ریز ازدیادی گیاه دارویی استویا (Stevia rebaudiana Berton) از طریق کشت دو ریزنمونه جوانه انتهایی و گره به همراه غلظتهای مختلف زغال فعال و هورمونهای BAP و Kn

بهاره شعفی[۱]، سیدسعیدموسوی[۱*]، سعید قمبرعلی باغنی[۱]، محمدرضا عبداللهی[۱] و حسن ساریخانی[۲]

[۱] ایران، همدان، دانشگاه بوعلی سینا، دانشکده کشاورزی، گروه زراعت و اصلاح نباتات

[۲] ایران، همدان، دانشگاه بوعلی سینا، دانشکده کشاورزی، گروه علوم باغبانی

تاریخ دریافت: ۹۶/۵/۸ تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۱/۱۶

چکیده

استویا با نام علمی *Stevia rebaudiana* Bertoni از تیره *Composite* گیاهی چندساله، علفی و دگرگردهافشان می‌باشد. با توجه به پایین بودن درصد جوانه‌زنی بذر و ناهمگنی گیاهان تکثیر یافته از بذور از نظر میزان شیرینی، ریزازدیادی این گیاه با استفاده از روشهای کشت بافت به منظور تکثیر انبوه مطلوب می‌باشد. در این مطالعه عملکرد دو ریزنمونه جوانه انتهایی و گره با استفاده از سه تیمار غلظت محیط کشت MS ، سطوح مختلف زغال فعال و هورمونهایBAP وKn در دو آزمایش مقایسه و بررسی گردید. به طوری که در آزمایش اول اثر زغال فعال وغلظت محیط کشت MS و در آزمایش دوم استفاده از غلظتهای جداگانه (۰، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) از هورمونهای BAP وKn در سه تکرار اجرا گردید. نتایج نشان داد بیشترین میزان افزایش صفات در کشت جوانه‌های انتهایی در غلظت کامل محیط کشت MS به همراه ۱/۵ گرم در لیتر زغال فعال به عنوان ماده جاذب فنولها مشاهده گردید. استفاده از غلظت ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر از هورمونهای BAP وKn تأثیر معنی‌داری را بر افزایش راندمان ریزازدیادی هر دو نوع ریزنمونه نشان داد. در مقایسه عملکرد هورمونهای BAP وKn استفاده از ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP در کشت جوانه‌های انتهایی بیشترین میزان صفات طول ساقه، تعداد گره و تعداد ساقه جانبی را نشان داد.

واژه های کلیدی: ریزازدیادی، استویا، زغال فعال ،BAP، Kn

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۸۸۵۲۶۹۴۰، پست الکترونیکی: s.moosavi@basu.ac.ir

مقدمه

استویا گیاهی دارویی، قندی، با عدد کروموزومی(2n=22) متعلق به خانواده*Asteraceae* می‌باشد که برگهای آن حاوی گلیکوزید دیترپن (شامل استویوزاید وربودیوزاید)، فاقدکالری، غیرسمی و خیلی شیرین است (۱۸). شیرینی قند این گیاه حدود ۲۵۰ تا ۳۰۰ برابر دیگر گیاهان قندی مانند نیشکر و چغندر قند بوده و میزان قند موجود در آن ۱۵۰ برابر می‌باشد به طوری که این قند می‌تواند جایگزین مناسب برای شیرین‌کننده‌های مصنوعی نظیر آسپارتام ، سدیم ساخارین و سیکلامات باشد (۲۴). ازدیاد انبوه گیاه در شرایط درون شیشه‌ای علاوه بر افزایش راندمان تولید در سطح وسیع، زمان و فضای محدودتر امکان حفظ و نگهداری ژرم پلاسم گیاهان با ارزش را نیز میسر می‌نماید (۳۸ و ۴۸). بنابراین دستیابی به یک پروتکل مناسب به منظور بهینه نمودن شرایط کشت نمونه‌ها می‌تواند سبب افزایش راندمان تولید گیاهچه‌ها گردد، به طوری که با توجه به خودناسازگاری، پایین بودن درصد جوانه‌زنی بذر و ناهمگنی گیاهان تکثیر یافته از طریق بذور مطالعه بر روی فاکتورهای مؤثر بر رشد نمونه‌ها می‌تواند یک راهکار

مناسب باشد (۳۳). با توجه به مطالعات انجام شده مؤثرترین فاکتورها بر افزایش راندمان ریزازدیادی گیاهان ژنوتیپ، نوع ریزنمونه، سن گیاهچه، محیطکشت و نوع و غلظت تنظیم کننده‌های رشد است. دو عامل نوع ریزنمونه وتنظیم کننده رشد از عوامل بسیار تأثیرگذار بر موفقیت و افزایش سرعت ریزازدیادی می‌باشند (۴۱ و ۵۰). در بسیاری از مشاهدات جوانه‌های انتهایی به دلیل فعالیتهای میتوزی بیشتر نسبت به جوانه‌های جانبی که در معرض غالبیت انتهایی قرار دارند از پتانسیل عملکرد بالاتری به منظور ریزازدیادی برخوردارند (۱۲ و ۵۳). امروزه ریزازدیادی گیاه دارویی استویا توسط محققان بر روی ریز-نمونه‌های مختلف نظیر، قطعات گره، میترا و همکاران (۲۶)، سینگ و همکاران (۴۳) و سیوارام و همکاران (۴۵)، قطعات میان‌گره، احمد و همکاران(۷)، سایرکار و همکاران (۳۹)، تیاقاراجان و همکاران (۵۱) و یودین و همکاران (۵۲)، برگ علی و همکاران(۹) و جوانه‌های ساقه آنباژنگان و همکاران(۱۱) و داس و همکاران (۱۴) گزارش شده است. استفاده مناسب از پتانسیلهای کشت بافت می‌تواند بازده بالای تولید را در کنار صرفه اقتصادی به همراه داشته باشد طوری‌که مطالعه بر روی غلظتهای مختلف محیط کشت و هورمونها با توجه به تفاوت گیاهان از نظر پاسخ به شرایط کشت درون شیشه‌ای از مراحل مهم ریزازدیادی گیاهان دارویی محسوب می‌گردد. با توجه به اینکه کاهش عملکرد رشد گیاهچه‌ها در غلظتهای تقلیل یافته محیط کشت به دلیل کاهش نسبتهای نیترات می‌باشند در صورت عدم تفاوت معنی‌دار بر افزایش بیوماس گیاهچه‌ها استفاده از محیطهای MS با نمکهای تقلیل یافته نسبت به محیط MS کامل ارجحیت داشته و مقرون به صرفه می‌باشند (۱۵ و ۲۱). زغال فعال به عنوان یک آنتی اکسیدان مؤثر با داشتن سطح صاف و شبکه وسیع از منافذ ، با کاهش پدیده قهوه‌ای شدن ریز نمونه‌ها و تیره نمودن محیط کشت قدرت جذب ترکیبات در محیط کشت را افزایش داده و سبب بهبود باززایی درون شیشه‌ای گیاهان می‌گردد (۶ و ۳۳). استفاده از هورمونهای سیتوکنین با ایجاد تورم در بافتها، تحریک نمو جوانه‌های جانبی نا به جا، تحریک تقسیم، افزایش تعداد و طول نوساقه‌ها فاکتورهای مؤثری بر افزایش راندمان ریزازدیادی ریزنمونه‌ها در شرایط درون شیشه‌ای می‌باشند (۱۰). در این پژوهش تأثیر دو سیتوکنین BAP و Kn با توجه به راندمان بالای آنها بر افزایش پتانسیل نمونه‌ها در گیاه استویا در مقایسه با سایر سیتوکنینها بررسی گردید. با توجه به اینکه استفاده از ترکیب BAP و Kn می‌تواند با افزایش تعداد ساقه‌جانبی و جذب مواد مغذی محیط کشت سبب کاهش صفت طول ساقه‌چه گردد در این پژوهش به طور جداگانه سطوح مختلف هورمونها بررسی گردید (۲۰). در این پژوهش برای اولین بار درکشورپتانسیل جوانه‌های انتهایی و گره با استفاده از سطوح مختلف زغال فعال و ترکیبات جداگانه BAP وKn درمحیط کشت MS بررسی گردید. هدف از این پژوهش ارزیابی مقایسه عملکرد ریزنمونه گره و جوانه انتهایی با اعمال تیمارهای مؤثر بر کشت درون شیشه‌ای بود به طوری که ضمن تعیین سطوح برتر هریک از تیمارها بهترین ریزنمونه نیز تعیین گردد.

مواد و روشها

گیاهچه‌های مورد استفاده در این پژوهش از نوع گیاهچه-های استویا ریبودیانا برتونی بودند که از شرکت گلساران گرگان تهیه گردیدند. این پژوهش در آزمایشگاه کشت بافت دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی سینا همدان انجام گرفت. وسایلی از قبیل استوانه مدرج، بشر، ظروف شیشه-ای درب دار، پنس، اسکارپر، پیپت، پیست، هودلامینار، pH متر، کاغذ صافی و ..... در این تحقیق استفاده گردید. تمامی وسایل شیشه‌ای و فلزی و همچنین محیط کشتها قبل از استفاده در اتوکلاو با دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد و فشار ۱/۲ بار به مدت ۲۰ دقیقه سترون شده و سپس به زیر هود لامینار منتقل شدند. حدود دو ساعت قبل از کشت، لامینار را روشن کرده و با الکل ۹۶ درصد محیط داخل آن را

سترون کرده و ۳۰ دقیقه قبل از کشت لامپ uv زیر لامینار روشن گردید. به منظور ضدعفونی ریزنمونه‌ها پس از شستشوی گیاهچه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه، ریز نمونه‌ها به مدت ۱ دقیقه در اتانول ۷۰ درصد قرار داده شدند و پس از شستشو با آب استریل، به مدت ۱۰ دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۲۰ درصد قرار گرفته و پس از آن ۳ مرتبه (هر بار ۳ دقیقه) با آب استریل شستشو شدند. پس از ضد عفونی وجدا کردن برگها، ریزنمونه‌های جوانه انتهایی وتک‌گره به طول ۱۵ الی ۲۰ میلی‌متر تهیه شده و به طور عمودی و با استفاده از پنس بر روی محیط کشت استقرار یافتند. نمونه-ها نیز به اتاقک رشد با شدت نور ۲۰۰۰ لوکس با تناوب نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. آزمایش اول به صورت فاکتوریل ۲×۲×۴در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار انجام گردید. به طوری که چهار سطح مختلف زغال فعال (۰، ۰/۵، ۱، ۱/۵ گرم در لیتر) به عنوان فاکتور اول، دو نوع محیط کشت (MS و ۱/۲MS) به عنوان فاکتور دوم و دو نوع ریزنمونه (جوانه انتهایی و تک گره) به عنوان فاکتور سوم در نظر گرفته شدند. آزمایش دوم به منظور بررسی استفاده جداگانه از هورمونهای BAP و Kn بر صفات ساقه‌زایی به صورت فاکتوریل ۲×۴در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار انجام گردید. در این آزمایش تمامی غلظتهای هورمون BAP و Kn به طور جداگانه به محیط کشت پایه MS اضافه گردیدند. چهار سطح مختلف از غلظت BAP (۰، ۰/۵، ۱، ۱/۵ گرم در لیتر) و Kn (۰، ۰/۵، ۱، ۱/۵ گرم در لیتر) به عنوان فاکتورهای اول و دو سطح نوع ریزنمونه به عنوان فاکتورهای دوم به صورت مستقل از هم در نظر گرفته شدند. محیط کشت پایه MS (۳۰) حاوی غلظتهای استاندارد نمکها به همراه ۱۰۰ میلی‌گرم میواینوزیتول، و۳۰ گرم ساکارز به عنوان منبع کربوهیدرات و ۸ گرم در لیتر آگار برای جامد کردن محیط کشت استفاده شد که pH برابر ۵/۷ تنظیم شده بود. برای تهیه محیط کشت ۱/۲MS تمام مواد مصرفی در محیط MS به نسبت ۱/۲ کاهش یافت. تجزیه آماری داده‌ها پس از بررسی نرمال بودن باقیمانده آنها انجام شد و مقایسه میانگین داده‌ها توسط آزمون دانکن (۱۶) در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد. به منظور تجزیه و تحلیل داده‌ها و رسم نمودارها از نرم افزار-های SAS و Excel استفاده گردید.

نتایج

نتایج تجزیه واریانس برای صفت طول ساقه اختلاف معنی‌داری را در سطح ۰/۰۰۰۱ برای نوع ریزنمونه، محیط کشت و غلظت زغال فعال نشان داد. اثر متقابل نوع ریزنمونه در محیط کشت و اثر متقابل محیط کشت در غلظت زغال فعال در سطح ۵ درصد معنی‌دار بوده است. مشاهدات نشان دهنده این موضوع است که سه عامل نوع ریزنمونه، محیط کشت و سطوح مختلف زغال فعال سه فاکتور بسیار مؤثر بر افزایش صفت طول ساقه بودند. اثر متقابل نوع ریز نمونه در غلظت زغال فعال و همچنین اثرات سه‌گانه نوع‌ریزنمونه در غلظت محیط کشت MS در غلظت زغال فعال معنی‌دار نبوده که این مشاهده بیانگر این موضوع می‌باشد که فاکتورها مستقل از هم عمل نمودند (جدول۱). نتایج مقایسه میانگین نشان داد کشت جوانه انتهایی در محیط کشت MS بیشترین میزان طول ساقه (۶/۳۷±۰/۳۲ سانتیمتر) و تعداد برگچه (۱۵/۷۵±۰/۸۷) را ایجاد کرد. همچنین کشت گره در محیط MS ۱/۲ منجر به کمترین میزان رشد ساقه‌چه (۴/۲۲±۰/۳۲ سانتیمتر) و تعداد برگچه (۱۳/۳۳±۰/۸۷) گردید (جدول۲). در رابطه با اثر محیط کشت و غلظت زغال فعال بیشترین میزن طول ساقه (۸/۱۶±۰/۳۲ سانتیمتر) در غلظت کامل محیط کشتMS به همراه استفاده از ۱/۵ گرم در لیتر زغال فعال مشاهده گردید. کمترین میزان طول ساقه‌چه(۲/۹۱±۰/۳۲ سانتیمتر) در محیط MS ۱/۲ در غلظت ۰ (شاهد) زغال فعال مشاهده گردید که این موضوع نشان دهنده تأثیر معنی‌دار استفاده از زغال فعال بر افزایش طول ساقه‌چه می‌باشد (شکل های ۱، ۲ و جدول۳).

جدول۱- تجزیه واریانس اثر نوع ریزنمونه، محیط کشت و غلظت زغال فعال بر ریزازدیادی گیاه استویا

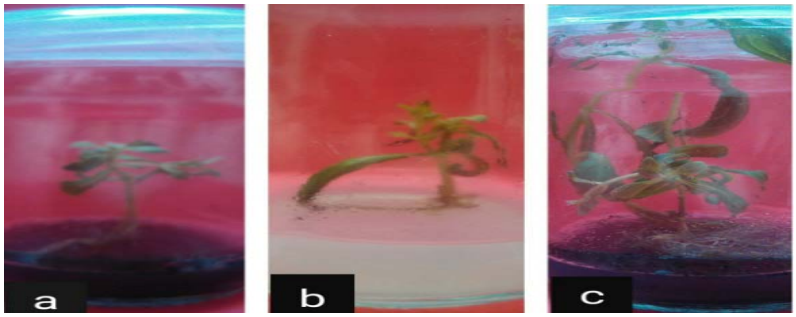
		درجه آزادی و میانگین مربعات			
منبع تغییر	درجه آزادی	طول ساقه	تعداد برگچه	طول ریشه	تعدا شاخه جانبی
نوع ریز نمونه	۱	۰/۰۰۲۷***	۰/۰۰۱۶***	۰/۰۳۳۳ ***	۰/۰۰۲۰***
محیط کشت	۱	۰/۰۱۴۸***	۰/۰۰۱۵***	۰/۰۱۵۴**	۰/۰۰۵۵***
غلظت زغال فعال	۳	۰/۰۱۶۴***	۰/۰۱۵۲***	۰/۳۴۸۶***	۰/۰۱۶۳***
نوع ریزنمونه * محیط کشت	۱	۰/۰۰۰۳*	۰/۰۰۰۴*	۰/۰۰۱۲^{ns}	۰/۰۰۰۰^{ns}
نوع ریزنمونه *غلظت زغال فعال	۳	۰/۰۰۰۰^{ns}	۰/۰۰۰۳*	۰/۰۰۲۲^{ns}	۰/۰۰۰۷**
محیط کشت * غلظت زغال فعال	۳	۰/۰۰۰۲*	۰/۰۰۰۰^{ns}	۰/۰۰۰۴^{ns}	۰/۰۰۰۲^{ns}
نوع ریزنمونه * محیط کشت * غلظت زغال فعال	۳	۰/۰۰۰^{ns}	۰/۰۰۰۰^{ns}	۰/۰۰۱۹^{ns}	۰/۰۰۰۰^{ns}
خطای آزمایشی	۳۲	۰/۰۰۰۰	۰/۰۰۰۰	۰/۰۰۱۸	۰/۰۰۰۱
ضریب تغییرات(٪)		۰/۶۶۹۳	۰/۶۱۵۶	۴/۲۵۴۲	۱/۰۴۴۴

***** ، **** ، ***: به ترتیب نشان دهنده اختلاف آماری معنی‌دار در سطح ۰/۰۰۱، ۰/۰۱ ، ۰/۰۵ ns عدم اختلاف معنی دار آماری می‌باشد.

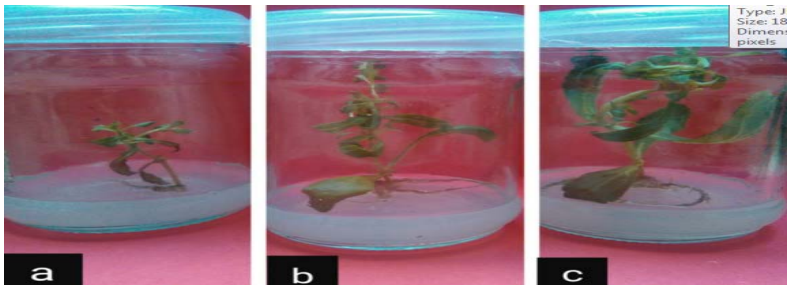
جدول۲- تأثیر نوع ریزنمونه و غلظت محیط کشت MS بر صفات طول ساقه و تعداد برگچه

نوع ریز نمونه	محیط کشت	طول ساقه	تعداد برگچه
تک گره	MS	۵/۳۵^{b} ±۰/۳۲	۱۳/۴۵^{c} ±۰/۸۷
	۱/۲MS	۴/۲۲^{d}±۰/۳۲	۱۳/۳۳^{d} ±۰/۸۷
جوانه انتهایی	MS	۶/۳۷^{a}± ۰/۳۲	۱۵/۷۵^{a}±۰/۸۷
	۱/۲MS	۴/۵۹^{c} ±۰/۳۲	۱۳/۷۵^{b} ±۰/۸۷

*اعداد موجود در هر ستون که دارای حروف مشابه هستند، تفاوت معنی‌داری با هم ندارند.



شکل۱- رشد گیاهچه‌ها در محیط حاوی ۰/۵ گرم در لیتر زغال فعال (a) محیط حاوی ۱ گرم در لیتر زغال فعال (b) محیط حاوی ۱/۵ گرم در لیتر زغال فعال (c)



شکل۲- رشد گیاهچه‌ها در محیط حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر در لیتر BAP (a) محیط حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP (b) محیط حاوی ۱/۵ میلی-گرم در لیترBAP (c)

جدول ۳- تأثیر نوع محیط کشت و غلظت زغال فعال بر صفت طول ساقه

نوع محیط کشت	غلظت زغال فعال	طول ساقه
MS	۰	۴/۴۱^{e}±۰/۳۲
	۰/۵	۴/۸۰^{d}±۰/۳۲
	۱	۶/۰۸^{c}±۰/۳۲
	۱/۵	۸/۱۶^{a}±۰/۳۲
۱/۲MS	۰	۲/۹۱^{g}±۰/۳۲
	۰/۵	۳/۵۰^{f}±۰/۳۲
	۱	۴/۶۳^{de}±۰/۳۲
	۱/۵	۶/۵۸^{b}±۰/۳۲

*اعداد موجود در هر ستون که دارای حروف مشابه هستند، تفاوت معنی‌داری با هم ندارند.

نتایج مقایسه میانگین نشان داد استفاده از ۱/۵ گرم در لیتر زغال فعال در هر دو ریزنمونه جوانه انتهایی و گره بیشترین میزان تعداد برگچه به ترتیب (۱۹/۱۶±۰/۸۷) و (۱۸/۲۳±۰/۸۷) را ایجاد می کند. کشت ریزنمونه جوانه انتهایی و گره به همراه استفاده از غلظت ۱/۵ گرم در لیتر زغال فعال بیشترین میزان تعداد ساقه‌جانبی به ترتیب (۹/۳۳±۰/۶۱) و (۸/۳۳±۰/۶۱) را ایجاد کرد. مشاهدات نشان داد استفاده از زغال فعال در هر دو ریزنمونه عامل بسیار مؤثری بر افزایش بیوماس گیاهچه‌ها بوده و پاسخ جوانه‌های انتهایی و گره به افزایش تعداد برگچه و ساقه-جانبی عملکرد مشابه و نزدیک به هم داشته است (جدول ۴).کشت جوانه انتهایی در محیط کشت MS و ۱/۲MS با استفاده از ۱/۵ گرم در لیتر زغال فعال بیشترین طول ریشه-چه به ترتیب (۳/۱۳±۰/۱۵ سانتیمتر) و (۲/۹۳±۰/۱۵ سانتیمتر) را نشان داد. کشت گره نیز در محیط ۱/۲ MS بیشترین میزان طول ریشه‌چه (۲/۴۳±۰/۱۵ سانتیمتر) را نشان داد. در واقع اضافه نمودن زغال فعال و استفاده از غلظت کامل محیط MS دو عامل بسیار مؤثر بر افزایش طول ریشه‌چه‌ها بوده که به طور معنی‌داری این صفت را نسبت به شاهد افزایش داده است (جدول۵).

جدول۴- تأثیر نوع ریزنمونه و غلظت زغال فعال بر تعداد برگچه و ساقه جانبی

نوع ریز نمونه	غلظت زغال فعال	تعداد برگچه	تعداد ساقه جانبی
تک گره	۰	۹/۰۰^{e}±۰/۸۷	۳/۸۳^{e}±۰/۶۱
	۰/۵	۱۱/۳۳^{d}±۰/۸۷	۵/۱۶^{d}±۰/۶۱
	۱	۱۵/۳۳^{b}±۰/۸۷	۷/۱۶^{b}±۰/۶۱
	۱/۵	۱۸/۸۳^{a}±۰/۸۷	۸/۳۳^{a}±۰/۶۱
جوانه انتهایی	۰	۱۰/۸۳^{d}±۰/۸۷	۴/۸۳^{d}±۰/۶۱
	۰/۵	۱۳/۳۳^{c}±۰/۸۷	۶/۱۶^{c}±۰/۶۱
	۱	۱۵/۶۶^{b}±۰/۸۷	۶/۶۶^{b}±۰/۶۱
	۱/۵	۱۹/۱۶^{a}±۰/۸۷	۹/۳۳^{a}±۰/۶۱

*اعداد موجود در هر ستون که دارای حروف مشابه هستند، تفاوت معنی‌داری با هم ندارند.

نتایج این آزمایش افزایش معنی‌دار عملکرد جوانه‌انتهایی نسبت به گره را نشان داد که این امر نشان دهنده پتانسیل بالای جوانه‌انتهایی نسبت به شرایط ریزازدیادی در گیاه دارویی استویا می‌باشد. با توجه به عدم غالبیت جوانه انتهایی امکان رشد نمونه در مدت زمان کمتر و بیوماس بالاتر اغلب در شرایط کشت درون شیشه‌ای فراهم می‌گردد که این امر با مشاهدات حسین و همکاران (۱۹) و مودی و همکاران (۲۹) نیز مطابقت داشت. اما با توجه به امکان تفاوت در گیاهچه‌های تکثیر یافته و تیمارهای اعمال شده در کشت ریزنمونه‌ها پاسخ به شرایط کشت بافت و ریزازدیادی می‌تواند متفاوت باشد. استفاده از قطعات گره با عملکرد بالا توسط کیسر و همکاران (۱۳)، ماتور و همکاران (۲۵)، مه‌تا و همکاران (۲۸) وسینگ و همکاران (۴۴) گزارش شده است.

جدول۵- تأثیر نوع ریزنمونه و محیط کشت بر طول ریشه‌چه

نوع ریزنمونه	نوع محیط کشت	غلظت زغال فعال	طول ریشه‌چه
تک گره	MS	۰	۱/۰۶^{d}±۰/۱۵
		۰/۵	۱/۲۶^{c}±۰/۱۵
		۱	۱/۶۶^{b}±۰/۱۵
		۱/۵	۲/۰۶^{a}±۰/۱۵
	۱/۲MS	۰	۱/۰۰^{d}±۰/۱۵
		۰/۵	۱/۱۳^{e}±۰/۱۵
		۱	۱/۷۰^{b}±۰/۱۵
		۱/۵	۲/۴۳^{a}±۰/۱۵
جوانه انتهایی	MS	۰	۱/۲۶^{d}±۰/۱۵
		۰/۵	۱/۴۳^{e}±۰/۱۵
		۱	۱/۸۶^{b}±۰/۱۵
		۱/۵	۳/۱۳^{a}±۰/۱۵
	۱/۲MS	۰	۱/۱۰^{d}±۰/۱۵
		۰/۵	۱/۳۶^{c}±۰/۱۵
		۱	۱/۶۰^{b}±۰/۱۵
		۱/۵	۲/۹۳^{a}±۰/۱۵

*اعداد موجود در هر ستون که دارای حروف مشابه هستند، تفاوت معنی‌داری با هم ندارند.

نتایج تجزیه واریانس برای صفات طول ساقه، تعداد گره و تعداد ساقه جانبی تفاوت معنی‌داری در سطح ۰/۰۰۰۱ برای نوع ریزنمونه و غلظت هورمونBAP نشان داد. اما اثر متقابل نوع ریزنمونه در غلظت هورمون BAP برای هر سه صفت معنی‌دار نبوده و این دو فاکتور مستقل از هم عمل نمودند (جدول۶). نتایج تجزیه واریانس اثر غلظت هورمون Kn و نوع ریزنمونه نیز برای صفات طول ساقه، تعداد گره و تعداد ساقه جانبی اختلاف معنی‌دار را نشان داد. اثر متقابل نوع ریزنمونه در غلظت هورمون Knمعنی‌دار نبود و فاکتورها مستقل از هم عمل نمودند (جدول۷). مقایسه میانگین تیمار کشت ریزنمونه‌ها با استفاده از هورمون BAP ، بیشترین صفات طول ساقه (۹/۵۸±۰/۰۰۳۶ سانتیمتر)، تعداد گره (۶/۰۸±۰/۰۲۷) و تعداد ساقه جانبی(۱۰/۵۰±۰/۰۰۴) را با کشت جوانه‌انتهایی نشان داد (جدول۸).

جدول۶- تجزیه واریانس اثرغلظت هورمونBAP و نوع ریز نمونه بر ریزازدیادی گیاه استویا

منبع تغییر	درجه آزادی	درجه آزادی و میانگین مربعات		
		طول ساقه	تعداد گره	تعداد ساقه جانبی
نوع ریزنمونه	۱	۰/۰۰۲۲ ***	۰/۰۶۸۶ ***	۰/۰۰۰۸ ***
غلظت هورمون BAP	۳	۰/۰۰۰۳ ***	۰/۰۱۰۷ ***	۰/۰۰۰۳ ***
نوع ریز نمونه* غلظت هورمون BAP	۳	۰/۰۰۰۰ ^{ns}	۰/۰۰۰۰ ^{ns}	۰/۰۰۰۰ ^{ns}
خطای آزمایشی	۱۶	۰/۰۰۰۰	۰/۰۰۰۷	۰/۰۰۰۰
ضریب تغییرات(٪)		۰/۲۶	۲/۰۳	۰/۳۳

*** ، ** ، *: به ترتیب نشان دهنده اختلاف آماری معنی‌دار در سطح ۰/۰۰۱، ۰/۰۱ ، ۰/۰۵ ns عدم اختلاف معنی دار آماری می‌باشد.

جدول۷- تجزیه واریانس اثرغلظت هورمونKn ونوع ریز نمونه بر روی ریزازدیادی گیاه استویا

منبع تغییر	درجه آزادی	درجه آزادی و میانگین مربعات		
		طول ساقه جانبی	تعداد گره	تعداد ساقه
نوع ریزنمونه	۱	۰/۰۰۲۱ ***	۰/۰۶۰۰ ***	۰/۰۰۰۸ ***
غلظت هورمون Kn	۳	۰/۰۰۰۱ **	۰/۰۱۵۶ ***	۰/۰۰۰۱ *
نوع ریز نمونه* غلظت هورمون Kn	۳	۰/۰۰۰۰ ^{ns}	۰/۰۰۱۴ ^{ns}	۰/۰۰۰۰ ^{ns}
خطای آزمایشی	۱۶	۰/۰۰۰۰	۰/۰۰۱۷	۰/۰۰۰۰
ضریب تغییرات(٪)		۰/۲۶	۳/۱۹	۰/۳۹

*** ، ** ، *: به ترتیب نشان دهنده اختلاف آماری معنی‌دار در سطح ۰/۰۰۱، ۰/۰۱ ، ۰/۰۵ ns عدم اختلاف معنی دار آماری می‌باشد.

جدول۸- تأثیر نوع ریز نمونه با استفاده از هورمون BAP بر صفات رویشی ساقه در استویا

نوع ریزنمونه	طول ساقه	تعداد گره	تعدادشاخه جانبی
جوانه انتهایی	۹/۵۸^{a}±۰/۰۰۳۶	۶/۰۸^{a}±۰/۰۲۷	۱۰/۵۰^{a}±۰/۰۰۴
گره	۸/۰۴^{b}±۰/۰۰۳۶	۳/۵۰^{b}±۰/۰۲۷	۹/۳۳^{b}±۰/۰۰۴

*اعداد موجود در هر ستون که دارای حروف مشابه هستند، تفاوت معنی‌داری با هم ندارند.

مقایسه میانگین تیمار کشت ریزنمونه‌ها با استفاده از هورمون Kn نیز بیشترین صفات طول ساقه (۹/۲۰±۰/۰۰۳۸ سانتیمتر) تعداد گره (۴/۵۰±۰/۰۴۱) و تعداد ساقه جانبی(۱۰±۰/۰۰۵) را با کشت جوانه‌انتهایی نشان داد (جدول۹). این مشاهده در واقع بیانگر این موضوع است که جوانه انتهایی پتانسیل بالاتری را در مقایسه با قطعات گره به ریزازدیادی داشته است. استفاده از ۱/۵ میلی‌گرم در لیترBAP تفاوت معنی‌داری را بر افزایش صفات رویشی ریزنمونه‌ها نسبت به شاهد و سایر غلظتها نشان داد به طوری‌که بیشترین صفات طول ساقه (۹/۶۶±۰/۰۰۳۶ سانتیمتر)، تعداد گره (۶/۱۶±۰/۰۲۷) و تعداد ساقه جانبی(۱۰/۸۳±۰/۰۰۴) مشاهده گردید (جدول۱۰). مقایسه میانگین سطوح مختلف غلظت هورمون Kn بیشترین صفات طول‌ساقه(۹/±۰/۰۰۳۸ سانتیمتر)، تعداد گره(۴/۶۶±۰/۰۴۱) و تعداد ساقه جانبی(۱۰/۱۶±۰/۰۰۵) را با استفاده از غلظت ۱/۵ میلی-گرم در لیترنشان داد (جدول۱۱).

جدول۹- تأثیر نوع ریز نمونه با استفاده از هورمون Kn بر صفات رویشی ساقه در استویا

نوع ریزنمونه	طول ساقه	تعداد گره	تعدادشاخه جانبی
جوانه انتهایی	۹/۲۰^{a}±۰/۰۰۳۸	۴/۵۰^{a}±۰/۰۴۱	۱۰^{a}±۰/۰۰۵
گره	۷/۸۳^{b}±۰/۰۰۳۸	۳/۰۸^{b}±۰/۰۴۱	۸/۹۱^{b}±۰/۰۰۵

*اعداد موجود در هر ستون که دارای حروف مشابه هستند، تفاوت معنی‌داری با هم ندارند.

جدول۱۰- تأثیر غلظت هورمون BAP بر صفات رویشی ساقه در استویا

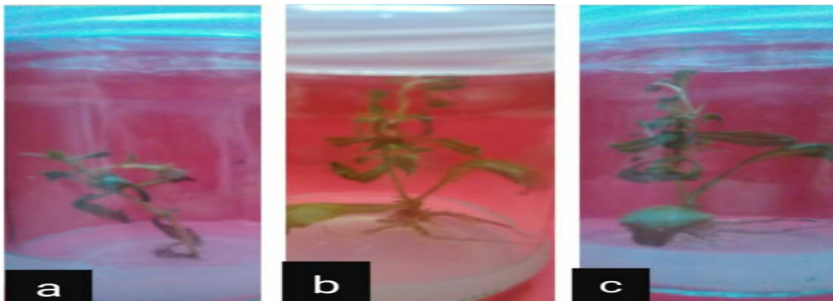
غلظت هورمون BAP	طول ساقه	تعداد گره	تعداد شاخه جانبی
۰	۸/۲۵^{d}±۰/۰۰۳۶	۳/۶۶^{d}±۰/۰۲۷	۹/۱۶^{d}±۰/۰۰۴
۰/۵	۸/۵۰^{c}±۰/۰۰۳۶	۴/۳۳^{c}±۰/۰۲۷	۹/۵۰^{c}±۰/۰۰۴
۱	۸/۸۳^{b}±۰/۰۰۳۶	۵/۱۶^{b}±۰/۰۲۷	۱۰/۱۶^{b}±۰/۰۰۴
۱/۵	۹/۶۶^{a}±۰/۰۰۳۶	۶/۱۶^{a}±۰/۰۲۷	۱۰/۸۳^{a}±۰/۰۰۴

*اعداد موجود در هر ستون که دارای حروف مشابه هستند، تفاوت معنی‌داری با هم ندارند.

جدول۱۱- تأثیر غلظت هورمون Kn برصفات رویشی ساقه در استویا

غلظت هورمون Kn	طول ساقه	تعداد گره	تعداد شاخه جانبی
۰	۸/۲۵^{d}±۰/۰۰۳۸	۳^{d}±۰/۰۴۱	۹/۱۶^{c}±۰/۰۰۵
۰/۵	۸/۳۳^{c}±۰/۰۰۳۸	۳/۵۰^{c}±۰/۰۴۱	۹/۱۶^{c}±۰/۰۰۵
۱	۸/۵۰^{b}±۰/۰۰۳۸	۴/۵۰^{b}±۰/۰۴۱	۹/۵۰^{b}±۰/۰۰۵
۱/۵	۹^{a}±۰/۰۰۳۸	۴/۶۶^{a}±۰/۰۴۱	۱۰/۱۶^{a}±۰/۰۰۵

*اعداد موجود در هر ستون که دارای حروف مشابه هستند، تفاوت معنی‌داری با هم ندارند.



شکل۳- رشد گیاهچه‌ها در محیط حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر در لیتر Kn (a) محیط حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر Kn (b) محیط حاوی ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر Kn (c)

بحث

انتخاب فاکتورها و تعیین سطح مناسب هر کدام در کشت بافت گیاهی اولین اقدام مهم در افزایش بازده اقتصادی و بیوماس گیاهچه‌ها می‌باشد. استفاده از ریزنمونه‌های مناسب با توجه به نوع گیاه و شرایط فیزیولوژی آن با کشت در محیط مناسب حاوی عناصر غذایی مورد نیاز می‌تواند مهمترین عامل در دستیابی به پروتکل مناسب باشد. در بسیاری از مطالعات استفاده از غلظتهای کامل محیط کشت MSموفقیت آمیز بوده است اما در مواردی نیز استفاده از غلظتهای تقلیل یافته نیز تفاوت معنی‌داری را نداشته و استفاده از آنها مقرون به صرفه بوده به طوری که امکان کشت موفق نمونه‌ها در غلظتهای تقلیل یافته MS نیز امکان پذیر بوده است (۳۵). درآزمایش اول برای اولین بار مقایسه پتانسیلهای دو ریزنمونه جوانه انتهایی و گره در جذب عناصر غذایی از محیط کشت MS به همراه استفاده از زغال فعال به عنوان عامل مؤثر در کاهش فنولها و افزایش قدرت جذب نمونه‌ها انجام گردید. درواقع زغال فعال با تیره نمودن محیط کشت و جذب عناصر فنولی رشد گیاهچه‌ها را نسبت به شاهد به طور معنی‌داری افزایش داد. در این مطالعه استفاده از زغال فعال و غلظت محیط کشت MS تفاوت معنی‌داری را در دو ریزنمونه جوانه انتهایی و گره نشان داد. به طوری که کشت جوانه-های انتهایی در محیط کشت MS به همراه استفاده از ۱/۵ میلی‌گرم در لیترزغال فعال نسبت به شاهد بیشترین تأثیر معنی‌دار را بر افزایش بیوماس گیاهچه‌ها را نشان داد. پاوار و همکاران (۳۲)، رانگانتان و همکاران (۳۵) کشت قطعات گره را در غلظت کامل محیط کشت MS در مقایسه با غلظتهای تقلیل یافته مناسب گزارش کردند که با نتایج این آزمایش نیزمطابقت داشت. داس و همکاران (۱۴) و کاویتا و همکاران (۲۲) برتری عملکرد کشت جوانه انتهایی گیاه استویا را در محیط MS ۱/۲ گزارش کردند. مهری‌زاده و همکاران (۵) بیشترین طول ساقه و تعداد برگچه را در کشت جوانه انتهایی استویا در محیط کشت MS حاوی ۱/۵ گرم در لیتر زغال فعال گزارش کردند که با نتایج حاصل از این آزمایش نیزمطابقت داشت. در واقع با توجه به اینکه ریزنمونه‌ها پس از قرارگیری بر روی محیط کشت اغلب به دلیل تنشهای اعمال شده به گیاه و آسیب به بافت مقادیر فراوانی مواد فنولی آزاد می‌کنند افزودن سطوح مناسبی از زغال فعال به محیط کشت با جذب اتیلن و کاهش اثر فنولهای اکسید شده سبب بهبود صفات رشدی گیاهچه‌ها گردیده است (۱۶ و ۲۷). مودی و همکاران (۲۹) بیشترین طول ریشه‌چه (۱۰/۹±۰/۷۱ سانتیمتر) و ۱۰۰ درصد ریشه‌زایی در کشت جوانه‌های جانبی و انتهایی استویا را با استفاده از ۱۰۰ppm زغال فعال در غلظت کامل محیط کشت MS گزارش کردند. سینگ و همکاران (۴۴) بیشترین افزایش تعداد ریشه‌چه (۱۱/۰±۰/۴۰) و طول ریشه‌چه (۴/۶۲±۰/۱۹ سانتیمتر) را با کشت قطعات گره گیاه دارویی استویا را با اضافه نمودن ۵۰ میلی‌گرم در لیتر زغال فعال به محیط MS ۱/۴ گزارش کردند. اطراشی و

همکاران (۲) افزایش ریشه‌زایی و رشد گیاهچه‌های حاصل از کشت ریزنمونه‌های فلفل دلمه‌ای *Capsicumannuum* .(L) را با استفاده از زغال فعال۰/۴ در محیط کشت MS گزارش کردند، به‌طوری که ۷۰ تا ۹۰ گیاهچه‌های انتقال یافته به گلخانه سازگار و رشد مطلوبی را داشتند. زبرجدی و همکاران (۳) پاسخ متفاوت ریزنمونه‌های هیپوکوتیل و کوتیلدون را در ریزازدیادی گیاه دارویی سرخارگل گزارش کردند. استفاده از تنظیم کننده‌های رشد در غلظتهای مناسب می‌تواند مؤثرترین عامل بر افزایش سرعت ازدیاد بیوماس نمونه‌های گیاهی باشد (۳۱). در این پژوهش با توجه به پاسخ مناسب ریزنمونه‌ها در گیاه استویا به ریشه-زایی و رشد مطلوب ریزنمونه‌ها و تأثیر هورمونهای اکسین بر کاهش متابولیتهای ثانویه مورد استفاده قرار نگرفت (۱۰). در مطالعات انجام شده در استویا و سایر گیاهان اغلب استفاده از دو سیتوکنین BAP و Kn نسبت به بقیه عملکرد برتری را نشان دادند. در مقایسه دو سیتوکنین فوق نتایج نشان داد استفاده از هورمون BAP بازده بیشتری را بر ریزازدیادی ریزنمونه‌ها داشته است. میرزایی اصل و همکاران (۴) افزایش ظرفیت باززایی نوساقه نا به جا ریز-نمونه‌های برگی چغندرقند را در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP، احمدی و همکاران (۱) ۸۷ درصد ساقه‌زایی با استفاده از ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BAP گیاه دارویی پروانش را گزارش کردند. مدنی و همکاران (۶) نیز بیشتری میزان ریزازدیادی کشت جوانه‌های انتهایی را با استفاده از ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP در توت فرنگی رقم سلوا گزارش کردند. ترکیبBAP با سایر سیتوکنینها اغلب با افزایش تعداد ساقه‌های جانبی باعث کاهش رشد طولی ساقه‌چه گردیده است. اسریدهار و همکاران (۴۷) کاهش معنی‌دار طول ساقه‌چه استویا را در ترکیب ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kn گزارش کردند. استفاده ازKn به صورت ترکیب با BAP اغلب در غلظتهای بالا بازده بیشتری را نشان داده است که با توجه به هزینه‌های تولید مقرون به صرفه نمی‌باشد بنابراین بررسی تأثیر استفاده ازسطوح مختلف به صورت جداگانه بر عملکرد نمونه‌ها کارآیی بهتری را نشان می‌دهد سینگ و همکاران (۴۲) ،سیلوا و همکاران (۴۶). بیشترین راندمان ازدیاد گیاهچه-های استویا در مطالعات علی و همکاران (۹) در غلظت ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون Kn و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و لاریبی و همکاران (۲۳) استفاده از غلظت ۱ میلی-گرم در لیتر BAP را سطوح برتر معرفی کردند. در سایر مطالعات انجام شده در بررسی تأثیر استفاده از تنظیم کننده‌های رشد بر افزایش صفات بیوماس ریزنمونه‌ها در گیاه دارویی استویا نیز نتایج متعددی گزارش شده است. مودی و همکاران (۲۹) استفاده از ۲ میلی‌گرم در لیتر Kn و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP را بیشترین طول ساقه‌چه (۰/۱۱±۳/۴۶ سانتیمتر) و تعداد گره (۰/۸۹±۳/۶) ، کاویتا و همکاران (۲۱) بیشترین تعداد ساقه جانبی (۰/۶۸±۱۲/۶)در غلظت ۳ میلی‌گرم در لیتر Kn و تیواری و همکاران (۵۰) افزایش صفات ساقه‌زایی در غلظت ۵ میلی-گرم در لیتر BAP در کشت قطعات گره، مه‌تا و همکاران (۲۸) بیشترین ساقه‌زایی و تعداد ساقه جانبی (۰/۵۸±۳/۴۲) در غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۲ میلی‌گرم در لیتر Knدر کشت جوانه انتهایی گزارش کردند. رازاک و همکاران (۳۵) بیشترین ساقه‌زایی قطعات گره را در محیط کشت MS در ترکیب ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر Kn مشاهده کردند. نتایج به دست آمده از این پژوهش برای اولین بار عملکرد جوانه‌های انتهایی و گره را با استفاده از غلظت محیط کشتMS و زغال فعال و نیز تأثیر افزایش بیوماس گیاهچه‌ها با استفاده از هورمونهای BAP و Kn مورد بررسی قرار داد. کشت جوانه‌انتهایی در غلظت کامل نمکهایMS و ۱/۵ گرمدر لیتر زغال فعال و ۱/۵ میلی‌گرم در لیترBAP بهترین سطوح تیماری بودند. با توجه به اینکه یکی از اهداف مهم ریزازدیادی استویا استخراج متابولیتهای ثانویه است، افزایش سرعت رشد نمونه‌ها و امکان تهیه متابولیتهای ثانویه از بخش ریشه می‌تواند راهکار مؤثری در

تولید و بهره‌وری از این گیاه دارویی باشد. با توجه به ریشه زایی مناسب ریزنمونه‌های استویا در محیط کشت و تولید ریشه‌چه‌های انبوه، استفاده از زغال فعال با تاریک نمودن محیط کشت و ممانعت از آزاد شدن ترکیبات فنولی باعث افزایش قدرت رشد ساقه‌چه و استحکام آن به طور معنی‌داری نسبت به شاهد گردید که پایداری آن نیز پس از انتقال به شرایط گلخانه‌ای نیز مشاهده شد به طوری که ۷۰ درصد توانایی سازگاری را نشان دادند. برتری استفاده از هورمون BAP بر افزایش بازده ریزازدیادی استویا در مطالعات احمد و همکاران (۸)، طالعی و همکاران (۴۹)، شتناوی و همکاران (۴۰) ، تیاگاراژان و همکاران (۵۱) ، راشل و همکاران (۳۷) گزارش شده که با نتایج این آزمایش نیز مطابقت داشت. در مطالعات بعدی می‌توان تأثیر تغییرات احتمالی متابولیتهای ثانویه را در استفاده از تیمارهای مختلف نیز بررسی کرد. به طوری‌که علاوه بر افزایش بازده تولید گیاهچه‌ها از طریق کشت درون شیشه-ای متابولیتهای ثانویه در اندامهای هدف به ویژه برگ، ثابت و یا به طور معنی‌داری افزایش یابند تا به منظور تولید تجاری استویا در سطح وسیع نتایج قابل تعمیم باشند.

منابع

۱- احمدی، ج، محمدی ر، و گروسی ق. ۱۳۹۳. ریزازدیادی درون شیشه‌ای گیاه دارویی پروانش (*Catharanthus roseus*) از طریق اندام‌زایی ساقه. مجله پژوهش‌های سلولی و ملکولی (مجله زیست شناسی ایران). جلد ۲۷. شماره۱. ص: ۲۵-۱۴.

۲- اطراشی، م و مرادی،ک. ۱۳۹۳. بررسی کالوس زائی و اندام زائی غیر مستقیم گیاه فلفل دلمه‌ای (Capsicum annuum L.) در شرایط کشت درون شیشه‌ای. مجله پژ وهش‌های گیاهی.دوره ۲۷. شماره۳. ص: ۳۵۵-,۳۴۶

۳- زبرجدی ع، معتمدی م، طراوت ا، اسماعیلی ا. ۱۳۹۳. ریزازدیادی گیاه دارویی سرخارگل(Echinacea purpurea L.) با استفاده از قطعات کوتیلدون و هیپوکوتیل، مجله پژوهش‌های گیاهی (مجله زیست شناسی ایران)، جلد ۲. شماره۳. ص: ۳۱۹-۳۱۱.

۴- میرزایی اصل، الف، هاتف سلمانیان ع، و جلال جوران، م. ۱۳۸۸. بررسی اثر پیش تیمارهای هورمونی و ژنوتیپ در تشکیل نوساقه‌های نا به جا مستقیم روی برگ چغندرقند (*Beta vulgaris*) در شرایط درون شیشه‌ای. مجله زیست شناسی ایران. جلد ۲۲. شماره ۴. صفحات ۷۲۲-۷۱۹.

۵- مهری‌زاده و، باغبان کهنه‌ورز، ب ، دورانی الف. ۱۳۹۲. بررسی اثر زغال فعال در ریزازدیادی گیاه استویا (Stevia rebaudiana Bertoni) . اولین همایش سراسری کشاورزی و منابع طبیعی.

۶- مدنی، قبادی س، سید طباطبایی، الف، طالبیم، یامچی، و. ۱۳۹۲. اثر تنظیم کننده‌های رشد و انواع ریزنمونه بر باززایی و ریزازدیادی توت فرنگی تجاری رقم سلوا (*Fragariax ananassa* cv. Selva) . علوم و فنون کشت‌های گلخانه‌ای. سال چهارم، شماره پانزدهم.

7- Ahmed MB, Salahin M, Karim R, Razvy MA, Hannan MM,Sultana R,Hossain M, Islam R. 2007. An efficient method for in vitro clonal propagation of newly introduction sweetener from plant *Stevia rebaudiana* Bertoni in Bangladesh. AM-Eurasian J Sci Res 2(2): 121-125.

8- Ahmed N, Fazal H, Zamir R, Khalil SA, Abbasi BH. 2011a. Callogenesis and shoot organogenesis from flowers of *Stevia rebaudiana* (Bert). C.R. Biol. 336, 486-492.

9- Ali A, Gull I,Naz S. 2010. Biochemical investigation during different stages of invitro propagation of *Stevia rebaudiana*. Pakj Bot 42(4): 2827-2837.

10- Aman N., Hadi F, Khalil SA, Zamir R, Ahmad N. 2013. Efficient regeneration for enhanced steviol glycosides production *Stevia rebaudiana* (Bertoni). C.R. Biol 336, 486-492.

11-AnbazahaganM,Kalpana M, Rajendran R, Natarajan V, Dhanavel D. 2010. In vitro production of *Stevia rebaudiana* Bertoni. Emirates J Food Agric, 22(3): 216-222.

12-Bano R, Haroon Khan M, Sher Khan R, Rashid H, Swati ZA. 2010. Development of an efficient regeneration protocol for three genotypes of *Brassica juncea*. Pakistan Journal of Botany 42: 963-969.

13-Ceasar SA, Maxwell SL, Prasad KB, Karthigan M, Ignacimuthu S. 2010. Highly efficient shoot regeneration of *Bacopa monnieri* (L.) using a

two stage culture procedure and assessment of genetic integrity of micropropagated plants by RAPD. Acta Physiol Plant, 32:443-452.

14-Das A, Gantait S, Mandal N. 2011. Micropropagation of an elite medicinal plant: *Stevia rebaudiana* Bert. Int J Agric Res 6: 40-48.

15-Danesh YR, Gotapeh EM, Alizadeh A, Sanavy MM. 2006. Optimizing carrot hairy root production for monoxenic culture of arbuscular mycorrhizal fungi in Iran. J Biol Sci, 6: 87-91.

16-Dennis TT. 2008. The role of activated charcoal in plant tissue culture. Biotechnology Advances, 26: 618-631.

17-Duncan, D.B. 1955. Multiple range and multiple F tests. Biometrics 11:1-42.

18-Goyal S.K, Samsher L, and Goyal R.K. 2010. Stevia *(Stevia rebaudiana* L.*)* a bio-sweetener: a review. International Journal of Food Sciences and Nutrition, 61: 1-10.

19-Hossain, M. A., A. H. M. Shamim, T. A. J. Kabir and M. N. Hasan. 2008. Micropropagation of *Stevia*. Inter. J. Sustainable Crop Prod. 3(4): 1-9.

20-Huy NT and TT Xan-Mai 2014. Investigation of effective in vitro propagation Media for *Stevia rebaudiana Bertoni*. KKU Research Journal, 19: 172-180.

21-Jagatheeswari D, and Ranganthan P. 2012. Studies on micropropagation of *Stevia rebaudiana Bertoni*. International Journal of Pharmaceutical and Biological Archives, 3: 315-320.

22-Kavitha MS, EG Wesely and P Meha lingam. 2012. Direct multiple shoot regeneration from shoot tip and nodal explant of Solanum Nigrum L.A Medicinal Herb. Journal of Ornamental and Hort Cultural Plants, 2: 65-72.

23-Laribi, B., N. Rouatbi, K. Kouki, and T.Bettaieb, 2010. In vitro propagation of *Stevia rebaudiana* (Bert.)-Anou-Caloric sweetener and antidiabetic medicinal plant. International Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 2: 333-339.

24-Lorenzo, C, Serrano-Diaz, J, Plaza, M, Quintanilla, C, Alonso, G. 2014. Fast methology of analyzing major Steviol glycosides from *Stevia rebaudiana* leaves. Food chemistry. 157, 518-523.

25-Mathur M and T Begum. 2015. Shoot lets regeneration and tissue culture studies on *Stevia rebaudiana* Bertoni and terminalia belleric Roxb. International Journal of Recent Biotechnology, 3: 25-35.

26-Mitra A, Pal A. 2007. In vitro regeneration of *Stevia rebaudiana* Bert from nodal explants. J Plant Biotechnol 16: 59-62.

27-Mirniam A, Roshandel P, Otroshi M, Ebrahimi M. 2013. A novel protocol for *Stevia rebaudiana* Bert regeneration. Journal of Advanced Laboratory Research in Biology, 7(4): 15-22.

28-Mehta J, Sain M, Sharma DR, Gehlot P, Sharma P, Dhaker JK. 2010. Micropropagation of an anti diabetic plant *Stevia rebaudiana Bertoni* (natural sweetener) in Hadoti region of South-east Rajasthan, India. ICCA J Biol Sci, 1(3):37-42.

29-Modi AR, Patil G, Kumar N, Singh AS, Subhash N. 2012. A simple and efficient in vitro mass multiplication procedure for *Stevia rebaudiana* Bertoni and analysis of genetic fidelity of in vitro raised plants through RAPD. Suger Tech, doi: 10.1007/s 12355-012-0169-6.

30-Murashige T, Skooge F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15: 473-494.

31-Papry M, Ahsan SM and Shahriyar S. 2015. In vitro regeneration protocol development via callus formation from stem explant of tomato. Asian J Med Biol Res, 1: 589-599.

32-Pawar SV, VG Khandagale, VM Jambhale, AS Jadhav and BD Pawar. 2015. In vitro regeneration studies in *Stevia* through nodal segment and shoot tip. The Bioscan, 10: 1007-1010.

33-Pan, M.J. and Van Staden, J. 2004. The use of charcoal in vitro culture, a review. Plant Growth Regulation, 26: 155-163.

34-Razak UNAA, OC Boon, VT Sing and LL Kiaw. 2014. In vitro micropropagation of *Stevia rebaudiana Bertoni* in Malaysia Chong Boon ong. Brazilian Archives of Biology and Technology, 57: 23-28.

35-Ranganthan ,J. 2012. Studies on micropropagation of *Stevia rebaudiana*. Int J Pharmacol Biol Arch, 3(2): 315-320.

36-Ramirez- Mosqueda MA, Lglesias-Andreu. 2016. Direct organogenesis of *Stevia rebaudiana*. Suger Tech, volume (18): 424-428.

37-Rashel SA, Moniruzzaman SH,Pijush S and S Yasmi. 2016. An efficient protocol for in vitro regeneration of *Stevia rebaudiana*. Asian Journal of Medicinal and Biological Research, 2(1): 95-106.

38-Sabah, A.H., Rasha, M.A.K. 2013. Biotechnological studies for improving of *Stevia rebaudiana* Bertoni in vitro Plant lets. Middle-East J.Sci.Res. 14,93-106.

39-Sairkar P,Chandravanshi MK, Shukla NK, Mehrotra MN. 2009.Mass propagation of an economically important medicinal plant *Stevia rebaudiana* using in vitro propagation technique. J Med Plant Res 3(4): 266-270.

40-Shatnawi MA, Shibli RA, Abu-Romman SM, Al-Mazraawi MS, Ajlouni ZL, Shatnawi WA, Odeh WH. 2011. Clonal propagation and cryogenic storage of the medicinal plant *Stevia rebaudian*. Spanish Journal of Agricultural Research, 9(1): 213-220.

41-Sanjida RM, Sarker RH,Hoque MI. 2011. In vitro plant regeneration in *Brassica Spp*. Plant Tissue Culture and Biotechnology 21: 127-134.

42-Singh A, Kumar J, Kumar P. 2008. Effect of plant growth regulators and sucrose on postharvest physiology membrane stability and vase life of cut S pikes of gladiolus. Plant Growth Regulation 55: 222-229.

43-Singh P, Dwivedi P, Atri N. 2012. In vitro shoot regeneration of *Stevia rebaudiana* through callus and nodal segments. Int J Agric Environ Biotechnol 5(2): 101-108.

44-Singh, P, Dwived I P. 2013. Efficient micropropagation protocols of regeneration of *Stevia rebaudiana Bertoni*, an anti-diabetic herb. Vegetos 26(1), 318-323.

45-Sivaram, L., and U. Mukundan. 2003. In vitro culture studies on *Stevia rebaudiana*. In Vitro Cellular and Development Biology Plant, 39: 520-523.

46-Silva All, Oliviera Y, Costa JL, Scheidt GN Carvalho DC, Santos JD, Guerra EP. 2011. Pre-acclimatization of micropropagated plants of Eucalyptus *saligana Sm.* Rev Acad Agrar Ambient. 9: 179-184.

47-Sridhar TM and C Aswath. 2014. Influence of additives on enhanced in vitro shoot multiplication of Stevia rebaudiana(Bert) an important anti diabetic medicinal plant. American Journal of Plant Sciences, 5: 192-199.

48-Taware AS, DS Mukadam, AM Chavam and SD Taware. 2010. Compartive studies of in vitro and in vivo grown plants and callus of Stevia Rebaudiana. International Journal of Integrative Biology, 1:10.

49-Taleie N, Hamidochli S, and Hamidoghli Y. 2012. In vitro plantlet propagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni. South Western Journal of Horticulture Biology and Environment, V(2), No, 1. Pp: 99-108.

50-Tiawari S, Arnold R, Saxena A, Mishra RM, Rajak A and Singh P. 2013. Studies on rapid micropropagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni: a natural sweetener. International Journal of Pharmacy and Life Sciences, V(4), ISSUE 5: 2667-2671.

51-Thiyagarajan M, Venkatachalam P. 2012. Large scale in vitro propagation *of Stevia rebaudiana Bert* for commercial application pharmaceutically important and anti diabetic medicinal herb. Ind Crops Prod 37(1):111-117.

52-Udin MS, Chowdhury MS, Khan MM, Uddin MB, Ahmed R, Betan MA. 2006. In vitro propagation of *Stevia rebaudiana Bert* in Bangladesh. Afr J Biotechnol 5: 1238-1240.

53-Verma SK, Raj MK, Asthana P, Jaiswal VS, Jaiswal U. 2010. In vitro plantlets from alginate-encapsulated shoot tips of *Solanum nigrum* L. Sci. Hortic. 124:517-521.

Micropropagation drug plant Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) through cultivation two explants end buds and node with various cocentrations activated charcoal and hormones BAP and Kn.

Shaafi B.,[1] Moosavi S.S.,[1] Ghanbarali Baghney S.,[1] Abdollahi M.R.[1] and Sarikhani H.[2]

[1] Dept., Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, I.R. of Iran.

[2] Dept. of Horticulture, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, I.R. of Iran.

Abstract

Stevia rebaudiana Bertoni is from the dark Composite perennial plant, herbaceous and pollinator. Due to the being below seed germination perecentage and heterogenous multiplication of plants from seed in terms of sweetness micropropagation of this plant with use of tissue culture methods in order to replicate mass is desirable. In this study, the performance of two explant end bud and node using three treatments the concentration of the medium MS and different levels of activated charcoal and hormones BAP and Kn in two experiment compared and reviewed. So that in the first experiment the effect of active charcoal and concentration of culture media MS and in the second experiment use separate concentrations (at 0,0/5,1 and 1/5mgr/l) of hormones BAP and Kn in three repeat was implemented. Results showed the highest increase traits in the cultivation of end buds at full concentration seen of culture medium MS with to 1/5gr/l activated charcoal as absorber substance phenols. Use concentration 1/5 mgr/l of hormones BAP and Kn showed an increase in micropropagation efficiency of both explants. Performance comparison hormones BAP and Kn using 1/5 mgr/l BAP in the cultivation of the end buds showed the most characteristics of shoot length, number of nodes and the number of lateral stems.

Key word: Micropropagation, Stevia, activated charcoal, BAP, Kn.