

تأثير نوع الجزء النباتي وبعض منظمات النمو في نشوء زروعات نبات *Stevia* خارج الجسم الحي

حسام سعد الدين محمد خير الله

علا موجد عبد الزهرة العبدي

باحثة

استاذ مساعد

وحدة أبحاث النخيل والتمور – كلية الزراعة – جامعة بغداد

khierallah70@yahoo.com

المستخلص

اجري البحث لدراسة تأثير نوع الجزء النباتي وبعض منظمات النمو في نشوء زروعات نبات *Stevia rebaudiana* Bertoni خارج الجسم الحي. اشتملت التجارب على تعقيم واختبار نوعين من الأجزاء النباتية (القلم النامية والعقد الساقية) وتأثير إضافة تراكيز متنوعة من السايتوكاينينات KIN و BA والأوكسينات IAA و IBA الى وسط MS في نشوء الزروعات. بينت النتائج كفاءة محلول هايپو كلورات الصوديوم (NaOCl) في تعقيم الأجزاء النباتية وأعطى التركيز 0.050 % منها أقل نسبة تلوث بلغت 10% و 20% للقلم النامية وللعقد الساقية بالتتابع، أما تأثير الأجزاء النباتية وتراكيز KIN فقد كان معنوياً في زيادة عدد الأفرع إذ أعطت القلم النامية المزروعة في أوساط حاوية على 0.3 ملغم. لتر⁻¹ أعلى متوسط لعدد الأفرع بلغ 4.2 فرع. جزء نباتي⁻¹، في حين أعطت معاملة القياس (من دون سايتوكاينين) أقل متوسط لعدد الأفرع بلغ 1.4 فرع. جزء نباتي⁻¹، كما قل طول الأفرع المتكونة إذ أعطت القلم النامية المزروعة في معاملة القياس أعلى متوسط لطول الأفرع بلغ 6.74 سم، أما تأثير التداخل بين الأجزاء النباتية وتراكيز BA فكان معنوياً وأعطت القلم النامية المزروعة في وسط حاوي على 0.1 ملغم. لتر⁻¹ BA أعلى متوسط لعدد الأفرع بلغ 3.6 فرع. جزء نباتي⁻¹، وقل طول الأفرع إذ أعطت معاملة القياس أعلى متوسط لطول الأفرع بلغ 6.74 سم للقلم النامية. لم يكن لأضافة الأوكسينين IBA أو IAA أي تأثير ايجابي في تحسين نشوء الأفرع لنبات *Stevia rebaudiana* خارج الجسم الحي. يمكن اعتماد النتائج اعلاه لأتشاء زروعات نبات *Stevia rebaudiana* خارج الجسم الحي بنجاح.

الكلمات المفتاحية: *Stevia rebaudiana* Bertoni، الأكتار الدقيق، اوكسينات، سايتوكاينينات.

البحث مستل من رسالة ماجستير للباحث الثاني.

The Iraqi Journal of Agricultural Sciences –1206-1214: (5) 48/ 2017

Khierallah& Al-Obaidy

EFFECT OF EXPALNT TYPE AND SOME PLANT GROWTH REGULATORS ON CULTURE INITIATION OF STEVIA PLANTS IN VITRO

H. S. M. Khierallah
Assist. Professor

O. M. A. Al-Obaidy
Researcher

Date Palm Research Unit, College of Agriculture, University of Baghdad

khierallah70@yahoo.com

ABSTRACT

This research was conducted in order to study the effect of explant type and some plant growth regulators on culture initiation of *Stevia rebaudiana* Bertoni in vitro. The experiments included surface sterilization and test two types of explants (shoot tips and stem nodes) and the impact of KIN and BA and IAA and IBA in the cultures initiation. Results revealed the efficiency of sodium hypochlorite (NaOCl) for disinfection of explant at 0.050% concentration giving less contamination for shoot tips and stem nods (10% and 20% respectively). Results showed that shoot tips inoculated in MS medium plus KIN at 0.3 mg. L⁻¹ was significantly increase the number of regenerated shoots as it produced 4.2 shoots per explant while medium without cytokinin (control) produced less number of shoots reached 1.4 shoots per explant. KIN treatment reduced shoots length as control treatment produced the highest length (6.74 cm). The interaction between the explant type and BA concentration was significantly increase the number of regenerated shoots as shoot tips produced 3.6 shoots per explant in MS medium supplemented with 0.1 mg. L⁻¹. BA treatment reduced shoots length as control treatment produced the highest length (6.74 cm). No positive effect was gain when auxins (IBA and IAA) were added in combination with cytokinin in culture medium. The above results can be adopted to established stevia in vitro culture successfully.

Key words: *Stevia rebaudiana* Bertoni, micropropagation, auxin, cytokinin.

*Part of M.Sc. Thesis of the second author

*Received:29/12/2016, Accepted:12/3/2017

المقدمة

النوعية بسبب عدم التجانس الوراثي للبذور (12). أما الأكتار عن طريق العقل فإنه يتطلب جهوداً كبيرة وعدد النباتات المنتجة منه محدوداً جداً. بناء على ما تقدم وللتغلب على جميع هذه المشاكل فقد قام الباحثون بمحاولات لتسخير تقانة زراعة الانسجة النباتية في الأكتار الواسع لنبات الستيفيا في مختلف الدول مثل ماليزيا (2 و 16) وتونس (9) ومصر (7). نظراً لأهمية نبات ورق السكر (*Stevia*) من الناحية الطبية والأقتصادية كونه يمثل كما يبدو من الدراسات والأبيات العلمية المنشورة مادة أولية واعدة لإنتاج السكر المستعمل للطعام والأغراض الصناعية الأخرى الأمر الذي يفسر السعي الحثيث للدول المتقدمة في العالم لا سيما الدول التي ينجح فيها زراعته وانتاجه الى التوسع في اكتاره ونشر زراعته، فان الهدف من هذه الدراسة هو إيجاد برنامج متكامل لأكتار نبات الستيفيا خارج الجسم الحي بدراسة بعض العوامل مثل الجزء النباتي وبعض مكونات الوسط الغذائي.

المواد والطرائق

أجريت التجارب على نبات *Stevia rebaudiana* Bertoni بجلب بذور هجينة مستوردة من شركة SEMILLAS FITTO الأسبانية وزراعتها في شهر أيلول في أصص وبعد انبات البذور تم الحصول على الشتلات البذرية بعمر ثلاثة أشهر والتي تعد مصدر الأجزاء النباتية. أخذت أفرع خضرية بطول 15 - 20 سم ونقلت الى المختبر ونظفت بمسحها بالكحول الأثيلي بتركيز 70% وقطع الى عقل بطول 5 سم وغسلت بتيار ماء جاري لمدة ساعة كاملة بعدها أزيلت الأوراق وغسلت بالصابون السائل ونقلت الى منضدة انسياب الهواء الطبقي Laminar Air Flow Cabinet لتعقيمها سطحياً كما موضح في الشكل ثم تؤخذ الأجزاء النباتية وهي:

أ- أطراف الأفرع بطول 0.5 سم.

ب- العقد الساقية بطول 0.5 سم.

تعقيم وتهينة الأجزاء النباتية:

أختبرت فعالية هايبيوكلورات الصوديوم في تعقيم الأجزاء النباتية من خلال تراكيز مختلفة من القاصر التجاري علامة Clorox وبتراكيز مادة فعالة 6% (وزن/حجم) لهذا الغرض إذ يجري تخفيفه في محاليل تعقيم للحصول على التراكيز

تعد المحليات الطبيعية (Natural sweeteners) من المواد التي من الممكن ان تكون بديلاً للسكر لذلك يمكن استعمالها لمقاومة السمنة وداء السكري، وقد اعطي مركب الستيفيوسيد (*Stevioside*) وهو عبارة عن كلوكوسيد مستخلص من نبات ورق السكر (*Stevia*) اهتماماً كبير نظراً للحلاوة التي يتميز بها، فضلاً عن تأثيراته العلاجية وهذا ما جعل له أهمية علمية وأقتصادية (20). ينتمي نبات ورق السكر (الستيفيا) الى العائلة المركبة *Compositae* الاسم الانكليزي له هو Sugar bush اي شجيرة السكر، أما الاسم العلمي للنبات فهو *Stevia rebaudiana* Bertoni ، يحتوي جنس *Stevia* على 280 نوعاً تنتمي للعائلة المركبة من النباتات العشبية أو الشجيرات التي تنمو الى ارتفاع 1م وتحتوي على اوراق بطول 2-5سم. ان اوراقها هي مصدر لكلايكوسيدات التربينات الثنائية والستيفيوسيد (*Stevioside*) والريبايديوسيد (*Rebaudiosid*) (10). في نهاية التسعينيات زاد الطلب على هذا النبات نظراً للفوائد العلاجية والغذائية، وللنبات خصائص متنوعة مثل كونه مضاداً بكتيرياً وفطرياً و فايروسياً ويستعمل لعلاج أمراض القلب ومدرر للبول و خافض للسكر بالدم وموسع للأوعية، يعد النبات منتجاً طبيعياً خالياً من السرعات الحرارية ومثبط لتجمع الدهون وخفض ضغط الدم للإنسان (4).

تعد أوراق الستيفيا مصدراً لكلوكوسيدات التربينات الثنائية مثل *steviolbioside* و *F,E,D,C,B,A rebaudioside* و *dulcoside* و *rubside* و *stevioside* (19)، ويعد المركب الأخير هو الأهم ويستخدم للتحلية نظراً للأعتبارات الصحية لأستخدام السكر العادي مثل تسوس الأسنان والسمنة ومرض السكري فضلاً عن ذلك فان الستيفويد وكلايكوسيدات التربينات الثنائية الأخرى (5 و 13). يكثر نبات الستيفيا أما جنسياً بالبذور أو خضرياً بالعقل الساقية، و تكتنف طريقة الأكتار بالبذور العديد من المشاكل أهمها نسبة الأنبات المنخفضة التي تعد المشكلة الأكبر في اكتار الستيفيا، كذلك وجود حالة عدم التوافق الذاتي في هذا النوع والذي يؤدي الى فشل الأخصاب (11). فضلاً عن ان نسبة الأنبات للبذور في الستيفيا واطئة جداً فانها لا تعطي نفس التركيب الوراثي و حلاوة الاوراق نفسها من ناحية الكمية و

(Autoclave) على درجة حرارة 121 م وضغط 1.04 كغم.سم⁻² ولمدة 15 دقيقة. جرى دراسة تأثير تراكيز مختلفة من كل من الساييتوكانينين BA و KIN ونوع الجزء النباتي والتداخل بينهما في نشوء الزروع اذ زرعت الأجزاء النباتية التي تم تحضيرها في الفقرة السابقة (القمم النامية والعقد) في وسط MS المجهز بالتراكيز 0.1، 0.3، 0.5، أو 1.0 ملغم.لتر⁻¹ من كل من BA أو KIN على انفراد بتجربة عاملية وبعشرة تكرارات لكل معاملة وبواقع جزء نباتي واحد لكل تكرار وجرى تحضيرها في غرفة النمو تحت شدة ضوئية قدرها 1000 لوكس ولمدة إضاءة 8/16 ضوء/ظلام وعلى درجة حرارة 24 م ± 1 ولمدة أربعة أسابيع. بعدها حسب متوسط عدد الأفرع الناتجة ومتوسط طولها. كذلك درس تأثير تراكيز مختلفة من IBA و IAA ونوع الجزء النباتي والتداخل بينهما في نشوء الأفرع اذ أضيفت التراكيز 0، 0.05، 0.1، أو 0.5 ملغم.لتر⁻¹ من IBA أو IAA على انفراد لوسط النشوء بوجود 0.3 ملغم. لتر⁻¹ Kin والذي كان أفضل تركيز للساييتوكانينين تم التوصل اليه من التجارب السابقة ، زرعت الأجزاء النباتية (القمم النامية والعقد الساقية) وبتجربة عاملية بعشرة تكرارات لكل معاملة وبواقع أنبوب اختبار لكل جزء نباتي واحد لكل تكرار وحضنت في الظروف نفسها المذكور في الفقرة السابقة ولمدة أربعة أسابيع بعدها حسب متوسط عدد الأفرع الناتجة ومتوسط طولها. اتبع التصميم التام التعشبية Completely Randomized Design (CRD) وبعدها التكرارات المبين أزاء كل تجربة، وقورنت المتوسطات حسب اختبار أقل فرق معنوي (LSD) وبمستوى احتمال 5% بأستعمال البرنامج الحاسوبي Discovery Genestat الإصدار (3.0).

النتائج والمناقشة

نتائج التعقيم السطحي بمحلول هايبيوكلورات الصوديوم للأجزاء النباتية لنبات الستيفيا :

تبين النتائج في الجدول 1 مدى فعالية هايبيوكلورات الصوديوم NaOCl في النسبة المئوية لتلوث الأجزاء النباتية، أذ بينت النتائج عدم وجود فروقات معنوية بين القمم النامية والعقد الساقية ، أما بالنسبة لتأثير تراكيز NaOCl فكان معنوياً إذ أن النسبة المئوية للتلوث كانت أقل عند

1.0، 1.5، 2.0 أو 2.5 % من هايبيوكلورات الصوديوم ولمدة 15 دقيقة لكل تركيز مستعمل مع مراعاة استعمال بضعة قطرات من المادة الناشرة Tween 20 مع محاليل التعقيم لتقليل الشد السطحي لمحاليل التعقيم ثم جرى بعدها غسل الأجزاء النباتية بالماء المعقم المقطر ثلاث مرات ونقلت العقل الى أوراق معقمة وقطعت الأجزاء المتضررة بالتعقيم وزرعت في أنابيب اختبار بطول 125 ملم وقطر 25 ملم حاوية على 10 مل من الوسط الغذائي. لوحظ من خلال نتائج هذه التجربة ان التراكيز المستعملة كانت عالية وادت الى تضرر و موت الأجزاء النباتية وأسودادها خلال يومين من الزراعة بعد التعقيم، ولذلك جرى اعتماد تراكيز أخرى اقل للمادة المعقمة (هايبيوكلورات الصوديوم) وهي 0، 0.025، 0.050، 0.075 أو 0.100 % أخذت البيانات بعد 10 أيام من تأريخ الزراعة وحسبت النسبة المئوية للزروعات الملوثة كالآتي:

النسبة المئوية للتلوث = (عدد الانابيب التي ظهر فيها

التلوث/عدد الأنابيب الكلية المزروعة) × 100

حضر الوسط الغذائي الخاص بنشوء الزروعات من مجموعة الأملاح اللاعضوية الكبرى والصغرى والحديد لوسط (MS) (14) مضافاً إليه (ملغم.لتر⁻¹) 0.1 Thiamin و 0.5 و Nicotinic acid و 0.5 و Pyridoxine و 2.0 Glycine و 100 Myo-Inositol مع 30000 سكرور مع 7غم/لتر من مادة Agar، وقد استعملت الخلطة الجاهزة من انتاج شركة Duchifah الهولندية لهذا الغرض اذ تم وزن الوزن الموصى به من المصنع (4.405 غم) لتحضير لتر وسط غذائي واذيب في 600 مل من الماء المقطر اللابايوني وأضيف السكرور وجرى تضمين الوسط بمنظمات النمو حسب الهدف من التجربة والتراكيز المبينة ازاء كل منها. بعد اضافة جميع مكونات الوسط الغذائي عدل الرقم الهيدروجيني pH الى 5.7 وأكمل الحجم النهائي للوسط الغذائي بعد اضافة الآكار اليه وجرى تسخينه الى ما قبل الغليان بقليل لغرض اذابة الآكار، ومن ثم توزيعه في اوعية الزراعة، والتي هي عبارة عن انابيب اختبار من نوع Pyrex بابعاد 25 × 150 ملم وجرى تغطية الانابيب بأغطية Polycarbonate caps ، بعد تحضير الاوساط الغذائية وتوزيعها في اوعية الزراعة المخصصة لها، جرى تعقيمها بجهاز الموصدة

تأثير تراكيز مختلفة من KIN ونوع الجزء النباتي و التداخل بينهما في عدد الافرع الناتجة لنبات الستيفيا بعد اربعة

اسباع من الزراعة خارج الجسم الحي

تبين النتائج في الجدول 2 عدم وجود فروقات معنوية في عدد الافرع الناتجة بين الاجزاء النباتية المستعملة لنبات الستيفيا المزروع خارج الجسم الحي، في حين كان لتراكيز KIN تأثيراً معنوياً في زيادة عدد الافرع إذ أعطى التركيز 0.3 ملغم. لتر⁻¹ أعلى متوسط لعدد الافرع بلغ 3.7 فرع. جزء نباتي⁻¹، بعدها أنخفض متوسط عدد الافرع بزيادة التراكيز فيما أعطت معاملة القياس (الخالية من الساييتوكاينين) أقل متوسط لعدد افرع الجزء النباتي بلغ 1.6. أما بالنسبة لتأثير التداخل بين الاجزاء النباتية وتراكيز KIN فقد كان تأثيراً معنوياً في زيادة عدد الافرع، إذ أعطت العقد المزروعة بأوساط حاوية على التركيز 0.3 ملغم. لتر⁻¹ أعلى متوسط لعدد الافرع بلغ 4.2 فرع. جزء نباتي⁻¹ في حين أعطت معاملة القياس أقل متوسط لعدد الافرع بلغ 1.4 فرع. جزء نباتي⁻¹.

جدول 2. تأثير تراكيز مختلفة من KIN ونوع الجزء النباتي و التداخل بينهما في عدد الافرع الناتجة لنبات الستيفيا بعد اربعة اسابيع من الزراعة خارج الجسم الحي.

متوسط التراكيز	عدد الافرع (فرع. جزء نباتي ⁻¹)		تراكيز KIN ملغم. لتر ⁻¹
	العقد الساقية	القمة النامية	
1.6	1.4	1.8	0
2.9	2.8	3.0	0.1
3.7	3.2	4.2	0.3
2.4	2.8	2.0	0.5
2.65	2.3	3.0	1.0
0.768	1.086		قيمة LSD _{0.05}
	2.5	2.8	متوسط الاجزاء النباتية
	N.S		قيمة LSD _{0.05}

تأثير تراكيز مختلفة من KIN ونوع الجزء النباتي و التداخل بينهما في متوسط طول الافرع الناتجة لنبات الستيفيا بعد

اربعة اسابيع من الزراعة خارج الجسم الحي

تشير النتائج في الجدول 3 الى ان اضافة تراكيز مختلفه من KIN الى وسط الزراعة أدت الى تقليل طول الافرع المتكون من زراعة القمة النامية والعقد الساقية معنوياً إذ اعطت معاملة القياس (الخالية من الساييتوكاينين) اعلى متوسط لطول الافرع بلغ 6.29 سم وأنخفض بعدها الطول بزيادة

التركيز 0.050 % وبلغت 15% في حين لوحظ تلوث جميع الاجزاء النباتية المعاملة

جدول 1. كفاءة محلول هاييوكلورات الصوديوم في التعقيم السطحي للأجزاء النباتية لنبات الستيفيا بعد اسبوعين من

الزراعة خارج الجسم الحي.

متوسط التراكيز	% تلوث الاجزاء النباتية		تراكيز NaOCl %
	العقد الساقية	القمة النامية	
100	100	100	0
40	50	30	0.025
15	20	10	0.050
50	60	40	0.075
45	50	40	0.100
27.14	38.39		قيمة LSD _{0.05}
	56	44	متوسط الاجزاء النباتية
	N.S		قيمة LSD _{0.05}

القياس (الخالية من NaOCl)، وبالنسبة لتأثير التداخل بين الاجزاء النباتية وتراكيز NaOCl قد كان تأثيره معنوياً في نسبة التلوث ففي الوقت الذي تلوثت فيه جميع الاجزاء النباتية عند خلو محلول التعقيم من هاييو كلورات الصوديوم أعطى التركيز 0.050 % أقل نسبة تلوث بلغت 10% و20% للقمة النامية وللعقد بالتتابع. يعود التأثير المعقم لهاييوكلورات الصوديوم في الأنسجة النباتية إلى حامض الهييوكلورين Hypochlorin acid (HOCl) الذي يعد مادة مؤكسدة قوية، إذ يتكون هذا الحامض نتيجة ذوبان الكلور بالماء كما في المعادلة أدناه وتعود هذه القوة المؤكسدة إلى الاوكسجين الذري الذي يتحرر نتيجة لتفكك هذا الحامض.



أما إختلاف إستجابة الاجزاء النباتية للتعقيم ربما يعود الى إختلاف طبيعة هذه الاجزاء ودرجة تطورها وعمرها الفسلجي (18)، وتتفق هذه النتائج مع ما توصل اليه Noordin وآخرون (16) في الأكتفاء بمحلول هاييوكلورات الصوديوم لتعقيم أفرع الستيفيا، في حين احتاج باحثون آخرون للمعاملة بالكحول الأيثيلي قبل او بعد التغطيس بمحلول الهاييوكلورات للحصول على أفضل النتائج (1 و15).

جدول 4. تأثير تراكيز مختلفة من BA ونوع الجزء النباتي و التداخل بينهما في عدد الافرع الناتجة لنبات الستيفيا بعد اربعة اسابيع من الزراعة خارج الجسم الحي.

متوسط التراكيز	عدد الافرع (فرع جزء نباتي ⁻¹)		تراكيز BA ملغم.لتر ⁻¹
	القمة النامية	العقد الساقية	
1.60	1.4	1.8	0
3.25	2.9	3.6	0.1
2.40	2.6	2.2	0.3
1.80	2.0	1.6	0.5
1.75	1.6	1.9	1.0
0.659	0.932		قيمة LSD _{0.05}
	2.10	2.22	متوسط الاجزاء النباتية
	N.S		قيمة LSD _{0.05}

تأثير تراكيز مختلفة من BA ونوع الجزء النباتي و التداخل بينهما في متوسط طول الافرع الناتجة لنبات الستيفيا بعد اربعة اسابيع من الزراعة خارج الجسم الحي

تشير النتائج في الجدول 5 الى أن طول الأفرع المتكونة لم يتأثر معنوياً بنوع الجزء النباتي المزروع، أما تأثير تركيز BA فقد كان معنوياً في خفض متوسط طول الأفرع إذ أعطت معاملة القياس (الخالية من السايبتوكاينين) أعلى متوسط لطول الأفرع بلغ 6.29 سم، وأدت إضافة BA الى خفض طول الفرع إذ أعطى التركيز 0.1 ملغم.لتر⁻¹ أعلى متوسط لطول الأفرع بلغ 3.17 سم، وانخفض بعد ذلك متوسط طول الأفرع إذ أعطى التركيز 1.0 ملغم.لتر⁻¹ أقل متوسط لطول الأفرع بلغ 1.44 سم، أما بالنسبة الى تأثير التداخل بين الأجزاء النباتية وتراكيز BA المختلفة فقد كان تأثيره معنوياً في خفض متوسط طول الافرع إذ أعطت معاملة القياس أعلى متوسط لطول الأفرع بلغ 6.74 سم للقيمة النامية في حين أعطى التركيز 1.0 ملغم.لتر⁻¹ أقل متوسط لطول الأفرع بلغ 1.17 سم للعقد. تشير نتائج الدراسة الحالية على أهمية السايبتوكاينينين BA و KIN في تحفيز استجابة الأجزاء النباتية وزيادة عدد الأفرع المتكونة منها خارج الجسم الحي لنبات الستيفيا وهذا يعود الى الدور الذي يؤديه هذين السايبتوكاينينين في تحفيز انقسام الخلايا ونموها (3) وتشير الدراسات الى أن هذا النوع من الهرمونات النباتية يعد متطلب أساس لتنظيم نشاط المرستيمات القمية والتكوين الشكلي Morphogenesis وتطور الكلوروبلاست ونمو الأوراق (22).

التركيز وصولاً الى التركيز 1.0 ملغم. لتر⁻¹ الذي أعطى اقل متوسط لطول الافرع بلغ 1.73 سم ، ولم يكن لنوع الجزء النباتي تأثير معنوي في طول الأفرع، اما تأثير التداخل بين الاجزاء النباتية والتراكيز فكان معنوياً في خفض طول الافرع إذ اعطت القمة النامية المزروعة في معاملة القياس اعلى متوسط لطول الافرع بلغ 6.74 سم بينما اعطى اقل متوسط لطول الافرع 1.58 سم عند التركيز 1.0 ملغم.لتر⁻¹.

جدول 3. تأثير تراكيز مختلفة من KIN ونوع الجزء النباتي و التداخل بينهما في متوسط طول الافرع الناتجة لنبات الستيفيا بعد اربعة اسابيع من الزراعة خارج الجسم الحي.

متوسط التراكيز	طول الفرع (سم)		تراكيز KIN ملغم.لتر ⁻¹
	العقد الساقية	القمة النامية	
6.29	5.84	6.74	0
5.64	5.10	6.18	0.1
4.675	4.75	4.60	0.3
3.85	3.82	3.88	0.5
1.73	1.88	1.58	1.0
2.600	3.676		قيمة LSD _{0.05}
	4.28	4.590	متوسط الاجزاء النباتية
	N.S		قيمة LSD _{0.05}

تأثير تراكيز مختلفة من BA ونوع الجزء النباتي و التداخل بينهما في عدد الافرع الناتجة لنبات الستيفيا بعد اربعة اسابيع من الزراعة خارج الجسم الحي

توضح النتائج في الجدول 4 ان متوسط عدد الافرع المتكونة لنبات الستيفيا لم يتأثر معنوياً بنوع الجزء النباتي المزروع بتراكيز مختلفة من BA، أما بالنسبة الى تأثير تراكيز BA في متوسط عدد الافرع فقد كان معنوياً وارتفع متوسط عدد الافرع عند التركيز 0.1 ملغم. لتر⁻¹ وأعطى اعلى متوسط لعدد الافرع بلغ 3.25 فرع.جزء نباتي⁻¹ وازيادة التركيز قل متوسط عدد الافرع المتكونة وصولاً الى التركيز 1.0 ملغم. لتر⁻¹ الذي أعطى 1.75 فرع.جزء نباتي⁻¹، في حين اعطت معاملة القياس اقل متوسط بعدد الافرع بلغ 1.6 فرع.جزء نباتي⁻¹، اما تأثير التداخل بين الاجزاء النباتية وتراكيز BA فكان معنوياً وأعطت القمة النامية المزروعة في وسط حاو على 0.1 ملغم. لتر⁻¹ BA أعلى متوسط لعدد الأفرع بلغ 3.6 فرع.جزء نباتي⁻¹ بينما اعطت العقد المزروعة في معاملة القياس اقل متوسط لعدد الافرع وبلغ 1.4 فرع.جزء نباتي⁻¹.

جدول 6. تأثير تراكيز مختلفة من IBA (بوجود 0.3 ملغم.لتر⁻¹ KIN) ونوع الجزء النباتي و التداخل بينهما في عدد الافرع الناتجة لنبات الستيفيا بعد اربعة اسابيع من الزراعة خارج الجسم الحي.

متوسط التراكيز	عدد الافرع (فرع.جزء نباتي ⁻¹)		تراكيز IBA ملغم.لتر ⁻¹
	العقد الساقية	القمة النامية	
3.7	3.2	4.2	0
2.25	2.0	2.5	0.05
1.85	1.9	1.8	0.1
1.7	1.8	1.6	0.5
0.614	0.868		قيمة LSD _{0.05}
	2.23	2.53	متوسط الأجزاء النباتية
	N.S		قيمة LSD _{0.05}

تأثير تراكيز مختلفة من IBA (بوجود 0.3 ملغم.لتر⁻¹ KIN) ونوع الجزء النباتي و التداخل بينهما في متوسط طول الافرع الناتجة لنبات الستيفيا بعد اربعة اسابيع من الزراعة خارج الجسم الحي

يلاحظ من الجدول 7 أنه لم يكن لإضافة تراكيز مختلفه من IBA (بوجود 0.3 ملغم.لتر⁻¹ KIN) أو لنوع الجزء النباتي المستعمل (القمة النامية والعقد)، تأثيراً معنوياً في متوسط طول الافرع الناتجة.

جدول 7. تأثير تراكيز مختلفة من IBA (بوجود 0.3 ملغم.لتر⁻¹ KIN) ونوع الجزء النباتي و التداخل بينهما في متوسط طول الافرع الناتجة من الأجزاء النباتية لنبات الستيفيا بعد اربعة اسابيع من الزراعة خارج الجسم الحي.

متوسط التراكيز	طول الفرع (سم)		تراكيز IBA ملغم.لتر ⁻¹
	العقد الساقية	القمة النامية	
4.68	4.75	4.60	0
4.86	4.80	4.92	0.05
3.75	4.15	3.34	0.1
4.89	4.45	5.33	0.5
N.S	N.S		قيمة LSD _{0.05}
	4.54	4.55	متوسط الأجزاء النباتية
	N.S		قيمة LSD _{0.05}

تأثير تراكيز مختلفة من IAA (بوجود 0.3 ملغم.لتر⁻¹ KIN) ونوع الجزء النباتي و التداخل بينهما في عدد الافرع الناتجة لنبات الستيفيا بعد اربعة اسابيع من الزراعة خارج الجسم الحي

توضح النتائج في الجدول 8 أن نوع الجزء النباتي لم يكن له تأثير معنوي في متوسط عدد الافرع الناتجة، أما تأثير

جدول 5. تأثير تراكيز مختلفة من BA ونوع الجزء النباتي و التداخل بينهما في متوسط طول الافرع الناتجة لنبات الستيفيا بعد اربعة اسابيع من الزراعة خارج الجسم الحي.

متوسط التراكيز	طول الفرع (سم)		تراكيز BA ملغم.لتر ⁻¹
	العقد الساقية	القمة النامية	
6.29	5.84	6.74	0
3.17	2.78	3.56	0.1
2.16	1.98	2.34	0.3
1.86	1.89	1.82	0.5
1.44	1.17	1.70	1.0
2.134	3.019		قيمة LSD _{0.05}
	2.732	3.232	متوسط الأجزاء النباتية
	N.S		قيمة LSD _{0.05}

بينت نتائج الدراسة كذلك أفضلية السايبتوكاينين KIN مقارنة مع BA في نشوء أفرع الستيفيا خارج الجسم الحي. تتفق هذه النتائج مع ما توصلنا اليه Chotikadachanarong و Dheeranupattana (6) في ان أعلى متوسط للأفرع المتكونة من عقد نبات الستيفيا (9.31 فرع.جزء نباتي⁻¹) كان عند زراعتها في وسط MS مجهز بـ 3.0 ملغم.لتر⁻¹ KIN ، بينما لا تتفق مع Ibrahim وآخرون (8) الذين استعملوا وسط MS الحاوي على 0.5 ملغم.لتر⁻¹ BAP للحصول على أفضل نمو أولي ومزرعة معقمة لنبات الستيفيا.

تأثير تراكيز مختلفة من IBA (بوجود 0.3 ملغم. لتر⁻¹ KIN) ونوع الجزء النباتي و التداخل بينهما في عدد الافرع الناتجة لنبات الستيفيا بعد اربعة اسابيع من الزراعة خارج الجسم الحي

توضح النتائج في الجدول 6 أنه لم يكن لنوع الجزء النباتي تأثير معنوي في عدد الأفرع المتكونة. أما تأثير تراكيز IBA فكان معنوياً في خفض معدل عدد الافرع اذ اعطت معاملة القياس (الخالية من IBA و بوجود 0.3 ملغم.لتر⁻¹ KIN) أعلى متوسط لعدد الافرع بلغ 3.7 فرع.جزء نباتي⁻¹ ، في حين اعطى التركيز 0.5 ملغم.لتر⁻¹ أقل متوسط لعدد الافرع بلغ 1.7 فرع.جزء نباتي⁻¹ ، أما بالنسبة الى تأثير التداخل بين الاجزاء النباتية وتراكيز IBA فقد كان معنوياً في خفض متوسط عدد الافرع اذ اعطت معاملة القياس أعلى متوسط لعدد الافرع بلغ 4.2 فرع.جزء نباتي⁻¹ للقمة النامية في حين اعطى التركيز 0.5 ملغم.لتر⁻¹ اقل متوسط لعدد الافرع بلغ 1.6 فرع.جزء نباتي⁻¹ لنفس الجزء النباتي.

الاجزاء النباتية وتراكيز IAA فقد كان معنوياً في خفض متوسط طول الافرع، اذ اعطى التركيز 0.5 ملغم. لتر⁻¹ للعقد الساقية اقل متوسط لطول الافرع بلغ 0.85 سم في حين تفوقت معاملة القياس و أعطت أعلى متوسط لطول الافرع بلغ 4.75 سم للعقد.

جدول 9. تأثير تراكيز مختلفة من IAA (بوجود 0.3 ملغم. لتر⁻¹ KIN) ونوع الجزء النباتي و التداخل بينهما في متوسط طول الافرع الناتجة لنبات الستيفيا بعد اربعة اسابيع من الزراعة خارج الجسم الحي.

متوسط التراكيز	طول الفرع (سم)		تراكيز IAA ملغم. لتر ⁻¹
	العقد الساقية	القمة النامية	
4.68	4.75	4.60	0
2.58	1.53	3.62	0.05
2.01	1.31	2.70	0.1
1.65	0.85	2.45	0.5
0.999	1.413		قيمة LSD _{0.05}
متوسط الأجزاء النباتية			متوسط الأجزاء النباتية
2.11		3.34	قيمة LSD _{0.05}
		0.706	

يلاحظ من خلال نتائج التجارب أعلاه ان إضافة الأوكسينين IBA أو IAA لم يكن له تأثير ايجابي في تحسين نشوء الأفرع لنبات الستيفيا خارج الجسم الحي ولربما كان السبب هو ان التراكيز المستعملة كانت أعلى من التركيز الأمثل لإحداث استجابة أفضل، وتتفق هذه النتائج مع ما وجدته Ibrahim وآخرون (8) و Abd El-Motaleb وآخرون (1) و Hassanen و Khalil (7) في ان تضمين وسط النشوء لنبات الستيفيا بالساييتوكاينين لوحده سبب استجابة أفضل للأجزاء النباتية. كما تبين من نتائج الدراسة اختلاف الاستجابة بين الجزئين النباتيين وتفوق قمة القمم النامية على العقد الساقية في الاستجابة وعدد الأفرع المتكونة وهذا قد يعزى الى عوامل فسلجية تتعلق بمحتوى النسيج الغذائي والهرموني (21) او الى درجة نضج وتمايز الخلايا المكونة للحزم الوعائية والتي تعتمد عليها عملية نقل الغذاء الممتص من الوسط الغذائي إذ أشار Omura و Hidika (17) الى ان الأجزاء النباتية الكبيرة الحاوية على نسيج البرنكيما والأوعية الناقلة والكامبيوم ، تظهر إستجابة أفضل بغض النظر عن تراكيز كل من الأوكسين والساييتوكاينين في الوسط الغذائي أو كلا السببين أعلاه. يمكن اعتماد النتائج اعلاه لأنشاء زروعات نبات الستيفيا خارج الجسم الحي بنجاح.

تراكيز IAA (بوجود 0.3 ملغم. لتر⁻¹ KIN) كان معنوياً في خفض متوسط عدد الافرع اذ اعطت معاملة القياس (الخالية من IAA) اعلى متوسط لعدد الافرع بلغ 3.7 فرع. جزء نباتي⁻¹، في حين اعطى التركيز 0.05 ملغم. لتر⁻¹ اقل متوسط لعدد الافرع بلغ 1.75 فرع. جزء نباتي⁻¹. اما بالنسبة الى تأثير التداخل بين الاجزاء النباتية و التراكيز IAA (بوجود 0.3 ملغم. لتر⁻¹ KIN) فقد كان تأثيره معنوياً في خفض عدد الافرع لكن تفوقت معاملة القياس و أعطت اعلى متوسط لعدد الافرع بلغ 4.2 فرع. جزء نباتي⁻¹ للقمم النامية في حين اعطى التركيز 0.05 ملغم. لتر⁻¹ اقل متوسط لعدد الافرع بلغ 1.7 فرع. جزء نباتي⁻¹ للعقد.

جدول 8. تأثير تراكيز مختلفة من IAA (بوجود 0.3 ملغم. لتر⁻¹ KIN) ونوع الجزء النباتي و التداخل بينهما في عدد الافرع الناتجة لنبات الستيفيا بعد اربعة اسابيع من الزراعة خارج الجسم الحي.

متوسط التراكيز	عدد الافرع (فرع. جزء نباتي ⁻¹)		تراكيز IAA ملغم. لتر ⁻¹
	العقد الساقية	القمة النامية	
3.70	3.2	4.2	0
1.75	1.7	1.8	0.05
2.00	2.0	2.0	0.1
2.00	1.8	2.2	0.5
0.595	0.841		قيمة LSD _{0.05}
متوسط الأجزاء النباتية			متوسط الأجزاء النباتية
2.180		2.55	قيمة LSD _{0.05}
		N.S	

تأثير تراكيز مختلفة من IAA (بوجود 0.3 ملغم. لتر⁻¹ KIN) ونوع الجزء النباتي و التداخل بينهما في متوسط طول الافرع الناتجة لنبات الستيفيا بعد اربعة اسابيع من الزراعة خارج الجسم الحي: تشير النتائج في الجدول 9 إلى أن الاجزاء النباتية اختلفت معنوياً في أستجابتها في صفة طول الأفرع المتكونة وتفوقت القمم النامية على العقد اذا اعطت 3.34 سم ، و بالنسبة لتأثير تراكيز IAA (بوجود 0.3 ملغم. لتر⁻¹ KIN) كان تأثيره معنوياً أيضاً في خفض متوسط طول الافرع بزيادة تركيز IAA اذا اعطى التركيز 0.5 ملغم. لتر⁻¹ اقل متوسط لطول الافرع بلغ 1.65 سم في حين تفوقت معاملة القياس (الخالية من IAA) وبلغ متوسط طول الافرع 4.68 سم. اما بالنسبة الى التداخل بين

REFERENCES

- 1- Abd EL-Motaleb, M, M. S. Abd EL-Hady; M. A. El-Kholy and A. Badr. 2013. *In vitro* propagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni in Egypt. Journal of Applied Sciences Research 9(8):4597-4605.
- 2- Abdul Razak, U. N., C. B. Ong, T. S. Yu, and L.K. Lau. 2014. *In vitro* Micropropagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni in Malaysia. Brazilian Archives of Biology and Technology. 57(1): 23-28.
- 3- Al-Khafaji, M. A. 2014. Plant Growth Regulators, Application and Utilizations in Horticulture. Bookstore for Printing, Publishing and Translating, University of Baghdad. p: 132-138.
- 4- Chalapathi, M.V. and S. Thimmegowda. 1997. Natural non-calorie sweetener stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) A future crop of India. Crop Research Hisar, 14 (2), 347-350.
- 5- Choi, Y. H., I. Kim, K. D. Yoon, S. J. Lee, C. Y. Kim and K. P. Yoo. 2002. Supercritical fluid extraction and liquid chromatographic-electrospray mass spectrometric analysis of stevioside from *Stevia rebaudiana* leaves. Chromatographia 55(10):617–620.
- 6- Chotikadachanarong, K. and S. Dheeranupatt. 2013. Micropropagation and acclimatization of *Stevia rebaudiana* Bertoni, Pakistan Journal of Biological Sciences 16(17): 887-890.
- 7- Hassanen, S. A and R. M. A. Khalil. 2013. Biotechnological studies for improving of stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) *in vitro* plantlets. Middle-East Journal of Scientific Research 14(1):93-106.
- 8- Ibrahim, I.A., M.I. Nasr, B.R. Mohammed, and M. E. Mohammed. 2008. Plant growth regulators affecting *in vitro* cultivation of *Stevia rebaudiana*. Sugar Tech., 10: 254-259.
- 9- Laribi, B., N. Rouatbi, K. Kouki, and T. Bettaieb. 2012. *In vitro* propagation of *Stevia rebaudiana* Bert. A non-caloric sweetener and antidiabetic medicinal plant. Int. J. Med. Arom. Plants. 2(2):333-339.
- 10- Ma L. and S. Yan. 2009. Identification of *Stevia rebaudiana* Bertoni proteins by sodium dedecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis. Asian Journal of Crop Science. 1(1): 63-65.
- 11- Miyazaki, Y. and H. Wantenabe. 1974. Studies on the cultivation of *Stevia*; on the propagation of plant. Japanese Journal of Tropical Agriculture, 17:154-157.
- 12- Miyagawa, H., N. Fujioka, H. Kohda, K. Yamasaki, K. Taniguchi and R. Tanaka. 1986. Studies on the tissue culture of *Stevia rebaudiana* and its components. II. Induction of shoot primordia. Planta Medicinal, 52:321–323.
- 13- Mizutani, K., and O. Tanaka. 2002. Use of *Stevia rebaudiana* sweeteners in Japan. In: A. D. Kinghorn (Ed.), *Stevia*, the Genus *Stevia*. Medicinal and Aromatic Plants Industrial Profile London: Taylor and Francis. Vol.19, p: 178–195.
- 14- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant 15:473–497.
- 15- Namdari, N., L. Shooshtari, and A. Qaderi. 2015. *In vitro* Micropropagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni, Biological Forum An International Journal 7(1): 1750-1754.
- 16- Noordin, N., N. Ibrahim, H. S. Sajahan, M. M. Nahar, R. Nahar, and N. R. Abdul Rashid. 2012. Micropropagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni through temporary Immersion Bioreactor System. www.iaea.org/inis/collection/NCLCollectionStore/_Public/44/096/44096871 .
- 17- Omura, M., and T. Hidaka. 1992. Shoot tip culture of citrus. Longevity of culture shoots. Bull. Fruit Tree Research Station, Japan, 22:37-48.
- 18- Ramawat, K. G. 2004. Plant Biotechnology. Reprint of the Second Edition. S. Chand and Company. Ltd. New Delhi. India., pp: 456.

19- Starratt, A.N., C.W. Kirby, R. Pocs, and J.E. Brandle. 2002. Rebaudioside F, a diterpene glycoside from *Stevia rebaudiana*. *Phytochemistry* 59, 367–370.

20- Suanarunsawat T., S. Klongpanichapak, S. Rungseesantivanon, and N. Chaiyabutr. 2004. Effect of stevioside and *Stevia rebaudiana* in strep tozotocin induced diabetic rats. *Eastern Journal of Medicine*. 9, 51-56.

21. Trigiano, R. N. and D. J. Gray. 2000. *Plant tissue culture concepts and laboratory exercises*, 2nd edition, Boca Raton, USA. CRC. Press., p:11-249.

22. Werner, T., V. Motyka, M. Strnad, and T. Schmülling. 2001. Regulation of plant growth by cytokinin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98:10487-10492.