فصلنامه اکوفیتوشیمي گیاهان دارویي، شماره پیاپي ۱۹، سال پنجم، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۶

مطالعه تغییرات کمی وکیفی کالوس گیاه *Stevia rebaudiana* Bertoni. تحت تاثیر کاربرد سالیسیلیک اسید و شوری در شرایط کشت جامد و مایع

مارال سلملیان[۱]، عظیم قاسم‌نژاد*[۲]، کامبیز مشایخی[۲]
[۱]کارشناس‌ارشد رشته گیاهان دارویی ادویه‌ای و نوشابه‌ای، گرگان، ایران.
[۲]دانشیار گروه باغبانی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۵/۱۱/۸ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۶/۳/۳

چکیده

تحقیق حاضر به منظور بررسی اثر ایلیسیتورهای شوری و سالیسیلیک - اسید در محیط کشت جامد و مایع بر برخی از پارامترهای رشدی و بیوشیمیایی کالوس گیاه استویا، از جمله وزن تر، خشک و رنگدانه‌های درونی با استفاده از روش پیشنهادی بارنس، میزان مهار رادیکال آزاد با استفاده از DPPH، قند کل با استفاده از آنترون و قند احیاء به روش مایلر انجام شد. آزمایش به‌صورت فاکتوریل بر پایه کاملا تصادفی با دو غلظت سالیسیلیک‌اسید (صفر و ۱۰۰ میکرومولار) و دو غلظت شوری (صفر و ۵۰ میلی‌مولار) در محیط‌های کشت جامد و مایع حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA و ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA در ٤ تکرار انجام شد. آنالیز نتایج با استفاده از نرم‌افزار SAS, V 9.2 صورت گرفت. ایلیسیتورهای مورد استفاده و محیطکشت و اثر متقابل این تیمارها اثر معنی‌داری بر صفات کمی و کیفی داشتند. وزن ترکالوس تحت تاثیر شوری و سالیسیلیک اسید نسبت به شاهد کاهش یافت. در مقابل وزن خشک در تیمار توأم شوری و سالیسیلیک‌اسید نسبت به شوری افزایش معنی‌داری نشان داد. رنگدانه‌های درونی در تیمارها به نسبت شاهد افزایش یافت. بیشترین توانمندی مهار رادیکال آزاد در تیمار سالیسیلیک‌اسید با غلظت ۱۰۰ میکرومولار و محیط کشت مایع دیده شد. تغییرات قند کل در محیط کشت مایع حاوی ۵۰ میلی مولار شوری در مقایسه با سایر تیمار ها افزایشی بود. در مقابل مقدار قند احیاء در تیمار سالیسیلیک‌اسید و محیط کشت جامد افزایش معنی‌داری نسبت به سایر تیمارها داشت. با توجه به نتایج به دست آمده به نظر می رسد در کشت استویا، در صورت تمایل به تولید متابولیت در شرایط درون شیشه‌ای، بهتر است که از سیستم کشت مایع استفاده گردد و این در حالی است که کشت کالوس با هدف تولید بیومس در سیستم کشت جامد توصیه می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: استویا، ایلیسیتور، رنگریزه‌های فتوسنتزی، قند کل و احیاء، کشت‌بافت، محیط کشت مایع.

*نویسنده مسئول: maral.salmalian79@gmail.com

مقدمه

گیاهان دارویي یکي از مهمترین منابع دارویي‌اند که از هزاران سال پیش کاربرد داشته‌اند (Tripathi and Tripathi, 2003) این گیاهان منبع بسیاري از مواد شیمیایي هستند که به‌عنوان ترکیب دارویي مصرف مي‌شوند. فرآورده‌هاي حاصل از متابولیسم ثانوي گیاهي جزء گرانبهاترین ترکیبات شیمیایي گیاهي مي‌باشند. متابولیت‌هاي ثانویه منحصر به گونه یا حتي نژاد و اغلب در طي یك دوره رشد و نموي خاص در گیاه تولید مي‌شوند. این متابولیت‌ها (متابولیت‌های ثانویه) عملکردهاي اکولوژیکي مهمی در گیاه دارند (Oksman-Caldentey and Inze, 2004)، علاوه بر فرآیندهای ژنتیکی به‌طور بارز تحت تاثیر عوامل محیطی قرار می‌گیرد (Omidbeigi, 1996). استفاده از الیسیتورها یکي از مهمترین روش‌ها براي افزایش تولید متابولیت‌هاي ثانویه است. الیسیتورها مواد شیمیایي یا عوامل زیستي مختلفي هستند که مي‌توانند تغییرات فیزیولوژیکي و تجمع فیتوآلکسین را القاء کنند. این ترکیبات با منشا زیستي و یا غیرزیستي، از طریق القاي پاسخ‌هاي دفاعي باعث بیوسنتز و انباشت متابولیت‌هاي ثانویه مي‌شوند (Zhao et al., 2005). از شوری و هورمون اسیدسالیسیلیک می‌توان به‌عنوان الیسیتورهای غیرزیستی جهت افزایش سنتز متابولیت‌های ثانویه بهره برد.

سالیسیلیک اسید (SA) متعلق به گروهی از ترکیبات فنلی است که به طور وسیعی درگیاهان وجود دارد و امروزه به عنوان ماده شبه هورمونی محسوب می‌گردد (Kang and Wang, 2003). این هورمون سیستم دفاعی گیاه را از طریق فعالسازي گروه مشخصی از ژن‌هاي مرتبط با دفاع و توسعه مقاومت سیستمیک تحریک می‌کند. تنش‌هاي محیطي مهمترین عوامل کاهش‌دهنده‌ي عملکرد محصولات کشاورزي در سطح جهان هستند. تنش در گیاهان دارویي باعث افزایش متابولیت‌هاي ثانویه مي‌شود. این افزایش مفید است اما تنش اگر از حد تحمل سلول بالاتر رود باعث خسارت و کاهش متابولیت‌هاي ثانویه در گیاهان دارویي مي‌شود (Hasanzadeh and Ahmadi, 2014). شوری از مهم‌ترین تنش‌های غیر زیستی است که رشد و عملکرد گیاهان را تحت تاثیر قرار می‌دهد و برتمام فرآیندهای اصلی مانند فتوسنتز، سنتزپروتئین، متابولیسم لیپید و انرژی موثر بوده و در نتیجه تمام مراحل زندگی گیاه ازجوانه‌زنی تا تولید بیوماس و تولید دانه را تحت تاثیر قرار می‌دهد (Pittman and Lauchly, 2004; Setayeshmehr et al., 2012; Delavari Parizi, 2010).

استویا با نام علمی (*Stevia rebaudiana* Bertoni) گونه‌اي نسبتاً چند ساله، بوته‌اي و کوتاه قد از خانواده (Asteraceae) و بومي نواحي شمالي آمریکاي جنوبي می‌باشد. از برگ‌های استویا به‌عنوان افزودنی و شیرین کننده در صنایع غذایی استفاده می‌شود که در کنار غلظت بالای استویوزید، این گیاه منبع خوبی از پروتئین، فیبر رژیمی، مواد معدنی و اسید آمینه‌های ضروری می‌باشد (Abu-arab et al., 2010). بذر گیاه استویا درصد جوانه‌زنی پائینی دارد و ازدیاد رویشی از طریق قلمه توسط تعداد کمی از افراد صورت می‌گیرد (Jain et al., 2009; Sakaguchi and Kan, 1982). کشت

بافت سریعترین روش برای افزایش انبوه استویا میباشد. محتواي متابولیتهاي ثانویه در کشت سلول به وسیله دست ورزي تنظیم کننده هاي رشد، افزودن پیشسازها، الیسیتورها قابل ارتقا ميباشد. از آنجايي كه آنتيا‌كسيدان‌ها در پيشگيري از بسياري از بيماريها نظير ديابت، پيري، التهاب، سرطان، آترواسكلروز، صدمات كبدي، آلزايمر، پاركينسون و بيماريهاي عروق كرونر قلب مؤثر ميباشند، يافتن گياهاني با اثرات آنتيا‌كسيداني قوي ميتواند در كاهش سير بيماري طيف وسيعي از بيماريها بسيار مؤثر باشد. محيط كشت مايع به عنوان يک روش كارآمد، با كمک كنترل و هدايت دستگاهی بطور خودكار و با كاهش هزينه و زمان، مورد استفاده قرار می-گيرد.

مواد و روشها

تحقیق حاضر در طول سالهای ۹۴-۹۵ در دانشکده تولید گیاهی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام شد. ریزنمونه برگ گیاه استویا در محیط MS حاوی BA به مقدار ۰/۵ و NAA به مقدار یک میلیگرم در لیتر کشت شده و پس از تهیه کالوس به اندازه مورد نیاز، تیمارهای آزمایشی شامل شوری در دو سطح صفر و۵۰ میلیمولار و اسید سالسیلیک در دو سطح صفر و ۱۰۰ میکرومولار در دو محیط کشت مایع و جامد در شرایط استریل کشت شد. پس از گذشت چهار هفته از اعمال تیمار، میزان وزن تر و وزن خشک و ترکیبات بیوشیمیایی ظرفیت آنتیاکسیدانی، رنگدانه های درونی، قند کل و قند احیاء کالوسها اندازهگیری شدند. اندازهگيري فعاليت به دام اندازي راديكالهاي آزاد با روش ميلياوسكاس و همكاران (Miliauskas et al., 2004) انجام شد. بدين منظور ۲ ميلي‌ليتر عصاره متانولی با ۲ ميلي‌ليتر محلول متانولی ۰/۰۰۴ درصد DPPHمخلوط گرديد. محلول كنترل شامل ۲ ميلي‌ليتر DPPH و ۲ ميلي‌ليتر متانول بود. محلول‌ها به مدت ۳۰ دقيقه در تاريكی و در دماي اتاق انكوبه شدند. جذب نمونه‌ها در ۵۱۷ نانومتر در مقابل شاهد خوانده شد. درصد مهار راديكال آزاد هر عصاره به كمک‌فرمول زير محاسبه شد (I%):

$$I\% = (A\ control - A\ sample) / A\ control \times 100$$

تعيين مقدار كلروفيل و كاروتنوئيد براساس روش پيشنهادي بارنس (Barens, 1992) انجام گرفت. به منظوراستخراج كلروفيل و كاروتنوئيد ابتدا ۰/۵ گرم كالوستر و نكوبيده از هر تكرار توزين و با ۱۰ ميلي‌ليتر دي‌متيل سولفوكسيد (DMSO) مخلوط شد. پس از قرار دادن نمونه در آون ۸۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت۳ ساعت، از نمونه حاصل ۱ ميلي‌ليتر برداشته شد و با DMSO به حجم ۵ ميلي‌ليتر رسانده شد. از DMSO خالص به عنوان شاهد استفاده شد. نمونه‌ها به‌وسيلة دستگاه اسپكتروفتومتر در طول موج‌هاي ٦٤٥، ٦٦٣، ٤٨٠ و ٥١٠ نانومتر قرائت شدند و با استفاده از فرمول‌های زير ميزان كلروفيل a، b، كلروفيل كل و كارتنوئيد محاسبه گرديد.

$$Chlo\ a\ (mg/g.F.w) = 12.7(A663) - 2.69(A645) \times V/1000 \times W \quad (۱)$$

$$Chlo\ b\ (mg/g.F.w) = 22.9(A645) - 4.68(A663) \times V/1000 \times W \quad (۲)$$

$$Chlo\ total\ (mg/g.F.w) = 20.2(A645) + 8.02(A663) \times V/1000 \times W \quad (۳)$$

$$Car\ (mg/g.F.w) = 7.6(A480) - 1.49(A510) \times V/1000 \times W \quad (۴)$$

A: طول موج، V: حجم نهایی محلول، W: وزن نمونه

به‌منظور استخراج قند محلول از روش اوموکولو و همکاران (Omokolo et al., 1996) استفاده شد. در این روش ۰/۳ گرم از کالوس، در لوله‌های پلی اتیلنی با ۵ میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درصد مخلوط و به مدت۱۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. عصاره الکلی حاصل به‌مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰۰g سانتریفیوژ گردید و محلول شفاف به‌دست آمده حاوی قندهای محلول به یک بشر منتقل شد. عمل فوق چهار بار دیگر نیز روی بقایای بافتی بجا مانده تکرار گردید. در نهایت عصاره الکلی با حرارت تغلیظ شده و حجم آن به یک پنجم اولیه رسید. سپس این عصاره الکلی با نسبت ۵:۱ با کلروفرم مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه در ۲۰۰۰ g سانتریفیوژ گردید و فاز بالایی آن جدا و برای اندازه‌گیری انواع قندهای محلول استفاده شد. اندازه‌گیری قند کل به روش مک‌کریدی و همکاران (MCcready et al., 1950) انجام شد. برای این کار ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره الکلی تغلیظ شده و ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر با ۳ میلی‌لیتر معرف آنترون مخلوط و به‌مدت ۲۰ دقیقه در بن‌ماری با دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. میزان جذب نور هر یک از تیمارها پس از سرد شدن در طول موج ۶۲۰ نانومتر قرائت شد و با مقایسه با نمودار استاندارد قند کل میزان قند کل هر نمونه محاسبه گردید. اندازه‌گیری قند احیاء نمونه براساس روش مایلر (Miller, 1959) انجام شد. برای اینکار ۱/۵ میلی‌لیتر از عصاره تغلیظ شده حاوی قندهای محلول با ۱/۵ میلی‌لیتر از معرف دی‌نیتروسالیسیلیک اسید مخلوط شده و به‌مدت ۲۰ دقیقه در بن‌ماری در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از آن بلافاصله ۰/۵ میلی‌لیتر پتاسیم سدیم تارتارات ۴۰ درصد به آن افزوده شد و پس از سرد شدن لوله‌ها، جذب نور در طول موج ۵۲۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت گردید.

نتایج

با توجه به تجزیه واریانس (جدول ۱) اثر ساده هورمون و محیط کشت بر هر دو وزن تر و وزن خشک در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار شد، ولی اثر متقابل هورمون و محیط کشت بر وزن تر کالوس اثر معنی‌داری نداشت.

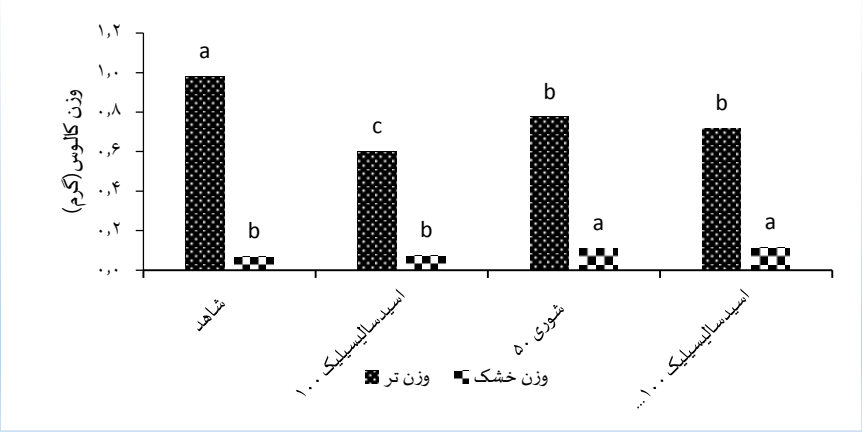
جدول ۱: تجزیه واریانس وزن و رنگدانه‌های درونی کالوس استویا تحت تاثیر شوری و اسید سالیسیلیک

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات					
		وزن تر	وزن خشک	کلروفیلa	کلروفیلb	کلروفیل کل	کارتنوئید
هورمون	۳	۰/۲۰۲**	۰/۰۰۲۶**	۰/۰۴۶۸**	۰/۰۸۱۱**	۰/۰۵۵۶**	۰/۰۰۰۰۹**
محیط کشت	۱	۳/۳۸۱**	۰/۰۵۰۱**	۰/۰۰۹۲**	۰/۰۰۰۳n.s	۰/۰۴۱۵**	۰/۰۰۰۰۲**
هورمون× محیط کشت	۳	۰/۰۰۸۷n.s	۰/۰۰۱۵**	۰/۰۰۴۱**	۰/۰۱۶۴**	۰/۰۳۲۴**	۰/۰۰۰۰۸**
خطا	۲۴	۰/۰۰۳	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۴	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰
ضریب تغییرات		۷/۵۱	۱۲/۸۲	۶/۲۲	۱۳/۹۰	۷/۲۸	۱۴/۰۵

** و * و n.s به‌ترتیب معنی‌دار در سطح ۱ درصد، ۵ درصد و عدم معنی‌داری.

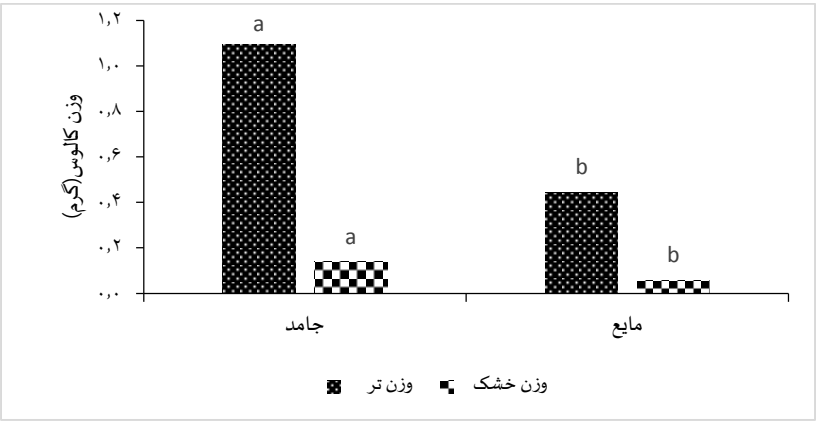
بررسی مقایسه میانگین داده‌ها (شکل ۱) نشان داد که وزن‌تر کالوس‌های استویا تحت تیمار هورمونی اختلاف معنی-

داری با شاهد داشت. نتایج نشان داد که کاهش معناداری در وزن تر کالوس در تیمار اسید و شوری در مقایسه با تیمار شاهد وجود دارد، به‌طوری‌که بیشترین وزن‌تر مربوط به تیمار شاهد و کمترین وزن‌تر در تیمار سالیسیلیک اسید ۱۰۰ مشاهده شد. همچنین بین تیمارهای شوری و ترکیب سالیسیلیک اسید و شوری اختلاف معنی‌داری از لحاظ آماری دیده نشد.



شکل ۱: تاثیر نوع هورمون بر وزن تر و خشک کالوس استویا

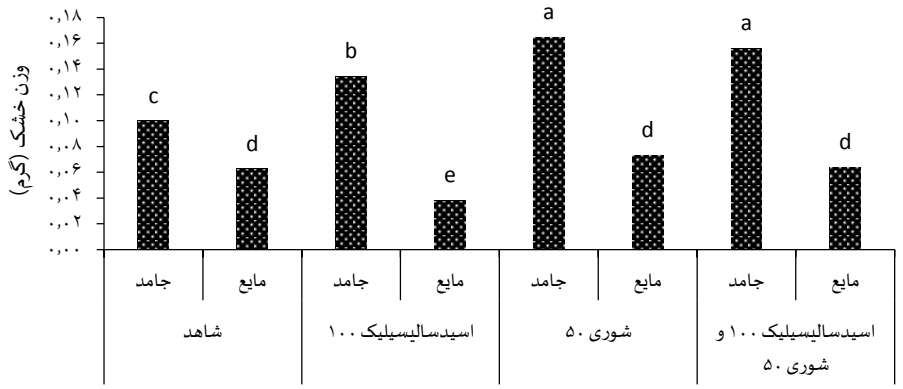
میزان وزن خشک کالوس در تیمار سالیسیلیک اسید اگرچه بیشتر از شاهد بود ولی از نظر آماری تفاوتی با تیمار شاهد نداشت ولی در تیمار شوری و تیمار ترکیبی شوری و سالیسیلیک‌اسید میزان وزن خشک افزایش یافت. با توجه به (شکل۲) وزن‌تر و خشک کالوس‌ها در محیط جامد بیشتر از محیط مایع شد. افزایش وزن خشک کالوس در محیط جامد به مایع به روشنی مشخص نیست. با این وجود می‌توان بیان داشت که افزایش نسبت رشدی کالوس در شرایط کشت جامد به مایع ثبات فیزیکی نمونه گیاهی و فراهم بودن شرایط پایدارتر جذب آب و مواد غذایی از مهمترین دلایل اختلاف مشاهده شده رشدی وزنی کالوس است.



شکل ۲: اثر نوع محیط کشت بر وزن تر و خشک کالوس

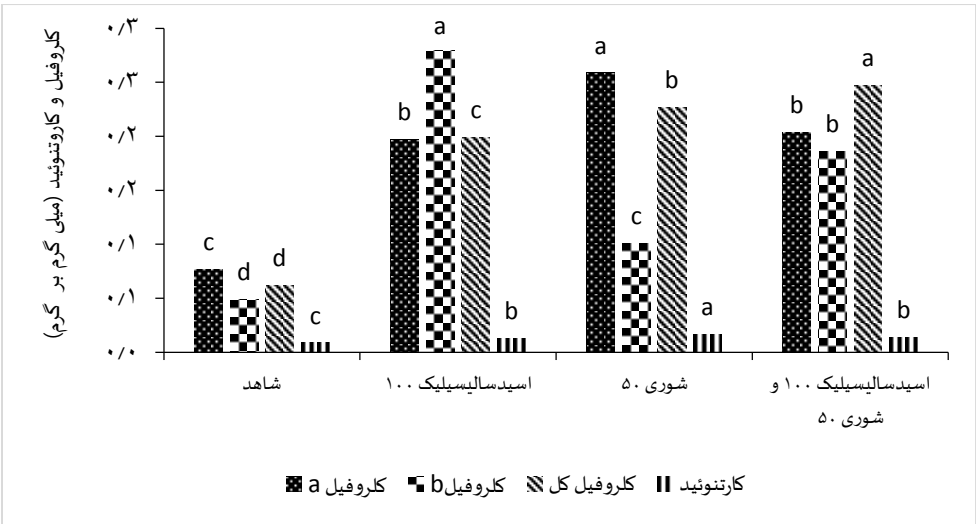
همانگونه که در (شکل ۳) نشان داده شده است، تحت تاثیر اثر متقابل ایلیسیتور و محیط کشت بیشترین وزن خشک

در تیمار شوری ۵۰ و تیمار توأم شوری ۵۰ و سالیسیلیک اسید ۱۰۰ در محیط کشت جامد مشاهده شد. در مقابل کمترین میزان وزن خشک نیز در تیمار سالیسیلیک اسید ۱۰۰ در کشت مایع دیده شد.

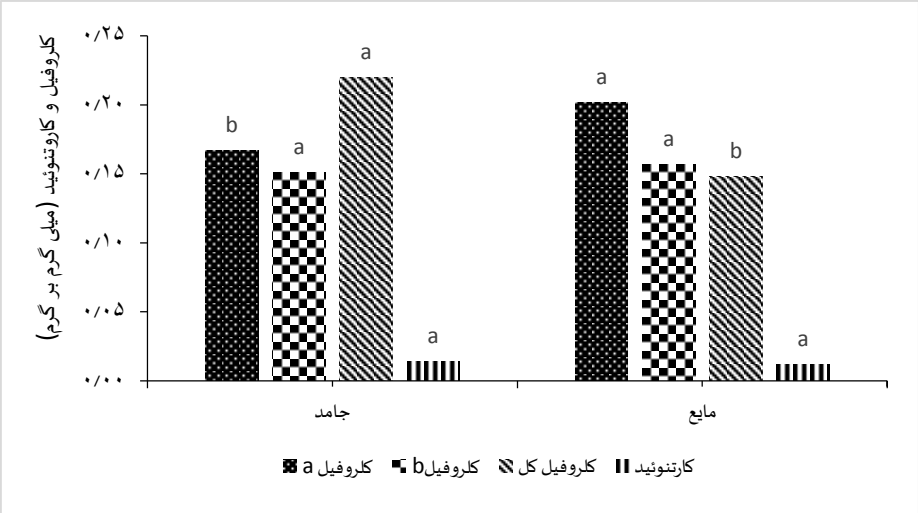


شکل۳: اثر متقابل هورمون و محیط کشت بر وزن خشک کالوس

مطابق نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱)، تحت تأثیر ایلیسیتور و محیط کشت و همچنین اثر متقابل آنها اختلاف معنی‌داری در سطح ۱ درصد در میزان کلروفیل‌ها و کاروتنوئید مشاهده شد. ولی اثر محیطکشت بر کلروفیلb معنی‌دار نبود. با بررسی مقایسه میانگین (شکل‌های ۵ و۴) تأثیرسالیسیلیک اسید و شوری بر محتوای رنگدانه‌های درونی کالوس استویا نشان داد که بیشترین میزان کلروفیل a مربوط به تیمار شوری ۵۰ و کمترین آن در تیمار شاهد و در محیط کشت مایع دیده شد. بیشترین مقدار کلروفیل b در تیمار سالیسیلیک اسید ۱۰۰ و بیشترین مقدار کلروفیل کل در تیمار ترکیبی سالیسیلیک اسید و شوری دیده شد و محیط مناسب تولید بیشتر این رنگریزه‌ها محیطکشت جامد بود.

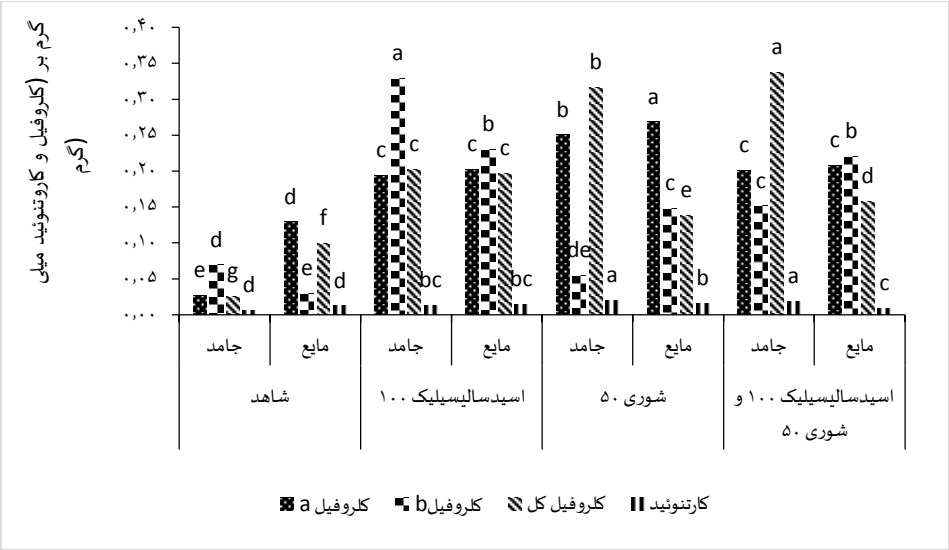


شکل ۴: تاثیر هورمون‌ها بر رنگدانه‌های درونی



شکل ۵: تاثیر محیط کشت بر رنگدانه‌های درونی

تیمار شوری همچنین بیشترین مقدار کاروتنوئید را نیز تولید کرد. با توجه به اثر متقابل‌ها (شکل ۶) مشخص شد که کمترین مقدار کلروفیل a، کلروفیلb و کلروفیل کل مربوط به تیمار شاهد بود و بیشترین مقدار کلروفیلa در کشت مایع تیمار شوری دیده شد و با کشت جامد این تیمار اختلاف معنی-داری نداشت. سالیسیلیک اسید در محیط کشت جامد سبب افزایش معنی‌داری در مقدار کلروفیل b شد. تیمار توأم سالیسیلیک اسید و شوری سبب افزایش کلروفیل کل و همچنین کاروتنوئید شد که با میزان کاروتنوئید تیمار جامد شوری ۵۰ اختلاف معنی‌داری نداشت. در این پژوهش در کالوس‌های تیمار شده با نمک در حضور سالیسیلیک اسید ، ماندگاری و افزایش بیشتری در رنگدانه‌های کلروفیل و کاروتنوئیدی دیده شد.



شکل ۶: اثر متقابل هورمون ها و محیط کشت بر رنگدانه های درونی

با توجه به (جدول ۲) نتایج تجزیه واریانس اثر هورمون‌ها و محیط کشت و اثر متقابل آن‌ها بر میزان مهار

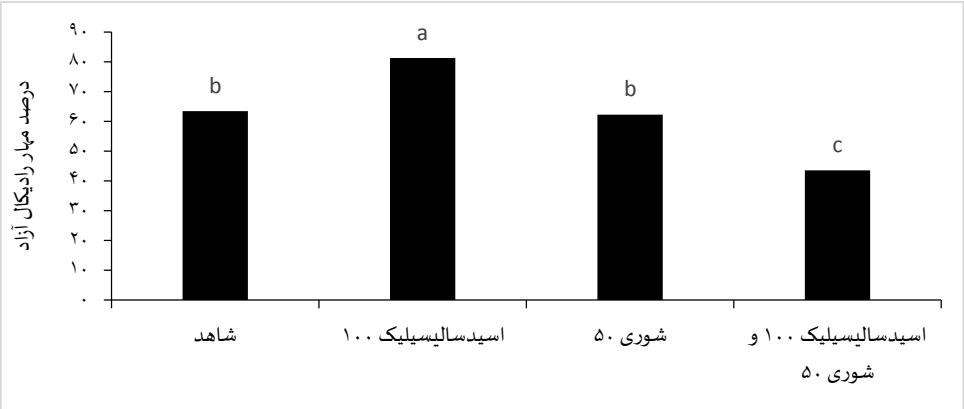
رادیکال آزاد در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار گردید.

جدول ۲: تجزیه واریانس آنتی‌اکسیدان و قندهای کالوس استویا تحت تاثیر شوری و اسید سالیسیلیک

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		مهار رادیکال آزاد	قند کل	قند احیا
هورمون	۳	۱۸۹۹/۱۵**	۰/۳۶۵۵**	۰/۰۰۹۰**
محیط کشت	۱	۵۱۵۳/۶۳۴۷**	۰/۰۹۲۵**	۰/۰۰۴۰**
هورمون× محیط کشت	۳	۵۹۸/۱۸**	۰/۰۳۰۴**	۰/۰۰۰۶**
خطا	۲۴	۳۰۷/۷۱	۰/۰۰۰۲	۰/۰۰۰۰۳
ضریب تغییرات		۱۳/۸۸	۲/۵۰۳	۱۰/۰۷

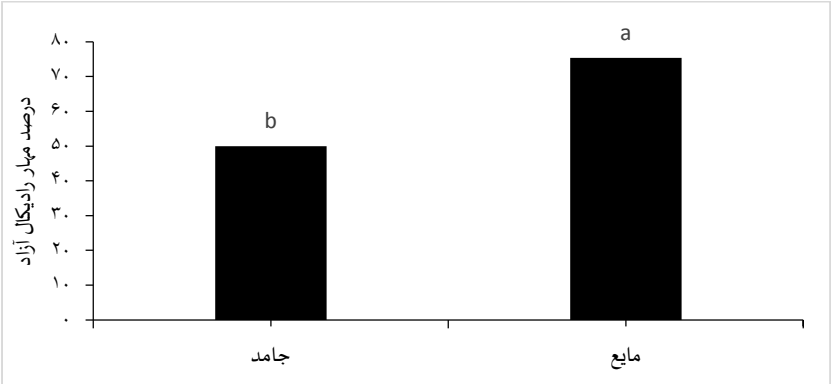
** و * و n.s به‌ترتیب معنی‌دار در سطح ۱ و ۵ درصد و عدم معنی‌داری.

با توجه به (شکل ۷) بیشترین مهار رادیکال آزاد در تیمار - سالیسیلیک اسید ۱۰۰ دیده شد.



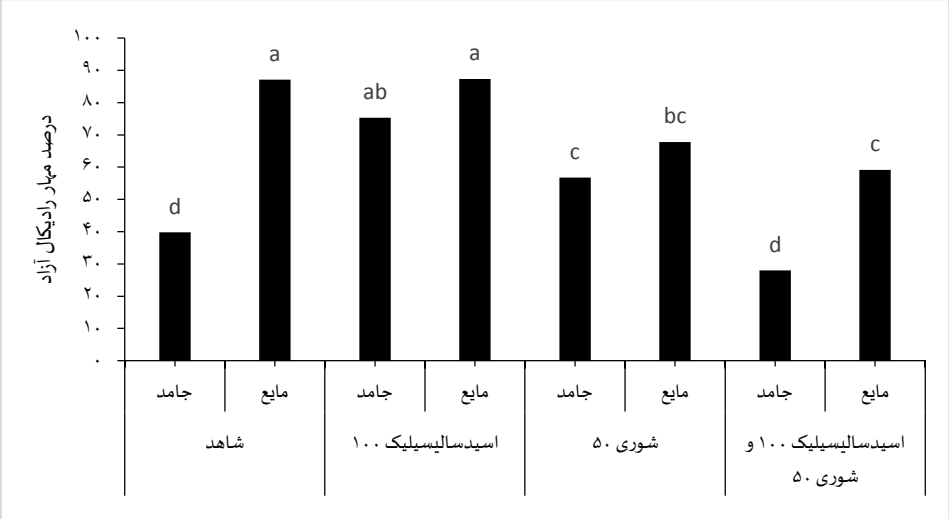
شکل ۷: تاثیر هورمون‌ها بر درصد مهار رادیکال آزاد

درصد مهار رادیکال آزاد با توجه به (شکل ۸) در محیط کشت مایع بیشتر از محیط کشت جامد دیده شد.



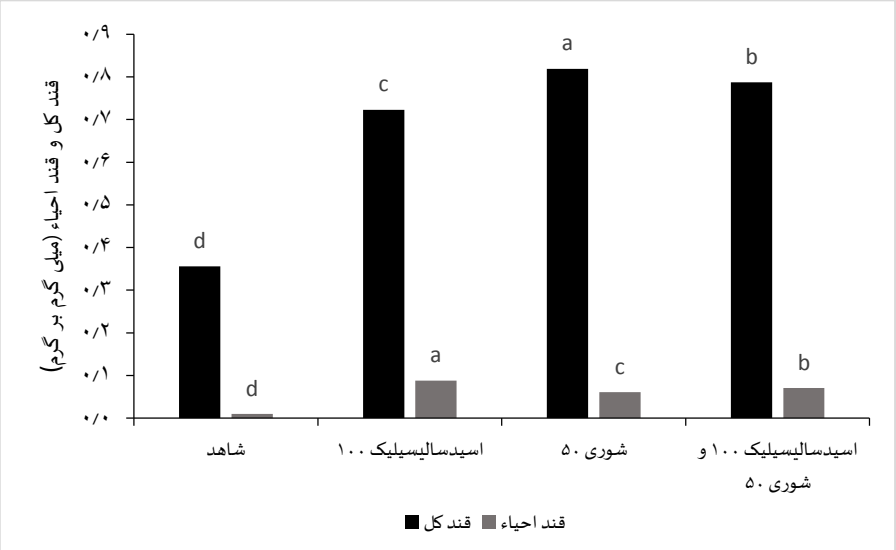
شکل ۸: تاثیر محیط کشت بر درصد مهار رادیکال آزاد

بیشترین درصد مهار رادیکال آزاد با توجه به (شکل ۹) در کشت مایع تیمار سالیسیلیک اسید ۱۰۰ دیده شد که با کشت مایع شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت و کمترین میزان فعالیت در کشت جامد تیمار ترکیبی - سالیسیلیک اسید ۱۰۰ و شوری ۵۰ بود که با کشت جامد تیمار شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت.



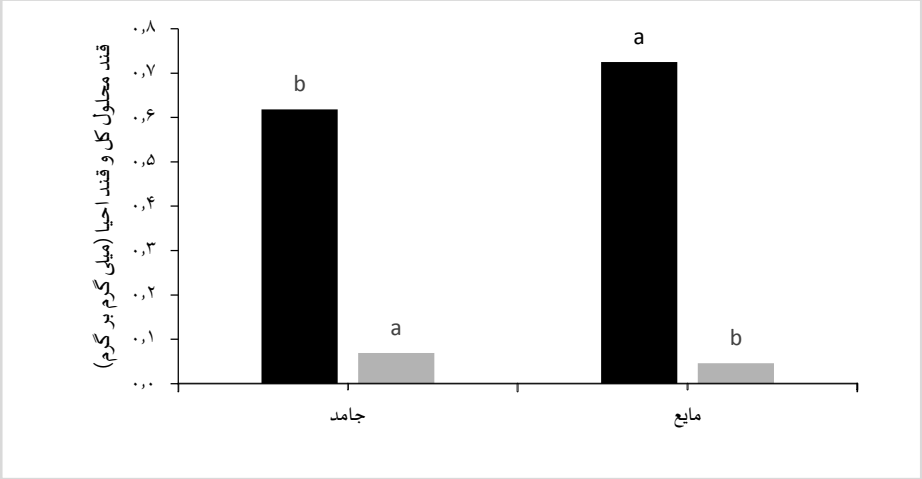
شکل ۹: اثر متقابل هورمون‌ها و محیط کشت بر درصد مهار رادیکال آزاد

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۲) نشان داد که تیمارهای شوری و سالیسیلیک اسید و همچنین محیط کشت و اثر متقابل آن‌ها بر میزان قند محلول کل در سطح ۱درصد دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند. با توجه به نمودار مقایسه میانگین‌ها (شکل ۱۰) تیمار شوری سبب افزایش مقدار قند محلول کل گردید و همچنین اثرگذاری مثبت تیمار شوری بر سالیسیلیک اسید نیز سبب افزایش مقدار قند کل در تیمار ترکیبی این دو ماده شد. کمترین مقدار قند کل مربوط به تیمار شاهد بود.



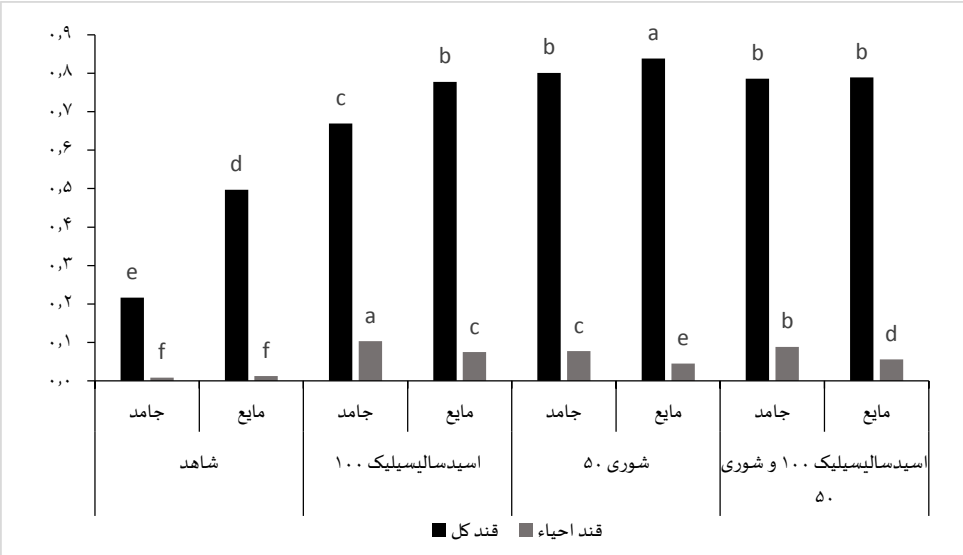
شکل ۱۰: تاثیر هورمون‌ها بر قند کل و قند احیاء

مقدار قند محلول کل در محیط مایع بیشتر از محیط جامد بود (شکل ۱۱).



شکل ۱۱: تاثیر محیط کشت بر قند کل و قند احیاء

اثر متقابل هورمون‌ها و محیط کشت بر میزان قند محلول کل (شکل ۱۲) نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین سطوح مختلف تیمارها وجود دارد. به‌طوری‌که بیشترین میزان قند محلول کل در تیمار شوری ۵۰ و محیط مایع دیده شد.



شکل ۱۲: اثر متقابل هورمون ها و محیط کشت بر قند کل و قند احیاء

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۲) نشان داد که تیمارهای شوری و سالیسیلیک اسید و همچنین محیط کشت و اثر متقابل آن‌ها بر میزان قند احیاء در سطح احتمال ۱ درصد دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند. با توجه به (شکل ۱۰) بیشترین مقدار قند احیاء در تیمار سالیسیلیک اسید ۱۰۰ دیده شد و کمترین مقدار آن در تیمار شاهد بود. میزان قند احیاء بر خلاف قند کل در محیط جامد بیشتر بود (شکل ۱۱). بیشترین میزان قند احیاء مربوط به تیمار - سالیسیلیک اسید ۱۰۰ در محیط کشت جامد دیده شد که با شاهد محیط مایع اختلاف معنی‌داری نداشت. تیمار توأم شوری و سالیسیلیک اسید سبب افزایش قند احیاء نسبت به شاهد و تیمار شوری به تنهایی شد (شکل ۱۲). مقدار قند احیاء

در تیمار شوری بر خلاف قند کل در این تیمار کاهش یافت.

بحث

نتایج این تحقیق نشان داد که ایلیسیتورها و محیط کشت بر میزان رشد کالوس، رنگدانه‌های درونی، درصد مهار رادیکال آزاد و قند کالوس‌های استویا در شرایط درون‌شیشه‌ای مؤثر است. واکنش کشت‌های سلولی به سالیسیلیک اسید با توجه به ماهیت این ترکیب به نوع کشت و نمونه گیاهی وابسته است. با توجه به ترکیب هورمونی، غذایی محیط کشت و نمونه گیاهی، سالیسیلیک اسید اثرات متفاوتی نشان می‌دهد. سالیسیلیک اسید به‌عنوان یک تنظیم‌کننده رشد گیاهی در اکثر فرآیندهاي فیزیولوژیکی گیاه تأثیر مهمی دارد و به‌دلیل ماهیتش در گیاه، سلول‌هاي گیاهی تحت تیمار این ترکیب، رفتارهاي رشدي یک سلول تحت تنش‌زا از جمله افزایش مواد جامد قابل حل سلول، کاهش اندازه سلول و غلیظ کردن محلول سیتوپلاسمی را از خود نشان می‌دهند، ازاین رو کاهش وزن تر در مقابل افزایش نسبی وزن خشک توجیه پذیراست، سالیسیلیک‌اسید با تأثیر بر تعادل هورمون‌هاي رشدي سبب تنظیم تعادل در رشد و پیري می‌شود (Popova et al., 1997). در پژوهشی که بر روی چند گونه از شنبلیله‌های ایران صورت گرفت، گزارش شد که افزایش غلظت شوری وزن‌تر کالوس‌های شنبلیله را کاهش داد (Niknam et al., 2006). تنش شوری با اثر بر روی بخش‌های مختلف به‌ویژه سیستم هورمونی و آنزیمی منجر به کاهش وزن تر کالوس می‌شود (Razavi, 2005). در خصوص افزایش وزن خشک در تیمار شوری، می‌توان این‌گونه اظهار نمود که افزایش جذب آب در چنین شرایطی با گسترش بیشتر و تداوم بهتر سطح فتوسنتزی همراه است که موجب ایجاد منبع فیزیولوژیکی قوی و کافی جهت استفاده هرچه بیشتر از نور دریافتی و تولید ماده خشک می‌گردد (Moghaib et al., 2004). هرناندز و فلوتا (Hernandez and Flota, 2006) بیان کردند که کاهش تکثیر سلولی و در نهایت توقف آن در محیط کشت مایع ممکن است به‌دلیل تخلیه نمودن تنظیم کننده‌های رشد و عناصر تغذیه‌ای موجود در محیط کشت و همچنین تولید و ترشح متابولیت‌های ثانویه توسط سلول‌ها و در نتیجه تجمع این مواد در محیط کشت باشد. با این وجود به نظر می‌رسد که عدم دسترسی سلول‌های میانی توده کالوس به اکسیژن کافی از جمله مهمترین دلایل کاهش رشد رویشی کالوس و در نهایت بیومس کل سلول باشد. همانگونه که قبلا نیز بیان شد، زمانی که نمونه گیاهی در محیط جامد قرار دارد، با وجود اینکه تنها از یک طرف با محیط کشت و مواد غذایی در تماس است، در صورت جذب مناسب مواد غذایی شرایط مناسبتری را برای رشد قسمت‌های فوقانی فراهم می‌آورد. این در حالی است که در محیط مایع تمام نمونه گیاهی در محیط کشت غوطه ور بوده که در این صورت دسترسی نامناسب اکسیژن می تواند به عامل اصلی توقف رشد و تکثیر سلول تبدیل گردد. لذا رشد بیشتر کالوس و افزایش زیست توده کالوس در محیط جامد در مقایسه با محیط مایع در شرایط نامساعد رشدی دور از انتظار نیست.

تغییرات میزان کلروفیل با توجه به ماهیت آن به‌شدت تحت تاثیر شرایط محیطی قرار

دارد. بررسی‌های انجام شده در شرایط برون شیشه‌ای و درون-شیشه‌ای بیانگر تاثیرپذیری کلروفیل از شرایط محیطی است. افزایش میزان کلروفیل کل تحت تنش شوری ممکن است به‌دلیل افزایش در تعداد کلروپلاست در بافت تحت تنش نیز باشد (El-sayed et al., 2015) در پژوهشی که روی محتوای کلروفیل کل ۴ گونه *Trigonella* در شرایط درون شیشه‌ای انجام شد محتوای کلروفیل کل در دو گونه *T. foenum-graecum* و *T. aphanoneura* در غلظت ۵۰ میلی‌مولار شوری، افزایش و در غلظت‌های بالاتر کاهش نشان داد (Niknam et al., 2011). در مطالعه روی گیاه نخود افزایش میزان کلرید سدیم موجب افزایش غلظت کلروفیلb و a و کاروتنوئیدها در نخود شد (Kafi et al., 2010). افزایش محتوای کلروفیل و کاروتنوئید در گیاه استویا بیانگر آغاز مکانیسم دفاعی و فرآیند مقاومتی آن در مقابل شوری می‌باشد که با نتایج حاصل از مطالعات صورت گرفته بر روی گیاهانی نظیر گوجه-فرنگی (El-sayed et al., 2015) و بامیه (Ashraf et al., 2003) مطابقت دارد. در حقیقت چون ظرفیت فتوسنتزی کلروفیل در تنش شوری کاهش می‌یابد، گیاه اقدام به تجمع بیشتر کلروفیل در جهت جبران این نقیصه می‌کند (Bagheri, 2013). در آزمایشی بر روی گیاه *Loliumperenne cv.Numan* کلروفیلb در غلظت ۷۵ و ۱۰۰ میلی‌مولار-سالیسیلیک اسید افزایش یافت (Hosseini et al., 2015). در تحقیقی گزارش شده است که اضافه کردن سالیسیلیک اسید پیش از اتوکلاو به محیط کشت، باعث افزایش تدریجی در محتوای کلروفیل کل *Chlorophytum borivilianum* پس از ۶۳ روز رشدشان تا غلظت ۲۵ میلی‌گرم در لیتر شد (Purohit et al., 2014). افزایش رنگدانه‌های فتوسنتزی تحت تیمار سالیسیلیک اسید گویای اثر محافظتی این تنظیم کننده رشد بر روی فتوسنتز و رنگدانه‌های فتوسنتزی گیاهان تحت تنش شوری می‌باشد (El-tayeb, 2005).

در خصوص افزایش مهار رادیکال آزاد جنیسون و توماس (Ganesan and Thomas, 2001) و دیویس (Davis, 2005) بیان داشتند که سالیسیلیک‌اسید با اثر بر روی H_2O_2 توان آنتی‌اکسیدانی را افزایش داده و از گیاه در برابر تنش‌های اکسیداتیو حفاظت می‌کند. سالیسیلیک‌اسید به دو شکل آنزیمی (فعالیت آنزیم‌های اکسیداتیو) و غیر آنزیمی (القاء متابولیت‌های ثانویه) دفاع آنتی‌اکسیدانی را فعال کرده و مانع تنش اکسیداتیو و کاهش خسارات می-گردد (Khalili et al., 2010). اثر-گذاری مثبت سالیسیلیک‌اسید بر افزایش مهار رادیکال آزاد در گیاه کاهو (Mohammadi et al., 2012)، نعناع فلفلی (Shabrangi and mehrabi, 2014) و گل بنفشه (Ghorbani et al., 2013) گزارش شده است. ریچ میلتون و همکاران (Rich Milton et al., 2015) بیان داشتند که میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی به گونه گیاهی و محیط کشت بستگی دارد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی درست در نقطه مقابل تشکیل بیومس قرار دارد. به این معنی که هرچه سلول گیاهی تحت تنش بیشتر قرار گیرد از توان رشدی خود کاسته و به تولید ترکیبات درونی خود در جهت افزایش پایداری خود اضافه می کند. افزایش ترکیبات دخیل در فعالیت آنتی‌اکسیدانی هم از جمله راه کارهای سلول برای مدیریت ترکیبات اکسیدانی است که در این نتایج به خوبی نشان داده شده است. بنابراین

بر اساس داده‌های به‌دست آمده می‌توان بیان کرد که در صورتی که هدف تولید متابولیت و افزایش توانمندی آنتی اکسیدانی عصاره گیاهی باشد کشت مایع ارجحیت خواهد داشت. همان‌گونه که بیان شد کشت مایع به خودی خود شرایط استرس‌زایی برای سلول‌های کشت شده گیاهی فراهم می‌نماید که نتایج آن را در مقایسه فعالیت آنتی‌اکسیدانی در محیط جامد و مایع مشاهده نمودیم. در کنار استرس ناشی از محیط کشت مایع افزودن هر کدام از عوامل ایلیسیتوری می‌تواند سبب افزایش فعالیت ضد استرسی سلول‌های نمونه گیاهی کشت شده شود. سالیسیلیک اسید با ماهیت شبه هورمونی و القاء کننده استرس در مقایسه با شوری در القاء استرس بهتر عمل کرده و بیشترین فعالیت سلول را در پی داشته است. به همین دلیل است که بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی نمونه و تجمع ترکیبات قندی در محیط حاوی سالیسیلیک اسید صد درصدی مشاهده شد. این در حالی است که با افزودن شوری به محیط حاوی سالیسیلیک اسید و اثر هم افزایی استرسی دو ایلیسیتور با شکستن سد مقاومتی سلول کاهش فعالیت آنتی اکسیدانی را به دنبال داشته است با این حال از تجمع ترکیبات قندی کاسته نشده است (شکل ۹ و شکل ۱۲). قندها از جمله مهمترین ترکیبات اسمولیتی بوده و در شرایط به هم ریختگی تعادل پتانسیل اسمزی سیتوپلاسم و محیط در سلول ساخته می‌شوند. مهمترین قندهای دخیل در این زمینه گلوگز، ساکارز و مانیتول هستند. افزایش قند در محیط حاوی سالیسیلیک اسید و نمک در سلول‌های کالوس با هدف غلبه بر پتانسیل منفی محیط کشت در جهت جذب بهتر انجام شده که نتایج مشاهدات حاضر مبین این نکته هستند. نتایج اثر تنش شوری بر بافت کالوس چهار گونه شنبلیله ایرانی در شرایط کشت درون شیشه‌ای نشان داد که شوری سبب افزایش قندهای محلول شد (Niknam et al., 2006). علت تجمع قندهای محلول در طی تنش شوری احتمالا به این دلیل است که قندهای نامحلول (نشاسته) تجزیه شده و قندهای محلول را ایجاد می‌کند تا پتانسیل اسمزی را حفظ کرده و خطر دهیدراتاسیون را کاهش دهد. علاوه بر این کاهش مصرف قند به‌دلیل کاهش فتوسنتز در طی تنش شوری نیز عامل دیگری برای افزایش غلظت قندهای محلول در سلول می‌تواند باشد (Minhas et al., 1989). در آزمایشی تیمار شوری و تیمار شوری به همراه سالیسیلیک اسید موجب افزایش مقدار قندهای محلول در برگ‌ها و ریشه‌های گیاه تربچه گردید، همچنین میزان قندهای محلول کل در تیمار با سالیسیلیک اسید در برگ و ریشه به صورت معنی‌دار افزایش یافت (Hosseinzad behbod et al., 2015). افزایش قندهای محلول کل طی تیمار سالیسیلیک اسید و نیز تیمار این ترکیب همراه با تنش شوری در ذرت نیز گزارش شده است (Khodarry, 2004).

احتمالاً کاهش قند احیاء در تیمار شوری به‌دلیل کاهش بهره‌وری فتوسنتزی گیاه در پاسخ به تنش شوری است که در نتیجه منجر به تأخیر انداختن بیوسنتز کربوهیدرات‌هایی که در رشد گیاهان مورد استفاده قرار می‌گیرند و یا افزایش مصرف بخشی از کربوهیدرات در مسیرهای سوخت و ساز دیگر می‌شود (Dubie and Singh, 1999). همچنین افشانه‌سازی برگ‌های گیاهان با غلظت‌های متفاوت

سالیسیلیک‌اسید موجب افزایش معنی‌دار مقدار قندهای احیاء-کننده در برگ شد (Delavari parizi, 2010).

نتیجه‌گیری نهایی

به‌دلیل اهمیت بسیار ترکیبات ثانوی گیاهان دارویی و کاربرد این ترکیبات در صنایع مختلف، دستیابی به روش‌های مفید جهت تولید اقتصادی این ترکیبات بسیارحائز اهمیت است. کاربرد ایلیسیتورها و ایجاد تنش به-منظور تحریک بیوسنتز و تولید متابولیت‌های ثانویه، یکی از مهم‌ترین روش‌های افزایش متابولیت‌های ثانویه می‌باشند. در این آزمایش اثر شوری و اسیدسالیسیلیک به‌عنوان ایلیسیتور در دو محیط‌کشت جامد و مایع استفاده شد و نتایج نشان داد که رشد و نمو کالوس استویا و همچنین فعالیت‌های بیوشیمیایی کالوس تحت تأثیر ایلیسیتورها و همچنین محیط کشت قرار دارد. ایلیسیتورها سبب افزایش وزن تر و وزن خشک، افزایش رنگدانه‌های درونی، افزایش مهار رادیکال آزاد و قندها شدند. محیط کشت مایع سبب کاهش وزن کالوس، افزایش کلروفیلa، افزایش درصد مهار رادیکال آزاد و افزایش قند کل شد. اما در خصوص قند احیاء محیط جامد عملکرد بالاتری داشت. بر اساس نتایج بدست آمده می‌توان بیان داشت که در شرایط تنش شوری، استفاده از سالیسیلیک اسید به‌عنوان یک ترکیب فنلی، سبب افزایش مهار رادیکال آزاد شده و آسیب کلروفیل را کاهش می‌دهند که سبب مقاومت در کالوس‌های استویا می‌شود. با توجه به نتایج به دست آمده به نظر می رسد در کشت استویا در صورت تمایل به تولید متابولیت به ویژه توجه به مقوله کشت متابولیتی در شرایط درون شیشه‌ای بهتر است که از سیستم کشت مایع استفاده گردد. این در حالی است که کشت کالوس با هدف تولید بیومس در سیستم کشت جامد توصیه می‌گردد.

References

1. Abou-Arab, E.A., Abou-Arab, A.A. and Abu-Salem, F.M. 2010. Physico-chemical assessment of natural sweeteners steviosides produced from Stevia rebaudiana bertoni plant. African Journal of Food Science, 4(5), 269-281.
2. Bagheri, A. 2013. Comparison of photosynthesis and durum wheat yield with normal wheat under salt stress conditions and application of salicylic acid hormone. Journal of Plant Ecophysiology, 5, 12.
3. Davis P.J. 2005. Plant hormones biosynthesis signal transduction, action. Springer. Germany. 750 pp.
4. Delavari Parizi, M. 2010. The effects of Salicylic acid and salinity stress on the some physiological and biochemical changes in Ocimum basilicum L. Master thesis, Department of Biology, Payam-e-Noor University.
5. Dubey, R.S. and Singh, A.K. 1999. Salinity induces accumulation of soluble sugars and alters the activity of sugar metabolizing enzyme in rice plants, Plant Biology, 42: 233-239.
6. El Sayed, Hameda El Sayed Ahmed, Salih, A.M. Baziad and Reem, A.A.S. Basaba, 2015. Application of Exogenous Ascorbic Acid on Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) Seeds under NaCl Salinity Stress. International Journal of Current Research in Biosciences and Plant Biology, 2(5): 33-46.
7. El Tayeb, M.A. 2005. Response of barley grains to the interactive effect of salinity and salicylic acid. Plant Grow. Reg. 45: 215-224.
8. Ganesan V. and Thomas, G. 2001. Salicylic acid response in rice: influence of

salicylic acid on H_2O_2 accumulation and oxidative stress. Plant Sci. 160: 1095-1106.

9. Ghorbani, N., Moradi, H., Akbarpour, V. and Ghasemnezhad, A. 2013. The phytochemical changes of violet flowers (*Violacornuta*) response toexogenous salicylic acid hormone. Journal of Chemical Health Risks, 3(4): 1- 8.
10. Hassanzadeh, K., Ahmadi, M. and Shaban, M. 2014. Effect of pre-treatment of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) seeds on seed germination and seedlings growth under salt stress. Inter. J. Plant, Ani. Environ. Sci. 4(3): 260-265.
11. Herna´ndez-Domı´nguez, E. and Va´zquez-Flota F. 2006. Monoterpenoid alkaloid quantitation by in situ densitometry–thin layer chromatography. Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies 29: 583–590.
12. Hosseini, M., Kafi, M. and Arghavani, M. 2015. The effect of Salicylic acid on physiological characteristics of Lolium grass (*Lolium perenne* cv. “Numan”) under drought stress. 7(1): 7-14.
13. Hosseinzad behbod A., chaparzade N. and deilmaghani K. 2015.effect of salicylic acid on growth parameters, Osmolytes and osmotic potential in plant radish (*Raphanus Sativus* L.) Under salt stress. Journal of Plant (Zsyt Journal of Iran). (27), 1. (In Persian).
14. Jain, P., Kachhwaha, S. and Kothari, S.L. 2009. Improved micropropagation protocol and enhancement in biomass and chlorophyll content in *Stevia rebaudiana* Bertoni by using high copper levels in the culture medium. Scientia Horticulturae, 119: 315–319.

15. Kafi, M., Bagheri, A., Nabati, J., Zare, M., and Masoumi, A. 2010. Effect of salinity stress on some physiological variables of 11 chickpea genotypes in hydroponics. Science and technology of greenhouse crops. 11:4.
16. Kang, G. and Wang, Ch. 2003. Environmental and Experimental Botany, 50: 9.
17. Khalili, M., Hasanloo, T., Kazemi Tabar, S.K. and Sepehrifar R. 2010. Effect of salicylic acid on antioxidant activity in milk thistle hairy root cultures. J. Medicinal Plant. 9(35): 51-59.
18. Khodarry, S.E.A. 2004. Effect of salicylic acid on the growth, photosynthesis and carbohydrate metabolism in salt stressed maize plants. International Journal of Agriculture and Biology 6:5-8.
19. Mccready, R.M., Guggolz, J., Silviera, V., and Owens, H.S. 1950. Determination of starch and amylose in vegetables. Anal. Chem. 22:1156.
20. Miliauskas, G., Venskutonis, P.R., and Van Beek, T.A. 2004. Screening of radical scavenging activity of some medicinal plants and aromatic plant extract. Food Chem., 85:231-237.
21. Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem. 31: 426–428.
22. Minhas P.S., Sharma D.R. and khosla B.K. 1989. Response to sorghum to the use of saline waters. J. Indian Soc. Soil Sci. 37: 140-146.
23. Moghaieb R.E.A., Saneoka H. and Fujita, K. 2004. Effect of salinity on osmotic adjustment, glycinebetaine accumulation and the betaine aldehyde dehydrogenase gene expression in two halophytic plants, Salicornia europaea and Suaeda maritime. Plant Sci 166:1345–1349.
24. Mohammadi, M., Khazaei, Z., Sayari, M. and Seyedi, M. 2012. Effect of salicylic acid on resistance to salt stress in Lettuce. Seventh Congress of Horticultural Sciences, Isfahan University of Technology. (In Persian)
25. Niknam, V., Razavi, N., Ebrahimzadeh, H. and Sharifizadeh, B. 2006. Effect of NaCl on biomass, protein and proline contents and antioxidant enzymes in seedlings and calli of two Trigonella species. Biol. Plant. 50(4): 591-596.
26. Oksman-Caldentey, K.M. and Inzé, D. 2004. Plant cellfactories in the postgenomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. Journal of Trends Plant Science, 9(9): 433-440.
27. Omidbeigi, R. 1996. Production and Processing of Medicinal Plants. Tarahan Nashr, Iran
28. Omokolo N.D., T sala, N.G. and Djocgoue, P.F. 1996. Changes in carbohydrates, amino acids and phenols contents in cacao pods from three clones after infection with P. megakarya Bra and Griff. Annals of Botany 77, 153– 158.
29. Pitman M. and Läuchli A. 2004. Global impact of salinity and agricultural ecosystems. In: Läuchli A, Lüttge U (eds) Salinity: Environment - Plants - Molecules. Springer, Dordrecht, pp 3-20.
30. Popova, L., Pancheva, T. and Uzonova A. 1997. Salicylic acid: Properties, Biosynthesis and Physiological role. Plant Physiology. 23: 85-93.
31. Purohit, S.D., Dave, A. and Kukda, G. 2014. Salicylic acid induced changes in growth and some biochemical characteristics in vitro cultures shoots of Chlorophytum Borivilianum sant. ET Fernand. 5(4): 774-779.
32. Razavi, N. 2005. Study the physiological and biochemical changes induced by salt stress in some species of *Trigonella* of Iran. MA thesis, Faculty of Tehran University.
33. Rich Milton R. Dulay, Kimberly S. Flores, Reyna C. Tiniola, Darille Hannah H. Marquez, Aileen G. Dela Cruz, Sofronio P. Kalaw and Renato G. Reyes, 2015. Mycelial biomass production and antioxidant activity of *Lentinus tigrinus* and Lentinus sajor-caju in Indigenous Liquid Culture.Mycosphere 6 (6): 659–666.
34. Sakaguchi M. and Kan T. 1982. Japanese researches on *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni and stevioside. CiCult 34: 235-248.
35. Sarahi, N.M., Niknam, V. and Moradi, B. 2011. Effect of salt stress on protein content, clorophylls, sugars and phenolic

compounds in tissue culture of some type of Iranians trigonella. Journal of Tehran University. 36, 2 (53-59).

36. SetayeshMehr, Z., Khajeh, H., Esmaeilzadeh Bahabadi, S. and Sabbagh, S.Z. 2012. Changes on proline, phenolic compounds and activity of antioxidant enzymes in *Anethum graveolens* L. under salt stress. International Journal of Agronomy and plant production. 3: 710-715.
37. Shabrangi, A. and Mehrabi, L. 2014. Evaluation of Antioxidant Activity and Secondary Metabolites of *Mentha piperita* L. Under Effect of Acetylsalicylic Acid and Methyl Jasmonate. International Research Journal of Applied and Basic Sciences, 8(3): 337-340.
38. Tripathi, L. and Tripathi, JN., 2003. Role of biotechnology in medicinal plants. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 2: 243-253.
39. Zhao, J., Davis, L.C. and Verpoorte, R. 2005. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. Biotechnology Advances. 23(4): 283-333.

The study of quantitative and qualitative changes of *Stevia rebaudiana* Bertoni. callus under the influence of salicylic acid and salt in solid and liquid culture conditions

Salmalian, M.[1], Ghasemnejad, A.[2*], Mashayekhi, K.[2]

[1]M.Sc of Medicinal Herbs and Drinks, Gorgan, Iran.

[2]Associate Professor, Department of Horticulture, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

Received: 2017-1-27 ; Accepted: 2017-5-24

Abstract

Present study was done to evaluate the effect of salinity and salicylic acid in solid and liquid culture media on callus growth and biochemical parameters *Stevia* like wet and dry weight, photosynthesis pigments, antioxidant activity, total and reduce sugar were measured. A factorial experiment based on completely randomized design with four replications, two different concentrations of salicylic acid (0 and 100µM) and salt (0 and 50mM) in solid and liquid culture media containing 0.5 mg/l NAA and 1 mg/l BA. Result were showed that the using of elicitor and culture and the interaction between the treatments had a significant effect on the measured quantitative and qualitative characteristics. In comparing to the control, the fresh weight callus decreased as affected by salinity and salicylic acid. In contrast, the dry weight of callus significantly increased when treated with elicitors. Internal pigment density of the callus increased when treated by elicitors. The highest antioxidant capacity was observed in liquid medium with containing of 100µM salicylic acid. Total sugar content was observed in medium containing 50 mM salinity. In contrast and compared to the other treatments, the content of reduced sugar in solid culture and under salicylic acid treatment increased significantly. According to the results, duo to increases of metabolit production in *Stevia*, its need to considering of metabolite culture in invitro conditions and the liquid culture is recommended, while the solid culture would be nessecory to biomass production.

Keywords: Elicitor, Photosynthetic pigments, Tissue culture, *Stevia*, Total and reduced sugar

*Corresponding author; maral.salmalian79@gmail.com