مقایسه تاثیر ساخت و کشت ریزنمونه‌های استویا در بیوراکتور TIS نسبت به کشت درون شیشه‌ای

بهاره شعفی[۱]، سیدسعیدموسوی[۲*] و سعید قمبرعلی باغنی[۳]

۱- دانشجوی دکتری، گروه مهندسی ژنتیک و به نژادی گیاهی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران، shaefibahar@gmail.com

۲*- استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران، s.moosavi@basu.ac.ir

۳- کارشناس‌ارشد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران، saeed.gh_66@yahoo.com

*نویسنده مسئول: سیدسعیدموسوی

تاریخ دریافت: اسفند ۱۳۹۷ تاریخ پذیرش: تیر ۱۳۹۸

Comparison of the effect of construction and cultivating of *Stevia rebaudiana* Bertoni specimens on TIS bioreactor in comparison with in vitro culture

Bahareh Shaefi[1], Seyed Saeed Mossavi[2*] and Saeed Ghanbarali Baghney[3]

1- Ph.D student, Department of Genetic Engineering and Plant Breeding, Razi University, Kermanshah, Iran, shaefibahar@gmail.com

2*- Assistant professor, Department of Plant Breeding and Agronomy, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran, s.moosavi@basu.ac.ir

3- M.Sc, Department of Plant Breeding and Agronomy, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran, saeed.gh_66@yahoo.com

*Corresponding author: Seyed Saeed Mossavi

Received: February 2019 Accepted: July 2019

چکیده

با توجه به خودناسازگاری، پوکی بسیار بالای بذور و عدم یکنواختی گیاهان از نظر کیفیت گیاهچه و میزان شیرینی ریزازدیادی گیاه دارویی استویا از طریق روش‌های نوین کشت بافت یک راهکار مناسب به منظور کشت انبوه این گیاه دارویی می‌باشد. در این مطالعه به منظور بررسی تفاوت پارمترهای رشد ریزنمونه‌های گیاه دارویی استویا در دو حالت کشت درون شیشه‌ای و بیوراکتورTIS مقایسه شدند. با توجه به امکان تبادل co_2 در بالای ظروف کشت در بیوراکتورTIS و تبادل عناصر غذایی در اثر فعالیت متناوب پمپ‌ها می‌توانند از مهمترین دلایل برتری عملکرد بیوراکتور TIS نسبت به کشت درون شیشه‌ای باشد. با توجه به کاهش معنی‌دار عملکرد و سرعت رشد نمونه‌ها در روش کشت درون شیشه‌ای به علت عدم تبادل عناصر غذایی محیط کشت به دلیل استفاده از آگار در کشت جامد می‌توان با کشت ریز-نمونه‌ها در بیوراکتورTIS سرعت و میزان رشد را به طور معنی‌داری افزایش داد. همچنین کشت نمونه‌ها در بیوراکتور TIS به دلیل حجم مناسب ارلن‌ها و شرایط غرقاب موقتی محیط کشت امکان بهره‌وری ریزنمونه‌ها را در شرایط نسبتا یکسان فراهم نموده به طوری که امکان کاهش واکشت گیاهچه‌ها و نیز آلودگی‌های پس از انتقال نیز کاهش یافت. عدم استفاده از آگار و کاهش واکشت نمونه‌ها این روش می‌تواند به منظور تولید انبوه گیاهچه‌های استویا با بیشترین بازده استفاده گردد.

کلمات کلیدی: استویا، بیوراکتورTIS، جوانه انتهایی، ریزنمونه

Abstract

Due to self-incompatibility, the high seeding of seeds and the lack of uniformity of the plants in terms of seedling quality and macrobiotics content of the stevia herb, through novel tissue culture methods, is a suitable strategy for the massive cultivation of this medicinal plant. In this study, in order to investigate the growth parameters differentiation, the stevia plant specimens were compared in in vitro culture and TIS bioreactors. Due to the possibility of co2 exchange on top of the TIS bioreactors and the exchange of nutrients due to the intermittent operation of the pumps, they can be one of the most important reasons for the superiority of the TIS bioreactor activity compared to in vitro culture. Due to the significant decrease in yield and growth rate of samples in in vitro culture, due to the lack of exchange of nutrients, the culture medium due to the use of agar in solid culture can be carried out using TIS bioreactor culture medium and increased the growth rate significantly. Also, the culture of the samples in the TIS bioreactor, due to the appropriate volume of archers and the temporary flood conditions of the culture medium, can allow the yield of the explants under relatively similar conditions, so that the possibility of reducing the seedlings and the subsequent contamination Transmission also declined. Non-agar use and reduction of particle retention. This method can be used to produce massive stevia seedlings with the highest yield.

Keyword: Explant, Shoot tip, Stevia, TIS bioreactor.

فصلنامه زیست شناسی سلولی و مولکولی گیاهی

سال ۱۳۹۸، دوره ۱٤، شماره ۱، صص ۲٦-۱۵

مقدمه و کلیات

گیاهی دارویی استویا با نام علمی Stevia rebaudiana *Bertoni* از تیره *Composite*، چندساله، علفی و دگرگرده افشان می‌باشد (Payday *et al*., 2016). با توجه به محدودیت کشت گیاه دارویی استویا در شرایط مزرعه‌ای به دلیل تعداد اندک و درصدبالای پوکی بذور تکثیر این گیاه در شرایط مزرعه‌ای به علت ریشه‌زنی و استقرارضعیف گیاهچه-ها با توجه به اهمیت تجاری آن توجیه اقتصادی ندارد. بنابراین استفاده از تکنیک کشت بافت می‌تواند کارآمدترین روش به منظور تکثیر سریع، یکنواخت و انبوه این گیاه دارویی باشد(Razak *et al*., 2014). ازیاد استویا در شرایط درون شیشه‌ای با بهینه نمودن پارامترهای رشد در شرایط استریل و کاملا کنترل شده باعث تولید انبوه گیاهچه‌ها می‌گردد. به طوری که در مطالعات انجام شده مشخص گردیده پس از ٤ هفته امکان انتقال گیاهچه‌ها به شرایط گلخانه‌ای و سازگاری فراهم گردیده است(Jain *et al*., 2014). دو ترکیب مهم گلیکوزید دیترپن استویوزاید وربودیوزاید در گیاه دارویی استویا با میزان قند بسیار بالا و عدم جذب در سیستم گردش خون توانایی جایگزینی با سایر شیرین کننده‌های تجاری نظیر آسپارتام، سدیم ساخارین و سیکلامات را دارد، به طوری‌که بیش از ۱۰ درصد وزن خشک برگ استویا را این ترکیبات تشکیل می‌دهند(Manvender *et al*., 2017). بنابراین تولید انبوه این گیاهچه از طریق ریزازدیادی به منظور دستیابی به زیست توده و کیفیت بالای برگ به منظور استخراج متابولیت‌های ثانویه با بهینه شدن شرایط تولید و کاهش هزینه‌ها می‌تواند یک راهکار موثر و طبیعی در صنعت غذایی و دارویی باشد (Aisun, 2013). یکی از اهداف تجاری تولید انبوه گیاهان دارویی استخراج متابولیت‌های ثانویه از آن‌ها به منظور استفاده در صنایع غذایی و دارویی می‌باشد. متابولیت‌های ثانویه اغلب در گونه‌ها و خانواده‌های خاصی از گیاهان به مقدار بسیار کمی در سلول‌های تخصصی و در مرحله خاصی از چرخه زندگی گیاه تولید می‌شوند. با توجه به این‌که گیاهان دارویی منبع غنی از متابولیت‌های ثانویه می‌باشند مهم‌ترین هدف از ازدیاد این گیاهان افزایش سرعت و میزان رشد زیست توده به ویژه در سلول‌های هدف که منبع غنی از این ترکیبات هستند می‌باشد(Ariel, 2017). امروزه به دلیل محدویت‌هایی که از نظر حجم پایین تولید، مشکلات تهیه بذور، وجود عوامل غیر قابل کنترل محیطی، عدم یکنواختی کیفیت گیاهچه‌ها و نیز هزینه‌های بالای تولید استفاده از روش‌های کشت بافت می‌تواند یک راهکار موثر و جایگزین باشد. امروزه استفاده از بیوراکتورهای گیاهی یکی از روش-های نوین ریزازدیادی می‌باشد که کاربرد گسترده در تولید متابولیت‌های ثانویه و استخراج پروتئین‌های گیاهی دارد(Suarez *et al*., 2014). در طراحی بیوراکتورها استفاده از محیط کشت مایع به همراه فیلترهای هوا و ایجاد یک جریان دائم و یکنواخت از تبادل محیط کشت بین ارلن‌ها امکان استفاده بهتر ریزنمونه‌ها از عناصر غذایی را فراهم می‌کند. به طوری‌که با افزایش اکسیژن رسانی به بافت نمونه‌ها و گیاهچه فعالیت‌های حیاتی گیاه و ریشه‌زنی نمونه‌ها و فتوسنتزبرگ‌ها را با ایجاد یک شرایط طبیعی کنترل شده به طور معنی‌داری افزایش می‌دهد (Nazmul *et al*., 2015). امروزه مطالعات متعددی در زمینه ریزازدیادی گیاهان دارویی با استفاده از بیوراکتورها نظیر زنجبیل وحشی (Stanly *et al*., 2010)، اسپرس درخت نقره‌ای(Spanker *et al*., 2011)، دانه برفی(Schumann *et al*., 2012)، گل انگشتانه (Perez *et al*., 2012)، چای معطر (Kokotkiewicz *et al*.,

(2013، وانیل (Ramos *et al*., 2014)، شاه بلوط چینی(Meiping *et al*., 2015)، ارکیده وندا (Smirch *et al*., 2014) انجام شده است. از میان انواع بیوراکتورهای گیاهی TISTemporary immersion (system) رایج‌ترین و بهترین نوع بیوراکتور به دلیل سیستم غرقاب موقتی به منظور ازدیاد گیاهان دارویی می‌باشد. طراحی سیستم TIS با توجه به امکان ایجاد آلودگی از طریق فیلتر و پمپ هوا یک عامل قابل کنترل است که با افزایش دقت در طی مراحل انجام پژوهش امکان کاهش و حذف آن وجود دارد (Ramos *et al*., 2014). بیوراکتورهای TIG یا وارانه با توجه به نوع خاص طراحی آن امکان مکش هوای تصفیه نشده را افزایش داده و در اغلب مطالعات نسبت به شرایط مشابه TIS عملکرد ضعیف‌تری را نشان داده است. استفاده از سیستم بیوراکتورهای WAVE به فضای انجام کاربیشتر و دقت بسیار بالایی نیاز دارد که اغلب برای کشت گیاهان غده‌ای نظیر سیب‌زمینی کارآمد می‌باشد (Bausch *et al*., 2011). بنابراین استفاده از بیوراکتور TIS به منظور کشت ریزنمونه‌های استویا می‌تواند یک روش مناسب به منظور افزایش تولید زیست توده گیاهچه‌ها به همراه مدیریت هزینه‌ها باشد. در کشت درون شیشه‌ای نمونه‌ها در محیط کشت جامد آگار باعث سکون مواد مغذی در دسترس گیاه شده و پس از مدتی از کشت عناصر غذایی به طور یکنواخت در دسترس گیاهچه‌ها قرار نمی‌گیرند. در این روش با توجه به بسته بودن سامانه و عدم تبادل عناصر فتوسنتز گیاه به میزان کمتر و نیز نیاز به واکشت مجدد نمونه‌ها در بازه‌های زمانی کوتاه وجود دارد که این عامل به نوبه خود حجم کار،هزینه و امکان آلودگی گیاهچه‌هارا افزایش می‌دهد(Cui *et al*., 2011). در مطالعات اخیرکشت قطعات گره در بیوراکتور TIS توسط (Vincent *et al*., 2016)، (Deshmukh *et al*., 2012) و (Lyman *et al*., 2012) در گیاهان دارویی استویا با موفقیت گزارش شده است. استفاده از بیوراکتور TISبه منظور ریزازدیادی گیاه دارویی استویا می‌تواند بازده بالاتری را نسبت به شرایط درون شیشه‌ای داشته باشد. با وجود ریشه زنی سریع و انبوه نمونه‌ها در استویا، استحکام ساقه‌چه و تولید برگچه اغلب ضعیف می‌باشد به‌طوری‌که در مرحله سازگاری در شرایط گلخانه‌ای اغلب تعدادی از گیاهچه‌ها از بین خواهند رفت(Kokotkiewicz *et al*., 2013). بیوراکتور TIS با مکانیزه نمودن کشت و ایجاد یک محیط غرقاب موقتی که امکان دسترسی ریزنمونه‌ها به عناصر غذایی را افزایش می‌دهد و باعث بهبود کیفیت گیاهچه‌ها و افزایش نرخ تکثیر می‌گردد. در واقع در صورت موفقیت این روش علاوه بر کاهش هزینه‌های تولید امکان دستیابی به حداکثر متابولیت‌های ثانویه برگ و ساقه نیز فراهم می‌گردد که این امر از نظر اقتصادی می‌تواند کاملا توجیه‌پذیر باشد(Calvert *et al*., 2016). با توجه به اینکه بازده ریزنمونه‌های مختلف به ریزازدیادی و روش‌های آن به دلیل تفاوت در پتانسیل نمونه‌ها در پاسخ به تیمارهای اعمال شده متفاوت می‌باشد بنابراین مقایسه عملکرد نمونه‌ها می‌تواند در تعیین ریزنمونه مناسب به منظور گسترش ریزازدیادی از طریق کشت درون شیشه‌ای و بیوراکتور مفید باشد. به طوری‌که در مراحل بعدی پژوهش با حذف ریزنمونه‌های ضعیف‌تر ضمن کاهش حجم کار امکان مطالعه تیمارهای موثرتربر روی بهترین ریزنمونه‌ها فراهم می‌گردد. در این پژوهش بررسی همزمان عملکرد قطعات گره، جوانه جانبی و جوانه انتهایی در شرایط کشت درون

شیشه ای و بیوراکتور TIS برای اولین بار در کشور مقایسه و انجام گردید. هدف اصلی از این پژوهش بررسی امکان کشت نمونه‌های استویا در سیستم بیوراکتور TIS به منظور ایجاد یک شرایط طبیعی و کنترل شده که پتانسیل فتوسنتز، استحکام ساقه‌چه و کیفیت برگ‌ها را به منظور افزایش درصد متابولیت-های ثانویه فراهم نماید.

فرآیند پژوهش

تهیه مواد گیاهی و ضدعفونی گیاهچه‌ها: گیاهچه-های مورد استفاده در این پژوهش از نوع گیاهچه‌های استویا ریبودیانا برتونی بودند که از شرکت گلساران گیلان تهیه گردید. مراحل انجام این پژوهش در آزمایشگاه کشت بافت دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی سینا همدان با همکاری مرکز تحقیقات کشاورزی کرمانشاه انجام گرفت. وسایلی از قبیل استوانه مدرج، بشر، ظروف شیشه‌ای درب دار، ارلن-های ۵۰۰ میلی‌لیتری، شیلنگ‌های سفید قابل اتوکلاو، پمپ هوا، چوب پنبه،تایمر،پنس، اسکارپر، پیپت، پیست، هودلامینار، pH متر، کاغذ صافی و غیره در این تحقیق استفاده گردید. وسایل شیشه‌ای و فلزی، محیط کشت مایع MS چوب پنبه‌ها و شیلنگ‌های سفید قبل از استفاده در اتوکلاو با دمای ۱۲۱c° و فشار ۱/۲ بار به مدت ۲۰ دقیقه سترون و سپس به زیر هود لامینار منتقل شدند. حدود دو ساعت قبل از کشت، لامینار را روشن کرده و با الکل ۹۶٪ محیط داخل آن را سترون کرده و ۳۰ دقیقه قبل از کشت لامپ UV زیر لامینار روشن گردید. به منظور ضدعفونی ریز-نمونه‌ها 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 گره، جوانه جانبی و جوانه انتهایی به طول ۲۰ میلی‌متر برش داده شدند. سپس ریزنمونه‌ها به طور عمودی درون ظروف شیشه‌ای به‌وسیله پنس بر روی محیط کشت MS جامد استقرار یافتند. این آزمایش به صورت فاکتوریل۲×۳ در قالب طرح کاملا تصادفی با ۳ تکرار انجام گردید. سه نوع ریزنمونه(گره، جوانه‌جانبی و جوانه انتهایی) به عنوان فاکتور اول و دو روش کشت نمونه(کشت درون شیشه‌ای و کشت در بیوراکتور TIS) به عنوان فاکتور دوم درنظر گرفته شدند. محیط کشت پایه MS 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 به همراه استفاده از ۱/۵ میلی‌گرم در لیترBAP درpH برابر ۵/۷ تنظیم و کشت گردیدند.

ساخت بیوراکتورTIS و کشت نمونه‌ها: به منظور ساخت بیوراکتور تناوبی TIS(غرقاب موقت) پس از اوتوکلاو نمودن کلیه وسایل مورد نیاز و انتقال آن‌ها به زیر هود لامینارکار اتصال قطعات تعبیه شده بیوراکتور و کشت ریزنمونه‌ها انجام شد. بدین منظور از دو ارلن ۵۰۰ میلی‌لیتری به عنوان ظروف کشت که هر کدام حاوی ۳۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع بودند استفاده شد. سپس ریزنمونه‌های گره، جوانه جانبی و جوانه انتهایی هر کدام به طور جداگانه در یک سیستم بیوراکتورTIS بدون بستر کشت شدند. دو چوب پنبه که هر کدام دارای یک منفذ برای عبور لوله‌های سیلیکونی (قابل اتوکلاو) برروی دهانه هر

ارلن به طور کاملا ثابت قرار دادیم. برای ساخت بیوراکتور غرقاب موقت از دو اندازه مختلف لوله‌های سیلکونی که شامل، یک لوله ۸۰ سانتی‌متری به عنوان رابط دو ارلن و دو لوله ۱۰۰سانتی‌متری برای هر کدام از ارلن‌ها به منظور رابط هر ارلن با فیلتر، پمپ و تایمراستفاده شد. به طوری که مطابق شکل(۱) پس از قرار دادن لوله‌های سیلیکونی فیلتر، پمپ و تایمر به هر کدام از ارلن‌ها به صورت متوالی متصل شدند و اطراف چوب پنبه‌ها و فیلترها پس از اتصال قطعات توسط پارافیلم به طور کامل پوشیده شد تا از احتمال ورود هوای خارجی ممانعت گردد. در این آزمایش مدت زمان غرقاب کردن به صورت متناوب توسط تایمرها به صورت بازه زمانی ۱۵ دقیقه تنظیم نمودیم بنابراین هر ۱۵ دقیقه یکبار یک طرف بیوراکتورTIS فعالیت دارد به طوری که فشار هوایی که از پمپ‌ها خارج می‌شود توسط لوله‌های سیلیکونی به سطح محیط کشت مایع وارد می‌شود و در اختیار ریزنمونه-ها و گیاهچه‌ها قرار می‌گیرد سپس پس از اتمام زمان پمپ دیگر فعال شده و محیط کشت از طریق لوله-های سیلیکونی وارد ارلن مجاور می‌گردد. طبق این فرآیند گیاهچه‌ها به صورت متناوب ۱۵ دقیقه در تماس با محیط کشت و ۱۵ دقیقه بدون قرار گرفتن در معرض محیط کشت می‌باشند. در واقع با توجه به غرقاب موقت بودن محیط کشت در سیستم بیوراکتور TIS از پدیده شیشه‌ای شدن که از مشکلات اساسی کشت مایع می‌باشد به طور معنی‌داری کاهش می‌یابد همچنین عناصر غذایی محیط کشت به طور موثری در دسترس ریزنمونه‌ها و گیاهچه‌ها قرار می-گیرند(Adam., 2011). پس از ساخت و کشت نمونه‌ها در بیوراکتورهای TIS، بیوراکتورها به اتاقک رشد با شدت نور ۲۰۰۰ لوکس با لامپ‌های LED قرمز با تناوب نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. استفاده از لامپ‌های LED قرمز در اتاقک رشد به علت افزایش ATP مورد نیاز در فرآیند فتوسنتز تاثیر معنی‌داری را افزایش بیوماس و متابولیت‌های ثانویه به ویژه استویوزاید نشان داده است(Mujib *et al*., 2016). تجزیه آماری داده‌ها پس از بررسی نرمال بودن باقیمانده آنها انجام شد و مقایسه میانگین داده‌ها توسط آزمون دانکن (Duncan, 1955) انجام شد. به منظور تجزیه و تحلیل داده‌ها و رسم نمودارها از نرم افزارهای SAS و Minitab و Excel استفاده گردید.

شکل(۱). طراحی و ساخت بیوراکتور TIS

Fig.1. Design and production TIS Bioreactor

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس برای صفت طول ساقه‌چه اختلاف معنی‌داری را در سطح ۰/۰۰۱ برای روش کشت و نوع ریزنمونه نشان داد. اثر متقابل روش کشت و نوع ریزنمونه برای صفت طول ساقه‌چه اختلاف معنی‌داری را نشان نداد. این مشاهده در واقع بیانگر وجود اثرات اصلی نوع روش کشت و ریز-نمونه برای این صفت بود(جدول۱). نتایج تجزیه واریانس صفت تعداد ساقه جانبی اختلاف معنی‌داری را در سطح ۰/۰۰۱ برای روش کشت و نوع ریزنمونه نشان داد. همچنین اثر متقابل روش کشت و نوع ریز-نمونه برای صفت تعداد برگچه اختلاف معنی‌داری را نشان نداد که بیانگر عملکرد مستقل این دو تیمار از هم می‌باشند(جدول۱). جوانه انتهایی بالاترین میزان

عملکرد افزایش طول ساقه‌چه(۸/٤۸ سانتی‌متر) و تعداد ساقه جانبی را در مقایسه با جوانه جانبی و قطعات گره نشان داد. در واقع جوانه انتهایی به دلیل قدرت تقسیم بالای سلول‌ها و عدم غالبیت انتهایی تاثیر معنی‌داری را بر افزایش بیوماس گیاهچه‌ها داشته است(جدول۳). تجزیه واریانس صفت تعداد برگچه اختلاف معنی‌دار را در سطح ۰/۰۰۱برای روش کشت و نوع ریزنمونه و ۰/۰۵ اثر متقابل روش کشت در نوع ریزنمونه نشان داد. بنابراین استفاده همزمان از دو تیمار روش کشت و نوع ریزنمونه تاثیر معنی‌داری را بر تولید برگچه داشته است(جدول۱). تجزیه واریانس صفت طول ریشه‌چه اختلاف معنی‌دار را در سطح ۰/۰۰۱برای روش کشت و نوع ریزنمونه و ۰/۰۵ برای اثر متقابل روش کشت در نوع ریزنمونه نشان داد. بنابراین استفاده همزمان از دو تیمار روش کشت و نوع ریزنمونه تاثیر معنی‌داری را بر طول ریشه‌چه داشته است(جدول۱). مقایسه میانگین نوع روش کشت نشان داد کشت ریزنمونه‌ها در بیوراکتور TIS بیشترین میزان طول ساقه‌چه(۸/۰٤ سانتی‌متری) و تعداد ساقه جانبی را در مقایسه با روش کشت درون شیشه‌ای در محیط کشت MS جامد ایجاد کرد(جدول۲). کشت جوانه انتهایی در هر دو روش کشت بیوراکتور TIS و کشت درون شیشه‌ای بیشترین میزان تعداد برگچه و طول ریشه‌چه را نشان داد. کشت جوانه انتهایی در بیوراکتور TIS به دلیل انتقال منابع نیترات و پمپاژ محیط کشت مایع عملکرد بالاتری را نسبت به شرایط درون شیشه‌ای که حاوی محیط کشت MS جامد می‌باشد ایجاد کرد به طوری که این مشاهده در قطعات گره و جوانه جانبی نیز مشاهده گردید(جدول٤). تفاوت در عملکرد ریز-نمونه‌های جوانه و گره با توجه به شرایط کشت و پتانسیل‌های درونی ریزنمونه‌ها در محیط ریزازدیادی می‌باشد. جوانه‌های انتهایی به علت عدم غالبیت انتهایی و غرقاب بودن تناوبی نمونه در محیط کشت مایع در بیوراکتور TIS امکان بهره‌مندی موثرتر از عناصر غذایی، تبادل هوا و نور رشد بهتری را نشان دادند(شکل۲). به طوری که حرکت مداوم محیط کشت امکان رشد سریع ریشه‌چه را فراهم کرد. بیوراکتور TIS با داشتن فضای بزرگتر نسبت به کشت درون شیشه‌ای و دریافت نور در سطح بیشتر باعث افزایش تبادلات گازی و فتوسنتز مطلوب شد. افزایش تعداد برگچه‌ها نیز مهم‌ترین دست آورد کشت در بیوراکتورTIS بود. با افزایش زمان واکشت-ها نیز به دلیل طراحی خاصی که در بیوراکتور TIS بود سازگاری گیاهچه‌ها پس از انتقال به شرایط گلخانه‌ای نیز به طور معنی‌داری افزایش یافت. تولید ساقه مقاوم به منظور تولید ساقه‌های جانبی و برگچه از اهداف مهم کشت ریزنمونه‌های استویا می‌باشد. افزایش تعداد برگچه‌ها یکی از راهکارهای موثر برافزایش متابولیت‌های ثانویه می‌باشد. لازمه افزایش استویوزاید و ریبوزاید در گیاهچه‌های حاصل از کشت بافت دستیابی به بیوماس انبوه و با کیفیت بالا می‌باشد. در این صورت با مدیریت هزینه‌های تولید تولید تجاری این گیاه دارویی میسر می‌گردد (Jose., 2016). در واقع در این آزمایش طراحی بیوراکتورTIS نشان داد استفاده از این روش به منظور ریزازدیادی استویا می‌تواند با کاهش هزینه‌های واکشت و افزایش سازگاری و ثابت بودن ساخت هزینه‌های ساخت بیوراکتور TIS بهترین راهکار به منظور دستیابی به پروتکل مناسب می‌باشد (Sankar *et al*., 2011).

جدول۱. تجزیه واریانس تاثیر روش کشت و ریزنمونه بر ریزازدیادی

Table1. The Analysis of variance of the impact of cultivation method and type of explant on micropropagation.

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	درجه آزادی و میانگین مربعات			
		طول ساقه‌چه Stem length (cm)	تعداد برگچه Number of leaflet	تعداد ساقه جانبی Number of shoot	طول ریشه چه Root length (cm)
روش کشت Cultivation method	1	16.43 ***	50 ***	29.38 ***	3.55 ***
ریز نمونه Explant	2	11.76 ***	40.72 ***	28.38 ***	4.55 ***
روش کشت*ریز نمونه Cultivation method *Explant	2	.22 n.s	2.16 *	.72 n.s	.20 *
خطای آزمایشی Error	12	.14	.44	.33	.04
ضریب تغییرات C.V (٪)		5.45	6.18	7.47	7.96

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

*,**,***, showed difference, .0001, .01, .05 and ns showed non signification probability levels, respectively.

جدول۲. تاثیر روش کشت بر صفات طول ساقه‌چه و تعداد ساقه جانبی

Table2. Effect cultivation method on traits stems length and number of shoot

روش کشت Cultivation method	طول ساقه‌چه Stem length (cm)	تعداد ساقه جانبی Number of shoot
بیوراکتورTIS TIS Bioreactor	8.04[a]	9[a]
کشت درون شیشه‌ای In vitro culture	6.14[b]	6.44[b]

*میانگین‌هایی با حروف مشابه در هر ستون تفاوت معنی‌داری با هم ندارند.

Means with the each column are statistically not significant probability level.

جدول۳. تاثیر ریزنمونه بر صفات طول ساقه‌چه و تعداد ساقه جانبی

Table3. Effect explant on traits stems length and number of shoot.

ریز نمونه Explant	طول ساقه چه Stem length (cm)	تعداد ساقه جانبی Number of shoot
جوانه جانبی Axillary bud	7.10[b]	7.50[b]
جوانه انتهایی Shoot tip	8.48[a]	10[a]
قطعات گره Nodal fragment	5.68[c]	5.66[c]

*میانگین‌هایی با حروف مشابه در هر ستون تفاوت معنی‌داری با هم ندارند.

Means with the each column are statistically not significant probability level.

جدول٤. تاثیر روش کشت و نوع ریزنمونه بر تعداد برگچه و طول ریشه‌چه

Table4. Effect way culture and explant on number leaflet and root length.

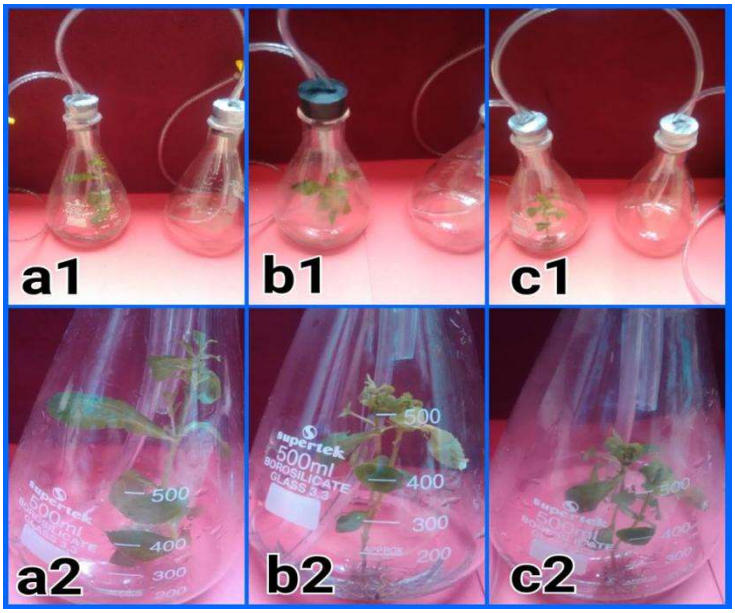
روش کشت Cultivation method	ریز نمونه Explant	تعداد برگچه Number of leaflet	طول ریشه چه Root length (cm)
بیوراکتورTIS TIS Bioreactor	جوانه جانبی Axillary bud	12.66[ab]	2.93[b]
	جوانه انتهایی Shoot tip	14.33[a]	3.96[a]
	قطعات گره Nodal fragment	10.33[ed]	1.96[e]
کشت درون شیشه‌ای In vitro culture	جوانه جانبی Axillary bud	9.66[d]	1.90[d]
	جوانه انتهایی Shoot tip	12[be]	2.80[b]
	قطعات گره Nodal fragment	5.66[e]	1.50[e]

*میانگین‌هایی با حروف مشابه در هر ستون تفاوت معنی‌داری با هم ندارند.

Means with the each column are statistically not significant probability level.

بیوراکتورها با داشتن سیستم قابل تنظیم از طریق پمپ و تایمر محدودیت‌های مربوط به کشت جوانه-های انتهایی و گیاهان چوبی را بر طرف کرده است. به طوری‌که دستیابی به متابولیت‌های ثانویه و افزایش کیفیت گیاهچه‌ها و طراحی یک شرایط مشابه به کشت برون شیشه‌ای می‌تواند مهم‌ترین دلیل موفقیت این روش است(Vasil *et al*., 2014). کشت درون شیشه‌ای نمونه‌ها پس از مدتی به دلیل کاهش عناصر غذایی در کشت جامد نیاز به واکشت نمونه‌ها داشته که این امر باعث افزایش هزینه‌ها و حجم کار می-گردد. بنابراین استفاده از بیوراکتور TIS با توجه به شرایط کشت می‌تواند یک جایگزین مناسب و با صرفه باشد. با توجه به اهمیت کشت استویا به منظور استخراج متابولیت‌های ثانویه با ارزش استویوزاید و ریبوزاید از برگ قرار گرفتن نمونه‌ها در محیط کشت مایع می‌تواند تاثیر معنی‌داری را بر افزایش این مواد موثره و بیوماس گیاهچه‌ها داشته باشد. به طوری که با توجه به درصد بالای ریشه‌زایی ریزنمونه‌های استویا مطالعاتی نیز می‌تواند بر روی امکان استخراج استویوزاید از ریشه این گیاه دارویی انجام گیرد تا بیشترین بهره‌وری از کشت این گیاه دارویی با ارزش انجام شود Harshest *et al*., 2016). بهترین عملکرد ازدیاد قطعات گره و جوانه انتهایی را در روش کشت بیوراکتور TIS گزارش شد، به طوری که در این بررسی جوانه انتهایی با کشت در محیط MS به همراه ۱ میلی‌گرم در لیتر Kin بالاترین پتانسیل تولید زیست توده و سازگاری گیاهچه‌ها را نشان داد Noor din *et* (*al*., 2012). افزایش درصد متابولیت‌های ثانویه گیاهان حاصل از کشت قطعات گره در بیوراکتور TIS را گزارش کردند(Meiping *et al*., 2015). در این مطالعه مشخص شد کشت ریزنمونه‌ها در بیوراکتور TIS عملکرد بالاتری را نشان دادند که این مشاهده می‌تواند به دلیل امکان افزایش سرعت انتقال کربوهیدرات‌ها بین دو ارلن، تبادل هوا به منظور اعمال تنفس و فتوسنتز باشد افزایش بازده ریزازدیادی در کشت بیوراکتور TIS دربسیاری از گیاهان مشاهده شده است(Kondo *et al*., 2014). کشت قطعات ریزوم ارکیده در بیوراکتورTIS با استفاده از محیط کشت MS به همراه ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA و ٤ میلی‌گرم در لیتر BAP ۹٤/۷ در-صد ریشه‌زایی را نشان داد (Gao.,2011). ریزازدیادی توت فرنگی در بیوراکتور TIS به همراه استفاده از ۰/۳ میلی‌گرم در لیترGA_3 و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP بیشترین رشد و سازگاری گیاهچه‌ها را پس از انتقال به گلخانه نشان داد(Georgieva *et al*., 2016). کشت قطعات گره و جوانه انتهایی در گیاه دارویی بنه در بیوراکتور به همراه استفاده از ٤ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر GA_3 عملکرد بالایی را نسبت به کشت درون شیشه‌ای نشان داد اما کشت جوانه جانبی کمترین میزان ریشه‌زایی ۲۷/۵ درصد و نکروزه شدن گیاهچه‌ها را نشان داد ,.Hulya *et al*) (2013. کشت لایه‌های نازک سلولی ارکیده وندا در بیوراکتور TISپس از ۲۱ روز بالاترین میزان درصد تبدیل به گیاهچه را نشان داد(Rizikita *et al*., 2016). ریزازدیادی قطعات پروتوکوم ماگنولیا در بیوراکتور تفاوت معنی‌داری را نسبت به کشت درون شیشه‌ای در محیط‌های مایع و جامد نشان داد که علت این مشاهده می‌تواند تبادل هوا و عناصر غذایی مربوط گردد. در این مطالعه با توجه به تاثیر معنی‌دار کشت ریزنمونه‌های استویا در محیط کشت MS به همراه استفاده از ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP به عنوان فاکتورهای ثابت در کشت درون شیشه‌ای و بیوراکتور

استفاده شدند. تا با توجه به یکسان بودن فاکتورهای موثر بر رشد عملکرد نمونه‌ها در این دو روش بررسی گردد. به طوری که نتایج برتری ریزنمونه‌ها در محیط کشت بیوراکتور را نشان دادند. در بسیاری از مطالعات نیز کشت ریزنمونه‌های مختلف نسبت به سایر روش‌های کشت نیز گزارش شدند. کشت قطعات گره در گل راعی(علف چای) به همراه ۳ گرم‌در لیتر زغال فعال در بیوراکتور ۸۷ درصد ریشه-زایی را نشان داد(Entesari *et al*., 2010). کشت قطعات گره بلوبری در بیوراکتور TIS ۸٦/۹۷ درصد تبدیل به گیاهچه و ٦٤/۸ درصد سازگاری را با شرایط گلخانه‌ای را نشان داد(Buckshee *et al*., 2012).کشت قطعات گره تمشک در بیوراکتور TIS به همراه ٤/٤ میکرومول BAP بیشترین میزان رشد را نسبت به شاهد نشان داد(Samric, 2011). کشت جوانه جانبی گل محمدی در بیوراکتور TIS بدون استفاده از بستر بیشترین میانگین ساقه‌زایی(۱۰/۷٦) را نشان داد (Ariel *et al*., 2017). امروزه مطالعه بر روی امکان کشت انبوه گیاه دارویی استویا از طریق ریزازدیادی ببسیار حائز اهمیت بوده و پژوهش‌های بسیاری نیز در این زمینه گزارش گردیده است.در این مطالعه برای اولین بار در ایران کشت قطعات گره و جوانه در ایران در ببوراکتور TIS بررسی شدند. در واقع می‌توان با توجه به موفقیت آمیز بودن نتایج در گام‌های بعدی آنالیز متابولیت‌های ثانویه پس از سازگاری و مقایسه آن‌ها را در کشت جوانه‌های انتهایی انجام داد تا به منظور توسعه ریزازدیادی استویا از طریق کشت در بیوراکتور TISبه مناسب-ترین پروتکل دست یافت.



شکل (۲)- مقایسه عملکرد جوانه‌های انتهایی (a)، جوانه جانبی (b) و قطعات گره (c) در بیوراکتور TIS

Fig.2. Comparison of the performance of the shoot tip (a), axillary bud (b) and nodal fragment on the TIS Bioreactor.

نتیجه گیری کلی

بهینه بودن عملکرد یک ریزنمونه در گیاهان مختلف و در شرایط کشت‌های متفاوت می‌تواند با توجه به تیمارهای مورد استفاده متفاوت باشد. به طوری که در این مطالعه علیرغم یکسان بودن فاکتورهای موثر بر رشد نمونه‌ها و بقا گیاهچه‌ها به علت تفاوت‌هایی که در ماهیت ریزنمونه‌ها وجود داشت نتایج یکسانی را نشان نداد. جوانه‌ها عملکرد بالاتری را در صفات رشدی و پس از انتقال به شرایط گلخانه نسبت به

قطعات گره نشان دادند. همچنین در مقایسه جوانه‌ها نیز عملکرد جوانه‌انتهایی سطوح برتر را نشان داد. که این امر در هر دو روش کشت درون شیشه‌ای و بیوراکتور مشاهده گردید. بنابراین کشت جوانه انتهایی در بیوراکتور TIS نسبت به کشت درون شیشه‌ای می‌تواند بازده بالاتری را نشان دهد که با توجه به ثابت بودن هزینه‌های طراحی و ساخت بیوراکتور و نیاز به تعداد دفعات کمتر واکشت و نیز افزایش معنی‌دار بیوماس گیاهچه‌ها این روش می-تواند یکی از بهترین روش‌های نوین به منظور کشت گیاه دارویی استویا به صورت تجاری و در سطح وسیع باشد(Bayraktar *et al*., 2016). با توجه به اینکه ازدیاد گیاه دارویی استویا از طریق قلمه یک روش ارزان و میسر می‌باشد اما استحکام و قدرت ساقه‌های استویا بسیار شکننده می‌باشد به طوری که در این پژوهش مشخص شد کشت نمونه‌ها در سامانه بیوراکتور امکان تولید گیاهچه‌ها با قابلیت سازگاری بالا، ساقه‌چه و برگچه‌های با کیفیت‌تری را فراهم نمود که با توجه به ثابت بودن هزینه ساخت بیوراکتور این روش کشت به منظور ریزازدیادی استویا به منظور استخراج متابولیت‌های ثانویه با توجه به کیفیت گیاهچه‌های تولید شده می‌تواند بهترین روش باشد.

منابع

1) Adam, KT., Adam, B. 2014. Xanthone benzophenone and bioflavonoid accumulation in *Cyclopia genistoides* (L.) Vent (honeybush) shoot culture grown on membrane rafts and in temporary immersion system. Plant Cell Tiss Org. 120:1.373-378.
2) Ariel, D., Arencibia, C.V. 2017. High performance micropropagation of dendroenege tic poplar hybrid in photomixotrophic temporary immersion bioreactors (TIBs). Inst Crops. 7:5. 102-109.
3) Aisun, M. 2013. Micropropagation of cherry laurel *Prunus laurocerasus* L. Food Agric.11: 576-579.
4) Bocsh, A, Moini, A., Dehghani, H., Movahedi, Z. 1393. Design construction of temporary syghrfaghraqab for micropropagation *Rosa damas* cenamill. Iran. J. Breeding. 4:7. 47-55. (In Persian).
5) Bayraktar, M., Naziri, E., Hakki, I., Fatih, A., Esra, K., Begum, I., Erdal, A., Gurel, BA. 2016. Elictor induced stevioside production in vitro shoot growth and biomass accumulation in micropropagation *Stevia rebaudiana*. Plant Cell Tiss. Org . 127: 289-300.
6) Calvet, A,. 2016. Plant cell and suitable bioreactors. Sci. Hort. 2:12. 331-338.
7) Cui, XH., Murthy, HN., Jin, YX., Yim, YH., Kim, JY., Pack, KY. 2011. Production of adventitious root biomass and secondary metabolities of *Hypericum perforatum* L. in aballoon type air lift reactor. Bio. Tech. 102: 10072-10079.
8) Entesari, M., Davodi, D., Haghnazari, A., Bagheri, S., Majidi, A., Habashi, A. 1391. The effect of the periodic indices bioreactor micropropagation and regeneration of (*Solanum tubersum*. L). Crop Breeding. 4:9. 54-67 . (In Persian).
9) Duncan, D.B. 1955. Multiple range and multiple F tests.J. Biomet. 11:1-42.
10) Deshmukh, S. 2012. In vitro rapid multiplication of *Stevia rebaudiana* an important natural sweetener herb. Biotechnology AmraUniversity.Springer. London.
11) Jain, P., Kachhwaha, S., Kothari, S.L. 2014. Biotechnology and metabolic engineering of *Stevia rebaudiana* Bertoni. Res Pharm. 3:2.220-227.
12) Jose, M.A, Antonio, A. 2016. Methanol elicits the accumulation of bioactive steviol glycosides and phenolics in *Stevia rebaudiana* and shoot cultures. Ind Crops. 7:87. 273-279.
13) Harshita, P., Pallavi, P., Shiv, P., Sailendra, S., Suchitra, B. 2016. Meeting the challenge of stevioside production in the hairy roots of Stevia rebaudiana by probing the underlying process. Plant Cell Tiss. Org. 126:3.511-521.

14) Hulya, A., Veysel, S., Ahmet, O., Engin, T., Viusuf, E., Yelda, O. 2013. Micropropagation of the pista chio and its root stocks by temporary immersion system. Plant Cell Tiss. Org. 81: 313-318.
15) Gao, R., Song., Q.W, Chung., P. 2013. Micropropagation of *Cymbidium sinense* using continuous and temporary air lift bioreactor system. Biol.Plantaurum. 36: 117-124.
16) Georgiev., M.I, Ebil., R, Zhong., J.J. 2013. Hosting the plant cells in vitro recent trends in bioreactors. Apply Biotech. 9:97. 3787-3800.
17) Georgieva, L., Tsvetkov, I., Georgieva, M and Kondakova, V. 2016. New Protocol for in vitro propagation of Berray plants by TIS bioreactor. Agric Sci. 22:5. 745-751.
18) Kokotkiewicz, A., Luczkiewicz, M., Kowalski, W., Badura, A., Piekus, N., Bucinski, A. 2013a. Isoflavone production in *Cyclopia subternata* vogel (honeybush) suspension cultures grown in shake flask and stirred tank bioreactor. Apply Biotech. 97: 8467-8477.
19) Kondo, S., Tomiyama, A., Okawa, K., Ohara, H., Sugaya, S., Terahara, N and Hiria, N. 2014. Abscisic acid metabolism and anthocyanin synthesis in grape skin ara affected by light emitting diode (LED) irradiationat night. Plant Physiol. 71:2. 823-829.
20) Lyam, P.T., Musa, Z.O., Jamaleddine, U.A., Okere, W.T., Odofine, A. 2012. The potential of temporary immersion bioreactors (TIBSs) in meeting crop production demand in *Nigeria*. Biol Sci. 3:66-86.
21) Manvender, Singh., Vinod, S., Jyostsna, D., Deepak, R., Yadunandan, S., Ajay, S. 2017. In vitro propagation *Stevia rebaudiana* (Bertoni. Apply Sci. 6:1. 1010-1022.
22) Meiping, G., Wen, J., Shaolong, W., Zhicheng, L., Binghua, C., Liu, Y., Cong, L., Xihua, H. 2015. High efficiency propagation of Chinese water chestnut (*Eleocharis dulcis* (Burm. f.) Trin.ex Hensch) using a temporary immersion bioreactor system. Plant Cell Tiss. Org. 121:3. 761-772.
23) Mujib, A. 2016. Somatic embryogenesis in ornamentals and Its applications. New Dehli, India Springer, 610.
24) Murashige, T., Skooge, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with *tobacco* tissue cultures. Biol.Plantaurum. 15: 473-494.
25) Ning, H.H., Den, Q.M. 2014. Effects of red and blue light quality on the metabolites and key enzyme activities of carbon-nitrogen metabolism in celery. Plant Physiol. 12:5. 112-118.
26) Noordin, N., Ibrahim, R., Sajahan, N.H., Nahar, S.M., Nahar, S.H,. Rashid, N.R. 2012. Micropropagation of *Stevia rebaudiana* through temporary immersion bioreactor system agrotechnology and bioscience division Malasian nuclear agency. Ministry of Science Technology and Apply Sci.14:2.68-85.
27) Nazmul, H.A., Mamumn, U., Cyrus, K. 2015. Bioreactor technology for clonal propagation of plants and metabolite production. Biol Sci. 10:2. 177-193.
28) Pandey, H., Pandey, P., Pandey, S.S., Singh, S., Banerjee, S. 2016. Meeting the challenge of stevioside production in the hairy roots of *Stevia rebaudiana* by probing the underlying process. Plant Cell Tiss. Org. 129:5. 511-521.
29) Pande S.S, and Gupta, P., 2013. Plant tissue culture of *Stevia rebaudiana* Bertoni a review. of Pharma and Phyt. 5: 3.23-33.
30) Perez, A., Capote, A., Jimenez, E. 2012. Increased cardenoildes production by elicitation of *Degitalis lanate* shoots cultured in temporary immersion systems. Plant Cell Tiss. Org. 110:5. 153-162.
31) Ramos, C., Lglesias, A., Lec, E. 2014. Improved propagation of *Vanilla* (*Vanilla planifolia* Jacks. Ex Andrews) using a temporary immersion system. Plant Tiss. Cult. 50:5. 576-581.
32) Razak, U.A., Lau, K.L. 2014. In vitro micropropagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni. Biol Tech. 57:5. 23-28.
33) Rizikita, R., Esyanti, N., Nikko, A., Robert, M. 2016. Agric Tech. 3:1.45-54.
34) Samirc, C. 2014. Bioreactor induced adventitious shoot regeneration affect genotype dependent morphology but maintains clonal fidelity in red raspberry. Plant Tiss. Cult. 50:6. 777-788.
35) Sankar, T., Lieberei, R. 2011. Camptothecin accumulation in various organ cultures of *Camptotheca acuminate*

culture systems. Plant Cell Tiss. Org. 106:8. 445-454.

36) Soren, W., Johanna, O., Danied, E., Dieter, E. 2013. An Approach for scale-up of Geometrically dissimilar orbitally shaken single use bioreactors. Chemic Ted. 8:5. 118-126.

37) Stanly C., Bhatt, A., Keng, C.L. 2010. Acomparative study of *Curcuma zedoaria* and *Zingber zerumbet* plantlet production using different micropropagation systems. Afrj Biotech. 9:28. 4326-433.

38) Schumann, A., Berkov, S., Calus, D., Gerth, A., Bastida, J., Codina, C. 2012. Production of glanthamine by *leucojum aestivum* shoots grow in different bioreactor system. Apply Biotech. 167:7. 1907-1920.

39) Suarez, I.E., Quintero, I.R. 2014. Micropropagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni a natural sweetener through pre existing mersion explant. Plant Biotech. 16:4. 29-33.

40) Vincent, A., Rizkita, E. 2016. Stimulation of stevioside accumulation on *Stevia rebaudiana* Bertoni shoot culture induced with red LED light in TIS RITA bioreactor system.Plant Biotech. 10:2. 779-785.

41) Vasil, G., Anika, S., Atanas, P., Thomas, B. 2014. Temporary immersion systems in plant biotechnology. Engin Sci. 14:6. 607-621.