نشریه علمی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران
جلد ۲۷، شماره ۱، صفحه ۱۱۹-۱۰۸ (۱۳۹۸)

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/ijrfpbgr.2019.122341.1308
شناسه دیجیتال (DOR): 98.1000/1735-0891.1398.27.103.53.1.1575.41

اثر عوامل مختلف بر رویان‌زایی بدنی گیاه استویا (*Stevia rebaudiana* Bertoni)

صغری رضایی‌گنجه[۱]، مریم دهستانی اردکانی[۲] و کاظم کمالی علی‌آباد*[۳]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه اردکان، اردکان، ایران
۲- استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه اردکان و پژوهشکده گیاهان داروئی و صنعتی، اردکان، ایران
۳- نویسنده و مسئول مکاتبات، استادیار، گروه علوم خاک‌شناسی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه یزد، یزد، ایران
پست الکترونیک: kkamali@yazd.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۴/۱۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۰/۲۹

چکیده

گیاه استویا (*Stevia rebaudiana* Bertoni) به‌علت محتوای بالای شیرین‌کننده‌های طبیعی قابل استحصال دارای ارزش فوق‌العاده بالایی است. با توجه به اهمیت گیاه از نظر صنعتی و به‌ویژه دارویی، این پژوهش به‌منظور بهینه‌سازی جنین‌زایی بدنی گیاه انجام شد. تولید و القای کالوس رویان‌زا با استفاده از ترکیبات مختلف تنظیم‌کننده‌های رشدی شامل بنزیل آدنین (BA)، نفتالین استیک اسید (NAA) و ۲ و ۴-دی-کلروفنوکسی استیک اسید (2,4-D) در ریزنمونه‌های برگ و جوانه گیاه در محیط کشت MS به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی در پنج تکرار بررسی شد. بیشترین میزان کالوس‌زایی در محیط کشت حاوی ۰/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر BA + ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D و بیشترین میزان رویان‌زایی در تیمار ۰/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر BA +۱ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D حاصل شد. همچنین اثر کازئین هیدرولیزات در پنج سطح (۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) و شیره نارگیل در دو سطح (صفر و ۵۵ میلی‌لیتر) بر رویان‌زایی گیاه استویا توسط دو ریزنمونه برگ و جوانه در آزمایشی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با شش تکرار بررسی شد. در غلظت‌های صفر و ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر کازئین هیدرولیزات به‌ترتیب بیشترین (۲۰/۲ درصد) و کمترین (۷/۸۴ درصد) رویان‌زایی حاصل شد. بیشترین درصد رویان‌زایی (۷۸/۸۲ درصد) در محیط کشت MS بدون شیره نارگیل توسط ریزنمونه‌های جوانه و کمترین درصد رویان‌زایی با ۲۵/۰۹ درصد توسط ریزنمونه‌های برگ به‌دست آمد. پس از آن رویان‌های حاصل به محیط کشت حاوی ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر GA_3 (اسید جیبرلیک) برای اندام‌زایی انتقال یافتند و در این بین ۱۸/۰۳ درصد از رویان‌ها به گیاهچه کامل تبدیل شدند.

واژه‌های کلیدی: بنزیل آدنین، زغال فعال، شیره نارگیل، کازئین هیدرولیزات، کشت بافت

مقدمه

دیابت یکی از شایع‌ترین بیماری‌های جوامع بشری است. بنابراین استفاده از شیرین‌کننده‌های طبیعی به‌ویژه اگر افراد مبتلا به دیابت نیز بتوانند از آنها استفاده کنند، اهمیت زیادی پیدا نموده‌اند. در این میان استویا با نام علمی *Stevia rebaudiana* Bertoni. یک گیاه علفی شیرین مزه و ضد دیابت از تیره Asteraceae می‌باشد که شیرینی آن ۳۰۰ برابر بیشتر از شکر تخمین زده شده است (Aggarwal et al., 2011; Altaf *et al.*, 2013). این گیاه با ارزش در حال حاضر به‌عنوان منبع قندی کم کالری و بدون ساکارز می‌باشد و می-تواند جایگزین مناسبی برای شیرین‌کننده‌های مصنوعی مانند آسپارتام، ساخارین و سیکلامات باشد، بدون آنکه اثرهای

ناشی از سوء مصرف این شیرین‌کننده‌ها را به همراه داشته باشد (Babber et al., 2001). در آینده نزدیک، استویا می‌تواند به‌عنوان یک منبع شیرین‌کننده قوی جایگزین شکر مصرفی مردم شود (Din et al., 2006). دو گلیکوزید اصلی این گیاه، استویوزید (Stevioside) و ربادیوزید (Rebadioside) است که به‌ترتیب ۵ تا ۱۰ درصد و ۲ تا ۴ درصد از وزن خشک برگ‌ها را شامل می‌شوند و این دو شیرین‌ترین ترکیبات گیاه استویا هستند (Sekaran et al., 2007).

رویان‌زایی بدنی روش جدیدی برای تولید انبوه گیاهان در محیط کشت درون‌شیشه است که با القاء توانایی تولید رویان در سلول‌های بدنی منجر به تولید گیاه کامل می‌شود (Gram et al., 1996). رویان‌زایی بدنی قابلیت بالایی برای ریزازدیادی در مقیاس وسیع به‌ویژه برای گیاهان چوبی و گیاهان دارای چرخه تولیدمثل خاص (همانند ارکیده‌ها) دارد، همچنین سیستمی بسیار کارآمد برای باززایی گیاهان در مهندسی ژنتیک و ایجاد گیاهان تراریخت محسوب می‌شود (Piri Zirkouhi *et al.*, 2009). باززایی گیاهان، ایجاد تنوع رویشی یا همسانی بدنی، بررسی پدیده گزینش درون‌شیشه‌ای و فراهم‌سازی بستری برای تراریختی گیاهان و انتقال ژن‌های کنترل‌کننده ویژگی‌های مطلوب در گیاهان، از سودمندی عملی رویان‌زایی بدنی به‌شمار می‌آید. تولید بذرهای مصنوعی با شرایط مطلوب، بدون آلودگی‌های ویروسی، قارچی و باکتریایی و حفظ دقیق ذخائر توارثی (ژرم‌پلاسم) گیاهان از برتری‌های دیگر رویان‌های بدنی می‌باشد (Moradi *et al.*, 2017).

برای توسعه و رشد کالوس‌های رویان‌زا روی ریزنمونه‌های برگی *Stevia rebaudiana* از آمینواسیدهای تریپتوفان و گلوتامین در غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر و عصاره مخمر، کازئین هیدرولیزات و عصاره سیب‌زمینی به میزان ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر در محیط کشت MS (Murashige & Skoog, 1962) حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D، ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آمینوپوین (BAP) و ۳۰ گرم بر لیتر ساکارز استفاده شد (Das & Mandal, 2010). بر اساس نتایج آنها، بیشترین کالوس‌های سبز رنگ و کروی شکل رویان‌زا در محیط کشت حاوی ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر گلوتامین و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کازئین هیدرولیزات تشکیل شد.

طی آزمایشی Naranjo و همکاران (۲۰۱۵)، به بررسی اثر ترکیبات مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد مختلف بر القاء و توسعه رویان‌های بدنی سه ژنوتیپ استویا (Bertoni، Morita II و SRQ-93) در محیط کشت MS حاوی مکمل‌های محیط کشت شامل آدنین، شیره نارگیل و گلوتامین پرداختند. با توجه به نتایج به‌دست آمده بیشترین تعداد رویان‌های بدنی در هر ریزنمونه در ترکیب ۱۸/۹ میکرومولار 2,4- D و ۷/۸۳ میکرومولار ۲-ایزوپنتیل آدنین (2ip) مشاهده شد. ژنوتیپ، اثر قابل توجهی بر تولید رویان نشان داد، به‌طوری که بیشترین میزان شکل‌گیری و توسعه رویان‌های بدنی در ژنوتیپ SRQ-93 حاصل شد.

به‌منظور بررسی ویژگی‌های القاء کالوس در گیاه استویا، Keshvari (۲۰۱۶) از تیمار هورمونی در ۱۰ سطح به‌همراه شاهد، دو نوع محیط کشت (MS و B5) و دو نوع ریزنمونه (برگ و میانگره) استفاده کرد. نتایج او نشان داد که بهترین تیمار برای درصد القای کالوس و همچنین برای رسیدن به کالوس در کمترین زمان، ترکیب ۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP + ۲ میلی‌گرم بر لیتر NAA و برای بالاترین وزن تر و خشک کالوس، محیط کشت گامبورگ (B5) همراه با ترکیبات ۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP + ۲ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D در قطعات برگ و برای میانگره، ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP + ۰/۲۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D به‌دست آمد.

با توجه به اهمیت تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی و نیز عوامل دیگر مانند کازئین هیدرولیزات، شیره نارگیل و نوع ریزنمونه بر رویان‌زایی بدنی، در این پژوهش به بررسی این عوامل برای بهینه‌سازی رویان‌زایی گیاه استویا پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: به‌منظور بررسی رویان‌زایی بدنی گیاه استویا، ابتدا اقدام به باززایی مستقیم گیاه در شرایط درون شیشه‌ای

شد و بعد نمونه‌های رشدکرده در لوله آزمایش به‌عنوان ریزنمونه برای رویان‌زایی انتخاب شدند. زمانی‌که گیاهچه‌ها کاملاً از نظر رشد طولی و تعداد برگ به‌اندازه کافی رشد کردند، از آنها برای تهیه ریزنمونه استفاده شد. ریزنمونه‌های استفاده شده برای رویان‌زایی بدنی شامل برگ‌ها و جوانه‌های جانبی گیاه استویا بودند. برای کشت ریزنمونه‌های برگی، برگ‌ها را از انتهای دمبرگ جدا نموده و به تعداد سه عدد و ریزنمونه‌های جوانه به طول ۱۰ تا ۱۵ میلی‌متر به تعداد ۴ عدد، داخل محیط کشت قرار داده شدند.

آزمایش اول

محیط و شرایط کشت: در تمام تیمارهای مورد آزمایش، محیط کشت مورد استفاده برای القای کالوس رویان‌زا، محیط کشت MS بود. پس از تهیه محیط کشت ۳۰ گرم در لیتر آگار افزوده و pH محیط‌های کشت برای ایجاد کالوس رویان‌زا روی ۵/۸–۵/۷ تنظیم شد. پس از تنظیم pH، ۷/۵ گرم در لیتر دیفکوباکتو آگار به آن افزوده شد. سپس ۳۰ میلی‌لیتر محیط کشت، به داخل شیشه‌های مربایی (ارتفاع ۱۰ سانتی‌متر و قطر ۶ سانتی‌متر) ریخته شد. پس از اتوکلاو محیط‌های کشت در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و با فشار ۱/۲ اتمسفر به مدت ۱۴ دقیقه نمونه‌های گیاهی به شیشه‌های مربا منتقل شده و به‌مدت ۶ روز در تاریکی نگهداری گردیدند، سپس به اتاقک رشد (در شرایط شدت نور ۲۰۰۰ تا ۲۵۰۰ لوکس در ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و درجه حرارت در دوره تاریکی ۱۸ و در دوره روشنایی ۲۵ تا ۲۶ درجه سانتی‌گراد) منتقل شدند (Pand & Khetmalas, 2012). تیمارهای مورد استفاده برای ایجاد کالوس رویان‌زا به‌شرح جدول ۱ بودند.

جدول ۱– تیمارهای مورد استفاده برای ایجاد کالوس رویان‌زا در آزمایش اول

ترکیبات	تیارها												
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T13
محیط کشت	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS
2,4-D(mgl^{-1})	۲	۰/۵	۱	۱/۵	۲	۲/۵	۱	۰/۵	۲/۵	۲/۵	–	–	–
BA(mgl^{-1})	–	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۵	–	۱	۱	۱	۱	۲
NAA(mgl^{-1})	–	–	–	–	–	–	۰/۵	۰/۵	–	–	۱	۲	۱
آمونیوم نیترات (mgl^{-1})	–	–	–	–	–	–	–	–	–	۱۶۵۰	–	–	–

در مرحله القای کالوس رویان‌زا، از تنظیم‌کننده‌های رشد مختلف استفاده شد. آزمایش‌های مرحله رویان‌زایی بدنی نیز به‌صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی با پنج تکرار انجام شد که شامل ۱۳ تیمار (جدول ۱) با دو ریزنمونه (برگ و جوانه) گیاه استویا بود.

واکشت کالوس‌های رویان‌زا به محیط بدون هورمون: پس از کشت و نگهداری نمونه‌ها در شرایط مناسب برای ایجاد کالوس، واکشت نمونه‌های کالوس‌زده پس از پنج هفته انجام شد. ساختار کالوس‌های ایجاد شده به صورت پفکی، اسفنجی نرم به رنگ سبز بود. انگیزه لازم برای تبدیل به رویان در کالوس‌ها ایجاد شده بود. کالوس‌ها کاملاً به شکل کروی شکل تبدیل شده و برای ادامه روند رشد و برای تبدیل شدن به یک گیاهچه کامل باید مراحل کروی، قلبی شکل و دوکی شکل را طی کنند. به‌همین دلیل کالوس‌های کروی شکل، بلافاصله به محیط کشت MS بدون تنظیم‌کننده رشد با میزان ۳۰ گرم بر لیتر ساکارز، ۷ گرم بر لیتر آگار و با pH برابر ۵/۷ انتقال داده شدند.

آزمایش دوم

بررسی اثر کازئین هیدرولیزات، شیره نارگیل، نوع ریزنمونه و محیط کشت بر تولید کالوس و رویان‌زایی گیاه استویا: برای بررسی تأثیر کازئین هیدرولیزات و شیره نارگیل در تولید کالوس‌های رویان‌زا، آزمایشی به صورت فاکتوریل

در قالب طرح کاملاً تصادفی شامل دو بافت متفاوت (برگ و جوانه) گیاه استویا، چهار غلظت کازئین هیدرولیزات (صفر، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر)، دو سطح شیره نارگیل (صفر و ۵۵ میلی‌لیتر بر لیتر) و دو نوع محیط کشت، در شش تکرار انجام شد. برای القای جنین‌زایی در این آزمایش، ریزنمونه‌ها ابتدا در محیط کشت پایه MS حاوی ۰/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر BA + ۱ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D کشت شدند و پس از دو هفته به محیط کشت جدید انتقال یافتند و اثر سطوح مختلف کازئین هیدرولیزات (صفر، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) و نیز شیره نارگیل (صفر و ۵۵ میلی‌لیتر بر لیتر)، ریزنمونه (برگ و جوانه) و محیط کشت بر رویان‌زایی مورد بررسی قرار گفت.

دو نوع محیط کشت مورد استفاده، به‌شرح زیر بودند.

۱- محیط کشت MS + ۰/۰۵ میلی‌گرم بر لیتر BA

۲- محیط کشت MS + ویتامین‌های B5 (۲ میلی‌گرم بر لیتر گلایسین + ۱ میلی‌گرم بر لیتر نیکوتینیک اسید + ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر تیامین + ۱ میلی‌گرم بر لیتر پیریدوکسین) + ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر میواینوزیتول + ۰/۰۵ میلی‌گرم بر لیتر BA+ ۱ گرم بر لیتر زغال فعال.

رویان‌های تولید شده پس از هشت هفته به محیط کشت MS حاوی ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر جیبرلیک اسید برای اندام-زایی منتقل شدند. صفات مورد ارزیابی شامل اندازه‌گیری درصد القای کالوس و جوانه‌زنی رویان‌ها بود.

تحلیل آماری و تجزیه داده‌ها

آزمایش‌ها به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. داده‌های به‌دست آمده با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.2 آنالیز شد و اختلاف میانگین‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن با سطح اطمینان ۹۵ درصد مورد تجزیه‌وتحلیل آماری قرار گرفتند.

نتایج

آزمایش اول

مرحله کالوس‌زایی: نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثرهای اصلی تیمار و نوع بافت بر درصد کالوس‌زایی در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. در حالی‌که اثر متقابل تیمار× نوع بافت بر درصد کالوس‌زایی اختلاف معنی‌دار نشان نداد (جدول ۲). این نتایج نشان داد که القای کالوس تحت تأثیر تیمارهای محیط کشت و نوع ریزنمونه قرار گرفته است. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر اصلی تیمار بر القای رویان در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار بود. در حالی‌که اثر اصلی نوع ریزنمونه و اثر متقابل تیمار× نوع ریزنمونه بر القای رویان اختلاف معنی‌داری نشان نداد (جدول ۲).

جدول ۲- تجزیه واریانس عوامل مورد مطالعه بر درصد کالوس‌زایی و رویان‌زایی گیاه استویا

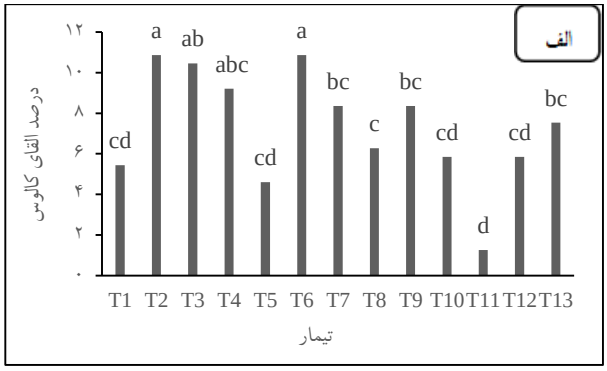
منابع تغییرات	درجه آزادی	MS	
		درصد کالوس‌زایی	درصد رویان‌زایی
تیمار	۱۲	۴/۴۰**	۵/۴۳*
نوع ریزنمونه	۱	۲۲/۴۳**	۰/۰۳ns
تیمار×ریزنمونه	۱۲	۳/۲۱ns	۲/۱۸ns
خطای آزمایشی	۱۰۴	۱/۷۵۳	۲/۵۱۵

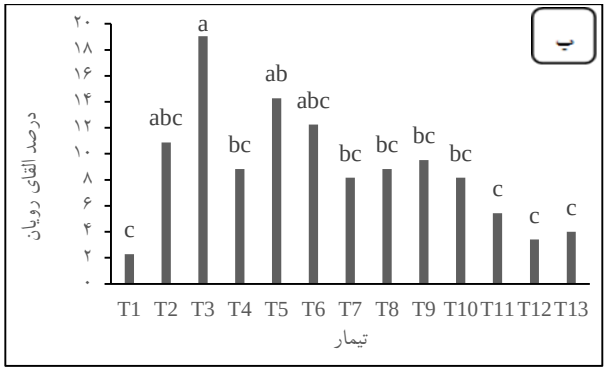
ns: بدون اختلاف معنی‌دار، ** و *: به‌ترتیب دارای اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد

نتایج مقایسه میانگین بین تیمارها نشان داد که تیمار۲ (۰/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر BA + ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D) و تیمار ۶ (۰/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر BA + ۲/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D) دارای بیشترین درصد القای کالوس (۱۰/۸۷

درصد) بودند (شکل ۱–الف) (شکل ۴–ج). همچنین تیمار ۱۱ (۱ میلی‌گرم بر لیتر BA + ۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA) دارای کمترین درصد القای کالوس (۱/۲۵ درصد) بود (شکل ۱–الف). نتایج مقایسه میانگین بین تیمارها نشان داد که تیمار ۳ (۰/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر BA +۱ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D) با ۱۹/۰۴ درصد بیشترین درصد رویان را تولید کرد (شکل ۱–ب) (شکل ۴–الف). همچنین تیمار ۱ (۲ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D) با ۲/۲۷ درصد کمترین درصد رویان را تشکیل داد (شکل ۱–ب) (شکل ۴–ب).

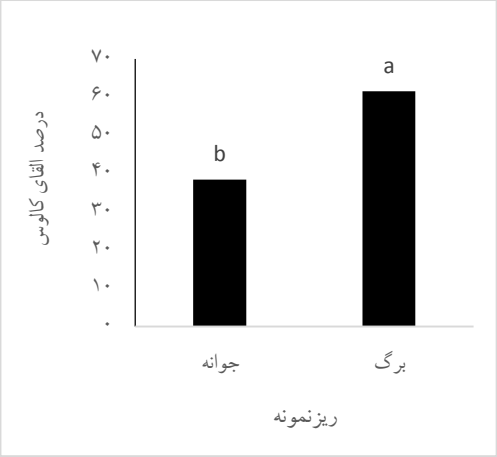
نتایج مقایسه میانگین نوع بافت ریزنمونه‌ها نشان داد که بافت برگ با میزان ۶۱/۵ درصد در مقایسه با ریزنمونه جوانه جانبی (۳۸/۴ درصد) دارای بیشترین میزان القای کالوس بود (شکل ۲).





شکل ۱– مقایسه میانگین اثر نوع تیمارها بر درصد الف) القای کالوس و ب) رویان (نام و مشخصات تیمارهای سیزده‌گانه در جدول ۱ آمده است)

ستون‌های دارای حروف مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح یک درصد می‌باشد.



شکل ۲– مقایسه میانگین اثر نوع بافت بر درصد القای کالوس

ستون‌های دارای حروف غیرمشابه دارای اختلاف معنی‌دار در سطح یک درصد می‌باشد.

آزمایش دوم

اثر کازئین هیدرولیزات و شیره نارگیل به محیط کشت بر رویان‌زایی ریزنمونه‌های گیاه استویا

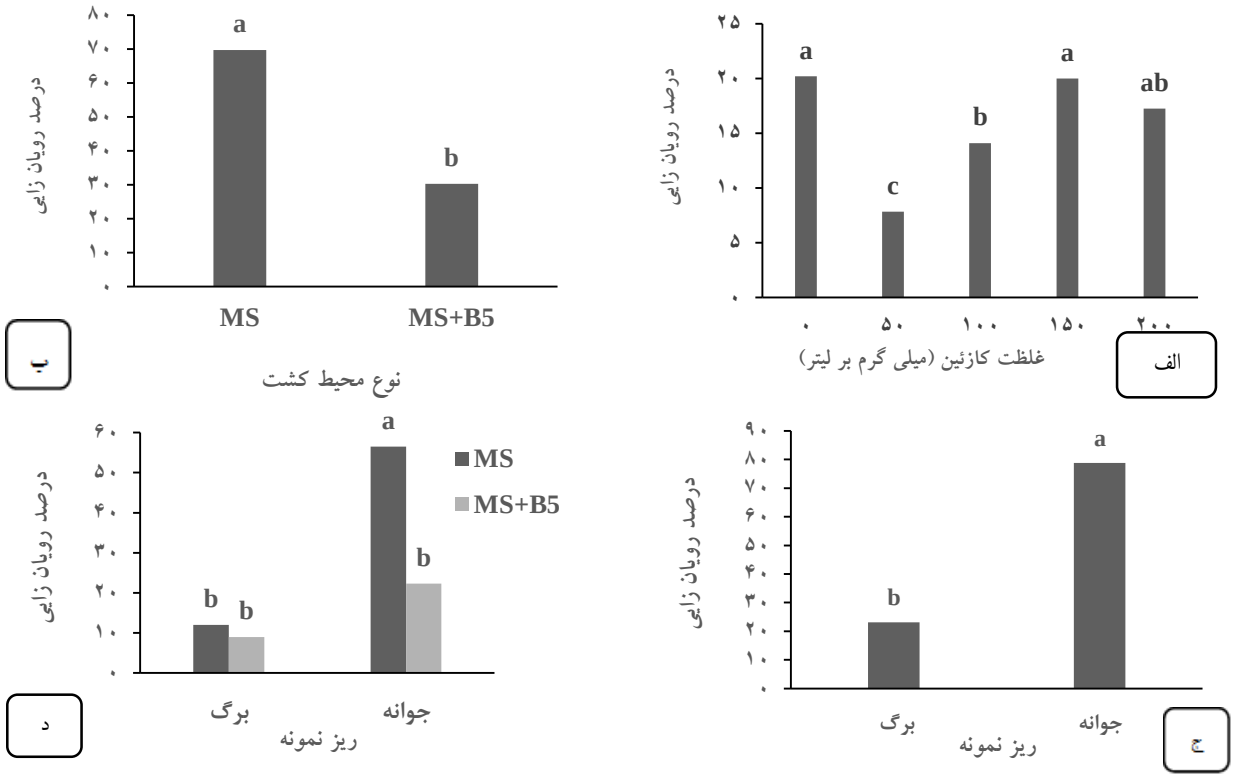
نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثرهای اصلی کازئین هیدرولیزات، محیط کشت و ریزنمونه در سطح احتمال یک درصد بر رویان‌زایی گیاه استویا معنی‌دار بود (جدول ۳). همچنین اثر متقابل محیط کشت و ریزنمونه و اثر سه‌گانه شیره نارگیل× محیط کشت × ریزنمونه در سطح احتمال پنج درصد بر میزان رویان‌زایی معنی‌دار بود (جدول ۳). اثر متقابل چهارگانه معنی‌دار نبود. این نتایج نشان می‌دهد که رویان‌زایی به‌شدت تحت تأثیر کازئین هیدرولیزات، نوع ریزنمونه و محیط کشت می‌باشد (جدول ۳).

جدول ۳- تجزیه واریانس عوامل مورد مطالعه بر رویان‌زایی گیاه استویا

منابع تغییرات	درجه آزادی (df)	میانگین مربعات (MS)
کازئین هیدرولیزات	۴	۱/۹۹**
شیره نارگیل	۱	۰/۳۶ ns
محیط کشت	۱	۳/۹۱**
ریزنمونه	۱	۷/۸۵**
کازئین هیدرولیزات × شیره نارگیل	۴	۰/۲۳ ns
کازئین هیدرولیزات × محیط کشت	۴	۰/۷۰ ns
کازئین هیدرولیزات × ریزنمونه	۴	۰/۳۴ ns
شیره نارگیل × محیط کشت	۱	۰/۹۱ ns
شیره نارگیل × ریزنمونه	۱	۰/۰۰۶ ns
محیط کشت × ریزنمونه	۱	۱/۶۵ ns
کازئین هیدرولیزات × شیره‌نارگیل×محیط کشت	۴	۰/۰۴ ns
کازئین هیدرولیزات × شیره‌نارگیل × ریزنمونه	۴	۰/۱۴ ns
کازئین هیدرولیزات × محیط‌کشت × ریزنمونه	۴	۰/۱۶ ns
شیره‌نارگیل × محیط کشت × ریزنمونه	۱	۲/۲۳*
کازئین هیدرولیزات × شیره‌نارگیل ×محیط کشت×ریزنمونه	۴	۰/۲۴ ns
خطای آزمایشی	۳۶	۰/۳۴۶
خطای کل	۷۵	

ns= بدون اختلاف معنی‌دار، **: دارای اختلاف معنی‌دار در سطح ۱ درصد، *: دارای اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد

نتایج مقایسه میانگین غلظت‌های کازئین هیدرولیزات نشان داد که در غلظت ۰ و ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر به‌ترتیب بیشترین (۲۰/۲ درصد) و کمترین (۷/۸۴ درصد) رویان‌زایی حاصل شد (شکل ۳-الف). شکل ۴-د رویان‌های کروی شکل در محیط کشت حاوی کازئین هیدرولیزات را نشان می‌دهد. غلظت‌های ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کازئین هیدرولیزات از نظر آماری اختلاف معنی‌داری بر رویان‌زایی گیاه استویا نشان ندادند (شکل ۳-الف). نتایج مقایسه میانگین بین دو محیط کشت نشان داد که در محیط کشت MS حاوی ۰/۰۵ میلی‌گرم بر لیتر BA نسبت به محیط کشت MS به علاوه ویتامین‌های B_5 و زغال فعال با مقدار ۶۹/۶۸ درصد، رویان‌زایی بیشتری انجام شده بود (شکل ۳-ب). نتایج مقایسه میانگین دو نوع ریزنمونه نشان داد که بافت جوانه با مقدار ۷۸/۸۲ درصد رویان‌زایی نسبت به بافت برگ (با ۲۳/۱۰ درصد رویان‌زایی) برتری داشت (شکل ۳-ج). نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل محیط کشت و ریزنمونه نشان داد که ریزنمونه‌های جوانه در محیط کشت MS بدون ویتامین‌های B5 بیشترین میزان رویان (۵۶/۴۷ درصد) را تولید کرده است (شکل ۳-د). سایر اثرهای متقابل ریزنمونه‌ها و محیط‌های کشت تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نشان ندادند (شکل ۳-د).



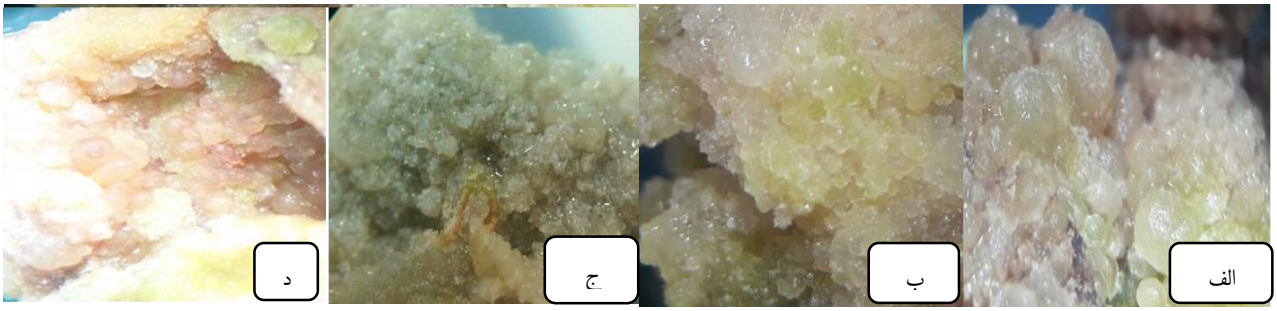
شکل ۳- مقایسه میانگین الف) غلظت‌های مختلف کازئین هیدرولیزات، ب) نوع محیط کشت، ج) نوع ریزنمونه و د) اثر متقابل ریزنمونه و محیط کشت بر درصد رویان‌زایی گیاه استویا (ستون‌های دارای حروف غیرمشابه اختلاف معنی‌داری در سطح یک درصد دارند).

جدول ۴- مقایسه میانگین اثر سه‌گانه شیره نارگیل، محیط کشت و ریزنمونه بر درصد رویان‌زایی گیاه استویا

شیره نارگیل	محیط کشت	ریزنمونه	درصد رویان‌زایی
شاهد (صفر)	MS	برگ	۱۳/۲bc
		جوانه	۴۲/۳۵a
	MS+B5	برگ	۵/۴۹cd
		جوانه	۵/۸۸cd
۵۵ میلی‌لیتر	MS	برگ	۵/۹۶cd
		جوانه	۱۶/۸۶b
	MS+B5	برگ	۰/۳۹d
		جوانه	۱۳/۳bc

ستون‌های دارای حروف غیرمشابه اختلاف معنی‌داری در سطح یک درصد دارند.

نتایج مقایسه میانگین اثر سه‌گانه شیره نارگیل × محیط کشت × ریزنمونه نشان داد که استفاده از ریزنمونه جوانه در محیط کشت MS فاقد شیره نارگیل بیشترین میزان رویان‌زایی (۴۲/۳۵ درصد) را نشان داد (جدول ۴). همچنین کمترین میزان رویان‌زایی (۰/۳۹ درصد) زمانی حاصل شد که از ریزنمونه برگ در محیط کشت MS + ویتامین‌های B_5 همراه با ۵۵ میلی‌لیتر شیره نارگیل استفاده گردید (جدول ۳).



شکل ۴- واکشت کالوس‌های رویان‌زا و غیررویان‌زا: الف) کالوس کروی شکل، ب) کالوس کروی در محیط حاوی تنظیم‌کننده رشد، ج) کالوس‌های غیررویان‌زا، د) کالوس‌های کروی در محیط کشت حاوی کازئین هیدرولیزات

بحث

بیشترین میزان کالوس‌زایی در دو تیمار T_2 و T_6 (۰/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر BA + ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D و ۰/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر BA + ۲/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D) به‌دست آمد که وجه مشترک آنها تنظیم‌کننده رشد گیاهی BA و 2,4-D بود که می‌تواند اثبات‌کننده کارایی خوب این تنظیم‌کننده‌ها در فرایند کالوس‌زایی باشد. در واقع 2,4-D به‌عنوان یک اکسین مصنوعی در کشت بافت و نگهداری کالوس حاصل از کشت بافت مفید می‌باشد (Kumar, 1999). در این پژوهش بیشترین میزان کالوس‌ها در محیط‌های کشت حاوی 2,4-D مشاهده شد و NAA تأثیر چندانی بر القاء کالوس نداشت. این نتایج با نتایج Banerjee و Sarkar (۲۰۱۰) مطابقت داشت. آنان تیمار حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D با ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP با میزان ۹۶ درصد کالوس‌زایی را بهترین تیمار برای القای کالوس در نظر گرفتند و وجود 2,4-D را برای القای کالوس مؤثر دانستند. در این پژوهش نیز مشخص شد که حضور 2,4-D و BA در کنار یکدیگر سبب تشکیل با کیفیت‌ترین کالوس‌های گلوبولار (کروی) و رویان‌زا گردید (شکل ۴-الف). نکته قابل توجه اینکه در تیمارهایی که مقادیر سیتوکینین بالاتری به‌کار رفته بود (۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر) میزان کالوس‌های حاصل شده کاهش یافت و کالوس‌های حاصل شده نسبت به کالوس‌های دیگر تیمارها، دارای بافت سخت‌تری بوده و از میزان فشردگی آنها کاسته شد و بهترین کالوس‌های رویان‌زا توسط ۰/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر BA به‌دست آمد. در تیماری که فقط 2,4-D به‌مقدار ۲/۵ میلی‌گرم بر لیتر استفاده شده بود و محیط بدون سیتوکنین بود کالوس‌های تشکیل شده پس از پنج هفته، دارای رنگ قهوه‌ای روشن بودند و پس از انتقال به محیط کشت بدون تنظیم‌کننده‌های رشد، در تعداد بسیار کمی مراحل تغییر کالوس تا اندام‌زایی طی شد. نتایج به‌دست آمده با نتایج Pand و Khetmalas (۲۰۱۲) مغایرت داشت. ازاین‌رو می‌توان گفت که پاسخ متفاوت ریزنمونه برگ گیاه استویا در ایجاد کالوس‌زایی در مقایسه با ریزنمونه جوانه آزمایش شده در این پژوهش ممکن است در نتیجه وضعیت غشای سلولی در این اندام باشد. بنابراین سلول‌های برگی دارای قابلیت‌های بیشتری در مورد 2,4-D برای تبدیل شدن به کالوس‌های رویان‌زا می‌باشند. نتایج حاصل با نتایج Bagheri و همکاران (۲۰۱۴) مطابقت داشت.

در میان عواملی که به‌طور مستقیم در تنظیم مراحل مختلف رویان‌زایی شرکت می‌کنند تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی

مهمترین نقش را دارند. در بیش از ۸۰ درصد از ۱۲۴ پروتکل اخیر منتشر شده با القاء رویان‌های بدنی در حضور اکسین به‌تنهایی و یا در ترکیب با سیتوکنین‌ها گزارش شده است (Gaj, 2004). در میان اکسین‌ها بیشترین گزارش‌های تولید رویان مربوط به هورمون 2,4-D بوده است. بعد از 2,4-D هورمون‌های IBA، IAA و NAA قرار دارند. در این تحقیق با توجه به نتایج حاصل از مقایسه میانگین تیمارها بیشترین میزان رویان‌زایی در محیط کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D در ترکیب با ۰/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر BA با میزان ۱۹/۰۴ درصد بیشترین رویان و کمترین میزان رویان در تیمار حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D با میزان ۲/۲۷ درصد به‌دست آمد (شکل ۱–ب). نتایج به‌دست آمده با نتایج Gopi و Rosemary (۲۰۱۴)، حاصل از آزمایش رویان‌زایی بدنی گیاه *Coleus forskohlii* مطابقت داشت. آنان بهترین محیط کشت برای رویان‌زایی را ترکیب ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D به همراه ۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP معرفی کردند، طبق نتایج بیان کردند که 2,4-D در محیط کشت به‌عنوان یک عامل تنش‌زا مطرح بوده و می‌تواند باعث شروع برخی از فرایندهای مربوط به تشکیل سلول‌های پیش‌رویان شود. اگرچه هنوز نقش واقعی 2,4-D در انگیزه سلول‌های رویانی مشخص نشده است، اما پیشنهاد شده است که 2,4-D با متیله کردن مولکول DNA، الگوی بیان ژن سلول‌های گیاه را به الگوی بیان رویان‌زایی تغییر می‌دهد و آنها را به سلول‌های رویانی تبدیل می‌کند (Loschiavo *et al*., 1989). با توجه به نتایج آزمایش، اکسین NAA تأثیر چندانی بر ایجاد رویان‌زایی بدنی نداشت. این نتایج مطابق با نتایج به‌دست آمده از آزمایش‌های Musavizadeh و همکاران (۲۰۱۰) بود. نتایج این مطالعه نشان داد که تشکیل رویان‌های بدنی تنها تحت تأثیر اکسین قرار ندارد. حضور مقادیر مختلف BA نیز در کنار مقادیر مختلف اکسین‌های 2,4-D و NAA باعث تشکیل رویان‌های بدنی شد. حضور مقدار کم سیتوکنین BA (۰/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر) به‌همراه 2,4-D حداکثر تولید رویان‌های بدنی را داشت. سلول‌ها به هورمون‌های گیاهی به‌ویژه اکسین‌ها و سیتوکنین‌ها برای فعال شدن سلول‌های بدنی و ورود به چرخه سلولی نیازمندند (Pola & Srada, 2006). سیتوکنین معمولا به محیط دارای اکسین افزوده می‌شود. در واقع این هورمون مسئول تنظیم سنتز پروتئین‌هاست که طی تشکیل دوک سلولی در زمان میتوز دخیل است.

وجود کازئین هیدرولیزات بر رویان‌زایی تأثیر مثبتی نشان داد. در کل نتایج نشان داد که وجود کازئین هیدرولیزات نسبت به شیره نارگیل در رویان‌زایی مؤثرتر بود. در کنار ضرورت استفاده از اکسین، اهمیت حضور شکل‌های مختلف نیتروژن در ترکیب محیط‌های کشت برای القای رویان‌زایی بدنی نیز از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (Inocente *et al*., 2007)، این در حالی است که شکل‌های مختلف نیتروژن (سایر مواد نیتروژن‌دار مانند اسیدهای آمینه) بر رویان‌زایی اثر دارد که این نتایج مطابق نتایج حاصل شده است. در کازئین هیدرولیزات اسیدهای آمینه لازم برای رویان‌زایی مانند گلوتامین، پرولین، آلانین، سرین و گلیسین وجود دارد. اسیدهای آمینه پرولین و سرین از طریق افزایش میزان هورمون‌های داخلی باعث افزایش فعالیت‌های میتوزی سلول-ها شده و به این وسیله تشکیل توده‌های سلولی پیش‌رویان‌زا را افزایش می‌دهند (Nutironchi *et al*., 1984). طی بررسی-هایی که توسط Sanjabi (۲۰۱۶)، برای بررسی القای رویان-های بدنی اولیه از جداکشت برگ نارون ملج (*Ulmus glabra*) روی محیط کشت MS حاوی سیتوکنین‌های مختلف و اکسین 2,4-D به همراه غلظت ثابت ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کازئین هیدرولیزات انجام شد، نتایج نشان داد که وجود کازئین هیدرولیزات در رویان‌زایی و میانگین تعداد رویان اثر مثبتی دارد که این نتایج با نتایج حاصل از این پژوهش مطابقت دارد. اسیدآمینه‌های آلی موجود در کازئین هیدرولیزات می‌توانند جایگزین مناسبی برای آمونیوم معدنی و مکمل نیترات باشند. همچنین جذب نیتروژن از طریق یک منبع آلی مثل کازئین هیدرولیزات بسیار آسان‌تر و سریع‌تر از منابع غیرآلی است (Thom *et al*., 1981).

بر اساس نتایج اگرچه هر دو ریزنمونه تحت تأثیر ترکیبات محیط کشت یکسان تولید رویان نمودند، اما نوع ریزنمونه در

تشکیل تعداد رویان تأثیرگذار بود، به‌طوری‌که تعداد رویان-های کروی تشکیل شده در ریزنمونه جوانه استویا بیشتر بود. این بررسی مشخص نمود که عامل ریزنمونه و محیط کشت در القا رویان‌زایی رویشی نقش مهمی را ایفا می‌کنند و قسمت‌های مختلف ریزنمونه از لحاظ توان و استعداد رویان-زایی بدنی متفاوت هستند. نتایج به‌دست آمده با نتایج Naranjo و همکاران (۲۰۱۵) مطابقت داشت. Gatica و همکاران (۲۰۰۸) نیز قطعات برگ قهوه (*Coffea arabica* L.) را به‌عنوان اندام مناسب رویان‌زایی بدنی معرفی کردند.

در محیط کشت حاوی زغال فعال میزان رویان‌های تولیدی کمتر بود و اثر منفی زغال فعال با هورمون BA مشاهده شد. این می‌تواند ناشی از آن باشد که زغال فعال علاوه بر محصولات اکسیداسیونی فنلی، باعث جذب برخی از ترکیبات تنظیم‌کننده‌های رشد نیز بشود که برای رشد ضروری هستند و این می‌تواند یک ویژگی منفی برای آن به‌شمار آید (Marks & Simpson, 1990). همچنین زغال فعال، ویتامین‌های تیامین و اسید نیکوتینیک را از محیط حذف کرده (Weatherhead *et al.*, 1979) و با افزودن زغال فعال به محیط کشت، pH محیط بعد از اتوکلاو کاهش یافته و باعث کم شدن قدرت ژله‌ای شدن آگار موجود در محیط کشت می-گردد (Monteuuis & Bon, 1985). هر چند با کاهش ژله‌ای شدن جذب سریع‌تر انجام می‌شود ولی به لحاظ افزایش آب بیشتر در محیط، تنفس افزایش یافته و از این طریق واکنش-های بازدارندگی رشد ظاهر می‌شود. بنابراین محیط کشت حاوی زغال فعال با جذب بنزیل‌آدنین و ویتامین‌های موجود در محیط کشت مانع از القا رویان‌زایی گیاه استویا شد و اثر منفی بر رویان‌زایی بدنی استویا را نشان داد.

سپاسگزاری

از همه افرادی که برای رسیدن این مقاله به مرحله چاپ کمک نمودند، قدردانی می‌گردد.

منابع مورد استفاده:

– Aggarwal, A., Singh, N. and Yadav, K. 2011. Influence of *arbuscular mycorrhizal* (AM) fungi on survival and development of micropropagated *Acorus calamus* L. during acclimatization. International Journal of Agricultural Technology, 7(3): 775-781.
– Altaf, T., Amin, S., Singh, S. and Kaloo, Z.A. 2013. Micropropagation of medicinally important plant species of family asteraceae– a review. International Journal of Recent Scientific Research, 4 (8): 1296-1303.
– Babber, S., Mittal, K., Ahlawat, R. and Varghese, T. 2001. Micropropagation of *Cardiospermum halicacabum*. Biologia Plantarum, 44: 603-606.
– Bagheri, A., Moshiri, F. and Khosravinia, S. 2014. Investigation on reaction of explants and plant growth regulators on callus induction, rooting and *in vitro* regeneration of *Bunium persicum* (Boiss.) B. Fedtsch. Crop Biotechnology, 3(5): 53-61.
– Banerjee, M. and Sarkar, P. 2010. Somatic embryogenesis in (*stevia rebaudiana* Bertoni) using different concentration of grow hormones. International journal of plant sciences, (5)1: 284- 289.
– Das, A. and Mandal, N. 2010. Enhanced Development of Embryogenic Callus in (*Stevia rebaudiana* Bertoni). Biotecnology, 9(3): 368-372.
– Din, M.S.U., Chowdhury, M.M.H. and Khan M.B.U. 2006. *In vitro* propagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni in Bangladesh. African Journal of Biotechnology, 5: 1238-1240.
– Gaj, M.D. 2004. Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to (*Arabidopsis thaliana* L.) Heynh. Plant Growth Regulation, 43: 27-47.
– Gatica, M. A., Arrieta, G. and Espinoza, A. M. 2008. Direct somatic embryogenesis in (*coffea arabica* L.) cvs. Caturra and catua: effect of triacontanol, light condition, and medium consistency. Agronoma Costarricense, 32 (1): 139-147.
– Gopi, C. and Rosemary, M.D. 2014. *In vitro* Plant Regeneration through Somatic Embryogenesis in Medicinally Important leaf explants of *Coleus forskohlii* Briq. Journal of Agriculture and Veterinary Science, 7 (9): 20-23.
– Gram, T., Mattson, O. and Joerson, M. 1996. Division frequently of pea protoplast in relation to starch accumulation. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 45: 3. 179-187.
– Inocente, G.C.C., Vesco, L.L.D., Steinmacher, D., Torres, A.C. and Guerra, M.P. 2007. Improvements in somatic embryogenesis protocol in Feijoa (*Acca sellowian* (Berg) Burret): Induction, conversion and synthetic seeds. Scientia Horticulture, 111: 228-234.
– Keshvari, T. 2016. Improvement of Somatic embryogenesis in medicinal plant of Stevia. Ms.c

– Nutironchi, V., Caligo, M.A., Nozzolini, M. and Luccarini, G. 1984. Stimulation of carrot somatic embryogenesis by proline and serine. Plant Cell Reports, 3: 210-214.
– Pand, S. and Khetmalas, M. 2012. Effect of concentration of sucrose on callus induction & Somatic embryogenesis of anti-diabetic plant: *stevia rebaudiana*. Asian Journal of biochemical and pharmaceutical research, 1(2): 27- 31.
– Piri Zirkouhi, M., Mashayekhi, K., Kamkar, B., Hemmati, Kh. and Vahdatpour, F. 2009. Embryogenesis of a commercial and a native tomato cultivar using different culture media, Journal of Plant Production Research, 16(1): 101-114. (In Persian)
– Pola, S.R. and Srada, M.N. 2006. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration in (*Sorghum bicolor* L.) Moench, from leaf segments. Journal of Cell & Molecular Biology, 5: 99- 107.
– Sanjabi, M. 2016. Induction of direct somatic embryogenesis in leaf explants of *Ulmus glabra*. Journal of Plant Researches, 28(4): 885-894.
– Sekaran, T., Giridhar, P., Ravishankar, G.A. 2007. Production of steviosides in *ex vitro* and *in vitro* grown *Stevia rebadiana* Bertoni. Journal of Science Food & Agriculture, 87: 420-424.
– Thom, M., Maretzki, A., Komor, E. and Sakai, W.S. 1981. Nutrient uptake and accumulation by sugarcane cell cultures in relation to the growth cycle, Plant Cell Tissue and Organ Culture, 1: 3-14.
– Weatherhead, M., Burdon, J. and Henshaw, G. 1979. Effects of activated charcoal as an additive to plant tissue culture media: Part 2. Z Pflanzenphysiol, 94: 399-405.
thesis in Razi university. (In Persian).
– Kumar, U.K. 1999. Methods in plants tissue culture. Agrobios. pp. 139- 147, India.
– Loschiavo, F., Pitto, L., Giuliano, G., Torti, G., Nuit-Ronchi,V., Marazziti,D., Vergara, R., Orselli, S. and Terzi, M. 1989. DNA methylation of embryogenic carrot cell culture and its variation as caused by mutation differentiation hormones and hypomethyalating, Theory Apply Genetic, 77: 325-331.
– Marks, T. and Simpson, S. 1990. Reduced phenolic oxidation at culture initiation *in vitro* following the exposure of field-grown stock plants to darkness or low levels of irradiance. Journal of Horticultural Science, 65: 103-111.
– Monteuuis, O. and Bon, M.C. 1985. Microbuturage dusequoia geant. Ann Rech Sylvicoles, AFOCEL, Pp: 49-87.
– Moradi, S., Azimi, M., Pourdad S.S and Habibi, F. 2017. Direct somatic embryogenesis from immature embryos of sunflower hybrids. Iranian Journal of Field Crop Science, 47(4): 701-707. DOI: 10.22059/ijfcs.2017.126609.653888. (In Persian).
– Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3): 473-497.
– Musavizadeh, S.J., Mashayekhi, K., Hemmati, Kh. and Kamkar, B. 2010. Evaluation of media elements and materials on petiole somatic embryogenesis of Carrot (*Daucus carota* L.). Journal of Plant Production, 17(1): 1-21. (In Persian).
– Naranjo, J.E., Fernandez-Betin, O., Urrea-Trujillo, A.J., Callejas- Posada, R. and Atehortua-Garces, L. 2015. Effect of genotype on the *in vitro* regeneration of (*Stevia rebaudiana*) via somatic embryogensis. Acta biologica Colombiana Journal, 21(1):87-98.

The effect of different factors on somatic embryogenesis of stevia plant (*Stevia rebaudiana* Bertoni.)

S. Rezaii Gangeh[1], M. Dehestani-Ardakani[2], K. Kamali Aliabad[3*]

1- M.Sc. student, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture & Natural Resources, Ardakan University, Ardakan, I.R. Iran.
2- Assist. Prof., Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture & Natural Resources and Medicinal and Industrial Plants Institute, Ardakan University, Ardakan, I.R. Iran.
3- Corresponding Author, Assist. Prof., Department of Soil Science, Faculty of Agriculture & Natural Resources, Yazd University, Yazd, I.R. Iran. Email: kkamali@yazd.ac.ir

Received: 04.07.2018 Accepted: 19.01.2019

Abstract

Stevia plant (*Stevia rebaudiana* Bertoni.) is an important plant species due to its high content of recoverable natural sweeteners. Considering the industrial and medical importance of plant, the current study was performed with the aim of optimizing somatic embryogenic of this plant. Embryogenic callus induction and embryogenesis were investigated using different concentrations of Benzyl Adenine (BA), Naphthalene Acetic Acid (NAA) and 2,4-Dihydrophenoxy acetic acid (2,4-D) in leaf and bud explants in MS culture medium in a factorial experiment based on completely randomized design (CRD) with five replications. The highest callus induction was obtained in culture media contained 0.01 mg/l (BA + 0.5 mg/l 2, 4-D and the highest embryo induction was obtained in 0.01 mg/l BA + 1 mgl^{-1} 2, 4-D treatment. Also the effect of Casein hydrolysate on the embryogenesis of the Stevia plant were investigated in five concentrations (0, 50, 100, 150 and 200 mgl^{-1}) and coconut milk in two levels (0 and 55 ml) by both explants of leaf and bud in a factorial experiment based on CRD with six replications. In concentrations of 0 and 50 mg/l of Casein hydrolysate respectively obtained the highest (20.2%) and lowest (7.84%) embryos. The percentages of embryogenesis in MS medium without coconut milk was 78.82% for bud explants and 25.09% for leaf explants, and finally, embryos were transferred to medium containing 0.1 mgl^{-1} of GA_3 for organogenesis, and 18.03% of the embryos were grown to complete seedling.

Keywords: Benzyl-adenin, Activated charcoal, Coconut milk, Casein hydrolysate, Tissue culture