Plant Prod., 2025, 47(4), 581-594
https://plantproduction.scu.ac.ir/
ISSN (P): 2588-543X; **ISSN (E):** 2588-5979
Doi: 10.22055/ppd.2024.47365.2187
Received: 8 July 2024
Accepted: 23 October 2024

Plant Productions

Research Article

Effect of phytohormone concentration and composition on the micropropagation efficiency of *Stevia rebaudiana* Bertoni

Atefeh Amini Neisiani [1], Abbas Saidi[2*], Masoud Tohidfar [3]

1- Ph.D. Student, Department of Cell & Molecular Biology, Faculty of Life Sciences & Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran.
2- Professor, Department of Cell & Molecular Biology, Faculty of Life Sciences & Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran.
3- Professor, Department of Cell & Molecular Biology, Faculty of Life Sciences & Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran.

Citation: Amini Neisiani, A., Saidi, A., Tohidfar, M. (2025). Effect of phytohormone concentration and composition on the micropropagation efficiency of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Plant Productions*, 47(4), 581- 594 .

Abstract

Introduction

Stevia rebaudiana Bertoni is a medicinal plant commercially used as a non-caloric sweetener for diabetic patients. Stevia seeds are small and infertile, and exhibit a relatively low germination rate. Moreover, given the steviol glycoside content and morphological characteristics (such as leaf shape and color), cross-pollination in this plant, leads to a great deal of diversity among the plants grown from the seeds. Consequently, asexual propagation methods are vital for the effective cultivation of this plant. Micropropagation not only enhances growth and reproduction rates, it also preserves genetic resources. Furthermore, it allows for the creation of a genetically homogeneous population with high yields of steviol glycosides, which makes it a suitable method for the propagation of Stevia. The present study aims to evaluate the effects of various growth regulators on this plant, presenting an efficient protocol for commercial cultivation.

Materials and Methods

Stevia seed germination rates were calculated on MS medium at four and eight days post-sowing. Shoot induction was examined using combinations of kinetin (KIN), gibberellic acid (GA3), and benzylaminopurine (BAP). Subsequently, rooting experiments were conducted with three auxin hormones: naphthaleneacetic acid (NAA), indole-3-acetic acid (IAA), and indole-3-butyric acid (IBA). The acclimatization of the samples was conducted following successful rooting.

* **Corresponding Author:** Abbas Saidi
E-mail: abbas.saidi@gmail.com

© 2025 The Author(s). Published by Shahid Chamran University of Ahvaz. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Results and Discussion

The germination rate of Stevia seeds was found to be 33.38%. The best shoot proliferation was achieved with 0.5 mg/L BAP and 2 mg/L KIN, producing the highest number of leaves and lateral branches. Optimal fresh weight (437.29 g) and shoot length (15.38 cm) were obtained in the treatment with 1.5 mg/L GA3 and 2 mg/L KIN. Significant negative correlations were observed at the 1% probability level between leaf number and shoot length (-0.61**), leaf number and fresh weight (-0.46**), lateral branch number and shoot length (-0.81**), and lateral branch number and fresh weight (-0.69**). Significant positive correlations were found between leaf and lateral branch numbers (0.95**) and between shoot length and fresh weight (0.98**). The longest root was observed in the treatment with 0.5 mg/L NAA, and the highest number of roots was found in the treatment with 1 mg/L IBA. The study reveal the effectiveness of specific combinations of growth regulators for the micropropagation of *Stevia rebaudiana*. The findings indicate that the hormonal treatments significantly affect various growth parameters, including leaf number, shoot length, fresh weight, and root development. The negative correlations between some traits suggest that optimizing one growth parameter might compromise. The positive correlations between other traits, such as leaf and lateral branch number, suggest that some growth attributes can be simultaneously enhanced.

Conclusion

The optimized protocol for the micropropagation of *Stevia rebaudiana* (0.5 mg/L BAP and 2 mg/L KIN for shoot proliferation, and 0.5 mg/L NAA for root induction) demonstrated efficient and economical performance using fewer and less diverse hormones compared to existing micropropagation protocols. Therefore, it can be considered an optimum protocol for the propagation of Stevia, potentially benefiting commercial cultivation and research applications.

Keywords: Growth regulators, Gibberellic acid, Kinetin, Stevia, Tissue culture.

تولیدات گیاهی، ۱۴۰۳، ۴۷(۴)، ۵۸۱ -۵۹۴
https://plantproduction.scu.ac.ir/
ISSN (P): 2588-543X; **ISSN (E):** 2588-5979
Doi: 10.22055/ppd.2024.47365.2187
تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۴/۱۸
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۸/۰۲

تولیدات گیاهی
مقاله پژوهشی

بررسی غلظت و ترکیب فیتوهورمون‌های مختلف در کارایی ریزازدیادی گیاه *Stevia rebaudiana* Bertoni

عاطفه امینی نیسیانی[۱]، عباس سعیدی[۲] *، مسعود توحیدفر[۳]

۱- دانشجوی دکتری، گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران.
۲- استاد، گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران.
۳- استاد، گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران.

چکیده

گیاه دارویی است که به صورت تجاری به عنوان شیرین کننده بدون کالری برای بیماران دیابتی استفاده می‌شود. بذرهای استویا کوچک و نابارور هستند و نرخ جوانه‌زنی نسبتاً پایینی دارند. همچنین گرده‌افشانی در این گیاه به صورت دگرگرده افشانی است که این امر با توجه به محتوای استویول گلیکوزیدها و ویژگی‌های مورفولوژیکی (شکل و رنگ برگ‌ها) باعث بروز تنوع بالا در جمعیت گیاهان حاصل از بذر می‌شود، به همین دلیل است که تکثیر این گیاه از طریق روش‌های غیر جنسی اهمیت پیدا می‌کند. از آنجا که ریزازدیادی، ضمن افزایش سرعت رشد و تکثیر گیاه، سبب حفظ ذخیره ژنتیکی می‌شود و امکان ایجاد یک جمعیت ژنتیکی همگن با بازده بالایی از استویول گلیکوزیدها را فراهم می‌کند، می‌تواند روش مناسبی برای تکثیر این گیاه و حفظ یکنواختی باشد. پژوهش حاضر با هدف دست‌یابی به روشی بهینه برای ریزازدیادی گیاه *Stevia rebaudiana* و بررسی اثر تنظیم کننده‌های مختلف رشدی بر این گیاه، در سال ۱۴۰۲ در آزمایشگاه تحقیقاتی دانشکده علوم و فناوری زیستی دانشگاه شهید بهشتی انجام شد. در این پژوهش درصد جوانه‌زنی بذرها در چهار و هشت روز پس از کشت در محیط کشت MS محاسبه شد. شاخه‌زایی با سه نوع ترکیب هورمونی KIN، GA3 و BAP ارزیابی شد و پس از شاخه‌زایی، ریشه‌زایی ریزشاخه‌ها، تحت سه نوع ترکیب اکسینی شامل NAA، IAA و IBA مورد مقایسه قرار گرفت. سازگاری نمونه‌ها پس از ریشه‌زایی نیز انجام شد. نتایج نشان داد که میزان جوانه‌زنی بذرها ۳۸/۳۳ درصد بود و بیشترین تعداد برگ و تعداد ریزشاخه مربوط به تیمار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۲ میلی‌گرم در لیتر KIN بود. بیشترین وزن تر (۴۳۷/۲۹g) و طول ریزنمونه (۱۵/۳۸ cm) در تیمار ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر GA3 و ۲ میلی‌گرم در لیتر KIN بدست آمد. بین صفات تعداد برگ و طول ریزنمونه (۰/۶۱-)، تعداد برگ و وزن تر (**۰/۴۶-)، تعداد ریزشاخه و طول ریزنمونه (**۰/۸۱-) و تعداد ریزشاخه و وزن تر (**۰/۶۹-) در سطح احتمال یک درصد ارتباط منفی و معنی‌داری وجود داشت. بین صفات تعداد برگ و تعداد ریزشاخه (**۰/۹۵) و طول ریزنمونه و وزن تر (**۰/۹۸)**

* **نویسنده مسئول:** عباس سعیدی
رایانامه: abbas.saidi@gmail.com

ارتباط مثبت و معنی‌داری وجود داشت. بیشترین طول ریشه مربوط به تیمار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و بیشترین تعداد ریشه مربوط به تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA بود. پروتکل معرفی شده برای ریزازدیادی گیاه استویا در این پژوهش (تیمار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۲ میلی‌گرم در لیتر KIN برای شاخه‌زایی و تیمار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA برای ریشه‌زایی) در مقایسه با سایر پروتکل‌های ریزازدیادی، در زمان کوتاه‌تر با میزان و تنوع هورمونی کمتر، عملکرد بهتری را به همراه داشت که می‌تواند به عنوان یک پروتکل اقتصادی مورد استفاده قرار گیرد.

کلید واژه ها: استویا، تنظیم کننده‌های رشدی، جیبرلیک اسید، کشت بافت،کینتین.

مقدمه

استویا با نام علمی *Stevia rebaudiana* Bertoni، گیاهی دولپه از خانواده Asteraceae است (Mthembu, 2017). این گیاه به دلیل شیرینی برگ‌هایش، به نام‌های برگ شیرین، برگ عسلی و برگ قندی نیز شناخته می‌شود (Arumugam *et al*., 2020). علت شیرینی برگ‌های این گیاه، حضور استویول گلیکوزیدها است (Omidi *et al*., 2019). قندهای موجود در این گیاه در بدن جذب نمی‌شود و علی رغم ایجاد طعم شیرین، فاقد کالری هستند (Wang *et al*., 2023; Ahmadi Khoei and Karamian, 2022). استویا گیاهی چند ساله، علفی و روز کوتاه بوده که به طور طبیعی در مناطقی از آمریکای جنوبی و مرکزی رشد می‌کند. به دلیل اهمیت اقتصادی و پزشکی این گیاه، امروزه در سایر مناطق جهان از جمله برخی از مناطق اروپا، آسیا و کانادا نیز کشت می‌شود (Moradi *et al*., 2017; Schiatti-Sisó *et al*., 2023). گیاه استویا به طور کلی از طریق بذر یا قلمه رویشی تکثیر می‌شود. از آنجایی که بذرهای استویا بسیار کوچک و در اکثر موارد نابارور هستند، جوانه‌زنی ضعیفی دارند. همچنین گرده افشانی در این گیاه به صورت دگر گرده افشانی است که این امر با توجه به محتوای SGs (استویول گلیکوزیدها) و ویژگی‌های مورفولوژیکی (شکل و رنگ برگ‌ها) باعث بروز تنوع بالا در جمعیت گیاهان حاصل از بذر می‌شود (Michalec-Warzecha *et al*., 2016; Gantait *et al*., 2015). بنابراین، تولید انبوه استویا از طریق بذر کارآمد نیست و این موضوع باعث شده تا روش‌های تکثیر غیر جنسی اهمیت بیشتری پیدا کند.

افزایش همگروهی از طریق قلمه‌های رویشی برای تولید در مقیاس کوچک عملی است، اما برای تولید انبوه، از نظر اقتصادی مقرون به صرفه نیست، زیرا هزینه‌های نیروی کار بسیار زیاد است (Gantait *et al*., 2015). کشت درون شیشه‌ای گیاهان علاوه بر افزایش سرعت رشد و تکثیر، سبب حفظ ذخیره ژنتیکی نیز می‌شود. بنابراین از طریق ریزازدیادی یک گیاه منتخب در شرایط کشت بافت می‌توان به یک جمعیت ژنتیکی همگن که بازده بالایی از استویول گلیکوزیدهای مورد نظر را تولید می‌کند، دست یافت (Gantait *et al*., 2015; Röck-Okuyucu *et al*., 2016). بهینه سازی شرایط کشت، نقش اساسی در استفاده از تکنیک کشت بافت دارد. کشت گیاه استویا در شرایط آزمایشگاهی به عوامل مختلفی از جمله عوامل خارجی (غلظت قند، pH، ترکیب محیط، تنظیم کننده‌های رشد گیاه (PGRs)، نور و دما) و ویژگی‌های داخلی (شرایط فیزیولوژیکی، سن و ژنوتیپ) بستگی دارد (Röck-Okuyucu *et al*., 2016; Lukatkin *et al*., 2007). با وجود پیشرفت‌های زیادی در روش ریز ازدیادی، القای ریشه و سازگاری همچنان چالش‌های اصلی برای تکثیر کلونال استویا هستند.

در پژوهشی که توسط Galo (2019) انجام شد، روش‌های مختلف تکثیر استویا با تمرکز بر استفاده از هورمون‌های مختلف ریشه‌زایی بررسی شد. در این مطالعه سه نوع بافت (نوک ساقه، ساقه میانی و قسمت پایه ساقه) و چهار نوع هورمون تجاری (میراکل گرو، روتک ژل ، NAA و کنترل) مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که بیشترین درصد بقای استویا مربوط به نوک اندام هوایی است و

قلمه‌های نوک ساقه تحت تیمار با ژل روتک ریشه‌زایی سریعتر، تعداد ریشه بیشتر، ریشه‌های بلندتر و همچنین درصد بقای بیشتری داشتند (Galo *et al*., 2019).

در پژوهشی توسط Rodriguéz-Páez *et al* (2024) از ترکیب‌های مختلفی از سیتوکینین‌ها و اکسین‌ها برای پروتکل‌های اندام‌زایی در سه ژنوتیپ استویا استفاده کردند. نتایج نشان داد که افزایش بهینه شاخساره برای ژنوتیپ‌های مختلف متفاوت بوده است. برای ژنوتیپ‌های L020 و L102 به ترتیب بهترین تیمار محیط MS پایه با ۱ میکرومولار ۶-بنزیل آمینوپورین (BAP) و MS پایه با ۱ میکرومولار BAP و ۰/۵ میکرومولار نفتالین استیک اسید (NAA) بوده، در حالی که برای ژنوتیپ موریتا II، MS مکمل با ۲ میکرومولار BAP و ۰/۵ میکرومولار NAA به عنوان بهترین تیمار شناخته شده است (Rodriguéz-Páez *et al*., 2024).

در مطالعه ابراهیمی و همکاران (2017) کشت درون شیشه‌ای گیاه استویا با استفاده از ریزنمونه‌های تک گره بدون برگ در محیط‌های کشت MS پایه ، B5 و LS بررسی شد. این محیط‌ها حاوی غلظت‌های مختلف بنزیل آمینو پورین همراه با ایندول استیک اسید یا ایندول بوتریک اسید بودند. نتایج نشان داد که تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA بیشترین میزان تولید شاخه اصلی را به همراه داشته است. بهینه رشد استویا در دمای ۲۵ درجه سلسیوس بود و از بین دو شدت نور بررسی شده، شدت نور $55\mu mol \cdot m^{2} \cdot s^{-1}$ سبب افزایش میزان رشد گیاهچه‌ها شد. پژوهش حاضر با هدف دست یابی به پروتکل مناسب برای ریزازدیادی گیاه *Stevia rebaudiana* و بررسی اثر تنظیم کننده‌های مختلف رشدی انجام شد.

مواد و روش‌ها

ضدعفونی بذر

در این آزمایش از بذر چینی *Stevia rebaudiana* که از پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران دریافت شده بود، استفاده شد. بذرها زیر کابین استریل (لامینار ایرفلو) به مدت ۳۰ ثانیه در اتانول ۷۰ درصد قرار گرفتند و سپس با آب استریل شسته شدند. در ادامه به مدت ۱۵ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم (NaOCl) تجاری دو درصد غوطه ور شده و سپس چهار بار با آب استریل شسته شدند.

کاشت بذر و محاسبه درصد جوانه‌زنی

بذرهای استریل به طور کاملاً تصادفی انتخاب و تحت شرایط استریل بر روی محیط کشت MS حاوی ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۷ گرم در لیتر آگار کشت شدند. کشت بذرها در سه تکرار و هر تکرار شامل یک شیشه کشت با ۲۰ بذر بود. بذرها به طور یکنواخت و با فاصله مناسب از یکدیگر قرار داده شدند. شیشه‌های کشت در شرایط محیطی کنترل شده با دمای ۲±۲۴ درجه سلسیوس، رطوبت ۶۵ درصد و دوره نوری ۸/۱۶ ساعت (۱۶ ساعت روشنایی / ۸ ساعت تاریکی) قرار گرفتند. اولین شمارش جوانه‌ها در روز چهارم و آخرین شمارش در روز هشتم انجام شد. معیار جوانه‌زنی، خروج ریشه چه به اندازه حدود دو میلی‌متر بود و درصد جوانه‌زنی محاسبه شد.

بهینه سازی پرآوری

آزمایش‌های بهینه سازی پرآوری در قالب طرح کاملاً تصادفی و براساس آزمایش فاکتوریل انجام گرفت. سه ترکیب هورمونی شامل اسید جیبرلیک، بنزیل آمینو پورین و کینتین در غلظت‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفتند: ۱) ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر جیبرلیک اسید (GA3) و ۲ میلی‌گرم در لیتر کینتین (KIN) ۲) ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آمینو پورین (BAP) و ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر کینتین (KIN) ۳) ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آمینو پورین (BAP) و ۲ میلی‌گرم در لیتر کینتین (KIN). هر غلظت شامل سه تکرار و هر تکرار شامل یک شیشه کشت با پنج ریزنمونه بود. تیمارهای مورد بررسی براساس بررسی منابع انتخاب شدند.

پنج هفته پس از جوانه‌زنی بذرها، قطعاتی به طول یک سانتی‌متر از میان‌گره و نوک ساقه در شرایط استریل مطابق شکل ۱ جدا شد. ریزنمونه‌ها به محیط باززایی دارای ۴۰ میلی‌لیتر محیط کشت پایه MS (۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۷

گرم در لیتر آگار) با غلظت‌های مشخصی از هورمون‌ها منتقل گردید. ظرف‌های مورد استفاده شیشه‌هایی با قطر ۷ و ارتفاع ۹ سانتی‌متر بودند. pH محیط کشت پیش از اتوکلاو روی ۵/۸ تنظیم شد و سپس در اتوکلاو با فشار یک اتمسفر و دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس استریل شد. پس از انتقال ریزنمونه‌ها به شیشه‌های کشت، به اتاق رشد با دمای ۲±۲۴ درجه سلسیوس، رطوبت ۶۵ درصد و دوره نوری ۸/۱۶ ساعت (۱۶ ساعت روشنایی /۸ ساعت تاریکی) منتقل شدند. صفات مورد بررسی شامل میانگین تعداد برگ، تعداد ریزشاخه ایجاد شده در هر ریزنمونه، میانگین طول ریزنمونه و وزن تر بودند که پس از شش هفته اندازه‌گیری شدند.

بهینه سازی ریشه‌زایی

پس از شاخه‌زایی، ریزنمونه‌ها در محیط‌های ریشه‌زایی قرار گرفتند. محیط ریشه‌زایی شامل محیط کشت MS پایه حاوی ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۷ گرم در لیتر آگار با انواع و غلظت‌های مختلف هورمون‌ها بود و pH آن روی ۵/۸ تنظیم شده بود. سه تیمار ریشه‌زایی براساس هورمون‌ها و غلظت‌های مختلف آنها استفاده شد که عبارت بودند از: ۱) ۱ میلی‌گرم در لیتر ایندول ۳ بوتیریک اسید (IBA)، ۲) ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر نفتالین استیک اسید (NAA) و ۱ میلی‌گرم در لیتر ایندول استیک اسید (IAA)، ۳) ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر نفتالین استیک اسید. هر تیمار با سه تکرار و هر تکرار با سه ریزنمونه انجام شد. پس از چهار هفته، درصد ریشه‌زایی، تعداد و میانگین طول ریشه‌ها مورد ارزیابی قرار گرفتند.

آنالیز آماری

پس از اندازه گیری صفات مورد مطالعه، تحلیل و بررسی داده‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۷ و SAS انجام شد، تجزیه واریانس داده‌ها با استفاده از ANOVA و همچنین مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام گرفت. برای مشخص کردن ارتباط احتمالی صفات، همبستگی پیرسون انجام شد و برای رسم نمودار از نرم افزار Excel استفاده گردید.

نتایج

جوانه‌زنی بذرها

در روز چهارم به ترتیب سه، سه و چهار و در روز هشتم به ترتیب هفت، هشت و هشت بذر از بیست بذر موجود در هر تکرار جوانه زده بود. به عبارتی درصد جوانه‌زنی در این رقم استویا در روز چهارم ۱۶/۶۶ درصد و در روز هشتم ۳۸/۳۳ درصد بود.

بهینه سازی پرآوری

نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که صفات تعداد برگ و وزن تر (با $P>0/01$) و صفات تعداد ریزشاخه تولید شده و طول ریزنمونه (با $P>0/01$)، به طور معنی‌داری تحت تاثیر هورمون‌ها قرار گرفته‌اند (جدول ۱، شکل ۲).

مقایسه میانگین تیمارهای مختلف تنظیم کننده‌های رشد نشان داد که افزایش طول ریزنمونه و تعداد برگ‌ها در ریزنمونه‌های مورد بررسی، به صورت معنی‌داری تحت تاثیر نوع و غلظت هورمون‌ها قرار گرفته است (شکل ۳). بیشترین تعداد برگ و ریزشاخه (به ترتیب با میانگین حدود ۷۴ برگ و ۷ ریزشاخه) در تیمار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۲ میلی‌گرم در لیتر KIN مشاهده شد، در حالی که در همین تیمار کمترین طول ریزنمونه و کمترین وزن تر یافت شد. بیشترین وزن تر (۴۳۷/۲۹ mg)، طول ریزنمونه (۱۵/۳۸ cm) و کمترین تعداد ریزشاخه مربوط به تیمار ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر GA3 و ۲ میلی‌گرم در لیتر KIN بود. کمترین تعداد برگ در تیمار، ۰/۵میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیترKIN مشاهده شد ولی تفاوت معنی‌داری با تیمار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۲ میلی‌گرم در لیتر KIN نداشت (شکل ۳).

Figure 1. Prepared samples for transfer to the shoot induction medium. A) Cutting the plant to prepare the node to transfer to the shoot induction medium. B) Explants transferred to the shoot induction medium

Figure 2. The effect of three different treatments after six weeks of cultivation of Stevia on MS medium. From left to right, the treatments are 1.5 mg/L GA3+ 2 mg/L KIN, 0.5 mg/L BAP + 0.25 mg/L KIN, and 0.5 mg/L BAP+2 mg/L KIN.

Table 1. Variance analysis of the effect of different treatments on the mean square of morphological traits evaluated in the MS medium of Stevia.

Sources of variance	Df	Mean of squares			
		Number of leaves	Number of sub-branches	Sample length	Fresh weight
Concentration	2	1705.55*	24.19*	54.46*	15053.52
Error	6	1.24	0.02	0.33	26.65
Coefficient of variation (%)		2.3	2.9	5.5	1.4

* and ** indicate significance at the 5% and 1% levels, respectively, and values without asterisks are non-significant.

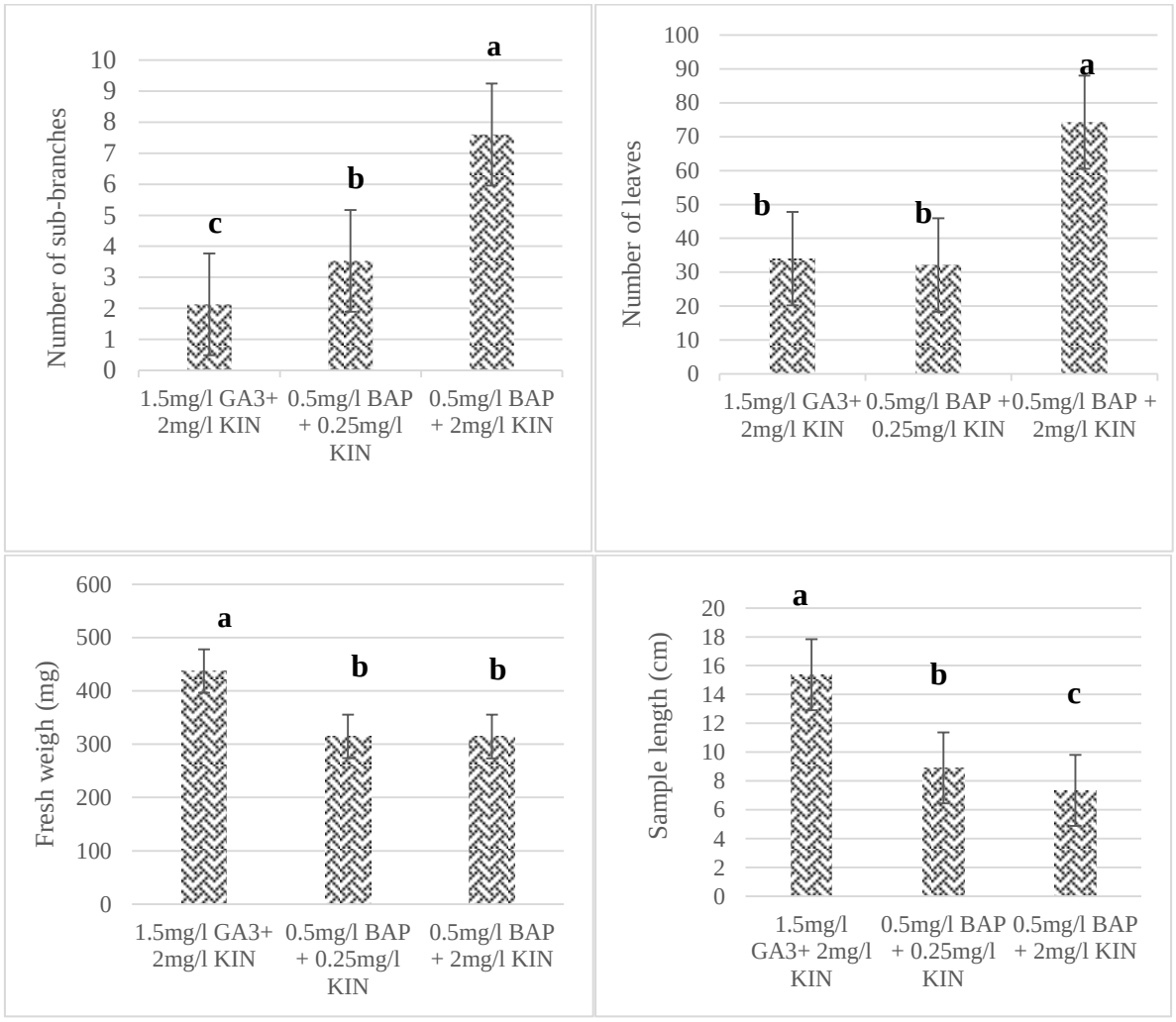

Figure 3. The effect of different treatments on the comparison of the morphological traits in MS medium cultivation of Stevia.

نتایج همبستگی نشان داد که بین صفات تعداد برگ و طول ریزنمونه (**۰/۶۱-)، تعداد برگ و وزن تر (**۰/۴۶-)، تعداد ریزشاخه و طول ریزنمونه (**۰/۸۱-) و تعداد ریزشاخه و وزن تر (**۰/۶۹-) در سطح احتمال یک درصد ارتباط منفی و معنی‌داری وجود داشته است. بین صفات تعداد برگ و تعداد ریزشاخه (**۰/۹۵) و طول ریزنمونه و وزن تر (**۰/۹۸) ارتباط مثبت و معنی‌داری مشاهده شده است (شکل۴).

بهینه سازی ریشه‌زایی

نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که صفات تعداد و طول ریشه، به طور معنی‌داری (به ترتیب با P>۰/۰۵ و P>۰/۰۱) تحت تاثیر هورمون‌ها قرار گرفته‌اند (جدول ۲، شکل ۵).

نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد که صفات تعداد و طول ریشه به طور معنی‌داری تحت تاثیر تیمارهای مختلف قرار گرفتند (شکل۶). تاثیر غلظت‌های مختلف هورمونی بر صفات اندازه گیری شده در قالب نمودار در شکل ۶ نشان داده شده است. بیشترین طول ریشه در تیمار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و بیشترین تعداد ریشه در تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA مشاهده شد. نتایج همبستگی نشان بین صفت طول ریشه و تعداد ریشه در سطح احتمال ۱٪ رابطه منفی و معنی‌داری (**۰/۸۰-) وجود داشته است.

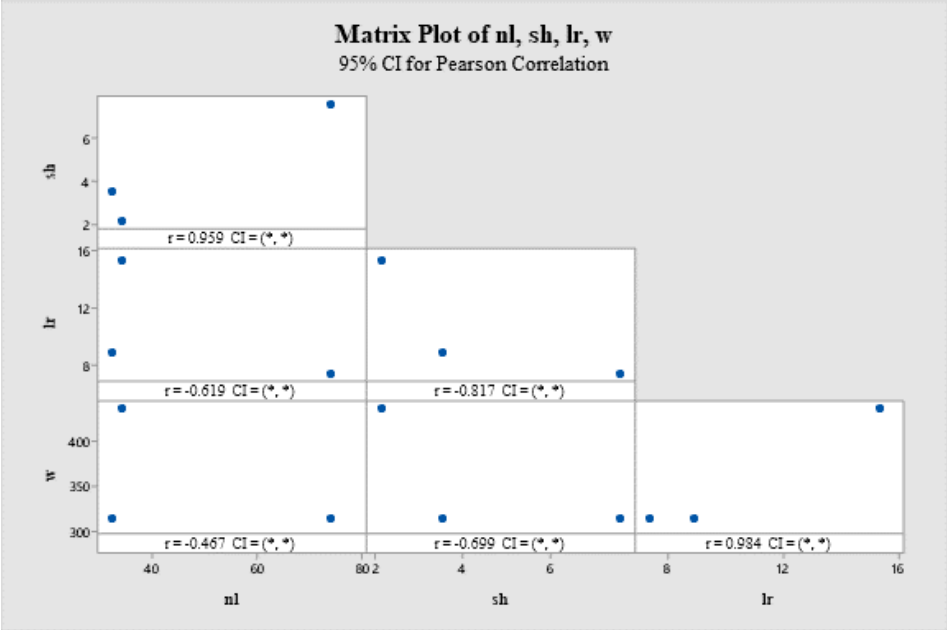

Figure 4. The plot is related to the correlation of studied traits. The correlation of traits to studied treatments for Shoot induction based on the matrix plot is shown in Figure 5. If the treatments are arranged in a way that the rectangle's diagonal can be drawn in an ascending manner, it indicates a positive correlation, and if the treatments are arranged in a way that the rectangle's diagonal can be drawn in a descending manner, it indicates a negative correlation. the correlation coefficient ranges from -1 to +1. The closer the treatments (blue circles) are to the diameter, the greater the numerical value of the correlation will be.

Figure 5. The effect of different treatments on root induction of Stevia. From left to right, 0.5 mg/L NAA, 1 mg/L IAA, 0.5 mg/L NAA, and 1 mg/L IBA.

Table 2. Variance analysis of the effect of different treatments on the mean square of morphological traits in the MS medium of Stevia

Sources of variance	df	Mean of squares	
		Root length	Number of roots
Concentration	2	0.78*	356.76**
Error	6	0.01	0.40
Coefficient of variation (%)		0.9	2.9

* and ** indicate significance at the 5% and 1% levels, respectively, and values without asterisks are non-significant.

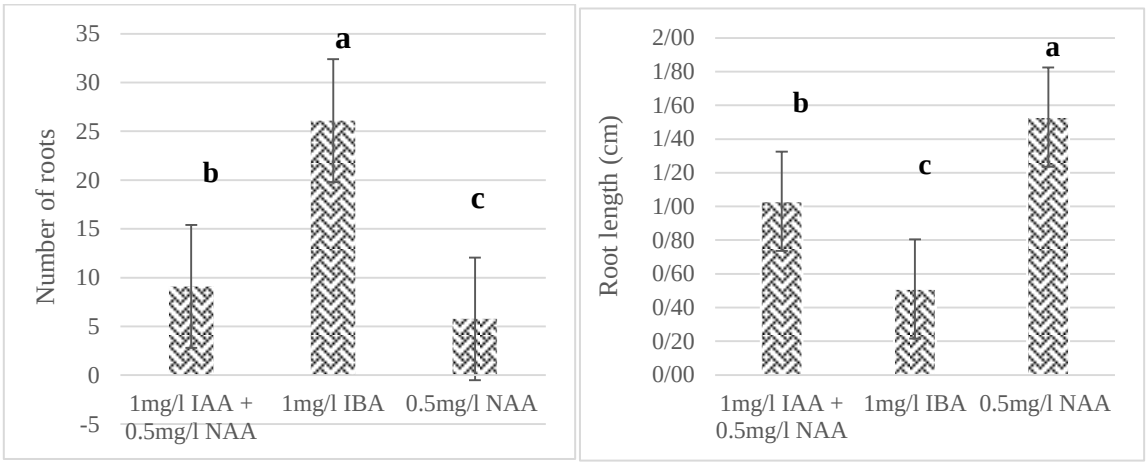

Figure 6. The effect of different treatments on the comparison of the morphological traits in MS medium cultivation of Stevia.

بحث

نتایج حاصل از ارزیابی درصد جوانه‌زنی نشان داد که استویا درصد جوانه‌زنی نسبتاً پایینی (۳۸/۳۳٪) دارد که این موضوع در مطالعات پیشین نیز گزارش شده است (Ucar *et al*., 2016; Simlat *et al*., 2019; Shahverdi *et al*., 2017). پایین بودن نرخ جوانه‌زنی گیاه استویا ممکن است به دلایلی همچون کیفیت پایین بذرها، شرایط نامناسب محیطی (نظیر نور و رطوبت) و همچنین نیاز به تیمارهای پیش از کاشت برای افزایش توان جوانه‌زنی بذرها، مرتبط باشد (Afshari *et al*., 2022; Simlat *et al*., 2016). این امر نشان می‌دهد که ازدیاد استویا از طریق بذر به تنهایی روش کارآمدی برای تولید انبوه و تجاری این گیاه نیست (Simlat *et al*., 2016).

استفاده از روش ریزازدیادی به عنوان یک جایگزین کارآمد و موثر برای ازدیاد استویا پیشنهاد می‌شود (Vilariño *et al*., 2023) که می‌تواند افزون بر حذف محدودیت‌های فصلی در کشت، به تسریع رشد و افزایش این گیاه کمک کند (Medorio-García *et al*., 2024). ریزازدیادی در گیاهان به عوامل متعددی چون نوع رقم، ریزنمونه، غلظت و ترکیب تنظیم کننده‌های رشدی در گیاهان بستگی دارد (Zarei *et al*., 2018; Bagheri *et al*., 2015). به عنوان مثال تنظیم کننده‌های رشدی می‌توانند از طریق تسریع تقسیم سلولی نقش مهمی در افزایش طول شاخه ایفا می‌کنند (Wu *et al*., 2021; Ahmed and Anis, 2014). افزایش نسبت سیتوکنین به اکسین، باعث افزایش شاخه‌زایی می‌شود، در حالی که کاهش این نسبت، کاهش شاخه‌زایی را به همراه خواهد داشت (Kurepa *et al*., 2022). Taiz و Zeiger (2002) نیز اشاره کرده‌اند که سیتوکنین‌ها با جلوگیری از غالبیت انتهایی، رشد جوانه‌های جانبی را افزایش می‌دهند، در حالی که اکسین‌ها با ممانعت از رشد جوانه جانبی و تحریک غالبیت انتهایی منجر به رشد طولی ساقه می‌شوند (Zarei *et al*., 2018; Taiz and Zeiger 2002). شاخه‌زایی بالا می‌تواند با جذب سیتوکنین خارجی، سوخت و ساز سیتوکنین، انتقال پیام و تعامل با سایر هورمون‌ها مرتبط باشد. در برخی موارد استفاده از سیتوکنین خارجی می‌تواند تولید سیتوکنین داخلی را القا کرده و تعاملی بین هورمون‌ها ایجاد کند (Zarei *et al*., 2018).

نتایج این پژوهش نشان داد بیشترین تعداد برگ و ریزشاخه در تیمار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۲ میلی‌گرم در لیتر KIN مشاهده شد، در حالی که بیشترین وزن تر و طول ریزنمونه مربوط به تیمار ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر GA3 و ۲ میلی‌گرم در لیتر KIN بوده است. نتیجه پژوهش Iapichino و Airo (2009) نشان داد که BAP در ایجاد شاخه‌های جدید و شکستن غالبیت انتهایی نقش دارد و

همچنین گزارش شده که با افزایش میزان BAP طول شاخه کم خواهد شد (Zarei *et al*., 2018) که با نتایج این پژوهش سازگاری دارد. پژوهش‌های پیشین بر روی گیاهان دیگر نشان داده‌اند که ۶- بنزیل آمینو پورین (BAP) بیشترین تاثیر را در پرآوری داشته است (Aghaye and Yadollahi, 2012; Zuraida *et al*., 2016; Saini*et et al*., *2016*). طبق نتایج این پژوهش و مطالعات دیگر جهت غلبه بر ممانعت از تاثیر BAP و تشویق شاخساره‌ها به رشد طولی، استفاده از جیبرلیک اسید در محیط پرآوری توصیه می‌شود (Bhojwani *et al*., 2013). افزون بر این، نتایج برخی پژوهش‌ها بیانگر آن است که در گیاه استویا هورمون سیتوکنین BAP نسبت به هورمون سیتوکنین KIN اثر بیشتری بر تعداد شاخه‌ها دارد، در حالی KIN در افزایش طول شاخه موثرتر است (Razak *et al*., 2014; Ahmed and Anis, 2014; Thiyagarajan and Venkatachalam, 2012). در این پژوهش نیز تایید شد که حضور تیمار KIN در افزایش طول شاخه موثر بوده است، اما هنگام استفاده توام دو هورمون KIN و BAP، علیرغم میزان کمتر BAP اثر گذاری آن بیشتر بوده و سبب افزایش تعداد شاخه شده است.

به طور کلی آنچه از نتایج این پژوهش به دست آمد این است که با افزایش تعداد شاخه هر چند تعداد برگ افزایش یافت اما برگ‌های ایجاد شده کوچک و ضعیف بودند. به عبارتی زمانی که گیاه به سمت افزایش تولید شاخه سوق داده می‌شود هر چند تعداد برگ‌ها افزایش می‌یابد، اما برگ‌های ایجاد شده، برگ‌های کوچکی هستند. نتایج همچنین نشان داد که با افزایش تعداد شاخه‌ها، طول ریزنمونه کاهش یافته است و بین تعداد ریزشاخه و طول ریزنمونه نسبت عکس وجود دارد. پژوهش‌های Huan *et al*. (2014) وAmare و Kassahun (2021) نتایج مشابهی را گزارش کرده‌اند. Huan *et al*. (2014) این پدیده را اینگونه توجیه کرده اند که افزایش تعداد شاخه‌ها ممکن است منجر به رقابت شدیدتر در میان برگ‌ها بر سر منابع نور شود که این امر به کاهش نرخ خالص فتوسنتزی، سطح برگ کوچک‌تر و طول ساقه کوتاه‌تر در هر شاخه منجر می‌شود، زیرا برگ‌ها برای جذب نور و منابع مورد نیاز برای تولید زیست توده رقابت می‌کنند.

ریشه‌زایی در کشت بافت نقش حیاتی در تکثیر موفق گیاهان دارد (Jangid *et al*., 2024)، زیرا ریشه‌ها نه تنها باعث تثبیت گیاه در محیط کشت می‌شوند، بلکه به عنوان اصلی‌ترین مسیر جذب آب و مواد مغذی عمل می‌کنند و در نتیجه رشد و بقاء گیاه را تضمین می‌کنند. یک سیستم ریشه‌ای قوی و توسعه‌یافته، همچنین مقاومت گیاه را در برابر تنش‌های محیطی مانند خشکی و شوری افزایش می‌دهد و به تسهیل فرآیند انتقال از شرایط کنترل‌شده آزمایشگاهی به محیط طبیعی کمک می‌کند. بنابراین، بهینه‌سازی ریشه‌زایی در کشت بافت برای افزایش نرخ بقای گیاهان و دستیابی به تولیدی موفق و پایدار ضروری است.

پژوهش‌های انجام شده در مورد گیاه استویا نشان داده‌اند که محیط MS حاوی یک میلی‌گرم در لیتر IBA منجر به ایجاد بیشترین تعداد ریشه می‌شود (Razak *et al*., 2014; Tadhani *et al*., 2007; Zarei *et al*., 2018). یافته‌های این تحقیق نیز این موضوع را تایید کرده است. Razak *et al* (2014) در پژوهشی بیشترین تعداد ریشه القا شده را در محیط کشت MS دارای ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA و طولانی ترین ریشه را در محیط MS دارای ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IAA گزارش کرده‌اند. همچنین اشاره کردند که ریشه‌ها در محیط حاوی IBA، ضخیم و قوی اما کوتاه و در محیط حاوی IAA نازک اما بلند بوده‌اند. همچنین وجود NAA عاملی برای افزایش تعداد ریشه معرفی شده است این در حالی است که این هورمون در القای ریشه‌های بلند ناکارآمد بوده است. یافته‌های این تحقیق نشان داد که تیمار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA تسبت به سایر تیمارها برای ریشه‌زایی (از لحاظ تعداد و طول ریشه) مناسب تر بوده است. همچنین نتایج این تحقیق حاکی از آن است که بین تعداد و طول ریشه رابطه معکوسی وجود دارد، به این معنا که با افزایش تعداد ریشه، طول ریشه کوتاه‌تر می‌شود. این امر

ممکن است به دلیل محدودیت منابع غذایی و آبی موجود برای رشد ریشه‌ها باشد که منجر به رقابت میان ریشه‌ها و در نتیجه کاهش طول آنها می‌گردد. گیاهانی که تعداد ریشه‌های جانبی، تراکم طول ریشه و نسبت ریشه به اندام هوایی بیشتری دارند، مقاومت و تحمل بیشتری نسبت به کم آبی و تنش خشکی نشان می‌دهند. قابلیت گیاهان از نظر جذب آب و مواد غذایی از خاک به ظرفیت، توسعه و مقاومت سیستم ریشه‌ای در برابر تنش‌های محیطی بستگی دارد. سیستم ریشه عمیق می‌تواند به گیاه در دسترسی بیشتر به منابع آب و مواد غذایی کمک کند (Zhang *et al*., 2024). با استفاده از پروتکل به دست آمده برای ریزازدیادی در این پژوهش (تیمار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۲ میلی‌گرم در لیتر KIN برای شاخه‌زایی و تیمار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA برای ریشه‌زایی) در مقایسه با سایر پروتکل‌ها، در زمان کوتاه‌تر و با مقدار و تنوع هورمونی کمتر، عملکرد بالاتری حاصل شد. براساس نتایج پژوهش Röck-Okuyucu *et al*. (2016) افزودن میزان زیادی از تنظیم کننده‌های رشدی باعث کاهش میزان استویول گلیکوزیدهای تولیدی در گیاه شده است. همچنین تنظیم کننده های رشدی ارائه شده با توجه به میزان هورمون‌های استفاده شده می‌تواند پروتکل مناسبی برای تولید اقتصادی این گیاه باشد.

نتیجه‌گیری

پایین بودن درصد جوانه‌زنی استویا نشان می‌دهد که افزایش از طریق بذر به‌تنهایی نمی‌تواند پاسخگوی نیازهای تولید انبوه این گیاه باشد و روش ریزازدیادی به دلیل کاهش محدودیت‌های فصلی و افزایش سرعت تکثیر، راه‌حل مناسبی برای این چالش است. بررسی اثر هورمون‌ها نشان داد که ترکیب مناسب و متعادل تنظیم‌کننده‌های رشد، می‌تواند به‌طور قابل‌توجهی در میزان تولید شاخه‌ها، برگ‌ها و ریشه‌ها را افزایش دهد. پروتکل معرفی‌شده در این پژوهش برای شاخه‌زایی تیمار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۲ میلی‌گرم در لیتر KIN و برای ریشه زایی تیمار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA بود که با موفقیت توانست در زمان کوتاه‌تر و با استفاده از مقادیر کمتر هورمون‌ها به نتایج مطلوبی دست یابد، که این موضوع می‌تواند زمینه‌ساز تولید اقتصادی و تجاری این گیاه ارزشمند باشد.

سپاس‌گزاری

از جناب آقای دکتر فواد مرادی به خاطر تامین بذرهای مورد نیاز این پژوهش، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌کنیم.

References

Afshari, F., Nakhaei, F., Mosavi, S., & Seghatoleslami, M. (2022). Physiological and biochemical responses of *Stevia rebaudiana* Bertoni to nutri-priming and foliar nutrition under water supply restrictions. *Industrial Crops and Products*, 176, 114399.

Aghaye, R. N. M., & Yadollahi, A. (2012). Micropropagation of GF 677 rootstock. *Journal of Agricultural Science*, 4(5), 131-138.

Ahmadi Khoei, M., & Karamian, R. (2022). Effect of *Priformospora indica* inoculation on biological activity of *Stevia rebaudiana* plants treated with selenium nanoparticles. *Plant Productions*, 45(3), 361-373. [In Persian]

Ahmed, R., & Anis, M. (2014). Rapid in vitro propagation system through shoot tip cultures of *Vitex trifolia* L. an important multipurpose plant of the pacific traditional medicine. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 20, 385-392.

Amare, K., & Kassahun, A. (2021). Participatory variety selection for released white common bean varieties in south Gondar Zone Ethiopia. *Heliyon*, 7(12), 1-8.

Arumugam, B., Subramaniam, A., & Alagaraj, P. (2020). Stevia as a Natural Sweetener: A Review. Cardiovasc. *Hematological Agents in Medicinal Chemistry*, 18(2), 94-103.

Bagheri, M. S., Saidi, A., Jari, S. K., & Goodarzi, G. (2015). Effects of different hormonal concentrations on damask rose (Rosa damascena Mill.) micro-propagation in liquid tissue culture medium. *International Journal of Biosciences*, 6(6), 10-16.

Bhojwani, S.S., & Dantu, P.K. (2013). Micropropagation. In: Plant Tissue Culture: An Introductory Text. India: Springer.

Ebrahimi, M., Mokhtari, A., & Amirian, R. (2017). Effects of basal media and some physical parameters on micropropagation of stevia *(Stevia rebaudiana* Bertoni). *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research*, 33(3), 373-385. [In Persian]

Galo, E. V. (2019). In Situ clonal propagation of Stevia (*Stevia rebaudiana*, Bertoni) using hormones. *American Journal of Plant Sciences*, 10(10), 1789-1796.

Gantait, S., Das, A., & Mandal, N. (2015). Stevia: A comprehensive review on ethnopharmacological properties and in vitro regeneration. *Sugar Tech*, 17(2), 95-106.

Huan, H., Xu, X., Liu, G., He, J., Yang, Y., & Huang, K. (2014). Effect of branch number on the growth and development of Morus alba saplings. *Acta Ecologica Sinica*, 34(4), 823-830.

Iapichino, G., & Airò, M. (2009). Multiplication of Crataegus monogyna by in vitro culture of nodal segments. *Acta Horticulturae*, 812, 135-140.

Jangid, V. K., Senthil-Kumar, M., Chandran, D., & Sinharoy, S. (2024). Callus induction and efficient in vitro plant regeneration protocol for Chickpea. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*,156(1), 21.

Kurepa, J., & Smalle, J. A. (2022). Auxin/cytokinin antagonistic control of the shoot/root growth ratio and its relevance for adaptation to drought and nutrient deficiency stresses. *International journal of molecular sciences*, 23(4), 1933.

Lukatkin, A. S., & Silva, J. A. T. (2007). Effects of cultivation parameters of *Stevia rebaudiana* Bertoni callus culture on callus proliferation. *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology*, 107-111.

Medorio-García, H. P., Hernández-Domínguez, E., Andueza-Noh, R. H., López-Aguilar, D. R., & Ramírez-Mosqueda, M. A. (2024). Micropropagation Methods in Temporary Immersion Systems. New York: Springer.

Michalec-Warzecha, Ż., Pistelli, L., D'Angiolillo, F., & Libik-Konieczny, M. (2016). Establishment of highly efficient agrobacterium rhizogenes-mediated transformation for *Stevia rebaudiana* Bertoni explants. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 58(1), 113-118.

Moradi, F. (2017). Stevia and its trade in Iran and the world. *Research Achievements for Field and Horticulture Crops*, 6(1), 13-24. [In Persian]

Mthembu, Z. (2017). Development of a hairy root bioreactor from *Stevia rebaudiana* to produce steviol glycosides. Doctoral dissertation. Stellenbosch University, South Africa.

Omidi, H., Bostani, A., & Gorzi, A. (2019). Effects of chemical treatments (Iron, zinc and salicylic acid) and soil water potential on steviol glycosides of Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni.). *Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, 39(1), 297- 311. [In Persian]

Razak, U. N. A. A., Ong, C. B., Yu, T. S., & Lau, L. K. (2014). In vitro micropropagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni in Malaysia. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 57, 23-28.

Röck-Okuyucu, B., Bayraktar, M., Akgun, I. H., & Gurel, A. (2016). Plant growth regulator effects on in vitro propagation and stevioside production in *Stevia rebaudiana* Bertoni. *HortScience*, 51(12), 1573-1580.

Rodriguéz-Páez, L. A., Pineda-Rodriguez, Y. Y., Pompelli, M. F., Jimenez-Ramirez, A. M., Genes-Avilez, O. J., Jaraba-Navas, J. D. D., & Rodríguez, N. V. (2024). Micropropagation protocols for three elite genotypes of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Horticulturae*, 10(4), 404.

Saini, H., Arya, I. D., Arya, S., & Sharma, R. (2016). In vitro micropropagation of Himalayan weeping bamboo, Drepanostachyum falcatum. *American Journal of Plant Sciences*, 7(9), 1317-1324.

Schiatti-Sisó, I. P., Quintana, S. E., & García-Zapateiro, L. A. (2023). Stevia (*Stevia rebaudiana*) as a common sugar substitute and its application in food matrices: an updated review. *Journal of Food Science and Technology*, 60(5), 1483-1492.

Shaafi, B., Mousavi, S. S., Bagheney, S. G. H., Abdollahi, M. R., & Sarikhani, H. (2018). Micropropagation drug plant Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) through cultivation two explants end buds and node with various concentrations activated charcoal and hormones BAP and Kn. *Molecular Cell Research*, 33(3), 289-301. [In Persian]

Shahverdi, M. A., Omidi, H., & Tabatabaei, S. J. (2017). Effect of nutri-priming on germination indices and physiological characteristics of stevia seedling under salinity stress. *Journal of Seed Science*, 39, 353-362. [In Persian]

Simlat, M., Skrzypek, E., Warchoł, M., Maciaszek, I., & Ptak, A. (2019). Evaluation on *Stevia rebaudiana* Bertoni seed germination and seedling development under phytohormones treatment. *Scientia Horticulturae*, 257, 1-13.

Simlat, M., Ślęzak, P., Moś, M., Warchoł, M., Skrzypek, E., & Ptak, A. (2016). The effect of light quality on seed germination, seedling growth and selected biochemical properties of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Scientia Horticulturae*, 211, 295-304.

Tadhani, M. B., Patel, V. H., & Subhash, R. (2007). In vitro antioxidant activities of *Stevia rebaudiana* leaves and callus. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20(3), 323-329.

Taiz, L., & Zeiger, E. (2002). Plant Physiology. Sunderland: Sinauer Associates.

Thiyagarajan, M., & Venkatachalam, P. (2012). Large scale in vitro propagation of *Stevia rebaudiana* (bert) for commercial application: Pharmaceutically important and antidiabetic medicinal herb. *Industrial Crops and Products*, 37(1), 111-117.

Ucar, E., Özyiğit, Y., & Turgut, K. (2016). The effects of light and temperature on germination of Stevia (*Stevia rebaudiana* Bert.). *Journal of Agricultural Engineering Research*, 3, 37-40.

Vilariño, S., Florido, M. D. C., García, J. L., & Cantos, M. (2023). Effects of culture system and substrate composition on micropropagated plantlets of two varieties of *Stevia rebaudiana* Bert. *Physiologia*, 3(1), 74-85.

Wang, Y., Luo, X., Chen, L., Mustapha, A., Yu, X., Zhou, C., & Okonkwo, C. E. (2023). Natural and low-caloric rebaudioside A as a substitute for dietary sugars: A comprehensive review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 22(1), 615-642.

Wu, W., Du, K., Kang, X., & Wei, H. (2021). The diverse roles of cytokinins in regulating leaf development. *Horticulture Research*, 8: 118.

Zarei, M., Dezhsetan, S., & Behnamian, M. (2018). Micropropagation stevia medicinal plant (*Stevia rebaudiana*) using proliferation of shoot tip. *Genetic Engineering and Biosafety Journal*, 6(2), 245-256. [In Persian]

Zhang, Y., Wu, X., Wang, X., Dai, M., & Peng, Y. (2024). Crop root system architecture in drought response. *Journal of Genetics and Genomics*. 1-10.

Zuraida, A.R., Shukri, M., Sabrina, M.N., Nazreena, O.A., Zain, C.R., Pavallekoodi, G., & Sreeramanan, S. (2016). Micropropagation of ginger (*Zingiber officinalevar*. rubrum) using buds from microshoots. *Pakistan Journal of Botany*, 48(3), 1153-1158.