رشد و تکثیر شاخساره و برخی پارامترهای بیوشیمیایی گیاه استویا در شرایط کشت درون شیشه‌ای تحت تأثیر الیسیتورهای زیستی و غیر زیستی

دیاکو رسولی[1*]، بهرام ملکی[1]، حسین جعفری[2] و ندا زند[2]

[1] **ایران، زنجان، دانشگاه زنجان، دانشکده کشاورزی، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی**

[2] **ایران، زنجان، آموزش و ترویج کشاورزی، سازمان تحقیقات، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان زنجان، بخش تحقیقات گیاه پزشکی**

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۵/۱۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۷/۰۷

چکیده

به منظور بررسی رشد و تکثیر و همچنین اندازه‌گیری برخی مؤلفه‌های بیوشیمیایی گیاه استویا تحت تأثیر الیسیتورهای زیستی و غیر زیستی در شرایط کشت بافت دو آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار انجام شد. بر همین اساس، ابتدا اثر دو نوع سایتوکینین کینیتین و بنزیل آمینو پورین (Kin و BAP) در غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲، ۲/۵ و ۳ میلی‌گرم بر لیتر به منظور انتخاب غلظت بهینه به عنوان پروتکل تکثیر گیاه استویا در آزمایش اول و سپس اثر الیسیتورهای کیتوزان، متیل جاسمونات و عصاره مخمر در چهار غلظت ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر بر افزایش رشد گیاه و همچنین پارامترهای بیوشیمیایی گیاه استویا در شرایط کشت بافت به عنوان آزمایش دوم انجام گرفت. نتایج آزمایش اولیه نشان داد که غلظت ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP جهت پرآوری شاخساره به عنوان غلظت بهینه باعث بیشترین رشد طول و تعداد شاخساره شد، بنابراین این غلظت به محیط کشت پایه اضافه گردید. اثر الیسیتورهای مختلف افزایش معنی‌داری بر طول و تعداد شاخه نشان دادند، به طوری‌که بیشترین طول و تعداد شاخه در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کیتوزان بود که به نسبت شاهد به ترتیب ۷۰ و ۹۵ درصد افزایش داشت. اثر الیسیتورها بر پارامترهای بیوشیمیایی نشان داد که به غیر از کربوهیدرات، اثر افزایشی به نسبت شاهد نداشتند، به طوری که محتوای آب و همچنین کلروفیل گیاه با افزایش غلظت الیسیتورها کاهش بیشتری را نشان داد. میزان کربوهیدرات کل تحت تأثیر غلظت‌های کیتوزان ۲۰۰، متیل جاسمونات ۱۰۰ و عصاره مخمر ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر به طور معنی‌داری به نسبت تیمار شاهد افزایش داشت. به طور کلی مشخص شد که این تحقیق می‌تواند به عنوان یک پروتکل مناسب جهت تولید انبوه گیاه استویا به عنوان یک گیاه اقتصادی مهم در شرایط کشت بافت مورد استفاده قرار گیرد.

واژه های کلیدی: استویا، کیتوزان، کشت بافت، متیل جاسمونات، عصاره مخمر

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۴۴۴۲۳۳۸۷۷۶، پست الکترونیکی: dirasouli@gmail.com

مقدمه

استویا با نام علمی *Stevia rebaudiana* (Bertoni) یکی از گیاهان دارویی شناخته شده از خانواده Asteraceae می-باشد. این گیاه بومی نواحی گرمسیری و نیمه گرمسیری آمریکای جنوبی مانند پاراگوئه و برزیل بوده (۱۴) که امروزه در دیگر نقاط جهان از جمله اروپا و بخش‌هایی از آسیا کشت می‌شود (۱۷). برگ‌های استویا حاوی شیرین کننده‌های قوی بدون کالری به نام گلیکوزیدهای استویول (SGs) می‌باشند که عامل مزه شیرین این گیاه هستند به طوری که امروزه در صنایع غذایی و دارویی کاربرد فراوانی دارند. (۳۱). تولید گلیکوزیدهای استویول از گیاهان استویا با توجه به پتانسیل بالای آن‌ها به عنوان مواد طبیعی غیر سمی، میزان شیرین کنندگی بالا، مقدار کالری پایین،

مقاومت در برابر حرارت و ثبات PH دارای ارزش بسیار زیادی می‌باشد (۱۴). برای بهره‌برداری گیاه استویا در صنعت، تولید و تکثیر آن در مقیاس وسیع ضروری به نظر می‌رسد. این گیاه در حال حاضر از طریق بذر تکثیر می-یابد. با این حال، تکثیر از طریق بذر به علت درصد زنده-مانی (viability) پایین و همچنین کاهش قدرت جوانه‌زنی محدود شده است (۲۶). از طرفی، با توجه به اینکه استویا یک گیاه خود ناسازگار است تکثیر آن از طریق بذر بسیار مشکل بوده و باعث بوجود آمدن بذرهای عقیم می‌شود (۹)، همچنین با توجه به دگرگشن بودن، بذور تولید شده نامتقارن بوده و از لحاظ فنوتیپی غیر یکدست می‌باشند. بنابراین می‌توان از روش‌های غیر جنسی جهت تکثیر این گیاه استفاده نمود (۱۵). یکی از روش‌هایی که جهت تکثیر انبوه گیاهان استفاده می‌شود قلمه‌زنی می‌باشد. این روش جهت تولید گیاهان همگن و یکدست روش مناسبی می-باشد اما با توجه به این که قلمه زدن به عنوان یک تکنیک سنتی در سطح وسیع و انبوه کار پر زحمت و طاقت-فرسایی است لذا می‌توان از تکنیک‌های دیگر تکثیر غیر جنسی نظیر کشت بافت استفاده نمود (۱۸). کشت بافت گیاهی می‌تواند نقش مهمی در تولید تجاری گیاه استویا ایفا کند به طوری‌که با حفاظت از ذخایر ژرم پلاسم (Germplasm) پایه مادری در مدت زمان کوتاهی تکثیر انبوهی را باعث می‌گردد (۴). بنابراین کشت بافت به عنوان یک روش کنترل شده و *in vitro* بهترین جایگزین برای انتشار سریع گیاه استویا است (۳۳).

اکثر گیاهان مقدار بسیار پایینی از متابولیت‌های ثانویه تولید می‌کنند و این میزان تولید ممکن است تحت شرایط مشخصی صورت گیرد. در کشت بافت گیاهی، الیسیتورها می‌توانند جهت افزایش سنتز متابولیت‌های ثانویه با کشت سلول‌های گیاهی به کار رفته و در نتیجه می‌توان در زمان کمتری به میزان تولید بیشتری دست یافت (۱). مطالعات بسیاری تایید کرده‌اند که تجمع متابولیت‌های ثانویه مختلف می‌تواند به طور مؤثری ناشی از کاربرد الیسیتورها باشد (۸, ۱۰, ۲۳). به طور کلی، الیسیتورها ترکیباتی زیستی و یا غیر زیستی می‌باشند که از طریق القای پاسخ‌های دفاعی در گیاهان می‌توانند باعث تولید و انباشت متابولیت‌های ثانویه شوند (۴۱). الیسیتورهای زیستی ممکن است دارای ترکیبات مشخصی مانند کیتین و کیتوزان و یا مانند قارچ-های همگن و عصاره مخمر دارای مجموعه‌ای از ترکیبات زیستی باشند (۳۷). از طرفی، الیسیتورهای غیر زیستی مانند اسید جاسمونیک و یا اسید سالیسیلیک به منظور افزایش تولید ترکیبات ثانویه مورد بررسی قرار گرفته‌اند (۲۵). مطالعات متعددی بر روی گیاه استویا در خصوص القای کالوس و توسعه کشت سوسپانسیون با استفاده از ریزنمونه‌های متنوع (برگ، گره، میانگره و غیره) انجام گرفته است (۳, ۱۳, ۱۹, ۲۰)، همچنین مطالعاتی نیز به بررسی بیان ژن‌های درگیر در مسیر بیوسنتزی گلیکوزیدهای استویول در گیاه استویا پرداخته‌اند که بخشی نیز توسط نویسندگان مقاله تحت تاثیر الیسیتورهای کیتوزان، متیل جاسمونات و عصاره مخمر انجام گرفته است (۲)، در حالی که گزارش‌های اندکی در ارتباط با تأثیر الیسیتورهای زیستی و غیر زیستی بر افزایش شاخه-زایی گیاه استویا در شرایط کشت بافت و همچنین اثر این الیسیتورها بر پارامترهای رشد گیاه در دسترس می‌باشند.

به طور کلی با توجه به تحقیقات مختلف مشخص شده است که گیاه استویا به عنوان یک گیاه اقتصادی مهم مطرح بوده که در بسیاری از کشورهای پیشرفته از قند آن در تولید محصولات غذایی شیرین استفاده می‌شود (۱۲). در کشور ایران با توجه به بومی نبودن این گیاه و لذا تکثیر آن از طریق کشت بافت، کمتر مورد توجه قرار گرفته است (۳) که پیش‌بینی می‌شود در آینده‌ای نزدیک به عنوان یک گیاه استراتژیک جهت تولید محصولات شیرین بدون کالری مورد استفاده قرار گیرد. بنابراین با توجه به ارزش اقتصادی این گیاه تولید و تکثیر آن از اهداف مهم محسوب می‌شود. لذا در تحقیق حاضر هدف تهیه پروتکل مناسب برای تکثیر از طریق کشت بافت و بررسی تاثیر استفاده از

الیسیتورهای کیتوزان، متیل جاسمونات و عصاره مخمر بر تولید شاخساره و برخی پارامترهای بیوشیمیایی گیاه استویا در شرایط کشت بافت می‌باشد.

مواد و روشها

به منظور بررسی اثر الیسیتورهای کیتوزان، متیل جاسمونات و عصاره مخمر بر تولید شاخساره گیاه استویا و همچنین افزایش تولید گلیکوزیدهای استویول در شرایط کشت بافت آزمایشی در قالب طرح کاملا تصادفی در آزمایشگاه تحقیقاتی بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه زنجان انجام گرفت.

ضدعفونی و کشت ریزنمونه‌ها: جهت بدست آوردن گیاهان یک‌دست و همگن، قلمه‌های دو ماهه گیاه استویا از مرکز تحقیقات کشاورزی استان گیلان تهیه شد. ضدعفونی ریزنمونه‌های گیاه استویا بر اساس روش وای لنگ و لای کنگ (۲۰۰۴) با اندکی تغییرات انجام گرفت(۳۹). به این منظور قطعات میانگره حاوی حداقل یک جوانه جانبی به اندازه‌های ۵ تا ۶ سانتیمتری برش داده شدند. سپس به مدت پنج دقیقه در محلول ضدعفونی حاوی توین ۲۰ قرار گرفته و با آب مقطر شستشو داده شدند. در زیر هود لامینار نمونه‌ها در محلول هیپوکلریت سدیم پنج درصد قرار گرفته و سه بار با آب مقطر شستشو داده شدند. زمانی که ریز نمونه‌ها دارای مقداری رطوبت سطحی بودند اقدام به کشت آن‌ها در محیط کشت بافت گردید.

کشت ریز نمونه‌های ضدعفونی شده در محیط کشت MS انجام گرفت. محیط کشت MS (۲۸) حاوی سه درصد ساکاروز و ۰/۸ درصد آگار بود. همچنین با توجه به هدف تحقیق، به محیط کشت MS سایتوکینین (BAP=6-Benzylaminopurine و Kin= Kinetin) با غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲، ۲/۵ و ۳ میلی‌گرم بر لیتر اضافه گردید که بر اساس نتایج آزمایش اولیه مناسب‌ترین غلظت به محیط کشت MS اضافه شد. غلظت‌های استفاده شده در این تحقیق بر اساس مطالعات و تحقیقات صورت گرفته در شرایط مشابه بر روی گیاهان مختلف انتخاب گردیدند. ریز نمونه‌های کشت شده جهت نگه‌داری به اتاقک رشد با درجه حرارت ۲ ± ۲۵ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۶۰- ۵۰ درصد با طول دوره روشنایی۱۶ ساعت در روز منتقل گردیدند. جهت بدست آوردن انشعابات جدید و نمونه‌های کافی جهت تیمار، در محیط کشت ریزنمونه‌های زیادی در محیط کشت MS تیمار شده با بهترین غلظت از سایتوکینین تحت آزمایش، به‌طور پیوسته کشت گردیدند. بعد از گذشت ۸ هفته از تکثیر ریز نمونه‌های استویا و بدست آوردن گیاهان کافی در شرایط *in vitro* گیاهان جهت کشت در مراحل بعدی و اعمال تیمار آماده گردیدند.

اعمال تیمار: تیمارها شامل کیتوزان، متیل جاسمونات و عصاره مخمر در ۴ غلظت ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر بودند. تیمارهای موردنظر ابتدا با استفاده از فیلترهای سرنگی ۰/۲ میکرومولار (µm) استریل شدند. قبل از کاشت قلمه‌های ضدعفونی شده در محیط کشت، تیمارهای مورد نظر هر کدام به‌صورت جداگانه در شرایط استریل به محیط کشت پایه اضافه گردیدند. جهت بررسی و مقایسه گیاهان تیمار شده با الیسیتورها با گیاهان شاهد بدون الیسیتور، از آب مقطر به‌عنوان تیمار شاهد در محیط کشت پایه استفاده گردید.

اندازه‌گیری طول و تعداد ساقه‌های استویا: جهت محاسبه طول و تعداد نمونه‌های کشت شده در محیط کشت پایه بعد از چهار هفته، طول نمونه‌های گیاهی با استفاده از خط‌کش اندازه‌گیری و تعداد آن‌ها شمارش شده و یادداشت گردید.

اندازه‌گیری وزن خشک نمونه‌ها: بعد از اندازه‌گیری طول و تعداد نمونه‌های کشت داده شده در چهار غلظت الیسیتورهای کیتوزان، متیل جاسمونات و عصاره مخمر، وزن خشک آن‌ها نیز اندازه‌گیری شد. جهت اندازه‌گیری

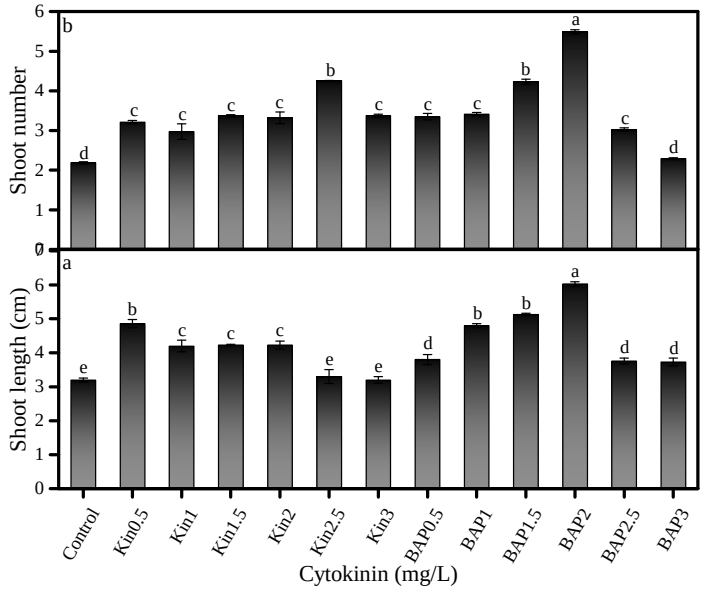
وزن خشک، نمونه‌ها ابتدا وزن شدند و سپس به مدت یک شب در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد در آون قرار داده شد. سپس وزن نمونه‌های خشک شده با استفاده از ترازوی سه صفر بر حسب میلی‌گرم اندازه‌گیری و به صورت درصدی از وزن تر اولیه بیان شد.

اندازه‌گیری پارامترهای رشد: میزان آب موجود در برگ و همچنین پروتئین کل موجود در برگ‌های تازه گیاه استویا با استفاده از روش ساداسیوام و مانیکام (۳۰) بدست آمد. همچنین کربوهیدرات کل موجود در برگ‌های استویا بر اساس روش ریگوین و امریک (۲۴) محاسبه شد. بر همین اساس، میزان کلروفیل موجود در برگ‌های سبز استویا با استفاده از روش هیسوکس و ایزرلستام (۱۶) بدست آمد. پارامترهای رشد اندازه‌گیری شده بر حسب میلی‌گرم بر گرم بدست آمدند که نتایج آن‌ها به صورت درصد بیان گردیدند.

تجزیه و تحلیل آماری: این آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی در سه تکرار انجام گردید. همچنین مقایسه میانگین‌ها با استفاده از نسخه ۹/۲ نرم افزار آماری SAS و آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد انجام شد.

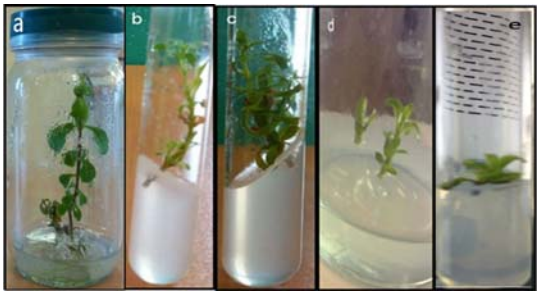
نتایج

آزمایش‌های اولیه: کشت بافت گیاهان استویا تحت تأثیر Kin و BAP در شش غلظت مختلف جهت بدست آوردن بهترین محیط کشت پایه انجام گرفت. نتایج مربوط به آزمایش‌های اولیه بر روی طول و تعداد شاخه نشان داد که همه غلظت‌های BAP به غیر از غلظت ۳ میلی‌گرم بر لیتر و همه غلظت‌های Kin به غیر از غلظت‌های ۲/۵ و ۳ میلی‌گرم بر لیتر، افزایش معنی‌داری در تعداد و ارتفاع شاخه در محیط کشت بافت را باعث شدند (شکل ۱). به طور کلی، بیشترین تعداد شاخه و بالاترین طول ساقه در محیط حاوی دو میلی‌گرم بر لیتر BAP بود به‌طوری که میانگین طول ساقه ۶/۰۳ سانتی‌متر (۸۸ درصد افزایش به نسبت کنترل) و تعداد شاخه به طور میانگین ۵/۴۹ ساقه (۱۵۰ درصد افزایش به نسبت کنترل) بود.



شکل ۱- اثر تنظیم کننده‌های رشد BAP و Kin بر طول (a) و تعداد (b) شاخه‌های گیاه استویا در محیط درون شیشه‌ای. محور عمودی نشان‌دهنده طول و تعداد شاخه. Standard error نشان‌دهنده انحراف معیار می‌باشد. حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی دار بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪ هستند.

اثر غلظت‌های مختلف کیتوزان، متیل جاسمونات و عصاره مخمر بر طول و تعداد شاخه: اثر غلظت‌های مختلف کیتوزان، متیل جاسمونات و عصاره مخمر بر طول و تعداد شاخه گیاه استویا در شرایط کشت بافت در سطح یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). نتایج حاصل از کشت قلمه‌های استویا بعد از ۴ هفته، در محیط کشت پایه حاوی غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کیتوزان، متیل جاسمونات و عصاره مخمر (شکل ۳) نشان داد که غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کیتوزان باعث بیشترین طول و تعداد شاخه گیاه استویا در محیط کشت گردید که به نسبت شاهد به ترتیب ۷۰ و ۹۵ درصد افزایش داشت (شکل ۲–a). همچنین غلظت‌های ۱۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کیتوزان و غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر متیل جاسمونات و عصاره مخمر به طور همزمان تأثیر مثبت و معنی‌داری بر طول و تعداد شاخه‌های گیاه استویا در محیط کشت بافت داشتند. کمترین میزان طول و تعداد شاخه تحت تأثیر غلظت ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر عصاره مخمر و متیل جاسمونات بود که باعث کاهش معنی‌دار به نسبت تیمار شاهد (بدون الیسیتور) شد (شکل ۲– d ،e).

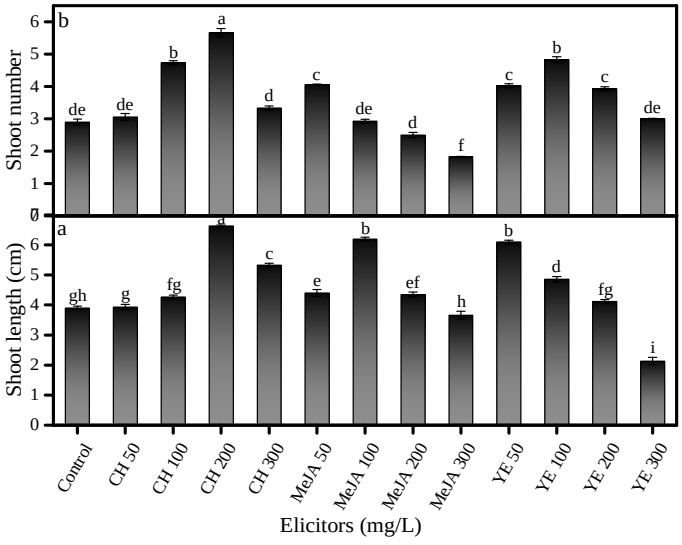


شکل ۲– کشت بافت گیاه استویا در شرایط کشت درون شیشه‌ای تحت تأثیر الیسیتورهای مختلف. a: بیشترین طول و تعداد ساقه تحت تأثیر ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کیتوزان. b و c: بیشترین طول و تعداد ساقه تحت تأثیر متیل جاسمونات ۱۰۰ و عصاره مخمر ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر. d و e: کمترین تعداد و طول ساقه در محیط کشت بافت تحت تأثیر متیل جاسمونات ۳۰۰ و عصاره مخمر در غلظت ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر.

جدول ۱– تجزیه واریانس اثر الیسیتورهای مختلف بر رشد شاخساره و پارامترهای بیوشیمیایی گیاه استویا در کشت درون شیشه‌ای

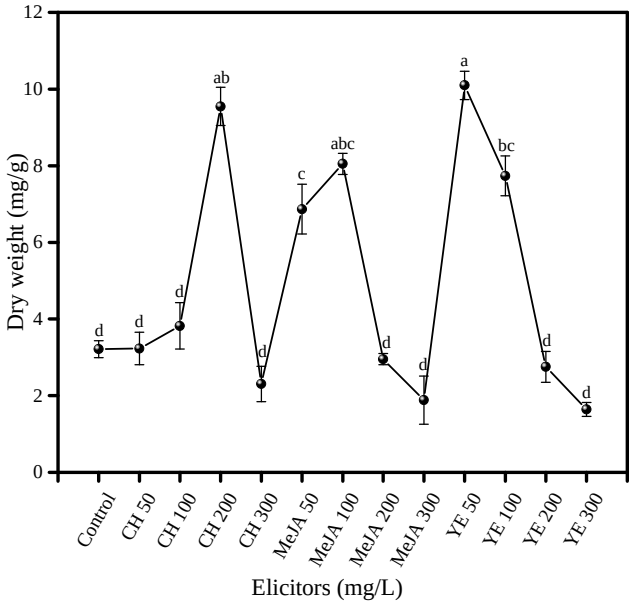
منابع تغییرات	درجات آزادی	میانگین مربعات						
		طول ساقه (cm)	تعداد ساقه	آب نسبی (٪)	پروتئین (٪)	کربوهیدارت (mg/g)	کلروفیل (mg/g)	وزن خشک (mg/g)
تیمار	۱۲	۵/۵۷**	۳/۴۴**	۴۹/۴۵**	۹/۶۳**	۰/۰۰۶**	۶/۶۸**	۸/۲۲**
خطا	۲۶	۰/۰۵۱	۰/۱۲	۱/۶۰	۱/۳۲	۰/۰۰۱	۰/۳۲	۰/۴۰
ضریب تغییرات (٪)		۵/۰۳	۹/۸۰	۱/۶۳	۶/۲۶	۳/۲۵	۴/۶۷	۷/۷۴

**: وجود اختلاف معنی‌دار در سطح یک درصد



شکل ۳– اثر غلظت‌های مختلف الیسیتورهای کیتوزان، متیل جاسمونات و عصاره مخمر بر طول (a) و تعداد (b) شاخه‌های گیاه استویا در محیط درون شیشه ای. محور عمودی نشان‌دهنده طول و تعداد شاخه. Standard error نشان‌دهنده انحراف معیار می‌باشد. حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی دار بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد هستند.

اثر غلظت‌های کیتوزان، متیل جاسمونات و عصاره مخمر بر وزن خشک گیاه استویا: وزن خشک نمونه‌های استویا در شرایط *in vitro* در غلظت‌های مختلف کیتوزان، متیل جاسمونات و عصاره مخمر در شکل ۴ نشان داده شده است. به‌منظور بررسی بیوماس گیاه تحت شرایط کشت در شیشه، ریزنمونه‌های قلمه استویا تحت غلظت-های مختلف به مدت چهار هفته قرار گرفتند. بعد از چهار هفته وزن خشک نمونه‌های خشک شده اندازه‌گیری شد. بر اساس نتایج مشخص شد که بیشترین وزن خشک گیاه مربوط به عصاره مخمر در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر (۵۱ درصد) بود که اختلاف معنی‌داری با کیتوزان ۲۰۰ (۴۷ درصد) و متیل جاسمونات ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر (۳۶ درصد) نداشت. همچنین عصاره مخمر در غلظت ۱۰۰ و متیل جاسمونات در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر افزایش وزن خشک معنی‌داری (به ترتیب ۳۳ و ۲۷ درصد) به نسبت تیمار شاهد نشان دادند. از طرفی تیمارهای کیتوزان ۵۰، ۱۰۰، ۳۰۰، متیل جاسمونات و عصاره مخمر در غلظت‌های ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر اثر معنی‌داری جهت بهبود یا کاهش وزن خشک گیاه در شرایط *in vitro* به نسبت تیمار شاهد نشان ندادند.



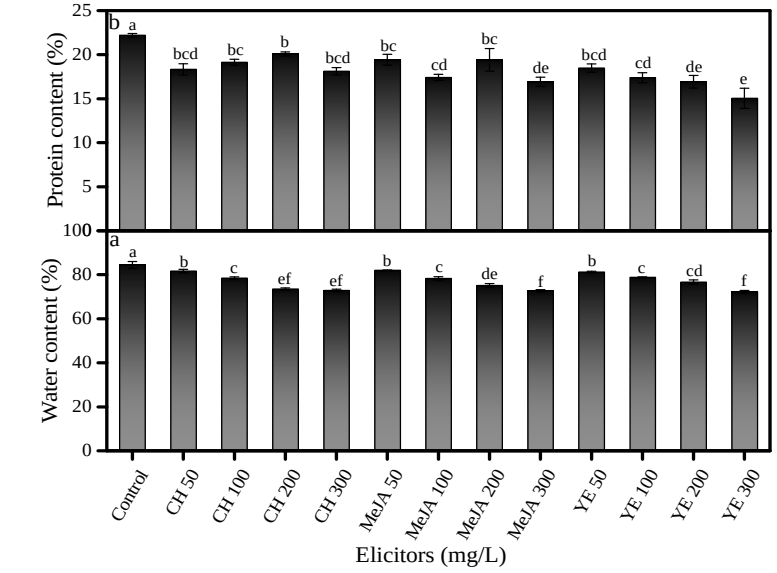
شکل ۴- وزن خشک شاخه‌های گیاه استویا در شرایط کشت درون شیشه‌ای تحت تأثیر الیسیتورهای مختلف. Standard error نشان‌دهنده انحراف معیار می‌باشد. حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی دار بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد هستند.

اثر غلظت‌های مختلف کیتوزان، متیل جاسمونات و عصاره مخمر بر محتوای آب و پروتئین گیاه (میلی‌گرم بر گرم): نتایج مربوط به درصد محتوای آب و همچنین پروتئین کل در شکل ۵ نشان داده شده‌اند. بر اساس نتایج مشخص شد که هر دو صفت بررسی شده تحت تأثیر غلظت‌های مختلف هر سه الیسیتور کیتوزان، متیل جاسمونات و عصاره مخمر به طور معنی‌داری کاهش داشتند. به طوری‌که بیشترین درصد این دو صفت به ترتیب ۰/۸۴ و ۰/۲۲ میلی‌گرم بر گرم بود که در تیمار شاهد مشاهده گردید و با افزایش غلظت الیسیتورها کاهش محتوای آب و پروتئین گیاه افزایش یافت.

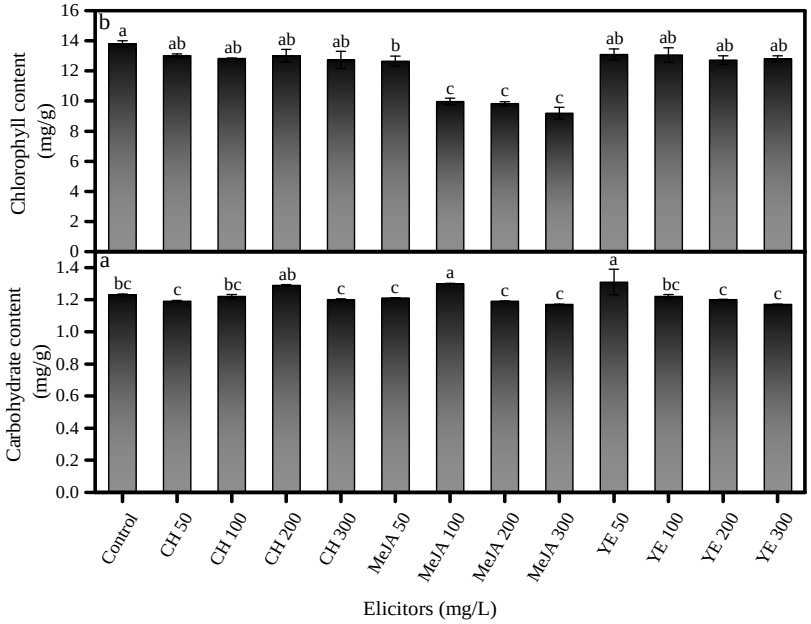
اثر غلظت‌های مختلف کیتوزان، متیل جاسمونات و عصاره مخمر بر کربوهیدرات کل و کلروفیل (میلی‌گرم بر گرم): بررسی اثر غلظت‌های مختلف کیتوزان، متیل جاسمونات و عصاره مخمر در شرایط کشت بافت نشان داد که اثر این الیستورها بر کربوهیدرات کل به صورت

جزئی بود به طوری که بیشترین میزان کربوهیدرات در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر متیل جاسمونات (۵/۶ درصد) و غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر عصاره مخمر (۶/۵ درصد) مشاهده گردید که به نسبت تیمار شاهد افزایش معنی‌داری داشتند. غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کیتوزان بر کربوهیدرات کل افزایش معنی‌داری نشان نداد. سایر غلظت‌های استفاده شده از الیسیتورهای کیتوزان، متیل جاسمونات و عصاره مخمر اثر معنی‌داری بر میزان کربوهیدرات کل نشان ندادند (شکل ۶).

همچنین اثر الیستورهای کیتوزان، متیل جاسمونات و عصاره مخمر در این تحقیق نشان داد که هیچ‌کدام از غلظت‌های استفاده شده باعث افزایش میزان کلروفیل نشدند به طوری که بیشترین میزان کلروفیل در تیمار شاهد مشاهده گردید. کیتوزان و عصاره مخمر به طور کلی اثر معنی‌داری بر میزان کلروفیل نشان نداند. از طرفی متیل جاسمونات در هر چهار غلظت باعث کاهش معنی‌دار میزان کلروفیل شد (شکل ۵).



شکل ۵- میزان محتوای آب نسبی (a) و همچنین پروتئین کل (b) گیاه استویا در شرایط کشت درون شیشه‌ای تحت غلظت‌های مختلف الیسیتورها. Standard error نشان‌دهنده انحراف معیار می‌باشد. حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد هستند.



شکل ۶- میزان کربوهیدرات (a) و کلروفیل (b) گیاه استویا در شرایط کشت درون شیشه‌ای تحت غلظت‌های مختلف الیسیتورها. Standard error نشان‌دهنده انحراف معیار می‌باشد. حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد هستند.

بحث و نتیجه گیری

تحقیقات زیادی مشخص کردند که سایتوکینین باعث تحریک رشد شاخه‌های کشت داده شده در محیط کشت بافت می‌گردد. به همین منظور در تحقیقی مشخص گردید که غلظت‌های متوسط بین ۱ تا ۲ میلی‌گرم بر لیتر از BAP تأثیر بسزایی در افزایش رشد و تکثیر شاخه‌های استویا در شرایط کشت بافت داشتند (۳۴). همچنین افزایش عملکرد برای ساقه‌های کشت داده شده از گیاه *Orthosiphon stamineus* تحت تنظیم‌کننده BAP در محیط MS گزارش شده است(۳۹). بر اساس نتایج بدست آمده مشخص شد که BAP به عنوان یک تنظیم‌کننده رشد بیش از Kin در تحقیق حاضر مؤثر بود. بنابراین این تنظیم‌کننده رشد به عنوان تیمار اولیه مناسب جهت افزایش تولید و تکثیر شاخساره به منظور بررسی تاثیر الیسیتورهای زیستی و غیر زیستی بر این گیاه، به محیط کشت پایه MS اضافه گردید.

نتایج بدست آمده از اثر الیسیتورهای کیتوان، متیل جاسمونات و عصاره مخمر بر گیاه استویا در شرایط کشت بافت بیانگر آن بود که الیسیتورهای استفاده شده باعث افزایش تکثیر و رشد شاخساره در این گیاه شدند. نتایج این تحقیق با مطالعه پاتالون و هکاران (۲۰۱۰) مشابه بود. آن‌ها گزارش کردند که الیسیتورهای کیتوزان، متیل جاسمونات، عصاره مخمر و سالیسیلیک اسید بعد از شش روز به طور معنی‌داری باعث افزایش میزان شاخه‌زایی گیاه *Drosera burmaniiin* شدند که در نهایت این شاخه‌زایی باعث افزایش تولید برگ و در نتیجه تولید بیشتر ماده مؤثره گردید (۲۹). همچنین در مطالعه‌ای دیگر، کادال و همکاران (۲۰۱۴) بیان کردند که غلظت ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر کیتوزان به طور معنی‌داری باعث افزایش رشد گیاه *Rubia cordifolia* در کشت ریشه مویی آن شد که این افزایش رشد با افزایش غلظت کیتوزان کاهش را نشان داد (۲۱). به نظر می‌رسد در پژوهش حاضر کیتوزان در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر به عنوان غلظت بهینه بوده که بیشترین طول و تعداد ساقه را باعث شده است. در واقع کیتوزان به عنوان یک پلی‌ساکارید در گیاه عمل کرده و با تحریک تولید لیگنین در دیواره سلولی باعث افزایش رشد گیاهان می‌شود (۳۸)، که این افزایش رشد را می‌توان در این تحقیق در طول و تعداد ساقه گیاه استویا مشاهده نمود. همچنین مشخص شده که استفاده از این الیسیتور در شرایط کشت بافت در غلظت مناسب اثر بیشتری بر گیاه داشته و با افزایش رشد می‌تواند ماده مؤثره گیاه را نیز افزایش دهد (۳۶). در تحقیقی دیگر بر روی گیاه *Gerbera aurantiaca* مشخص شد که کیتوزان باعث افزایش برخی از پارامترهای رشد از قبیل طول ساقه گل‌دهنده، تعداد برگ در هر ساقه و تعداد گل می‌شود (۴۰). اما به طور کلی اثر کیتوزان بر رشد گیاهان به صورت نامشخص باقی مانده که نیازمند آزمایش‌های بیشتری بر نحوه عملکرد و میزان آن بر روی گیاه می‌باشد (۳۶). از طرفی در این تحقیق مشخص شد که متیل جاسمونات و عصاره مخمر در غلظت‌های پایین باعث افزایش طول و تعداد شاخه گیاه استویا شدند. در مطالعه‌ای، بایراکتار و همکاران (۲۰۱۶) بیان کردند که متیل جاسمونات به طور معنی‌داری باعث کاهش طول و تعداد ساقه در گیاه استویا در شرایط گلخانه‌ای شد، به طوری که غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات باعث کاهش رشد گیاه شده و بعد از دو هفته رشد گیاه متوقف و در نهایت تولید ماده مؤثره گیاه را کاهش داد (۷). آن‌ها بیان کردند که این کاهش رشد ممکن است به دلیل غلظت بالای متیل جاسمونات و همچنین مدت زمان اعمال تیمار باشد. بر خلاف این تحقیق، در پژوهش حاضر غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر در طی چهار هفته باعث افزایش میزان ساقه‌دهی گیاه استویا شده است که ممکن است به دلیل شرایط کشت و همچنین تحوه اعمال و افزایش میزان این الیسیتور در شرایط کشت درون شیشه‌ای باشد. گزارش‌های بسیار اندکی از اثر عصاره مخمر بر رشد گیاه در شرایط کشت بافت موجود است اما ممکن است غلظت‌های بهینه

این الیسیتور باعث رشد سلول‌های رشدی در طی مرحله رویش شده و در نهایت منجربه افزایش رشد شاخساره در کشت بافت شوند.

عملکرد بیوشیمیایی الیسیتورهایی مانند کیتوزان و اسید جیبرلیک بر برخی پارامترهای رشدی گیاه نظیر میزان آب نسبی و همچنین پروتئین گیاه در طی آزمایش هنوز به صورت ناشناخته باقی مانده است (۳۲). در پژوهشی کاهش محتوای آب سلولی تحت محلول‌پاشی اسید جیبرلیک نشان داد که این الیسیتور احتمالا باعث افزایش بیوماس برگ گیاه می‌شود (۲۷). احمد و همکاران (۲۰۱۶) بیان کردند که کیتوزان اثر معنی‌داری بر رشد و پارامترهای بیوشیمیایی درختان پرتقال رقم Washington navel شامل تعداد برگ، رشد برگ و همچنین محتوای آب نسبی برگ نداشت (۵). به نظر می‌رسد الیسیتورها بیشتر تأثیر بازدارنده بر محتوای آب و پروتئین گیاه بر روی گیاه استویا داشته و نقش تنش را ایفا می‌کنند. شرف–الدین و همکاران (۲۰۰۳) گزارش کردند که محتوای پروتئین در گیاهان تیمار شده با اسید جیبرلیک به نسبت گیاهان شاهد کاهش داشت (۳۲). آن‌ها بیان کردند که این الیسیتور اثری بر برخی مؤلفه‌های رشد شامل زودرسی، میزان محصول و همچنین کربوهیدارت و پروتئین کل در گیاه *Cynara cardunculus* نداشت به طوری که تأثیر مستقیمی بر پارامترهای رشدی گیاه مشاهده نشد. در تحقیق حاضر با افزایش غلظت هرکدام از الیسیتورها محتوای آب و پروتئین گیاه کاهش بیشتری نشان داد که این کاهش ممکن است به دلیل مقابله گیاه با تنش‌های احتمالی و از طرفی افزایش بیوماس گیاه باشد. به طوری‌که اگرچه این الیسیتورها باعث کاهش این دو صفت بررسی شده شدند اما با توجه به افزایش وزن خشک گیاه، احتمالا این الیسیتورها نقش دوگانه داشته و در نهایت عملکرد گیاه را افزایش دادند. در واقع به طور قاطع دلیل کاهش آب و پروتئین تحت تأثیر الیسیتورهای استفاده شده را با توجه به نبود اطلاعات کافی نمی‌توان بیان کرد اما ممکن است به دلیل کشت درون شیشه‌ای احتمالا افزایش غلظت الیسیتورها باعث کاهش رطوبت محیط و در نتیجه آب نسبی گیاه شده باشد. همچنین افزایش غلظت الیسیتورها به خصوص متیل جاسمونات و عصاره مخمر احتمالا اثر منفی بر اسیدهای آمینه داشته و در نهایت پروتئین‌ها را کاهش داده‌اند.

از طرفی، نتایج متفاوتی از میزان کربوهیدرات کل در گیاهان مختلف تحت تأثیر الیسیتورهای مختلف گزارش شده است. شرف–الدین و همکاران (۲۰۰۳) گزارش کردند که متیل جاسمونات اثر معنی‌داری بر کربوهیدرات کل در گیاه *Cynara cardunculus* نشان نداد (۳۲). از طرفی تاکور و سوهال (۲۰۱۴) بیان کردند که کربوهیدرات تحت تأثیر الیستورهای اسید سالیسیلیک و بنزوتیادیوزل کاهش معنی‌داری در هر دو گونه *Brassica napus* و *Brassica juncea* داشت (۳۵). همچنین ال–خالیل (۲۰۰۷) در یک بررسی بیان داشت که الیسیتورهای متیل جاسمونات و اسید سالیسیلیک باعث افزایش میزان کربوهیدرات به نسبت تیمار شاهد شدند (۱۱). کربوهیدرات، به عنوان قند گیاه، جزو متابولیت‌های مهم و اولیه گیاه محسوب می‌شود. به طور کلی و بر اساس مطالعات و گزارش‌های متفاوتی که از اثر الیسیتورها بر افزایش یا کاهش کربوهیدرات گیاه موجود می‌باشد، می‌توان بیان داشت که انتخاب غلظت مناسب در افزایش میزان کربوهیدرات گیاه بسیار مؤثر می‌باشد. همچنین بررسی و ارزیابی کربوهیدرات کل در گیاهان نیازمند بررسی چرخه تولید این متابولیت اولیه بوده که در گیاه نقش بسیار ارزشمندی ایفا می‌کند. بنابراین با توجه به عدم گزارش‌های موجود در این زمینه، نمی‌توان به طور کامل اثر الیسیتورها بر میزان کربوهیدرات کل را بیان کرد و نیازمند تحقیقات دیگری در زمینه‌های چرخه بیوسنتزی کربوهیدرات و آنزیم‌های درگیر جهت تشریح کامل این چرخه می‌باشد. از سویی دیگر، در این تحقیق کاهش میزان کلروفیل تحت تأثیر متیل جاسمونات مشاهده گردید که با یافته‌های آنانیوا و همکاران (۲۰۰۴) مشابه بود (۶). آن‌ها در تحقیقی اثر غلظت‌های مختلف متیل

جاسمونات بر میزان کلروفیل کل در گیاه *Cucurbita pepo* را بررسی کردند که نتایج نشان داد این الیسیتور باعث کاهش معنی‌دار کلروفیل گردید. آن‌ها بیان کردند با توجه به اینکه مسیر تولید کلروفیل و همچنین متیل جاسمونات (GA3) در گیاه از طریق مسیر بیوسنتزی متیل اریترول فسفات (MEP) می‌باشد. افزودن متیل جاسمونات به عنوان تیمار به گیاه باعث افزایش مسیر تولیدی GA3 می‌شود و از طرفی تولید کلروفیل را کاهش می‌دهد. در تحقیق حاضر نیز با توجه به این‌که مسیر بیوسنتزی گلیکوزیدهای استویول به عنوان متابولیت‌های ثانویه گیاه استویا در مسیر MEP قرار دارد (۲۲) ممکن است متیل جاسمونات به عنوان یک تیمار بازدارنده عمل کرده و در نتیجه باعث کاهش میزان کلروفیل کل شود.

بر اساس نتایج این تحقیق، مشخص شد تولید و تکثیر سریع شاخه‌های گیاه استویا در شرایط کشت بافت با استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی نظیر سایتوکینین‌ها افزایش یافت. در واقع محیط کشت بافت بستر مناسبی برای رشد سلول‌های گیاهی به وجود آورده و با استفاده از غلظت‌های مناسب و بهینه از تنظیم‌کننده‌ها باعث تسریع رشد گیاه می‌شود. در این تحقیق اضافه کردن دو میلی‌گرم بر لیتر BAP به محیط کشت MS می‌تواند به عنوان یک پروتکل مناسب جهت تولید انبوه گیاه استویا در شرایط کشت بافت استفاده شود. همچنین مشخص شد که الیستورهای استفاده شده به طور کلی اثر افزایشی بر تولید و تکثیر ساقه گیاه استویا داشتند. با توجه به این‌که وزن خشک گیاه تحت تأثیر این الیسیتورها افزایش داشت، کاهش پارامترهای رشد ممکن است به دلیل آماده شدن گیاه در مقابل تنش‌های احتمالی باشد. بنابراین بررسی پارامترهای رشد نیازمند آزمایش‌های مولکولی جهت بیان ژن‌های درگیر در چرخه‌های موردنظر و در نتیجه مقایسه آن از لحاظ مولکولی و مورفولوژیکی می‌باشد. در این تحقیق این گونه می‌توان نتیجه‌گیری کرد که غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کیتوزان، ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر متیل جاسمونات و ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر عصاره مخمر به عنوان غلظت‌های بهینه بیشترین تأثیر را به نسبت سایر غلظت‌ها بر افزایش رشد گیاه استویا در شرایط محیط کشت پایه ایفا نمودند. این تحقیق می‌تواند به عنوان مقدمه‌ای جهت تولید انبوه گیاه استویا به عنوان یک گیاه اقتصادی مهم در شرایط کشت بافت مورد استفاده قرار گیرد. همچنین مقدمه‌ای جهت انجام آزمایش‌های جامع‌تر شامل بررسی بیان ژن و همچنین افزایش تولید ماده مؤثره گیاه استویا با استفاده از غلظت‌های بهینه بدست آمده از این تحقیق باشد.

منابع

۱- اسمعیل‌زاده بهابادی ص، شریفی م. (۱۳۹۲). افزایش تولید متابولیت‌های ثانوی گیاهی با استفاده از الیسیتورهای زیستی. مجله سلول و بافت، ۴ (۲): ۱۱۹- ۱۲۸.

۲- رسولی د، ملکی ب، جعفری ح، بهاری ع. (۱۳۹۷). بررسی بیان ژن‌های کلیدی در مسیر تولید گلیکوزیدهای استویول در گیاه *Stevia rebaudiana* تحت الیسیتورهای زیستی و غیر زیستی. فصلنامه علمی ژنتیک نوین.، ۱۳ (۲): ۲۵۷-۲۴۷.

۳- ملکی‌راد م، نصر ن، کاظمی تبار ک. (۱۳۹۵). مطالعه برخی متابولیت‌های گیاه دارویی استویا (*Stevia rebaudiana* Bertoni) در شرایط کشت درون شیشه‌ای و طبیعی با استفاده از گاز کروماتوگرافی- طیف سنجی جرمی (GC-MS). مجله زیست‌فناوری گیاهان دارویی، ۲ (۴): ۴۱-۵۴.

4- Ahmad N, Fazal H, Zamir R, Khalil SA, Abbasi BH. (2011). Callogenesis and shoot organogenesis from flowers of *Stevia rebaudiana* (Bert.). Sugar tech 13: 174-177.

5- Ahmed AHH, Nesiem MRA-E, Allam HA, El-Wakil AF. (2016). Effect of pre-harvest chitosan foliar application on growth, yield and chemical composition of *Washington navel* orange trees grown in two different regions. African Journal of Biochemistry Research 10: 59-69.

6- Ananieva K, Malbeck J, Kamínek M, Van Staden J. (2004). Methyl jasmonate

down-regulates endogenous cytokinin levels in cotyledons of *Cucurbita pepo* (zucchini) seedlings. Physiologia Plantarum 122: 496-503.

7- Bayraktar M, Naziri E, Akgun IH, Karabey F, Ilhan E, Akyol B, Bedir E, Gurel A. (2016). Elicitor induced stevioside production, in vitro shoot growth, and biomass accumulation in micropropagated *Stevia rebaudiana*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC) 127: 289-300.

8- Bonfill M, Mangas S, Moyano E, Cusido RM, Palazón J. (2011). Production of centellosides and phytosterols in cell suspension cultures of *Centella asiatica*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC) 104: 61-67.

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

10- Dey A, Kundu S, Bandyopadhyay A, Bhattacharjee A. (2013). Efficient micropropagation and chlorocholine chloride induced stevioside production of *Stevia rebaudiana* Bertoni. Comptes Rendus Biologies 336: 17-28.

11- El-Khallal SM. (2007). Induction and modulation of resistance in tomato plants against *Fusarium wilt* disease by bioagent fungi (*Arbuscular mycorrhiza*) and/or hormonal elicitors (jasmonic acid & salicylic acid): 2-changes in the antioxidant enzymes, phenolic compounds and pathogen related-proteins. Aust J Basic Appl Sci 1: 717-732.

12- Geuns JM. (2003). Stevioside. Phytochemistry 64: 913-921.

13- Gupta P, Sharma S, Saxena S. (2010). Callusing in *Stevia rebaudiana* (natural sweetener) for steviol glycoside production. International Journal of Agricultural and Biological Sciences 1: 30-34.

14- Gupta P, Sharma S, Saxena S. (2015). Biomass Yield and Steviol Glycoside Production in Callus and Suspension Culture of *Stevia rebaudiana* Treated with Proline and Polyethylene Glycol. Applied Biochemistry and Biotechnology 176: 863-874.

15- Hastoy C, Cosson P, Cavaignac S, Boutié P, Waffo-Teguo P, Rolin D, Schurdi-Levraud V. (2018). Deciphering performances of fifteen genotypes of *Stevia rebaudiana* in southwestern France through dry biomass and steviol glycoside evaluation. Industrial Crops and Products.

16- Hiscox JT, Israelstam G. (1979). A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. Canadian Journal of Botany 57: 1332-1334.

17- Hossain MA, Siddique A, Mizanur Rhaman S, Hossain A. (2010). Chemical composition of the essential oils of *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. Asian J Trad Med 5: 56-61.

18- Jain P, Kachhwaha S, Kothari S. (2009). Improved micropropagation protocol and enhancement in biomass and chlorophyll content in *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni by using high copper levels in the culture medium. Scientia Horticulturae 119: 315-319.

19- Janarthanam B, Gopalakrishnan M, Sai GL, Sekar T. (2009). Plant regeneration from leaf derived callus of *Stevia rebaudiana* Bertoni. Plant Tissue Culture and Biotechnology 19: 133-141.

20- Kim I-S, Yang M, Lee O-H, Kang S-N. (2011). The antioxidant activity and the bioactive compound content of *Stevia rebaudiana* water extracts. LWT-Food Science and Technology 44: 1328-1332.

21- Kudale S, Dalvi S, Dixit G. (2014). Effect of chitosan elicitation on alizarin production in hairy root cultures of *Rubia cordifolia* L. Journal of Chitin and Chitosan Science 2: 62-69.

22- Kumar H, Kaul K, Bajpai-Gupta S, Kaul VK, Kumar S. (2012). A comprehensive analysis of fifteen genes of steviol glycosides biosynthesis pathway in *Stevia rebaudiana* (Bertoni). Gene 492: 276-284.

23- Lee-Parsons CW, Royce AJ. (2006). Precursor limitations in methyl jasmonate-induced *Catharanthus roseus* cell cultures. Plant Cell Reports 25: 607-612.

24- Lrigoyen J, Emerich D. (1992). Water stress induced changes in concentration of praline and total soluble sugars in modulates alfalfa (*Medicagosatire*) plants. Physiologic Planetarium 84: 55-60.

25- Matkowski A. (2008). Plant in vitro culture for the production of antioxidants—a review. Biotechnology Advances 26: 548-560.

26- Mitra A, Pal A. (2007). In vitro regeneration of *Stevia rebaudiana* (Bert) from the nodal explant. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology 16: 59-62.

27- Modi AR, Shukla YM, Litoriya NS, Patel NJ, Narayan S. (2011). Effect of gibberellic acid foliar spray on growth parameters and stevioside

content of ex vitro grown plants of *Stevia rebaudiana* Bertoni. Medicinal Plants 3: 157-160.

28- Murashige T, Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15: 473-497.

29- Putalun W, Udomsin O, Yusakul G, Juengwatanatrakul T, Sakamoto S, Tanaka H. (2010). Enhanced plumbagin production from in vitro cultures of *Drosera burmanii* using elicitation. Biotechnology Letters 32: 721-724.

30- Sadasivam S, Manickam A. (2008). Biochemical Methods New Age International (P) Limited. New Delhi: 4-10.

31- Savita S, Sheela K, Sunanda S, Shankar A, Ramakrishna P. (2004). *Stevia rebaudiana*–A functional component for food industry. J. Hum. Ecol 15: 261-264.

32- Sharaf-Eldin M, Schnitzler W, Nitz G, Razin A, El-Oksh I. (2003). Effects of GA3 on growth characteristics, earliness, yield, carbohydrates, and protein in globe arti choke (*Cynara cardunculus* var. scolymus (L.) Fion). J. Appl. Bot 77: 1-9.

33- Sivaram L, Mukundan U. (2003). In vitro culture studies on *Stevia rebaudiana*. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant 39: 520-523.

34- Sridhar TM, Aswath CR. (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.

35- Thakur M, Sohal B. (2014). Effect of elicitors on physiomorphological and biochemical parameters of Indian mustard (*Brassica juncea*) and rapeseed (*B. napus*). Journal of Applied and Natural Science 6: 41-46.

36- Uthairatanakij A, Teixeira da Silva J, Obsuwan K. (2007) Chitosan for improving orchid production and quality. Orchid Science and Biotechnology 1: 1-5.

37- Vasconsuelo A, Boland R. (2007). Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants. Plant Science 172: 861-875.

38- Vasconsuelo A, Giuletti AM, Picotto G, Rodriguez-Talou J, Boland R. (2003). Involvement of the PLC/PKC pathway in chitosan-induced anthraquinone production by *Rubia tinctorum* L. cell cultures. Plant Science 165: 429-436.

39- Wai Leng L, Lai-Keng C. (2004). Plant regeneration from stem nodal segments of *Orthosiphon stamineus* Benth., a medicinal plant with diuretic activity. In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant 40: 115-118.

40- Wanichpongpan P, Suriyachan K, Chandrkrachang S. (2001). Effect of chitosan on the growth of Gerbera flower plant (*Gerbera jamesonii*). Chitin and chitosan: Chitin and Chitosan in Life Science, Yamaguchi, Japan: 198-201.

41- Zhao J, Davis LC, Verpoorte R. (2005). Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. Biotechnology Advances 23: 283-333.

Shoot multiplication and some biochemical parameters of *Stevia rebaudiana* plants under the effect of biotic and abiotic elicitors *in vitro*

Rasouli D.[1], Maleki B.[1], Jafary H.[2] and Zand N.[2]

[1] Dept. of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, I.R. of Iran.

[2] Dept. of Plant Protection Research, Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Zanjan, I.R. of Iran

Abstract

To study the shoot multiplication and to measure some biochemical parameters of Stevia rebaudiana under biotic and abiotic elicitors via *in vitro* condition, two experiments were conducted in a completely randomized design with three replications. Accordingly, in the first experiment, the effects of two cytokinins, Kin and BAP, at 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 and 3 mg/L concentrations to pick the optimal concentration as shoot multiplication protocol and then the effect of chitosan (CH), methyl jasmonate (MeJA) and yeast extract (YE) at 50, 100, 200 and 300 mg/L concentrations on plant growth and biochemical parameters of Stevia plant under *in vitro* culture was investigated as a second experiment. Primary experiment showed 2 mg/L BAP was the best regulator for shoot multiplication, therefore, supplemented with MS medium. The effect of various concentrations of elicitors showed a significant increase on shoot length and number. The highest amount of shoot length and number were observed in CH 200 mg/L, which showed a significant increase (70 and 95% respectively) compared to control plants. The effect of elicitors on biochemical parameters except for carbohydrates showed no effect compared to control. So that the water content and chlorophyll, showed more reduction with increasing doses of elicitors. The content of total carbohydrate was significantly increased by Chitosan 200, Methyl jasmonate 100 and Yeast extract 50 mg /L with relative to control. Overall, it was found that this research could be used as a proper protocol for mass production of *Stevia rebaudiana* as an economically valuable plant in tissue culture conditions. Chitosan, Yeast extract, In vitro culture, Methyl jasmonate, Stevia rebaudiana.

Key words: Chitosan, Yeast extract, *In vitro culture*, Methyl jasmonate, *Stevia rebaudiana*.