P. and Atri, N., 2014. In vitro shoot multiplication of *Stevia* and assessment of stevioside content and genetic fidelity of the regenerants. Sugar Tech, 16: 430-439.
- Sivaram, L. and Mukundan, U., 2003. In vitro culture studies on Stevia rebaudiana. In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant, 39: 520-523.
- Sreedhar, R.V., Venkatachalam, L., Thimmaraju, R., Bhagyalakshmi, N., Narayan, M.S. and Ravishankar, G.A., 2008. Direct organogenesis from leaf explants of *Stevia rebaudiana* and cultivation in bioreactor. Biologia Plantarum, 52(2): 355-360.
- Tamura, Y., Nakamura, S., Fukui, H. and Tabata, M., 1984. Comparison of *Stevia* plants grown from seeds, cuttings and stem tip cultures for growth and sweet diterpene glycosides. Plant Cell Reports, 3: 180-182.
- Tanaka, O., 1982. Steviol-glycosides: New natural sweeteners. Trends in Analytical Chemistry, 1(11): 246-248.
- Wada, Y., Tamura, T., Kodama, T., Yamaki, T. and Uchida, Y., 1981. Callus culture and morphogenesis of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni. Yukagawa, 36: 215-219.
- Yadav, A.K., Singh, S., Dhyani, D. and Ahuja, P.S., 2011. A review on the improvement of stevia (*Stevia rebaudiana* (Bertoni)). Canadian Journal of Plant Science, 91: 1-27.

Effects of basal media and some physical parameters on micropropagation of stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni)

M. Ebrahimi[1*], A. Mokhtari[2] and R. Amirian[3]

1*- Corresponding author, Department of Plant Tissue Culture, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran-Central Branch- Isfahan, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran,
E-mail: m.ebrahimi@abrii.ac.ir
2- Department of Plant Tissue Culture, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran-Central Branch- Isfahan, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran
3- Department of Genomics, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran-Central Branch- Isfahan, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran

Received: August 2016 Revised: February 2017 Accepted: February 2017

Abstract

Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) is a cross-pollinated plant whose seed vigor is poor. Therefore, the vegetative propagation approaches like *in vitro* culture techniques could be the best choice for mass and true-to-type production of stevia plantlets. This study was aimed to evaluate the effects of basal media (MS, B5 and LS) and physical parameters such as light (55 and 110 µmol m^{-2} s^{-1}) and temperature (22, 25 and 27ºC) on *in vitro* culture of stevia. The nodal segments were cultured on basal media containing various combination of BAP and IAA or IBA. The ANOVA showed significant differences ($P \leq 0.05$) among treatments on micropropagation of stevia. In another experiment, the effect of mT (0.5, 1, 1.5 and 2 mg/l) was also compared with the best treatment from the first experiment. It was found that mT at 1 mg/l was the best concentration. The genetic stability of micropropagated plantlets relative to the mother plant was achieved by AFLP marker using 12 selected primers. In this study, 231 reproducible bands around 50-500bp were scored, indicating similarity of *in vitro* plantlets with the donor.

Keywords: Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni), tissue culture, *Meta*-Topolin, BAP, activated charcoal, light.