

وزارت جهاد كشاورزي
سازمان تحقيقات و آموزش كشاورزي
مؤسسه آموزش عالي علمي کاربردي جهاد كشاورزي

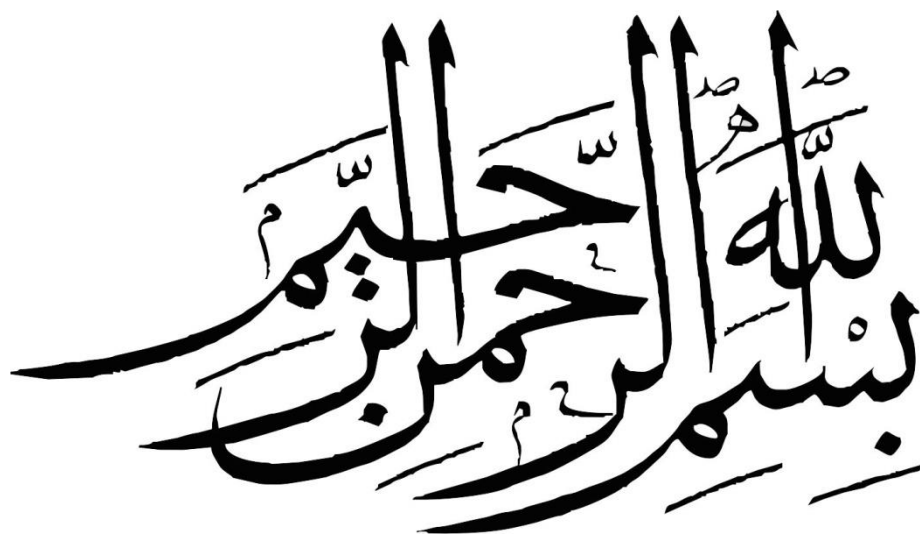
گزارش پروژه تحقيقاتي:
بررسي اثر بستر كشت بر رشد و ويژگي هاي ييوشيميايي گياه استويا به منظور
بالابردن توليد و فرآورده هاي آن به ويژه قندهاي استويولي

مجري: دكتور ربابه اصغري

وزارت جهاد كشاورزي
سازمان تحقيقات و آموزش كشاورزي
مؤسسه آموزش عالي علمي کاربردي جهاد كشاورزي

عنوان طرح: بررسی اثر بستر کشت بر رشد و ویژگی‌های
بیوشیمیایی گیاه استویا به منظور بالابردن تولید و فرآورده
های آن به ویژه قندهای استویولی

- شماره مصوب طرح: ۲۰۱۰۱۸۹۲۱۰۸
- نام و نام‌خانوداگی مجری مسئول (اختصاص به پروژه ها و طرح های ملی و مشترک دارد):
- نام و نام‌خانوداگی مجری/مجریان: ربابه اصغری
- نام و نام‌خانوادگی همکاران: مهرداد تیموری
- نام و نام‌خانوادگی مشاور(ان):
- محل اجرا: مرکز آموزش عالی امام خمینی (ره)
- تاریخ شروع: ۱۳۹۲/۱۲/۲۱
- مدت اجرا: یک سال و نیم



تشکر و قدردانی

بر خود واجب می دانم شکرگذار خدوند منعان باشم که بنده را یاری نمود پژوهش حاضر را با همکاری، همکاران اندیشمند با موفقیت به پایان برسانم. بر همین اساس در این تحقیق آقای مهندس مهرداد تیموری، مهندس علی باباگلزاده به عنوان همکار در فرآیند انجام این تحقیق، با اینجانب همکاری صمیمانه ای داشته اند، لازم می دانم از تلاش های این عزیزان نهایت تشکر و قدردانی را داشته باشم. از جناب آقای دکتر عبدالله مخبر ریاست محترم مرکز آموزش عالی امام خمینی (ره) علاوه بر مشاوره های علمی ارزشمند، امکانات (فضای کاری مناسب و ...) را در اختیار اینجانب قرار دادند و بدون مساعدت ایشان انجام این تحقیق به ویژه انجام عملیات میدانی امکان پذیر نبود. صمیمانه تشکر نموده و از خدواند متعال برای ایشان آرزوی توفیقات روزافزون را دارم. از ریاست و مدیران مؤسسه آموزش عالی علمی و کاربردی جهاد کشاورزی به خاطر تأمین اعتبار مورد نیاز طرح و ارائه نقطه نظرات کارشناسی ارزشمند به ویژه از همکاری های صمیمانه همکاران دفتر مطالعات آقای دکتر شهرام مقدسی فریمانی، سرکار خانم مهندس زهرا تشکری صمیمانه تشکر می نمایم. از تمام همکاران محترم معاونت پژوهشی و کارآفرینی مرکز آموزش عالی امام خمینی (ره) به ویژه از آقای دکتر سید داود حاجی میر رحیمی به خاطر همکاری های ارزشمندشان صمیمانه تشکر می نمایم.

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
چکیده	

فصل اول : کلیات تحقیق

۱-مقدمه	 ۲
۱-۱- بیان مسأله	 ۳
۱-۲- اهمیت و ضرورت پژوهش	 ۷
۱-۳- اهداف تحقیق	 ۹
۱-۴- سؤال های تحقیق	 ۹
۱-۵- تعریف عملیاتی و نظری واژگان	 ۱۰

فصل دوم : بررسی منابع

۲-مقدمه	 ۱۲
۲-۱- معرفی گیاه	 ۱۲
۲-۲- خصوصیات گیاه شناسی	 ۱۴
۲-۳- مناطق پراکنش، سازگاری و نیازهای اکولوژیکی	 ۱۵
۲-۴- تکثیر استویا	 ۱۷
۲-۵- ترکیبات اصلی استویا	 ۱۹
۲-۶- سایر ترکیبات مفید استویا	 ۲۲
۲-۷- اهمیت دارویی استویا	 ۲۳
۲-۸- سوابق در داخل کشور و خارج از کشور	 ۲۵

عنوان	صفحه
-------	------

فصل سوم : روش شناسی تحقیق

۳-مقدمه	 ۳۸
۳-۱- موقعیت مکانی	 ۳۸
۳-۲- طرح آزمایش	 ۳۹
۳-۳- محیط کشت	 ۳۹
۳-۴- آماده سازی مواد گیاهی	 ۴۰
۳-۵- اندازه گیری صفات رویشی	 ۴۲
۳-۶- قند محلول کل	 ۴۲
۳-۷- فنل کل	 ۴۳
۳-۸- پروتئین کل	 ۴۳
۳-۹- سنجش کلیکوزیدهای استویولی	 ۴۳
۳-۱۰- آنالیز آماری	 ۴۴

فصل چهارم : یافته های پژوهش

۴-مقدمه	 ۴۶
۴-۱- صفات مورفولوژیکی و تیمارهای غذایی	 ۴۶
۴-۱-۱- برگ	 ۴۶

۴۷		۲-۱-۴-طول ساقه
۴۸		۳-۱-۴-وزن خشک برگ
۴۹		۴-۱-۴-صفات بیوشیمیایی
۵۰		۵-۱-۴-قند خون و فنل
فصل پنجم: خلاصه، نتیجه‌گیری و پیشنهادات		
۵۷		۱-۵-خلاصه و جمع بندی
۶۰		۲-۵-پیشنهادهای تحقیق
۶۱		۳-۵-عناوین تحقیقاتی پیشنهادی
۶۱		۴-۵-محدودیت های تحقیق

عنوان صفحه

فهرست جداول

جدل (۳-۱) . تیمارهای مورد مطالعه	۴۱
جدول (۳-۲) . عناصر غذایی	۴۱
جدول (۴-۱) . تجزیه واریانس سطح برگ ، طول ساقه و وزن خشک و تر	۴۷
جدول (۴-۲) . تجزیه واریانس کلروفیل، کارتونید و پروتین	۵۰
جدول (۴-۳) . تجزیه واریانس	۵۲
جدول (۴-۴) . تیمارها و متغیرهای مورد مطالعه	۵۵

فهرست نمودارها

نمودار (۴-۱) . رابطه سطح برگ و بسترهای کشت	۴۶
نمودار (۴-۲) . رابطه طول ساقه و بسترهای کشت	۴۷
نمودار (۴-۳) . رابطه وزن خشک و بسترهای کشت	۴۸
نمودار (۴-۴) . رابطه وزن تر و بسترهای کشت	۴۹
نمودار (۴-۵) . رابطه کلروفیل و بسترهای کشت	۵۰
نمودار (۴-۶) . رابطه کلروفیل b و بسترهای کشت	۵۱
نمودار (۴-۷) . رابطه پروتین و بسترهای کشت	۵۲
نمودار (۴-۸) . رابطه گلوکوز و بسترهای کشت	۵۳
نمودار (۴-۹) . رابطه فنل وز و بسترهای کشت	۵۳
نمودار (۴-۱۰) . رابطه کلروفیل b و بسترهای کشت	۵۴

فهرست شکل ها

شکل (۲-۱) . نمایی از قسمت‌های مختلف گیاه استویا	۱۵
---	----

چکیده

این تحقیق حاضر به منظور بررسی اثر بستر رشد و کودهای (شیمیایی و زیستی) بر ویژگی‌های رشدی (سطح برگ، طول گیاه، وزن تر و وزن خشک) و میزان ترکیبات بیوشیمیایی (شامل رنگدادهای فتوسنتزی a,b و کاروتنوئیدها، پروتئین کل، قندهای محلول، فنل کل و ریبادیوزایدها) استویا در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار، انجام شد. برای دستیابی به بهترین بستر کشت و تیمار غذایی به نظر می‌رسد مقایسه بسترهای کشت شامل بسترهای بدون خاک ارگانیک با ترکیبهای مختلف با هم و با بسترهای دارای خاک با ترکیبهای مختلف و تحت تیمارهای غذایی متنوع با کودهای شیمیایی و ارگانیک می‌تواند در تأمین شرایط بهتر رشد گیاه و نهایتاً تولید محصول بهتر و بیشتر منجر شود. تحقیق حاضر ضمن تأیید نتایج حاصل از تحقیقات گذشته مبنی بر تأثیرپذیری خصوصیات مورفولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه استویا از محیط کشت نشان می‌دهد برای بهبود رشد و تولیدات بیوشیمیایی گیاه بستر کشت و نوع ماده مغذی افزوده شده به بستر بسیار تأثیرگذارند، و با توجه به هدف کشت گیاه بایستی محیط مناسب انتخاب شود. کاروتنوئیدها نیز از نوع محیط کشت تأثیر می‌پذیرند. بستر متشکل 40%vearmicompost+60%pearlite بدون نیاز به افزودن ماده مغذی بیشتر بهترین شرایط را از نظر رنگدانه‌های فتوسنتزی و در واقع فتوسنتز فراهم می‌آورد، که بالا بودن توده زیستی در گیاهان رویش یافته در این محیطها توجیح می‌نماید. در مورد پروتئین کل نیز تغییرات معنی‌داری را در محیطهای مختلف نشان داده که این تغییرات هم به نوع بستر و هم نوع تیمار غذایی بستگی دارد.

واژه‌های کلیدی: استویا، بسترهای کشت ارگانیک، قندهای استویولی، گلیکوزیدهای دی‌ترپنی، ریبادیوزاید

فصل اول

کلیات تحقیق

۱-مقدمه

استویا یکی از گیاهان با خاصیت دارویی دارای اهمیت خاص می باشد. استویا که به آن شیرین گیاه نیز می گویند، گیاهی است که ارتفاع آن به یک و نیم متر هم می رسد. این گیاه از خانواده کاسنی است و در زادگاه خود، یعنی آمریکای لاتین و

اختصاصاً در کشور پاراگوئه، به نام ka'a he'ê شناخته می‌شود. شیرین گیاه در سال ۱۹۸۸ به وسیله یک گیاه‌شناس سوئیسی نام-گذاری علمی شده است. بیش از صد ترکیب در برگ‌های گیاه استویا شناسایی شده است که بهترین و شناخته شده ترین آن ها استویوزید و ربودیوزید A است (کنلی، ۲۰۰۲).

برگ های استویا مجموعه ای از گلیکوزیدهای دی ترپن با عنوان گلیکوزیدهای استویول دارند. استویوزید یکی از اصلی ترین گلیکوزیدهای موجود در این گیاه است که ۱۱۰ تا ۲۷۰ بار شیرین تر از ساکاروز است. گلیکوزیدهای موجود در این گیاه جذب بدن نمی‌شوند و بدون کالری هستند (تاوارینی و آنجلینی، ۲۰۱۳؛ یاداو^۳ و همکاران، ۲۰۱۱؛ برنل و روزا^۴، ۱۹۹۲).

مطالعه شرایط رشد و تأثیر بسترهای کشت مختلف و ویژگی‌های بیوشیمایی گیاه استویا می‌تواند در دستیابی به کیفیت بهتر این گیاه دارای اهمیت باشد. این تحقیق با "بررسی اثر بستر کشت بر رشد و ویژگی‌های بیوشیمایی گیاه استویا به منظور بالابردن تولید و فرآورده های آن به ویژه قندهای استویولی" با هدف بررسی رابطه اثر بستر کشت بر رشد و ویژگی‌های بیوشیمایی گیاه استویا انجام گردید. برای دستیابی به هدف-های تحقیق علاوه بر مطالعات کتابخانه‌ای و شناخت تحقیقات انجام یافته در این حوزه و شاخص‌های بیوشیمایی و اثر بستر کشت، با استفاده از طرح کاملاً تصادفی با انجام آزمایشات مربوط با بسترهای مختلف و تیمارهای غذایی متفاوت شامل سطح برگ، طول ساقه، وزن تر برگ، وزن خشک برگ مورد ارزیابی آماری قرار گرفتند. این فصل از گزارش تحقیق به کلیات

1 Kennelly

2 Tavarini & Angelini

3 Yadav

4 Brandle & Rosa

تحقیق اختصاص دارد در این فصل اهمیت و ضرورت انجام تحقیق، بیان مسأله، اهداف، سؤال های تحقیق و واژگان کلیدی و ... مورد بررسی قرار گرفته است.

۱-۱- بیان مسأله

استویا (*Stevia rebaudiana* Bertoni) گیاه علفی نیمه بوته ای کوچک، دائمی مناطق حاره (تروپیکال) متعلق به خانواده Asteraceae و از ارشمندترین گیاهان دارویی این مناطق می باشد. این گیاه بومی پاراگوئه و برزیل (جین^۱ و همکاران، ۲۰۰۹؛ حسن و خلیل^۲، ۲۰۱۳) است و یکی از اعضای جنس *Stevia* می باشد که قندهای استویلی شیرین تولید می کنند (علی^۳ و همکاران، ۲۰۱۰؛ سوجارتا^۴ و همکاران، ۱۹۸۲). برگ های استویا منبع گلیکوزیدهای دی ترپنی که عمدتاً استویوزید و ریبادیوزاید (*Stevioside*, *rebaudioside*) هستند، می باشد. این ترکیبات ۳۰۰ بار شیرین تر از قند سوکروز که از چغندر قند، نیشکر و سایر منابع حاصل می شود، می باشد (یودین^۵ و همکاران، ۲۰۰۶). استویوزید ارشمندترین شیرین کننده طبیعی است که تولید شده، چون از طعم نسبتاً خوب و پایداری شیمیایی برخوردار است؛ همچنین فاقد کالری می باشد (آنباژانگ^۶ و همکاران، ۲۰۱۰). نسبت های متداول چهار تشکیل دهنده اصلی گلیکوزیدهای حاصل از برگ استویای وحشی بر اساس وزن خشک عبارت است از: استویوزید (*Stevioside*) ۱/۹٪، ریبادیوزاید A (*rebaudioside A*) ۸/۳٪، ریبادیوزاید C (*rebaudioside C*) ۶/۰٪ و دالکوزاید (*dulcoside*)

1 Jain

2 Hassanen and Khalil

3 Ali

4 Soejarta

5 Uddin

6 Anbazhagan

۳/۰٪ (Bhosle, 2004) (بوهسل، ۲۰۰۴). مسیر بیوسنتز گلیکوزیدهای استویولی از موالونیک اسید مشتق می‌شود. استویا یک گیاه دارویی و دارای شیرین‌کننده بدون کالری مهم می‌باشد که در صنایع دارویی؛ غذایی و آرایشی استفاده می‌شود (راتور^۲ و همکاران، ۲۰۱۴). از آنجائی‌که استویا تأثیری بر قند خون ندارد برای سلامتی مفید می‌باشد (تاوار^۳ و همکاران، ۲۰۱۰). افراد دارای رژیم های غذایی خاص و افراد دیابتی با قند بالا می‌توانند از این ترکیبات به عنوان شیرین‌کننده جایگزین استفاده‌کنند (دین^۴ و همکاران، ۲۰۰۶). بعلاوه، این گیاه در تهیه دارو برای لاغری، فشار خون، بیماری قلبی ارزشمند است، همچنین از آن می‌تواند بعنوان یک داروی ضد قند خون (گریسن^۵ و همکاران، ۲۰۰۴)، ضد فشارخون (فری^۶ و همکاران، ۲۰۰۶)، ضد تومور (یاسوکاوا و همکاران، ۲۰۰۲)، سرطان و یک کاهنده سطح اسید اوریک (احمد و همکاران، ۲۰۰۷؛ حسن و خلیل، ۲۰۱۳) استفاده کرد. این گیاه یکی از بهترین گیاهان دارویی است که علاوه در موارد اشاره شده همچون قند خون بالا و فشار خون در سایر موارد از جمله مشکلات گوارشی، تهیه محلول‌های پاک‌کننده پوست، بیماری‌های قلبی استفاده می‌شود. این گیاه علاوه بر کاربردهای دارویی در صنایع غذایی مختلف از جمله در تهیه ژله، مربا، انواع نان، آب میوه، قنادی، آبنبات، انواع شربت‌ها و غیره مورد استفاده می‌باشد (علی و همکاران، ۲۰۱۰). سایر جذابیت‌های این ماده طبیعی فوق شیرین

1 Bhosle

2 Rathore

3 Taware

4 Din

5 Gregersen

6 Ferri

7 Yasukawa

8 Ahmed

شامل غیرقابل تخمیر بودن، بی‌رنگ بودن، پایداری در دمای بالا (تا ۱۰۰۰ درجه سانتی‌گراد) و ماندگاری بالا می‌باشد. این فرآورده را می‌توان به چای، قهوه و انواع نان، غذاهای فرآوری شده و نوشابه‌ها افزود (تاوار و همکاران، ۲۰۱۰؛ گوجارال، ۲۰۰۴).

کودها موادی ارگانیکی یا غیر ارگانیکی، طبیعی یا سنتتیک، می‌باشند که نیازهای معدنی گیاهان را برای رشد و تولید محصول در حد بهینه فراهم می‌سازند. کودهای ارگانیکی موادی طبیعی از منابع گیاهی یا حیوانی هستند. کودهای ارگانیکی بعنوان منبعی از تمام عناصر میکرو و ماکرو به که در طی فرآیند معدنی شدن به فرم‌های قابل دسترس تبدیل شده‌اند می‌باشند و خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک را بهبود می‌بخشند، تأثیر مستقیم بر رشد گیاهان دارند (چاترجی^۲ و همکاران، ۲۰۰۵) و نقشی مهم در افزایش رشد، تولید و ترکیبات بسیاری از تولیدات کشاورزی دارند (ریان^۳ و همکاران، ۱۹۸۵). گزارش شده کودهای ارگانیکی تأثیر معنی داری بر قد، سطح برگ و میوه گوجه فرنگی و تعدادی از گیاهان دارند (عباس^۴ و همکاران، ۲۰۱۳).

کمپوست از انواع کودهای ارگانیکی از تجزیه بیولوژیک بقایای گیاهی و حیوانی تحت شرایط هوازی و کنترل شده تولید می‌شود (اقبال^۵ و همکاران، ۱۹۹۷) و ورمی کمپوست یکی دیگر از کودهای ارگانیکی بعنوان یک ماده پایدار حاصل بیواکسد مواد ارگانیکی که به واسطه عمل کرم‌های خاکی و میکرو ارگانیسم‌های

1 Gujral

2 Chaterjee

3 Ryan

4 Abbas

5 Eghball

خاک تولید می‌شود، شناخته می‌شود (ایرا^۱ و همکاران، ۲۰۰۲). کودها از نقش تعیین‌کننده در افزایش تولید محصول برخوردارند. ورمی واش و تی کمپوست از کودهای محلول تهیه شده از ورمی کمپوست هستند که در کشاورزی ارگانیک به هر دو صورت جایگزین و یا مکمل کودهای جامد ظرفیت منحصر به فرد آن به جهت در تأمین مواد غذایی به جهت تأثیرگذاری و سرعت اثر آنها می‌باشد (فاطیما و سکار^۲، ۲۰۱۴).

کودهای شیمیایی یا غیر ارگانیک محتوی عناصر ماکرو اصلی شامل نیتروژن، فسفات و پتاسیم می‌باشند که بر رشد رویش و مرحله باز تولید رشد گیاهی تأثیر بسزایی دارد، همچنین قابل انحلال بودن عناصر و سرعت آزاد شدن عناصر نسبت به کود ارگانیک که بطور معمول کمتر از کودهای غیرارگانیک است موجب شده کودهای غیرارگانیک بیش از کودهای ارگانیک مورد استفاده قرار گیرند. اگرچه در کشورهای توسعه یافته مصرف این کودها هزینه بالایی را به کشاورزان بخصوص کشاورزان خرد که معمولاً از نظر مالی بنیه ضعیفی دارند را متأثر می‌سازد. استفاده از کودهای شیمیایی، آفتکش‌ها و علفکش‌ها میزان تولید را افزایش می‌دهد اما مصرف آنها تأثیرات نگران کننده-ای بر کیفیت محیط‌زیست و فرآورده‌های حاصل از خاک یا همان تولیدات کشاورزی را نیز افزایش می‌دهد.

کودهای زیستی یا ارگانیک مواد مفیدی هستند که نسبت به کودهای غیرارگانیک، کیفیت خاک را بهبود می‌بخشند. کیفیت خوب، مواد ذخیره شده بالا در تولیدات گیاهی که با کاربرد این کودها فراهم می‌شود، می‌تواند مزایای زیادی از جمله کاهش هزینه های تولید کشاورزان، به خصوص در

1 Aira

2 Fathima and Sekar

کشورهای توسعه یافته مانند هند، داشته باشند. استفاده درست و کامل از نیتروژن مصرفی یک هدف ضروری در مدیریت محصول می باشد. امروزه مسلم است که استفاده از کودهای زیستی که حاصل نیتری فیکاسیون هستند یطور قابل ملاحظه ای مدت زمان استفاده و حاصلخیزی خاک را افزایش می دهند (جات و پال، ۲۰۰۲). مدیریت ترکیب عناصر غذایی خاک توسط استفاده توأم از کودهای زیستی و شیمیایی موجب افزایش تولید استویا می شود (پتیل، ۲۰۱۰).

تلاشهایی به منظور تبدیل استویا از یک گیاه وحشی به یک گیاه اصلاح شده انجام پذیرفته است، بنابراین شناخت این گیاه از جنبه های زیست شناختی، شیمیایی و بیوشیمیایی ضروری می باشد. بدین منظور مطالعاتی در زمینه اثر کودها (شیمیایی و زیستی) بر رشد، میزان پروتئین و کربوهیدرات های استویا (*Stevia rebaudiana*) انجام شده است گرفته شد (پتیل، ۲۰۱۰).

تحقیق حاضر به منظور بررسی اثر بستر رشد و کودهای (شیمیایی و زیستی) بر ویژگی های رشدی (سطح برگ، طول گیاه، وزن تر و وزن خشک) و میزان ترکیبات بیوشیمیایی (شامل رنگداده های فتوسنتزی a,b و کاروتنوئیدها، پروتئین کل، قندهای محلول، فنل کل و ریبادیوزایدها) استویا انجام شد.

۲-۱- اهمیت و ضرورت پژوهش

استویا، با نام علمی *Stevia rebaudiana* Bertoni متعلق به خانواده آستراسه، یک گیاه چندساله است که به طور کلی با نام استویا شناخته می شود (راین^۳ و همکاران، ۲۰۱۳). ارتفاع گیاه استویا

1 Jat and Pal

2 Patil

3. Raina

بسته به شرایط ۶۰-۸۰ سانتیمتر متغیر بوده و طول عمرش ۳-۵ می باشد. امروزه از استویا در بسیاری از کشورها به عنوان شیرین کننده استفاده می شود. استویا (stevia) یک گیاه بومی آمریکای جنوبی است که امروزه در کشورهای مختلف اروپایی کشت و مصرف می شود. خوشبختانه کشت این گیاه چند سالی است که در زمین های شهرهای شمالی ایران نیز شروع شده است. استویا یک گیاه با قدرت شیرین کنندگی بسیار قوی می باشد که می تواند یک جایگزین مناسب برای قندهای تصفیه شده باشد. این گیاه همیار لاغری است، فشار خون را کاهش می دهد، با دیابت و قند خون بالا مقابله می کند. از آنجائی که تولید این محصول در ایران با اهداف تحقیقاتی، صنعتی و دارویی در گلخانه انجام می گیرد و محدودیتهایی که در کشت گلخانه وجود دارد به جهت تولید بیشتر، سالم تر و کم هزینه تر دستیابی به بسترهای کشت مناسب ضروری به نظر می رسد.

شیره برگ های استویا شیرین کننده صد در صد طبیعی است. ترکیبات موجود در این گیاه میزان گلوکز را پایین نمی آورند اما شاخص گلیسمی بسیار پایینی در حد هیچ دارند. در واقع گیاه استویا باعث بالا رفتن انسولین نمی شود. بهتر است عصاره استویا جایگزین قند شود. البته قبل از هر کاری اول با پزشک خود مشورت کنید.

در سال اول از هر هکتار ۱ تا ۲ تن برداشت و از سال دوم ۳ تن در هر هکتار. قیمت هر کیلو برگ خشک استویا ۱۵ هزار تا ۳۵ هزار تومان می باشد. یکبار کشت برابر است با پنج سال برداشت.

مزایای استفاده از بسترهای بدون خاک به ویژه در کشت گلخانه ای از جمله سبکتر بودن آن و ممانعت از گسترش آفات و بیماری هایی با منشاء خاک که این امر موجب کاهش مصرف سم

مصرفی و هزینه های مربوطه و تولید محصول سالم تر می شود. استفاده از بسترهای بدون خاک ارگانیک که به دلیل مغذی بودن می تواند به کاهش مصرف کودهای شیمیایی نیز منجر شود که این امر نیز هم به کاهش هزینه های تولید و هم تولید محصول سالم منجر می شود حائز اهمیت می باشد. لذا در این پژوهش سعی بر انتخاب بستر کشت مناسب به منظور افزایش تولید، کاهش هزینه و تولید سالم برای گیاه استویا که از ارزش اقتصادی بالایی برخوردار است، می باشد.

تحقیقات چشمگیری نیز در امر اصلاح و انتخاب ارقام جدید صورت گرفته در سال های اخیر توجه جهانیان را بخود جلب کرده اند و شرکت های متعددی در سطح جهان به تولید فرآورده های آن روی آورده اند و مصرف آن بجای قند و شکر معمولی روز بروز رو به افزایش است زیرا پودر حاصله از آسیاب برگ آن شکر طبیعی است و خصوصیات بهداشتی بالائی در سلامت انسان است زیرا هیچگونه کالری ندارد و کاملاً طبیعی است و می رود که در آینده بسیار نزدیک جای مصرف شکر و قند معمولی را در جهان بگیرد و به دلیل بالابودن میزان شربتی آن در مصارف مختلف زندگی انسان جای خاصی را باز کرده است.

با توجه به اهمیتی که کشت و پرورش این گیاه دارد به منظور دستیابی به محصول بیشتر سالم تر و ارزان تر بررسی نقش بسترهای کشت و تیمارهای غذایی بر رشد (سطح برگ، طول گیاه، وزن تر و خشک برگ)، خصوصیات بیوشیمیایی با تأکید بر تولید قندهای استویولی، میزان پروتئین، فندهای محلول و آنتی اکسیدان های موجود در برگ های گیاه و نیز رنگدانه ای فتوسنتزی استویا حائز اهمیت می باشد. بنابراین بسترهای کشت دارای خاک و بدون خاک تحت تیمارهای مختلف شیمیایی و

ارگانیک برای کشت استویا و بررسی تأثیر آن مناسب به نظر می‌رسد.

۳-۱-۱ اهداف تحقیق

هدف کلی این تحقیق بررسی اثر بستر کشت بر رشد و ویژگی‌های بیوشیمیایی گیاه استویا به منظور بالابردن تولید و فرآورده های آن به ویژه قندهای استویولی.

۱-۱-۳ هدف / اهداف پروژه

- شناخت تأثیر بستر کشت بر خصوصیات رشدی استویای کشت شده در گلخانه (آیا گیاه رشد بیشتر و در واقع توده زیستی بیشتری تولید می‌کند؟).

- شناخت تأثیر بستر کشت بر میزان ترکیبات بیوشیمیایی تولید شده (قندهای استویولی، میزان پروتئین، فندهای محلول و آنتی اکسیدان‌های موجود در برگ‌های گیاه و نیز رنگدانه‌ای فتوسنتزی)

- شناخت تأثیر تیمار غذایی بکار رفته بر صفات مورد بررسی
- انتخاب بهترین بستر و تیمار غذایی برای تولید بیشتر گیاه با کیفیت مطلوب

۴-۱-۱ سؤال‌های تحقیق

سؤال اصلی این تحقیق این است که بسترهای مختلف کشت بر رشد و ویژگی‌های بیوشیمیایی گیاه استویا در جهت بالابردن تولید و فرآورده های آن به ویژه قندهای استویولی چه تأثیری دارد؟

سؤال های فرعی مورد نظر در این ارتباط به شرح زیر است:

- بستر کشت تا چه حدی بر خصوصیات رشدی استویای کشت شده در گلخانه تأثیر دارد؟

- بستر کشت بر میزان ترکیبات بیوشیمیایی تولید شده (قندهای استویولی، میزان پروتئین، فندهای محلول و آنتی اکسیدان-

های موجود در برگ‌های گیاه و نیز رنگدانه‌ای فتوسنتزی) چه تأثیری دارد؟

- تیمار غذایی بکار رفته بر صفات مورد بررسی چه تأثیری دارد؟

- بهترین بستر و تیمار غذایی برای تولید استویای کشت شده چیست؟

۵-۱- تعریف عملیاتی و نظری واژگان

گیاه دارویی استویا با نام علمی *Stevia rebaudiana* Bertoni متعلق به تیره کاسنی (Asteraceae) می‌باشد.

فصل دوم

بررسی منابع

۲-مقدمه

بدون شک بررسی منابع و سوابق موضوع به همراه واکاوی پیشینه‌های پژوهشی یکی از مهم‌ترین بخش‌های هر تحقیقی به شمار می‌آید. چرا که در واقع چارچوب نظری تحقیق و تدقیق متغیرهای آن بر اساس این بخش از پژوهش شکل گرفته و سازمان می‌یابد. بر این اساس، در این فصل از یک سو به بررسی مبانی نظری موضوع از تعاریف و مفاهیم مربوط به استویا و تحقیقات انجام شده توسط صاحب‌نظران ارائه می‌گردد.

۲-۱- معرفی گیاه

استویا گیاهی از خانواده Asteraceae و چند ساله است، که در مناطق نیمه‌گرمسیری و در عرض‌های جغرافیایی بالا با روزهای بلند رشد می‌کند (مونداکا^۱ و همکاران، ۲۰۱۲). استویا گیاهی شیرین‌کننده طبیعی دارای اهمیت دارویی و تجاری است که در همه دنیا مورد استفاده قرار می‌گیرد و با نام‌های علف شیرین، برگ شیرین، گیاه شیرین و برگ عسل نیز شناخته می‌شود (چالپاتی^۲ و همکاران، ۱۹۹۹). این گیاه بومی مناطق شمالی آمریکای جنوبی به ویژه پاراگوئه و برزیل می‌باشد. بیش از ۲۰۰ گونه استویا شناخته شده است که گونه (Stevia rebaudiana) بیشترین شیرینی را نشان می‌دهد (پتیل، ۲۰۱۰).

جنس استویا دارای بیش از ۲۰۰ گونه است که گونه Stevia rebaudiana B. در میان همه گونه‌ها دارای اسانس شیرین‌تری است. استویا یک گیاه دارویی مهم است که از لحاظ صنعتی به عنوان شیرین‌کننده طبیعی محسوب می‌شود. بذرهاي این گیاه به سختی جوانه می‌زنند و بسیاری از این بذرها غالباً پوک و عقیم می‌باشند و قابلیت کشت ندارند. علاوه بر آن با توجه به رشد اولیه کم و کند، گیاهچه‌های این گیاه قادر به

1 Mondaca

2 Chalapathi

رقابت با علف‌های هرز نیستند و از طرفی تکثیر از ساقه نیز نیازمند نیروی کار بالا و زمان زیادی می باشد (سیوارام و موکوندان، ۲۰۰۳).

به همین دلیل در اکثر موارد از کشت بافت برای تکثیر آن استفاده می‌شود. این گیاه در بافت‌برگی دارای گلیکوزیدهای ترپنی با خواص شیرین‌سازی می‌باشد. دو گلیکوزید اصلی آن شامل استویوزید و

A

ربادیوزید

می‌باشد که هر کدام به ترتیب ۲۵۰ تا ۳۰۰ بار و ۳۵۰ تا ۴۵۰ بار شیرینتر از ساکارز هستند. این ترکیبات می‌توانند مانع رشد باکتری‌ها شوند و به عنوان داروی دیابت‌نیز در تنظیم قند خون نقش دارند (تاوار^۲ و همکاران، ۲۰۱۰).

استویا به گیاه برگ‌عسل، گیاه شیرین، علف‌شیرین، معروف می‌باشد، استویا گیاهی است علفی، چندساله، درختچه‌ای، دارویی و متعلق به خانواده آفتابگردان. ارتفاع گیاه استویا بسته به شرایط اقلیمی ۶۰-۸۰ سانتیمتر متغیر بوده و طول عمرش ۳-۵ سال می باشد. ساقه گیاه کرکدار و برگ‌ها بیضوی، دندانه دار، نیزه‌ای و متقابل هستند و دارای گل‌های سفید کوچک به اندازه ۷-۱۵ میلیمتر می‌باشند. برگ‌های استویا ۲۰۰-۳۰۰ بار شیرین‌تر از ساکارز هستند. برگ‌های استویا فاقد ساخارین و آسپارتام و کالری است (چالپاتی و همکاران، ۱۹۹۹).

استویا گیاهی بوته‌ای از تیره *Asteraceae* است که ارتفاع آن به یک متر نیز می‌رسد. برگ‌های آن دارای دی-ترپن گلیکوزیدهایی از جمله Stevioside و (A, B, C, D, E) Rebaudioside و Dudoside است، که برای اولین بار

1 Sivaram and Mukundan

2 Taware

در پاراگوئه توسط گیاه شناسی به نام Bertoni شناسایی شد (ایلیکینز، ۱۹۹۷).

امروزه استفاده از شیرین کننده های طبیعی به ویژه اگر افراد مبتلا به دیابت نیز بتوانند از آنها مصرف نمایند، اهمیت زیادی پیدا نموده اند. از ویژگی های ترکیبات شیرین کننده این است که اولاً در سیستم گوارشی جذب نمی شود، لذا افراد دیابتی می توانند به راحتی از آن استفاده کنند. ثانیاً این شیرین کننده کالری را نیست و مناسب افراد چاق و کسانی که مراقب کالری روزانه خود هستند، می باشد. بنابراین، این گیاه از لحاظ اقتصادی بسیار مورد توجه است. در حال حاضر حدود ۴۰۰ میلیون نفر در جهان مبتلا به دیابت هستند. دیابت هر ساله سبب مرگ بیش از ۵ میلیون نفر می شود، یعنی هر ۶ ثانیه یک نفر به علت دیابت جان خود را از دست می دهد (گوپتا^۲ و همکاران، ۲۰۱۳).

۲-۲- خصوصیات گیاه شناسی

استویا با نام علمی (*Stevia rebaudiana* Bertoni) گیاهی دائمی از خانواده کاسنی یا مرکبان است که دارای برگ های متناوب و رشد علفی است (سینگ و راو، ۲۰۰۵). عدد کروموزومی این گیاه است اما بعضاً گونه های پلیپلوئید نیز در این گیاه مشاهده شده است (پانده و گوپتا، ۲۰۱۳).

برگ ها کوچک، فاقد دم برگ و نوک تیز و متقارن بوده که از قسمت وسط خمیده است (مایتی و پوروهیت، ۲۰۰۸). گل ها کوچک ۱۵ تا ۱۷ میلی متر) سفید و در قسمت میانی بنفش کمرنگ اند (دیودی، ۱۹۹۹). گیاهی روز کوتاه بوده و دانه آن فندقه^۴ کشیده و باریکی به طول حدود ۳

1 Elikins

2 Gupta

3 Asteracea

4 Achen

میلیتر است و از انتها به حدود ۲۰ رشته سیخک مانند و مقاوم حاصل از کاسه گل متصل است (شکل ۲-۱).



شکل (۲-۱). نمایی از قسمت‌های مختلف گیاه استویا (<https://sweetgreenfeilds.com/our-story/about-stevia>)

استویا گیاهی خودناسازگار^۱ است (میاگاو و همکاران، ۱۹۸۶؛ چالاپاتی و همکاران، ۱۹۹۹) و احتمالاً توسط حشرات گرده افشانی می‌شود (اودون، ۱۹۹۷). بذور بارور معمولاً تیره رنگ هستند در حالیکه بذور عقیم، معمولاً زرد روشن یا شفاف هستند (مونتیرو، ۱۹۸۰؛ ژئومولر و چینگ، ۱۹۹۹). علاوه بر نرخ پایین جوانه‌زنی بذور، به دلیل خودناسازگاری امکان تولید جمعیت یکنواخت از بذر وجود ندارد (جاگاتیسفاری و رانگاناتان، ۲۰۱۲).

۲-۳- مناطق پراکنش، سازگاری و نیازهای اکولوژیکی

آب و هوای مناسب برای رشد این گیاه، نیمه مرطوب و نیمه گرمسیری با دمای ۶- تا ۴۶ درجه سانتیگراد و میانگین ۲۳ درجه سانتیگراد و میزان بارندگی ۱۵۰۰ تا ۱۸۰۰ میلیمتر در سال می‌باشد. هم اکنون، این محصول در کشورهای زیادی مثل برزیل، کره، مکزیک، ایالات متحده آمریکا، اندونزی، تانزانیا، کانادا و هند معرفی شده است (پانده

¹ Self-incompatibility

و گوپتا، ۲۰۱۳) ارتفاع آن ۶۵ سانتیمتر و در شرایط مناسب کشت و در خاک حاصلخیز به ۱۸۰ سانتیمتر نیز خواهد رسید. در این مناطق نشای گیاه می‌تواند در فوریه و مارس و کشت بذر در آخر تابستان صورت گیرد و گلدهی در این شرایط، بسته به میزان حساسیت به طول روز در کولتیوارهای مورد استفاده برای تولید بذر، بین ۵۴ تا ۱۰۴ روز طول می‌کشد. عملکرد بذر با افزایش تعداد بوته به ۸۳۰۰۰ تا ۱۱۱۰۰۰ بوته در هر هکتار در سال اول تولید، افزایش می‌یابد. همچنین وقتی گیاهان در شرایط روز بلند رشد می‌کنند، غلظت استویوساید در برگ‌ها افزایش می‌یابد. برداشت قبل از گلدهی و زمانیست که بالاترین میزان استویوساید در برگ‌ها وجود دارد. وزن هزار دانه آن ۱۵/۱ تا ۳۰/۰ گرم و عملکرد آن بسته به میزان تراکم گیاهی بالاتر از ۸/۱ کیلوگرم در هکتار است (مادان^۱ و همکاران، ۲۰۱۰). اگرچه این گیاه **مقاومت زیادی بالاتر از ۷ سرما ندارد** اما، می‌تواند در صورت شروع رشد در گلخانه و سپس کشت گیاهان پس از آخرین سرمای مورد انتظار، به عنوان یک گیاه یکساله نیمه مقاوم در نقاط نیمه سردسیر کشت شود (احمد و همکاران، ۲۰۱۱). اولین کشت تجاری این گیاه در سال ۱۹۶۴ در پاراگوئه گزارش شده است و پس از آن تلاش زیادی برای (شناساندن و پایه ریزی این گیاه به عنوان محصول در ژاپن آغاز شد (لوئیس، ۱۹۹۲).

استویا بومی مناطق نیمه گرمسیری و گرمسیری می‌باشد و از غرب آمریکای شمالی تا آمریکای جنوبی در کشورهای نظیر، آمریکا، برزیل، پاراگوئه یافت می‌شود.

استویا گیاه نیمه گرمسیری است که به صورت دائمی کشت می‌شود. در پاییز و زمستان قسمت‌های هوایی گیاه از بین می‌رود و بخش زیرزمینی زیر خاک باقی می‌ماند. در بهار سال

آینده رشد کرده و محصول می دهد. تاریخ کاشت برای اولین بار در زمین ۲۰ تا ۳۰ فروردین است. برگ خشک گیاه استویا باید بسته بندی شده و در محلی خنک و خشک به دور از نور مستقیم و هوای آزاد نگهداری شود، در این شرایط برگ خشک حدود ۲ سال ماندگاری دارد.

۲-۴- تکثیر استویا

الف) تکثیر جنسی (از طریق بذر)

بذر گیاه استویا به دلیل عدم تلقیح صحیح و کامل دچار مشکل بوده و قدرت جوانه زنی بذر استویا حدود ۲۵٪ می باشد. با توجه به قیمت فروش این بذر در ایران که بالغ بر ۱۰۰۰ تومان برای هر بذر است.

ب) تکثیر از طریق کشت بافت

در این روش تکثیر قسمتی از اندام گیاهچه مادری جدا شده و در آزمایشگاه در بسترهای رشد و توسط هرمون های رشد انجام می پذیرد.

محاسن تکثیر از طریق کشت بافت

۱- تکثیر گیاهچه با دارا بودن تمامی خصوصیات والد به تعداد زیاد و در هر زمان می باشد.

معایب تکثیر از طریق کشت بافت

۱. تکثیر توسط هورمون های رشد وارداتی می باشد و تحریم ها و افزایش نرخ ارز . اثر مستقیم در افزایش قیمت دارد.

۲. به علت وابسته بودن تولید به آزمایشگاه و حساسیت بسیار شدید به نور ، گرما و شرایط آزمایشگاهی، در صورت ایجاد اشکال در شرایط آزمایشگاهی، برق و تأسیسات. گیاهچه ها از بین رفته و تکثیر به تأخیر می افتد.

۳. به علت ضعیف بودن گیاهچه باید پس از تکثیر و طی شدن مراحل اولیه باید با شرایط آب و هوایی مزرعه تطبیق یابد (آداپته شدن). گیاهچه آداپته شده دارای ساقه های نازک و شکننده می باشد.

پ) تکثیر از طریق قلمه

در این روش تکثیر از طریق قلمه استویا می باشد. این روش بهترین و به صرفه ترین روش می باشد.

محاسن تکثیر از طریق قلمه

۱- بعلت عدم استفاده از هرمون ها و لولزم آزمایشگاهی. تکثیر از این طریق هیچگونه رابطه ای به قیمت ارز و تحریمات اقتصادی ندارد.

۲- بعلت عدم نیاز به کارگر های ماهر هزینه تکثیر کاهش می یابد.

۲- بعلت اینکه گیاهچه از اول در شرایط کشت تکثیر می-گردد، نیازی به آداپته کردن وجود ندارد.

۳- به علت اینکه بر خلاف تکثیر کشت بافتی که جوانه ها علفی هستند، در تکثیر قلمه ای جوانه ها بصورت چوبی هستند و ریشه بسیار زیادی تولید می کنند در زمان کاشت در مزرعه تلفات بسیار ناچیز می گردد.

معایب تکثیر از طریق قلمه

از هر گیاهچه مادری فقط ۱۰ قلمه می توان گرفت که البته با توجه به وجود ۱۰۰۰۰ گیاهچه در مزرعه، می توانیم در سال اول ۱۰۰ هزار قلمه به بازار ارائه نماییم و در سال های بعد ظرفیت تولید قلمه استویا در سال ۶۰۰ هزار قلمه برآورد شده است کشت بافت یکی از روش های مهم در بیوتکنولوژی است که امکان تولید سریع گیاهان عاری از عوامل بیماری زا را محقق می سازد. کشت بافت همچنین یک تکنیک مفید و مؤثر در تکثیر گیاهانی مانند استویا

است که بذر آنها به سختی جوانه می‌زند و قلمه‌ها یا گیاهچه‌های حاصل از قلمه زنی هم مرگ و میر زیادی نشان می‌دهند و هم میزان بیوماس کمتری نسبت به گیاهچه‌های تکثیر شده به روش کشت بافت نشان می‌دهند، در نتیجه تکثیر این گیاهان به روش‌های سنتی کار مشکلی است (دبنا^۱، ۲۰۰۸). اما در جریان کشت بافت گیاهچه‌ها از هر نوع آلودگی میکروبی دور می‌مانند. اگرچه این امر برای مهار بیماری‌ها مفید است اما این گیاهچه‌ها امکان روابط همزیستی مسالمت‌آمیز را تا حدودی از دست می‌دهند (کپور^۲ و همکاران، ۲۰۰۸). گزارش شده که تلقیح

گیاهچه‌های حاصل از کشت بافت با قارچ‌های میکوریزی و یا با باکتری‌های محرک رشد گیاهان می‌توانند به استقرار این گیاهچه‌ها کمک کنند و نقش مهمی در سلامتی و تأمین نیازهای غذایی این گیاهچه‌ها داشته باشند (رای^۳، ۲۰۰۱؛ روسو^۴ و همکاران، ۲۰۰۸).

۲-۵- ترکیبات اصلی استویا

گیاه استویا و همچنین عصاره‌های حاصل از آن به عنوان شیرین‌کننده در آمریکای جنوبی، آسیا ژاپن، چین و کشورهای مختلف اروپایی مورد استفاده قرار می‌گیرد. قند موجود در این گیاه فاقد کالری بوده و برگ‌های این گیاه حاوی ترکیبات شیرین‌کننده‌ای است، که تحت عنوان استویول گلیکوساید^۵ نامیده می‌شود و با توجه به ژنوتیپ، نوع تیمار و شرایط رشد بین ۴ تا ۲۰ درصد وزن خشک برگ‌ها را تشکیل می‌دهند. جز اصلی

شیرین‌کننده این گیاه استویوساید^۶ موجود در برگ‌ها می‌باشد که ۳۰۰

1 Debnath

2 Kapoor

3 Rai

4 Russo

5 Steviol glycosides

6 Stevioside

بار شیرین‌تر از نیشکر است (کنلی، ۲۰۰۲؛ استارات و همکاران، ۲۰۰۲).

سلامت استفاده از استویوساید به عنوان یک شیرین‌کننده طبیعی، گزارش شده است (گئونز، ۲۰۱۴). برگ‌ها حاوی ترکیبات شیرین دیگریست که، به میزان کمتری وجود دارند. این ترکیبات شامل استویول‌بیوساید^۱، ریبودیوساید^۲، A،B،C،D،E،F و دولکوساید^۳ می‌باشد (گویال و گویال، ۲۰۱۰). این ترکیبات بسته به نوع آنها از ۵۰ تا ۴۵۰ برابر شیرین‌تر از سוכروز هستند (یادا و همکاران، ۲۰۱۱). و در بین گلیکوزیدهای دیترپنوئید استویوزید و ربادیوزید A از اهمیت بیشتری برخوردار می‌باشد (ادری^۴ و همکاران، ۲۰۱۲). مقدار گلیکوزیدهای استویول در استویا به عوامل متعددی وابسته است و ممکن است به ۲۰ درصد وزن خشک برگ برسد در مجموع دامنه غلظت کل گلیکوزیدهای استویول حدود ۲۰ تا ۴۰ درصد وزن خشک گزارش شده است (استارات^۵ و همکاران، ۲۰۰۲). به طور کلی سه نوع محصول اصلی در استویا وجود دارد: ۱. محصول منظم و دائمی که به طور اصلی شامل استویوساید است؛ ۲. محصولات Reva A که بیشتر شامل ریبودیوساید A می‌باشد و ۳. محصول متاستاسیس شکر. در حالت اول نسبت استویوساید به ریبودیوساید ۷:۳ تا ۸:۲ است در حالیکه در Reva A این نسبت ۱:۳ می‌باشد. شیرینی ریبودیوساید A بیشتر و دارای کیفیت بالاتری نسبت به استویوساید است (ماتزوکوبو و تاکازو، ۲۰۰۶).

شیرین‌بودن برگ‌های استویا به دلیل متابولیت‌های ثانویه ای است که گلیکوزیدهای دیترپنی نامیده می‌شوند. دو گلیکوزید اصلی گیاه،

1 Steviolbioside

2 Rubusoside

3 Dulcoside

4 Goyal and Goyal

5 Adari

6 Starratt

استویوزاید و ربودیوزاید A هستند. غلظت استویوزاید معمولاً دامنه‌ای از ۱۰-۳ درصد و غلظت ربودیوزاید A دامنه‌ای از ۳-۱ درصد وزن خشک برگ است. برگ‌های استویا استویوزاید، ۲۰۰-۳۰۰ مرتبه و ربودیوزاید A، ۱۸۰-۴۰۰ مرتبه شیرین‌تر از شکر است (داس^۱ و همکاران، ۲۰۰۷).

ماده شیرین‌کننده استویا به سبب فاقد کالری بودن برای افرادی که از دیابت، هیپوگلیسمی، فشار خون بالا، فنیل‌کتون اوری، ناراحتی‌های قلبی، چاقی و عفونت‌های قارچی مزمن رنج می‌برند یک شیرین‌کننده مطلوب است (ولور-ریک، ۲۰۱۰)، زیرا استویوزاید قادر به تحریک ترشح انسولین در پانکراس بیماران دیابتی و دیگر اختلالات متابولیسم کربوهیدراتی است و سطح گلوکز خون را بالا نمی‌برد (کدیک^۲ و همکاران، ۲۰۰۳) و به عنوان کاهنده سطوح اسید اوریک و ضدتوموربه شمار می‌آید (مادان^۳ و همکاران، ۲۰۱۰).

اخيراً تقاضای بالایی برای متابولیت‌های ثانویه این گیاه، به دلیل بیماری‌هایی که توسط شیرین‌کننده‌های شیمیایی مانند ساخارین و آسپارتام ایجاد می‌شوند و سلامتی را به مخاطره می‌اندازند، در جهان وجود دارد. به همین دلیل بیشتر کشورها به دنبال تنظیم یک دستورالعمل قطعی برای کشت استویا هستند تا بتوانند هم میزان بیوماس و هم میزان گلیکوزید استویوزاید گیاه استویا را افزایش دهند (اطرشی و همکاران، ۱۳۹۲).

قند استویا با شیرینی بیشتر از ساکارز، کالری کمتر و اندیس گلیسمی پایین که از برگ گیاه استویا به دست می‌آید شیرین‌کننده گیاهی مناسبی است. واحد سازنده اصلی گلیکوزیدهای شیرین استویا استویول است. چهار نوع گلیکوزید استویول اصلی در استویا شناسایی شده است: ریتادیوزید A،

1 Woelwer-Rieck

2 Kedik

3 Madan

ریبادیوزید C، دانکوزید A و اسرتویوزید. تاکنون ریتادیوزید A بهترین کیفیت (شیرینی) را در میان انواع دیگر داشته است. همچنین برگ استویا حاوی ترکیبات بیواکتیوی مانند فلاونوئیدها، استرولها، لبدانها، کلروفیلها، تری ترپنوئیدها، مونو و دی ساکاریدها، اسیدهای آلی و نمکهای معدنی است (گویال و همکاران، ۲۰۱۰؛ عبدالبسیط^۱ و همکاران، ۲۰۱۴).

از این رو از سال ۲۰۱۱ استویا به عنوان افزودنی غذایی مورد پذیرش قرار گرفته است (کمسیون اروپایی، ۲۰۱۱).

استویا در PH حدود ۳-۹ و تا دمای بالا (۱۰۰ درجه سانتی گراد) ثابت مانده، تخمیر نشده و رنگش در اثر پخت تغییر نمی کند (عبدالبسیط و همکاران، ۲۰۱۴). از این شیرین کننده در تولید محصولات کم کالری که مناسب افراد دیابتی نیز می باشد مانند انواع مربا، نوشیدنی شیرمیه ای و شیر شکلاتی، آبنمیه، نوشابه و بستنی استفاده می گردد (علیزاده^۳ و همکاران، ۲۰۱۴؛ یوسفی^۴ و همکاران، ۲۰۱۲؛ همایونی راد^۵؛ ۲۰۱۲؛ رئیسی اردلی^۶ و همکاران، ۲۰۱۴؛ صنیعه و شریفه^۷، ۲۰۱۲).

۲-۶- سایر ترکیبات مفید استویا

علاوه بر استویول گلیکوسایدها، برگهای این گیاه متشکل از ترکیبات روغنی فرار، استرولها، تری ترپنوئیدها، فلاونوئیدها، کومارین و دی ترپنهای غیرگلیکوزیدی هستند (مونداکا و همکاران، ۲۰۱۲). برگها حاوی مقادیر زیادی پروتئین، کربوهیدرات و عناصر فعال شیمیایی مثل پتاسیم، کلسیم، فسفر، سدیم، ترکیبات گوگردی و میکروالمنت هایی مانند کبالت، مس، آهن، منگنز، روی، سلنیوم و

1 Abdalbasit

2 European Commission

3 Alizadeh

4 Yousefi

5 Homayouni Rad

6 Raeisi Ardali

7 Saniah and Sharifah

مولیبدن است (گوچان و همکاران، ۲۰۰۴؛ مونداکا و همکاران، ۲۰۱۲؛ بوگاجی و همکاران، ۲۰۱۳). از دیگر خواص این شیرین‌کننده پر قدرت و طبیعی

می‌توان به عدم تخمیر و تغییر رنگ، پایداری بالا در مقابل حرارت تا ۱۰۰۰ درجه سانتیگراد و ماندگاری طولانی آن اشاره کرد. محصول می‌تواند در چای، قهوه، پخت غذا، شیرینی و نوشیدنی‌ها مورد استفاده قرار گیرد (گوچارال، ۲۰۰۴؛ جیونگو و همکاران، ۲۰۱۴).

بررسی‌های کنلی^۱ و همکاران در سال ۲۰۰۲ نشان داد که عصاره‌های متانولی گونه‌های مختلف استویا، به دلیل حضور فلاونوئیدها، آلکالوئیدها، گزانتوفیلها^۲ و هیدروکسیسینامیکاسیدها^۳ خاصیت آنتی اکسیدانی قابل توجهی بروز داد. با توجه به این که ترکیبات قندی استویا، برخلاف قندهای الکلی در درجه حرارت بالا به ویژه دمای پخت پایدار هستند و خاصیت شیرین‌کنندگی خود را از دست نمی‌دهند، می‌توان به عنوان جایگزین مناسب شکر در فرمول فرآورده‌های قنادی، معرفی نمود. همچنین سایر خواص فیزیولوژیکی ترکیبات شیرین‌کننده استویا، نظیر خاصیت آنتی اکسیدانی، موجب افزایش عمر ماندگاری محصول به دلیل به تأخیر انداختن واکنش‌های نامطلوب شیمیایی می‌گردد که این امر نیز مورد توجه صاحبان صنایع قرار گرفته است (حمزه لویی^۴ و همکاران، ۲۰۰۹).

۲-۷- اهمیت دارویی استویا

گیاه دارویی استویا به عنوان یک آنتی‌دیابتیک شناخته شده و تأثیر آن در پیشگیری و همچنین درمان مؤثر بیماری دیابت به اثبات رسیده است. استویا باعث کاهش فشارخون بالا شده و به دلیل عدم وجود کالری

1 Kennelly

2 Flavonoid

3 Alkaloid

4 Xanthophyll

5 Hydroxyl cinnamic acid

6 Hamzeluie

یک منبع رژیمی مناسب برای افرادی است که اضافه وزن دارند. ضمن اینکه ترکیبات موجود در این گیاه از پوسیدگی دندان جلوگیری می‌کند.

این گیاه دارای ارزش‌های درمانی زیادی از جمله اثرات ضد دیابت، ضد سرطان و ضد حساسیت می‌باشد (رادور^۱ و همکاران، ۲۰۱۳). وجود عوامل ضد دیابتیک این گیاه باعث تحریک دفع انسولین از پانکراس می‌شود. بنابراین شیرینی بسیار جذابی برای بیماران دیابتی و سایر کسانی است که نسبت به رژیم کنترل کربوهیدرات هشیار هستند (یودین^۲ و همکاران، ۲۰۰۶). همچنین دارای فواید دیگری از جمله ضد فشارخون بالا، خواص آنتی‌اکسیدانی، ضد اسهال، خاصیت ضد میکروبی و ... می‌باشد (جیانماریا و همکاران، ۲۰۱۵).

استویا بعنوان یک گیاه دارویی و دارای شیرین کننده فاقد کالری از اهمیت ویژه ای برخوردار است و در صنایع دارویی، غذایی و آرایشی مورد استفاده قرار می‌گیرد (رادور و همکاران، ۲۰۱۴؛ ، تاوار^۳ و همکاران، ۲۰۱۰). این گیاه برای افراد دیابتی، دارای فشار خون بالا و افراد دارای ناراحتی‌های قلبی و نیز در داروهای لاغری و داروهای ضد سرطان مورد استفاده قرار می‌گیرد (حسن و خلیل، ۲۰۱۳؛ پتیل، ۲۰۱۰). این گیاه دارویی مهم علاوه بر موارد مصرفی که پیشتر اشاره شده در سایر موارد از جمله مشکلات گوارشی، تهیه محلول‌های پاک‌کننده پوست و نیز در صنایع غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرد (علی و همکاران، ۲۰۱۰). سایر جذابیتهای این ماده طبیعی شیرین شامل غیر قابل تخمیر بودن، بی رنگ بودن، پایداری در دمای بالا (تا ۱۰۰۰ درجه سانتی گراد) و

1 Rathore

2 Uddin

3 Taware

ماندگاری بالا می‌باشد. این فرآورده را می‌توان به چای، قهوه و انواع نان، غذاهای فرآوری شده و نوشابه‌ها افزود (تاوار و همکاران، ۲۰۱۰). این گیاه دارای اثرات ضد سرطانی، کاهش بیماری‌های قلبی عروقی و قندخون به دلیل حضور ترکیبات فنولی که خاصیت گیرندگی رادیکال‌های آزاد دارند، می‌باشد (گویال^۱ و همکاران، ۲۰۱۰). گیاه دارویی استویا مخصوص نواحی گرمسیری و نیمه‌گرمسیری و نیز مرطوب است. این گیاه در دمای ۱۱ تا ۴۱ درجه سانتیگراد به رشد می‌نماید. استویوزید یا قند تهیه شده از گیاه استویا ۳۰۰ مرتبه شیرین‌تر از قند ساکارز است. اساس ساختمانی این ماده شیرین که از برگ‌های گیاه استویا ریب‌آودیانا تهیه می‌شود، بر پایه مولکول‌های پیچیده الکلی، در ترکیب با واحدهای ساختمانی گلوکز است. که منجر به شیرینی بیش از حد گیاه مزبور می‌گردد و به این سبب برگ این گیاه از زیان آفات نباتی در امان خواهد بود. وجود سه ترکیب گلیکوزیدی (استویوزید، آ-ربادیوزید و بی-ربادیوزید) و غالب بودن میزان استویوزید بر دو ترکیب دیگر نیز به اثبات رسیده است (حمزه لویی و همکاران، ۲۰۰۹).

استویا، گیاه علفی و چندساله متعلق به خانواده کاسنی^۲ و از ارزشمندترین گیاهان دارویی مناطق حاره می‌باشد. این گیاه بومی مناطق شمالی آمریکای جنوبی (پاراگوئه و برزیل) (کاردلو^۳ و همکاران، ۱۹۹۹؛ حسن و خلیل، ۲۰۱۳؛ جین^۴ و همکاران، ۲۰۰۹) است و یکی از اعضای جنس *Stevia* می‌باشد که قندهای استویلی شیرین تولید می‌کنند (علی^۵ و همکاران، ۲۰۱۰). برگ‌های استویا منبع گلیکوزیدهای دی‌ترپنی است که

1 Goyal

2 Asteraceae

3 Cardello

4 Jain

5 Ali

عمدتاً استویوزید^۱ و ریبودیوزاید^۲ هستند، می‌باشد. این ترکیبات ۳۰۰ بار از قند سوکروز موجود در چغندر قند، نیشکر و سایر منابع شیرین تر است (یودین^۳ و همکاران، ۲۰۰۶). استویوزید ارزشمندترین شیرین کننده طبیعی است که تولید شده است، چون از طعم نسبتاً خوب و پایداری شیمیایی کافی برخوردار است؛ و در عین حال فاقد کالری می‌باشد (انبازگان^۴ و همکاران، ۲۰۱۰).

۲-۸- سوابق در داخل کشور و خارج از کشور

تحقیقات گسترده در ارتباط با قندهای استویولی استخراج شده از برگ استویا و اجزای آنها (میشرا^۵ و همکاران، ۲۰۱۰)، تأثیر آنتی باکتریال عصاره برگ استویا (آپادهیای^۶، ۲۰۱۳) انجام شده است. همچنین مطالعاتی در زمینه خصوصیات بیوشیمیایی گیاه در مراحل مختلف ریز ازدیادی (علی و همکاران، ۲۰۱۰)، تأثیر کودهای زیستی بر رشد، کربوهیدرات-ها و پروتئین‌ها (پتیل، ۲۰۱۰) و تأثیر تیمار شوری بر خصوصیات بیوشیمیایی گیاه (راتور، ۲۰۱۴) انجام شده است. در مطالعه حاضر به مقایسه تأثیر بسترهای خاکی، بدون خاک ارگانیک و کودهای ارگانیک برای معرفی بهترین شرایط برای ارتقاء رشد استویا و بهبود ویژگی‌های بیوشیمیایی به خصوص قندهای استویولی پرداخته خواهد شد.

گرامی و همکاران (۱۳۹۶)، تأثیر اتیل متان سولفونات (EMS) بر برخی ویژگی‌های بیوشیمیایی و مقدار استویوزید و

1 Stevioside
2 Rebaudioside
3 Uddin
4 Anbazhagan
5 Mishra
6 Upadhyay
7 Ali

ربادیوزید A در نمونه‌های باززایی شده از کالوس‌های گیاه استویا (*Stevia rebaudiana* Bertoni). به‌منظور بررسی اثرات ماده جهش-زای اتیل متان سولفونات (EMS) بر برخی خصوصیات بیوشیمیایی در گیاهان باززایی شده از کالوس در گیاه استویا، دو آزمایش با سه تکرار اجرا گردید. در آزمایش اول، که به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی اجرا شد، ریزنمونه-های برگ‌ی جهت تمایززدایی و کالوس‌زایی به محیط کشت MS حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر تنظیم‌کننده رشدی تیدیاژرون منتقل شدند. توده‌های کالوسی با غلظت‌های مختلف EMS (۰/۱ درصد، ۰/۲ درصد و ۰/۵ درصد) در زمان‌های (۳۰، ۶۰ و ۱۲۰ دقیقه) تیماردهی و روی محیط کشت MS واکشت شدند. نتایج آزمایش اول نشان داد که برخی از خصوصیات کالوس‌های باززایی شده تحت تأثیر غلظت‌های مختلف اتیل متان سولفونات و زمان‌های متفاوت در معرض قرارگیری و اثرات متقابل این دو فاکتور، قرار گرفتند. به‌طوری‌که با افزایش غلظت و مدت زمان در معرض قرارگیری، میزان و شاخص‌های باززایی توده‌های کالوسی به صورت مستقیمی کاهش یافت. در آزمایش دوم که به صورت طرح کاملاً تصادفی اجرا شد، هر گیاه باززایی شده از کالوس‌های تحت تیمار اتیل متان سولفونات، به‌عنوان یک رویداد جهش در نظر گرفته شده و جمعیت کلونی با سن مشابه از هر گیاهچه منحصر به فرد تهیه و بعد از دو ماه، خصوصیات فیتوشیمیایی و مقدار گلیکوزیدهای قندی (استویوزید و ربادیوزید A) گیاهان اندازه‌گیری شد. نتایج آنالیز نشان داد که عامل جهش-زای اتیل‌متان سولفونات اثر کاملاً معنی‌داری بر صفات فیتوشیمیایی و گلیکوزیدهای قندی استویوزید و ربادیوزید A در سطح یک درصد داشت. در میان موتانت‌های مطالعه شده

موتانت‌های M_6 ، M_{10} ، M_{11} ، M_{18} و M_{19} دارای صفات فیتوشیمیایی مطلوبتری نسبت به سایر نمونه‌ها بودند، همچنین موتانت M_8 بیشترین درصد تغییرات مقدار استویوزید و ربادیوزید A را به ترتیب با $87/3$ و $58/3$ درصد افزایش نسبت به نمونه شاهد داشت.

مهرگان و همکاران (۱۳۹۶)، اثر غلظت‌های مختلف محرک زیستی کیتوزان بر خصوصیات بیوشیمیایی و مورفوفیزیولوژیکی گیاه استویا (*Stevia rebaudiana* Bertoni). کیتوزان از پلی ساکاریدهای نیتروژن دار است که با واکنش استیل زدای کیتین به صورت طبیعی ایجاد می شود و به عنوان یکی از محرک های زیستی کارآمد برای در تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی زیادی تایید شده است. بررسی اثر غلظت‌های مختلف محرک زیستی کیتوزان بر خصوصیات بیوماس رویشی و متابولیت‌های ثانویه گیاه استویا. آزمایش در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با سه تکرار در شرایط گلخانه‌ای با تیمار کیتوزان، در چهار سطح شامل ۰، ۰/۰۵، ۰/۱ و ۰/۲ درصد انجام شد. نتایج به دست آمده از تجزیه واریانس داده ها نشان داد، که محلول پاشی محرک زیستی کیتوزان اثر معنی داری بر وزن خشک برگ، وزن خشک اندام هوایی، طول برگ ($P<0.05$)، فنل و ربادیوزید A ($P<0.01$) داشته است. کیتوزان در سطح ۰/۱ درصد بیشترین وزن تر و خشک ساقه، برگ و اندام هوایی را تولید نمود، به طوری که با افزایش غلظت کیتوزان از ۰/۱ به ۰/۲ درصد این صفات کاهش یافت. بیشترین میزان فنل در غلظت ۰/۱ درصد کیتوزان مشاهده شد، همچنین در این آزمایش کیتوزان با غلظت ۰/۲ درصد بیشترین تاثیر را بر ربادیوزید A داشته است. محلول پاشی

کیتوزان سبب بهبود خصوصیات بیوماس رویشی و صفات بیوشیمیایی مانند ربادیوزید A گیاه استویا شده است.

افشار محمدیان و انصاری پیری (۱۳۹۶)، تأثیر سطوح مختلف سرما روی پروتئین کل، پرولین و فعالیت برخی از آنتی اکسیدان‌های آنزیمی گیاه استویا (*Stevia rebaudiana* Bertoni). امروزه استفاده از شیرین کننده های طبیعی به ویژه اگر افراد مبتلا به دیابت نیز بتوانند از آنها مصرف نمایند، اهمیت زیادی پیدا کرده است. استویا (*rebaudiana Stevia*) گیاهی بوته ای از تیره *Asteraceae*، به دلیل دارا بودن دی‌ترپن گلیکوزیدهایی از جمله *Stevioside* و *Rebaudioside* و *Dudoside* که بیش از ۳۰۰ بار از ساکارز شیرین ترند، از نظر اقتصادی و علمی بسیار مورد توجه است. این تحقیق، به منظور بررسی پروتئین کل، پرولین و برخی از آنتی اکسیدان های آنزیمی گیاه استویا تحت تنش سرما در قالب طرح کاملاً تصادفی با دو سطح تیمار دمایی ۱۵ و ۵ درجه سانتیگراد در مقایسه به کنترل (C25°) در سه تکرار انجام شد. نتایج بدست آمده تفاوت معنی داری را در میزان پروتئین کل، پرولین و آنتی اکسیدان‌های آنزیمی شامل سوپر اکسید دیس موتاز (SOD)، آسکوربات پراکسیداز (APX)، پراکسیداز (POD) و پلی فنل اکسیداز (PPO) تحت تنش سرما نشان ندادند. لذا می‌توان گفت که تیمارهای سرمایی ۱۵ و ۵ درجه سانتیگراد برای گیاه استویا تنش زا نبوده و این گیاه در دماهای مذکور، به شرط کوتاه بودن زمان تیمار (۲ ساعت)، احتمالاً از نظر فیزیولوژیکی متحمل می باشد. همچنین از نظر ظاهری نیز گیاهان تحت تیمار نسبت به کنترل تفاوت محسوسی نداشتند.

هاشمی و همکاران (۱۳۹۳)، بررسی اثر جایگزینی قند گیاه استویا با ساکارز بر روی خصوصیات فیزیکوشیمیایی، رئولوژیکی و حسی شربت رژیمی زعفران. امروزه تولید و استفاده از مواد غذایی و نوشیدنی-های رژیمی و فراسودمند رو به فزونی گذاشته است. با توجه به اینکه کربوهیدرات‌ها یکی از مهمترین منابع افزایش دهنده کالری می‌باشند، بسیاری از توجهات در صنعت غذا به کاهش استفاده از این منبع مهم و جایگزینی آن با شیرین‌کننده‌های بدون کالری یا کم‌کالری معطوف گردیده است. با توجه به اینکه، شیرین‌کننده‌های طبیعی و سنتزی بسیاری برای جایگزینی ساکارز در مواد غذایی استفاده می‌شود، اثرات شیرین‌کننده‌های مصنوعی و جایگزین بر روی ویژگی‌های محصول نهایی قابل توجه می‌باشد. استویا یک شیرین‌کننده گیاهی مناسب است که در بسیاری از مواد غذایی رژیمی به عنوان جایگزین شکر مورد استفاده قرار می‌گیرد. در تحقیق پیش رو اثر مصرف قند استویا در جایگزینی با ساکارز در تهیه نوشیدنی زعفرانی به عنوان یک نوشیدنی فراسودمند بررسی شده است. بر این اساس در تهیه شربت زعفرانی ۵ تیمار ۱۰۰٪، ۷۵٪، ۵۰٪ و ۰٪ از قند استویا جایگزین ساکارز گردید. سپس خصوصیات فیزیکوشیمیایی، رئولوژیکی و حسی آن بررسی شد. بر اساس نتایج حاصله، با افزایش استویا میزان بریکس، دانسیته، ویسکوزیته و PH شربت‌ها کاهش یافت و همچنین از نظر حسی نیز با افزایش قند استویا امتیاز کمتری کسب گردید. بهترین تیمار در بین تمامی تیمارها، نمونه حاوی ۲۵٪ استویا و ۷۵٪ ساکارز می‌باشد که در مقایسه با دیگر نمونه‌ها از نظر خصوصیات حسی از پذیرش بالاتری برخوردار بود و از لحاظ خصوصیات فیزیکوشیمیایی مشابهت بیشتری با نمونه شاهد داشت.

اصغری (۱۳۹۶)، مقایسه اثر تیمار تغذیه ای و نوع بستر کشت بر برخی خصوصیات فیتوشیمیایی گیاه استویا. استویا (*Stevia rebaudiana*) یک گیاه تجاری و دارویی مهم است که دارای خاصیت شیرین کننده گی قوی بوده و برای افراد مبتلا به دیابت و چاقی مناسب می باشد. هدف تحقیق مقایسه اثر نوع بستر و تیمارهای غذایی بر ویژگی های فیتوشیمیایی گیاه استویا است. تحقیق در قالب طرح کاملاً تصادفی با شانزده تیمار در سه تکرار در گلخانه تحقیقاتی مرکز آموزش عالی امام خمینی اجرا شد. در این آزمایش عامل نسبت ورمی کمپوست در سه سطح شامل بستر پایه بدون خاک متشکل از پرلیت و کوکوپیت و نیز بستر متشکل از خاک مزرعه بعلاوه ۰، ۳۰ و ۴۰ درصد ورمی کمپوست و عامل تیمار غذایی شامل کودهای آلی (ورمی واش و تی کمپوست) و محلول غذایی هوگلند بود. نتایج حاصل از تحقیق بیانگر تأثیر معنی دار و مثبت ($P < 0/01$) تیمارهای استفاده شده بر صفات مورد بررسی شامل میزان کل پروتئین، فنل، قند محلول و قند استویولی ریبودیوزاید^۱ بود. بنابر این استفاده از نسبت مناسب ورمی کمپوست در بستر بدون خاک تأثیر مثبت بر برخی ویژگی های فیتوشیمیایی مورد بررسی در تحقیق داشت. اگرچه در مورد شیرین کننده استویولی (ریبودیوزاید) وجود تی کمپوست به تنهایی در بستر بدون خاک، قند محلول کل و فنل کل وجود ورمی واش به تنهایی در بستر بدون خاک و در مورد پروتئین محلول هوگلند در بستر خاکی بدون نیاز به استفاده از ورمی-کمپوست بیشترین تأثیر را داشتند.

رسولی الموتی و همکاران (۱۳۹۴)، بررسی اثر تنش شوری بر عملکرد فیتوشیمیایی و رشدی گیاه دارویی استویا در شرایط

1 rebaudioside

هیدروپونیک. در حال حاضر دیابت یکی از شایع‌ترین بیماری‌های جامعه بشری می‌باشد و ایرانی‌ها یکی از بزرگ‌ترین مصرف‌کننده‌های قند جهان هستند و بسیاری از آنها با بیماری دیابت دست و پنجه نرم می‌کنند، تلاش محققان برای از بین بردن این بیماری با استفاده از داروها و جایگزین کردن شکر با موادی که سلامتی انسان را همراه با بر آورده نمودن نیازش به ادامه رژیم غذایی روزانه تامین نماید، افزایش یافته است؛ در این میان استفاده از ترکیبات دارویی مشتق از گیاهان نه تنها قدمت زیادی دارد، بلکه به دلیل عوارض جانبی بی شمار داروهای شیمیایی و نارسایی‌های متعدد طب نوین در درمان برخی از بیماری‌ها با گذشت زمان، بار دیگر پرورش و تولید گیاهان دارویی را با رشد قابل توجهی مواجه ساخته است. امروزه گیاه دارویی استویا به عنوان یک شیرین‌کننده طبیعی جایگزین قند، در کشورهای پیشرفته شناخته شده است؛ میزان شیرینی در عصاره برگ گیاه استویا حدود ۳۰۰ برابر ساکارز است، ماده شیرین‌کننده استویا، کالری را نیست و در کاهش میزان قند در افراد دیابتی، درمان فشار خون بالا و در درمان بیماری‌های معده و روده مؤثر است و همچنین اثرات سوء مصرف شیرین‌کننده های مصنوعی همچون آسپارتام، سدیم ساکارین و سیکلامات را ندارد. از این رو تکثیر این گیاه در ایران اهمیت فراوانی پیدا کرده است؛ اما اراضی حاصلخیز جهت توسعه کشت این گیاه محدود است و این اراضی به غلات و سایر محصولات گیاهی اختصاص یافته است، بنابراین لازم است تحقیقات جامعی بر روی گیاه استویا و چالش‌ها و محدودیت‌های کشت آن در اراضی وسیعی که با شوری آب و خاک مواجه هستند، انجام گیرد تا امکان کشت آن در این شرایط بررسی شود.

سراج و همکاران (۱۳۹۵)، اثر قارچ اندوفیت در تحمل گیاه دارویی استویا به تلفیق تنش شوری و خشکی در شرایط کنترل شده. به منظور بررسی اثر همزیستی قارچ *Piriformospora indica* بر میزان تحمل گیاه دارویی استویا تحت تنش خشکی و شوری، آزمایشی درون‌شیشه‌ای در دو مرحله مقدماتی و تکمیلی انجام شد. مرحله مقدماتی به منظور مشخص کردن میزان تحمل گیاه به تنش خشکی و شوری به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی و در سه تکرار انجام شد. تیمارهای آزمایش مرحله مقدماتی شامل پنج سطح پتانسیل اسمزی (صفر، -۳، -۶، -۹ و -۱۲ بار) و سه منبع اسمزی شامل NaCl (Na) ، مانیتول (M) و NaCl+ مانیتول (Na+M) بود. برآزش منحنی‌ها نشان داد که افزایش سطوح تنش اسمزی سبب کاهش رشد رویشی گیاه استویا شد. روند تغییرات صفات ارتفاع بوته، سطح برگ، وزن خشک برگ و بخش هوایی، کلروفیل b، نشت الکترولیت و محتوای آب نسبی برگ با افزایش پتانسیل اسمزی محیط در پاسخ به هر سه منبع اسمزی به صورت معادله دوتکه‌ای و وزن خشک ساقه از نوع خطی بود. بیشترین شیب تغییرات و در نتیجه بالاترین حساسیت صفات مورد مطالعه در این مرحله آزمایش در پتانسیل‌های پایین (صفر تا -۳ بار) به دست آمد. همچنین، میزان کاهش وزن تر اندام‌های رویشی در تیمار خشکی ناشی از مانیتول نسبتاً بیشتر بود. مرحله تکمیلی آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی و در سه تکرار به منظور بررسی نقش قارچ *P. indica* در بهبود صفات رویشی، مورفولوژیک، فیزیولوژیک و فعالیت آنزیمی استویا تحت تنش خشکی و شوری انجام شد. تیمارهای آزمایشی این مرحله آزمایش شامل سه سطح پتانسیل اسمزی (صفر، -۵ و -۱۰ بار)، سه منبع اسمزی شامل NaCl (Na) ، مانیتول (M) و NaCl+ مانیتول (Na+M) و تیمار همزیستی قارچی در دو سطح

عدم تلقیح و تلقیح قارچ *P. indica* بود. از طرفی طبق نتایج، در شرایط بدون تنش (سطح اسمزی صفر)، قارچ *P. indica* سبب بهبود قابل توجه رنگیزه های فتوسنتزی شامل کلروفیل *a*، *b*، کل و کاروتنوئید شد. همچنین، همزیستی قارچی در سطح اسمزی ۵- بار با کاربرد مانیتول و ترکیب همزمان دو منبع اسمزی (Na+M) وزن خشک برگ (به ترتیب ۱۱۲ و ۱۵۶) و بخش هوایی (به ترتیب ۴۹ و ۱۴۴ درصد) را در گیاهچه های همزیست نسبت به شاهد افزایش داد. از سوی دیگر، همزیستی قارچی سبب افزایش فعالیت بیشتر آنزیم های آنتی اکسیدانی در مقایسه با شرایط عدم تلقیح شد. برای این اساس، در سطح اسمزی ۵- بار، در تنش شوری و ترکیب شوری و خشکی (Na+M) فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز به ترتیب ۶۲ و ۱۸۵ درصد نسبت به شاهد بیشتر شد. قارچ *P. indica* در بیشتر سطوح و منابع اسمزی مورد مطالعه رشد رویشی اندام های گیاهی را بهبود بخشید که بیشترین اثر مثبت آن در تنش خشکی ناشی از مانیتول و همچنین ترکیب همزمان NaCl و مانیتول (Na+M) و به ویژه در تنش اسمزی متوسط (۵- بار) مشاهده شد. در مجموع، نتایج بیانگر اثر مثبت قارچ *P. indica* در افزایش تحمل به تنش، به ویژه تنش همزمان خشکی و شوری در گیاه دارویی استویا بود.

صابر همیشگی و همکاران (۱۳۹۱)، بررسی اثر سطوح مختلف نیتروژن و پتاسیم بر خصوصیات مورفولوژی و شیمیایی گیاه استویا. به منظور بررسی اثر سطوح مختلف نیتروژن و پتاسیم بر خصوصیات مورفولوژیکی و شیمیایی گیاه دارویی استویا تحت شرایط گلخانه، آزمایشی در سال زراعی ۱۳۸۹ در پژوهشکده بیوتکنولوژی شمال کشور به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب کامل تصادفی در چهار تکرار انجام شد که در آن نیتروژن در چهار سطح (صفر، ۲۰، ۴۰ و ۶۰) کیلوگرم در هکتار و

پتاسیم در چهار سطح (۲۰، ۳۰، ۴۰ و صفر) کیلوگرم در هکتار در نظر گرفته شد. صفات مورد اندازه‌گیری شامل طول ساقه، طول میانگره، وزن تر ریشه، وزن خشک ریشه، و میزان کربوهیدرات بود. بیشترین طول ساقه با ۹۰/۹۰ سانتی متر و بیشترین طول میانگره با ۴/۳۱ سانتیمتر و بیشترین وزن تر ریشه به میزان ۱۵/۵ گرم در بوته و بیشترین وزن خشک ریشه با ۲/۹ گرم در تیمار N₄ یا کاربرد کود ۶۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار مشاهده شد. بیشترین طول ساقه با ۷۷/۰۱ سانتی‌متر در تیمار K₄ یا کاربرد کود پتاسین ۴۰ کیلوگرم در هکتار به دست آمد. بیشترین میزان کربوهیدرات با ۰/۵۷ در تیمار (N₄K₄) یا کاربرد کود نیتروژن ۶۰ کیلوگرم در هکتار و کود پتاسیم ۲۰ کیلوگرم در هکتار مشاهده شد.

کشوری و همکاران (۱۳۹۵)، بهینه سازی جنین زایی سوماتیک در گیاه دارویی استویا. استویا از خانواده کاسنی، گیاهی مفید در پیشگیری و درمان دیابت، فشار خون، افزایش وزن و پوسیدگی دندان است. به منظور بررسی ویژگی‌های القاء کالوس در گیاه استویا از یک آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی (CRD) با سه تکرار استفاده شد. عامل اول شامل تیمار هورمونی در ۱۰ سطح به همراه شاهد، عامل دوم شامل دو نوع محیط کشت (MS و B5) و سومین عامل نوع ریزنمونه (برگ و میانگره) بود. صفات القاء کالوس از جمله درصد کالوس‌زایی، روز تا القای کالوس و وزن تر و خشک کالوس اندازه‌گیری شد. نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای هورمونی، محیط‌های کشت، نوع ریزنمونه و اثرات متقابل آنها با یکدیگر و همچنین با تیمار شاهد وجود دارد. نتایج نشان داد، بهترین تیمار برای درصد القای کالوس همچنین برای رسیدن به کالوس در کمترین زمان ترکیب 2mg/lNAA+1mg/l BAP و برای بالاترین وزن تر و خشک کالوس، محیط

کشت گامبورگ (B5) همراه با ترکیبات ۱ mg/l BAP + 2,4-D mg/l در قطعات برگ و 0/25mg/l 2,4-D + 0/1mg/l BAP برای میانگرمه، به دست آمد. این نتایج می‌توانند در کشت سوسپانسیون مورد استفاده قرار گیرند. به دلیل خودناسازگاری استویا، بررسی جنین‌های سوماتیکی برای تولید بذر مصنوعی در این گیاه، ارزشمند است. به این منظور ۶ تیمار هورمونی در دو نوع محیط کشت مورد بررسی قرار گرفتند. بیشترین درصد جنین‌زایی در محیط MS و تیمار 0.5mg/l BAP + 0.5mg/l NAA + 2mg/l 2,4-D به دست آمد.

شهیدی نوقابی و همکاران (۱۳۹۴)، اثر شیر خشک و شیرین‌کننده استویا بر میزان آکریل‌آمید و خصوصیات شیمیایی فرآورده دونات. دونات یکی از فرآورده‌های نانوایی سرخ شده محبوب در بین مصرف‌کنندگان می‌باشد. این فرآورده ارزان قیمت، مستعد تشکیل اکریل‌آمید در حین تولید می‌باشد. اکریل‌آمید، ترکیبی است که در مواد غذایی نشاسته‌ای که در دماهای بالاتر از ۱۲۰ درجه سانتیگراد فراوری می‌شوند تولید می‌شود. این ترکیب به عنوان یک ترکیب سرطان‌زا شناخته شده است و لذا شناخت عوامل مؤثر در میزان تولید آن در حین فراوری مواد غذایی و کنترل تولید آن بسیار حائز اهمیت است. هدف از انجام پژوهش بررسی اثر مقدار (صفر، ۱/۵، ۲/۵ درصد) شیرخشک و نوع شیرین‌کننده (استویا و شکر) در چهار سطح مختلف (استویا: شکر به ترتیب ۰:۱۰۰، ۳۰:۷۰، ۵۰:۵۰، ۰:۱۰۰) بر مقدار آکریل‌آمید تشکیل شده در دونات می‌باشد. در پژوهش از طرح کاملاً تصادفی برپایه آزمایشات فاکتوریل برای بررسی اثر مقدار شیر خشک و نوع شیرین‌کننده بر ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی و میزان تشکیل اکریل‌آمید در محصول (دونات) استفاده شد. نمونه‌های تهیه شده با تیمارهای مختلف از لحاظ خصوصیات شیمیایی (رطوبت، pH، اسیدیته، پروتئین و قند کل و همچنین اندازه‌گیری رنگ) مورد بررسی و آنالیز قرار گرفتند. جهت بررسی اثر تیمارها بر میزان تشکیل آکریل‌آمید

در محصول نهایی، از روش گاز کروماتوگرافی (GC-MS) استفاده شد. مقایسه میانگین صفات مورد بررسی، با استفاده از آنالیز چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵ درصد و به کمک نرم افزار مینی‌ت‌ب‌نسخه ۱۶ انجام شد و نمودارها توسط نرم افزار اکسل رسم گردید. نتایج تحقیق نشان داد که با افزایش شیر خشک به فرمولاسیون دونات، درصد رطوبت، درصد پروتئین، قند کل، قند احیاء و آکريل آمید افزایش و درصد قند غیر احیاء و تیرگی در محصول کاهش یافت. مقدار شیر خشک بر Ph و اسیدیته محصول اثر معنی‌داری نداشت. جایگزین کردن ساکارز با شیرین‌کننده استویا در فرمولاسیون دونات، درصد رطوبت، اسیدیته، رنگ‌ظاهری و میزان آکريل آمید کاهش و مقدار پروتئین، قند کل و قند احیاء در محصول افزایش می‌یابد. همچنین، نتایج نشان داد که نوع شیرین‌کننده از عوامل بسیار مهم در تشکیل آکريل آمید می‌باشد و با جایگزین کردن شکر با استویا، مقدار آکريل آمید در محصول نهایی کاهش یافت. همچنین، نتایج نشان داد که با افزایش مقدار شیر خشک در فرمولاسیون، مقدار آکريل آمید در محصول نهایی افزایش یافت. لذا می‌توان با بهینه‌سازی فرمولاسیون، تولید آکريل آمید و خواص شیمیایی را در محصول نهایی کنترل نمود. با داشتن این اطلاعات می‌توان شرایط را به گونه‌ای بهینه کرد که آکريل آمید در کمترین مقدار ممکن تولید شود و بدین ترتیب می‌توان سلامت جامعه را بهبود بخشید. در نتیجه با بهینه‌سازی فرمولاسیون (مثلاً جایگزین کردن شکر با استویا)، می‌توان تولید آکريل آمید و خواص شیمیایی را در محصول نهایی کنترل نمود. با داشتن این اطلاعات می‌توان شرایط را به گونه‌ای بهینه کرد که آکريل آمید در کمترین مقدار ممکن تولید شود و بدین ترتیب می‌توان سلامت جامعه را بهبود بخشید.

مرادی (۱۳۹۶)، استویا و تجارت آن در ایران. استویا، گیاهی چند ساله و بومی آمریکای جنوبی است که در سال‌های اخیر به

علت تولید گلیکوزیدهای شیرین که فاقد کالری هستند، اهمیت زیادی یافته است. استویا برای افرادی که با محدودیت مصرف کربوهیدرات مواجه هستند، مانند افراد دیابتی، افراد چاق و بیماران قلبی مناسب است. گلیکوزیدهای استویا حدود ۳۰۰ تا ۳۵۰ برابر شیرین‌تر از ساکارز می‌باشند و عصاره استویا علاوه بر داشتن استیویول گلیکوزید، خواص آنتی اکسیدانی، ضد میکروبی و ضد قارچی نیز دارد. برگ‌های گیاه استویا حاوی لیدان، دی‌ترپن‌ها، تری‌ترپن‌ها، استیگماستروول، تانن‌ها، روغن‌های فرار، پروتئین، فیبر، کربوهیدرات، فسفر، آهن، کلسیم، پتاسیم، سدیم، منیزیم، روتین (فلاونوئید)، روی، ویتامین C و ویتامین A، اسید فولیک و تمام اسیدآمین‌های ضروری، به استثنای تریپتوفان می‌باشد. توان تحمل درجه حرارت‌های بالا تا ۲۰۰ درجه سانتی‌گراد، از ویژگی‌های شیرین‌کننده‌های استویاست و آنها را برای استفاده در غذاهای پخته شده مناسب می‌سازد. بنظر می‌رسد گیاه استویا پتانسیل بالایی به عنوان یک محصول کشاورزی جدید دارد زیرا تقاضای مصرف‌کنندگان برای این نوع شیرین‌کننده‌های طبیعی بدون کالری به شدت رو به افزایش است.

اطرشی و همکاران (۱۳۹۲)، اثر قارچ میکوریز و ریزوباکتری‌های محرک رشد گیاه بر سرعت رشد، زمان گل‌دهی و الگوی تجمع استویوزاید در گیاه استویا. استویا یک گیاه دارویی است که به عنوان شیرین‌کننده‌ای مناسب برای بیماران دیابتی استفاده می‌شود. در پژوهش تأثیر تلقیح منفرد یا توأم قارچ میکوریزی گلوموس اینترارادیسز و باکتری‌های باسیلوس پلی‌میکسا، سودوموناس پوتیدا و ازتوباکتر کروکوکوم بر گیاهچه‌هایی که از کشت قطعات تک‌گره استویا بازرایی شده بودند، در زمان‌های ۱۵، ۳۰، ۴۵۰ و ۶۰ روز پس از اعمال تیمارها بررسی شد. نتایج نشان دادند که میزان پارامترهای رشد

(وزن تر، وزن خشك و طول ساقه) و استویوزايد تا ۶۰ روز پس از اعمال تیمارها، در تیمارهاي منفرد و سه تايي باكتري يا قارچ در حد معني داري افزايش يافت ولي بيشترين ميزان پارامترهاي رشد و استویوزايد در تیمارهاي دوتايي از ميكروارگانيسم ها و به طور ويژه در تیمار ازتوباكتتر+گلوبوموس مشاهده شد. بيشترين ميزان وزن تر، وزن خشك، طول ساقه و استویوزايد در ۶۰ روز پس از اعمال اوليه تیمارها و در تیمار ازتوباكتتر+گلوبوموس كه به ترتيب ۵۳/۷٪، ۵۷٪، ۳۷٪ و ۸۱٪ افزايش نسبت به شاهد را نشان مي دهند، مشاهده شد. به طور جالب توجهي مشاهده شد كه سرعت رشد در تیمارهاي دوگانه و سه گانه در فاصله ۳۰-۱۵ روز حداكثر بود و در فاصله ۴۵-۳۰ روز كه منطبق با دوران گلدهي آنها بود، كاهش يافت. اما در تیمارهاي منفرد سرعت رشد در فاصله ۴۵-۳۰ روز به حداكثر رسيد و در فاصله ۶۰-۴۵ روز با ورود به مرحله گلدهي بشدت كاهش يافت. به هر حال حداكثر ميزان تجمع استویوزايد در همه تیمارها در فاصله ۴۵-۳۰ روز بدست آمد و در فاصله ۶۰-۴۵ روز با ورود به مرحله گلدهي ميزان تجمع استویوزايد در تیمارهاي سه گانه و منفرد بشدت و در تیمارهاي دوگانه به طور ملايم تر كاهش يافت. بنابر اين تیمار ميكروارگانيسم ها سرعت رشد، فنولوژي گياه و الكوي تجمع استویوزايد را در استويا تحت تأثير قرار مي دهند.

فصل سوم

روش شناسی پژوهش

۳-مقدمه

اعتبار و دقت نتایج پژوهش متأثر از روش تحقیق است و روش تحقیق انتخاب شده بستگی به عواملی چون ماهیت تحقیق، فرضیات تحقیق، جامعه آماری، امکانات محقق و ... دارد. روش تحقیق مانند دستورالعملی است که تمام مراحل همراه محقق می-باشد و محقق از طریق آن بین بخش‌های مختلف تحقیق ارتباط برقرار می‌کند. بدین خاطر یکی از مهمترین مراحل تحقیقات علمی، انتخاب روش تحقیق مناسب برای انجام پژوهش است. منظور از روش تحقیقی مناسب آن است که مشخص کنیم چه روش تحقیقی برای موضوع خاصی لازم است و انتخاب روش تحقیق به عهده محقق است و او باید در انتخاب روش صحیح تحقیق حساسیت لازم را عمل آورد (خلیلی، ۱۳۷۸). در این فصل به تشریح نوع روش تحقیق، روش نمونه‌گیری، ... پرداخته می‌شود.

۳-۱- موقعیت مکانی

این تحقیق در مرکز آموزش عالی امام خمینی (ره) انجام گردید این آزمایش در سال زراعی ۱۳۹۶-۱۳۹۷ در مزرعه تحقیقاتی و آزمایشگاه های مرکز آموزش، واقع در کیلومتر ۵ جاده محمد شهر، خیابان شهید همت، مرکز آموزش عالی امام خمینی (ره) انجام پذیرفت. ارتفاع شهرستان کرج از سطح دریای آزاد ۱۲۹۲/۹ متر و طول جغرافیایی آن ۵۰ درجه و ۵۷ دقیقه شرقی و عرض آن ۳۵ درجه و ۴۸ دقیقه شمالی می‌باشد. میانگین بارندگی این منطقه ۲۵۱ میلیمتر، حداقل و حداکثر دمای منطقه به ترتیب ۲۰- و ۴۲ درجه سانتیگراد می‌باشد. در شهرستان کرج میانگین سالانه حداقل‌های دما ۸/۲ درجه سانتیگراد و میانگین سالیانه حداکثرهای دما ۲۰/۸ درجه سانتیگراد می‌باشد. میانگین سالیانه رطوبت نسبی ۵۲ درصد و

حداکثر و حداقل آن نیز به ترتیب ۷۲ و ۳۸ درصد می‌باشد. کرج در تمام ماه‌های سال بی‌بهره از بارندگی نبوده و توزیع باران ماهیانه آن نسبتاً مناسب است، البته میانگین سالانه آن اندکی پایین‌تر از حد مورد قبول برای کشت دیم و ۲۴۵/۸ میلیمتر می‌باشد. بطور کلی می‌توان اقلیم کرج را در حد اقلیم نیمه خشک به حساب آورد.

۳-۲- طرح آزمایش

در پژوهش حاضر به منظور مقایسه اثر بسترهای کشت انتخابی و بررسی اثر بستر کشت بر رشد و ویژگی‌های بیوشیمیایی گیاه استویا به منظور بالابردن تولید و فرآورده های آن به ویژه قندهای استویولی، آزمایش‌ها به صورت فاکتوریل در قالب طرح آزمایشی بلوک‌های کاملاً تصادفی انجام شد. از کوکوپیت، پرلیت، ورمی کمپوست و کمپوست غنی شده گلجا به عنوان محیط کشت بدون خاک با نسبت‌های زیر همراه و بدون محلول غذایی استفاده گردید. بسترهای مورد استفاده در این تحقیق شامل بسترهای دارای خاک و بدون خاک با نسبت‌های متفاوت از کوکوپیت، پرلیت و ورمی کمپوست و با تیمار مغذی متفاوت شامل تی کمپوست، ورمی واش و محلول هوگلند تیمار شده و تأثیر آنها بر رشد با مطالعه صفات مورفولوژیکی (سطح برگ، طول گیاه، وزن تر و خشک) و بر صفات فیزیولوژیکی با اندازه گیری میزان رنگدانه های فتوسنتزی و ترکیبات بیوشیمیایی شامل تولید پروتئین، فنل‌ها، قندهای محلول، و یکی از قند استویولی آن آزمایش‌ها در سه تکرار در گلدان‌های به قطر ۳۰ سانتی‌متر و در هر گلدان سه بوته در گلخانه تحقیقاتی مرکز آموزش عالی امام خمینی در کرج انجام شد.

۳-۳- محیط کشت

گیاهچه‌های استویا در ۱۶ محیط متفاوت از نظر ترکیب بستر شامل بسترهای دارای خاک و بدون خاک با نسبت‌های متفاوت از کوکوپیت، پرلیت و ورمی کمپوست و با تیمار مغذی متفاوت شامل تی کمپوست، ورمی واش و محلول هوگلند تیمار شده و تأثیر آنها بر رشد با مطالعه صفات مورفولوژیکی (سطح برگ، طول گیاه، وزن تر و خشک) و بر صفات فیزیولوژیکی با اندازه گیری میزان رنگدانه های فتوسنتزی و ترکیبات بیوشیمیایی شامل تولید پروتئین، فنل‌ها، قندهای محلول، و یکی از قند استویولی آن مورد بررسی قرار خواهد گرفت. از طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار استفاده شد. تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS انجام گردید. تمام مراحل در گلخانه با دوره نوری ۱۶ ساعت و دمای ۲۵ درجه سانتی گراد انجام شد .



شکل (۱-۳) .

۳-۴- آماده سازی مواد گیاهی

آزمایش‌های انجام شده بر روی استویا به منظور ارزیابی تأثیر بسترهای کشت و کودهای مختلف بر ویژگی‌های رویشی و فیتوشیمیایی استویا در طی سال ۹۴ در گلخانه گروه تولیدات گیاهی مرکز آموزش عالی امام خمینی (ره) کرج انجام شد. گیاهچه‌های استویا از بخش بیوتکنولوژی مؤسسه جهاد دانشگاهی واقع در کرج تهیه گردید. گیاهچه‌ها استویا در گلدان‌هایی به قطر ۳۰ سانتی‌متر محتوی محیط‌های کشت مختلف با ترکیب آمده در

جدول (۳-۱) ویژگی‌های محیط‌های استفاده شده در این تحقیق (برای کشت استویا) در گلخانه ای با دوره نوری شانزده ساعت و دمای روز/ شب ۲۵/ درجه سانتی‌گراد ۱۷ قرار داده شدند.

جدل (۳-۱). تیمارهای مورد مطالعه

Growth bed name	Growth bed	Additional fertilizer	Growth bed name	Growth bed	Additional fertilizer
G1	100%Soil	tea compost	G9	40%vearmicompost+60%pearlite	-----
G2	100%Soil	Vermiwash	G10	30%vermicompost+60%pearlite+10%Cocopeat	Teacompost
G3	100%Soil	Hogland	G11	30%vermicompost+60%pearlite+10%Cocopeat	-----
G4	40%Cocopeit+60%pearlite	tea compost	G12	30%vermicompost+60%pearlite+10%Cocopeat	Vermiwash
G5	40%Cocopeat+60%pearlite	Hogland	G13	60%Soil+40%vermicompost	tea compost
G6	40%cocopeat+60%perlite	Vermiwash	G14	60%Soil+40%vermicompost	Vermiwash
G7	40%vermicompost+60%pearlite	Teacompost	G15	60%Soil+40vermicompos	Hogland
G8	40%vearmicompost+60%pearlite	Vearmiwash	G16	100%Soil	-----

جدول (۳-۲) . عناصر غذایی

Biofertilizer component	Mg(%)	Ca(%)	N%	P(%)	Fe(ppm)	Zn(ppm)	Mn(ppm)	K(%)	Na(%)	EC(μ s/cm)	pH
Vermivash	0.104	0.256	0.046	0.029	6.676	163.5	56.44	0.504	0.047	470	7.58
Teacompost	0.413	0.453	0.046	0.331	82.988	320.46	56.44	6.334	0.071	2300	6.77
Vermicompost	0.334	0.44	0.046	0.298	89.045	343.35	67.38	6.125	0.072	2200	6.95

۳-۵- اندازه‌گیری صفات رویشی

اثرات محیط‌های رشد بر اندازه سطح برگ، طول ساقه، وزن تر و خشک برگ مورد مطالعه قرار گرفت. جهت اندازه‌گیری وزن خشک، پس از اندازه‌گیری وزن تر نمونه‌ها به منظور خشک کردن به مدت ۲۴ ساعت در آون ۷۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از رساندن دمای آنها به دمای محیط مجدد وزن آنها جهت تعیین وزن خشک اندازه‌گیری شد.



شکل (۳-۲) .

۳-۶- قند محلول کل

قند محلول کل به روش Thimmaiah (2004) برآورد شد. یکصد میلی گرم از نمونه با ۵ میلی لیتر اسید کلریدریک ۲/۵ نرمال در حمام آب به مدت ۳ ساعت به منظور هیدرولیز جوشانده شد و سپس با کربنات سدیم خنثی شد. حجم آن به ۱۰۰ میلی لیتر افزوده شد و در ۵۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. محلول رویی جدا شد و یک میلی لیتر از نمونه جهت آنالیز برداشته شد. ۴ میلی لیتر عامل Anthrone به آن افزوده شد و در حمام آب گرم (۷۰ درجه سانتیگراد) به مدت یک دقیقه گرم شد. نمونه سپس به سرعت سرد شد و رنگ آن از سبز به خاکستری تغییر یافت و جذب آن در ۶۳۰ نانومتر خوانده شد.

۳-۷- فنل کل

جهت اندازه گیری ترکیبات پلی فنلی کل از معرف Folin-Ciocalteu استفاده شد (مک دونالد^۱ و همکاران، ۲۰۰۱). ۰/۵ میلی لیتر از این معرف به ۰/۵ میلی لیتر عصاره استخراج شده گیاهی و استانداردهای گالیک اسید اضافه و سپس به مخلوط حاصل ۴ میلی لیتر سدیم کربنات ۱ مولار اضافه شد. پس از ۱۵ دقیقه نگهداری در دمای محیط جذب نمونه ها در طول موج ۷۶۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر UV-Vis خوانده شد. نتایج به صورت میلی گرم بر گرم وزن خشک گزارش شد (شیو و لئونگ^۲؛ ۲۰۰۲؛ پانجایتان و هوآرد^۳، ۲۰۰۵).

۳-۸- پروتئین کل

برای تعیین میزان پروتئین کل محلول از متد Biuret (راسوسن و جانستون^۴، ۱۹۶۱) استفاده شد. کلروفیل و کاروتنوئید اندازه گیری رنگ برای سنجش میزان کلروفیل و کاروتنوئید با

1 McDonald

2 Shui& Leong

3 Pandjaitan& Howard

4 Racusen&Johnstone

استفاده از روش آنالیز اسپکترومتری (طیف سنجی نوری) با استفاده از میزان تراکم اپتیکی در ۴۲۰ و ۶۶۴ نانومتر سنجیده شد. میزان هر یک از رنگدانه ها (کلروفیل a,b و کلروفیل کل) با استفاده از روش اسپکترومتری تغییر داده شده توسط آرنون^۱ (۱۹۴۹) اندازه گیری شد.

۳-۹- سنجش کلیکوزیدهای استویولی

آنالیزهای انجام شده با استفاده از سیستم HPLC Alliance SPD-10AV UV- (Waters Co., MA, USA) 2695, با بکارگیری آشکارگر Vis انجام شد (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan). جداسازی با استفاده از یک ستون ODS به طول ۲۵۰×۴/۶ میلی متر و اندازه ذرات ۵ میکرو متری: Capcell Pak C18 MG|| (Shimadzu Corporation, Shim-pack (Shiseido Co., Ltd., Tokyo, Japan) و Luna C18 (Phe-nomenex Co., Ltd., CA, USA) صورت پذیرفت. دمای ستون ۴۰ درجه سانتی گراد نگهداری شد.



شکل (۳-۳).

آماري

۳-۱۰- آنالیز

نتایج به دست آمده مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. تجزیه و تحلیل داده ها از طریق نرم افزار آماری SPSS (نسخه ۱۶)، Microsoft Office Excel (نسخه ۲۰۰۷) انجام شد و جهت ترسیم

¹ Arnon

نمودارها از نرم افزار Excell 2003 استفاده شد. داده ها با استفاده از آنالیز واریانس یک سویه آنالیز شد (ANOVA). همچنین ضرایب همبستگی ساده برای یه دست آوردن میزان ارتباط صفات با یکدیگر به دانکن محاسبه شد.

فصل چهارم

یافته های پژوهش

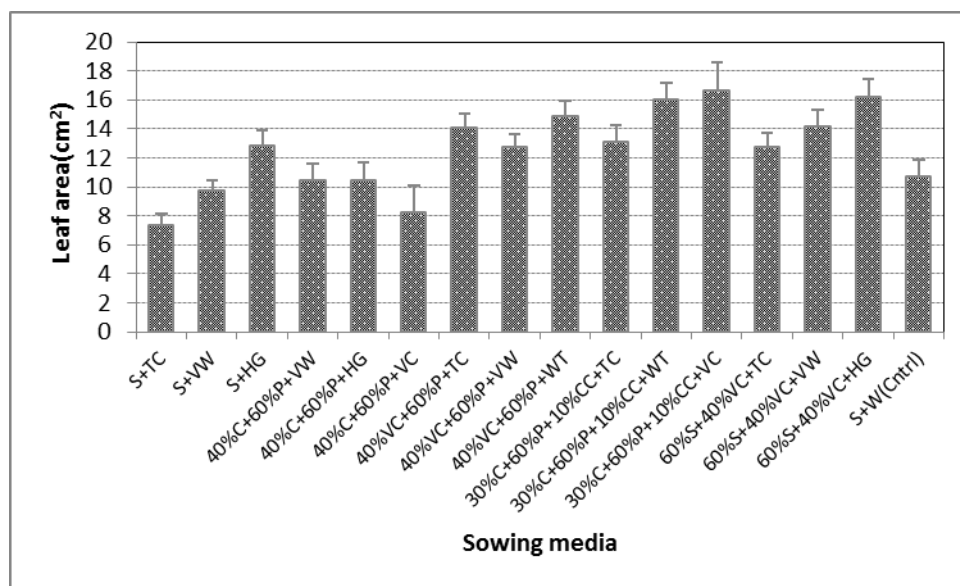
این فصل از گزارش تحقیق به نتایج تحقیق اختصاص دارد. در این قسمت اطلاعات و داده‌های حاصل از آزمایشات تحقیق با استفاده از روش‌های آماری مورد تجزیه و تحلیل قرار می‌گیرند.

۴-۱- صفات مورفولوژیکی و تیمارهای غذایی

نتایج حاصل از تحقیق بر روی صفات مورفولوژیکی در بسترهای مختلف و تحت تیمارهای غذایی متفاوت شامل سطح برگ، طول ساقه، وزن تر برگ، وزن خشک برگ مورد ارزیابی آماری قرار گرفتند و نشان داده شد همگی صفات بطور معنی داری تحت تأثیر قرار گرفته اند ($P < 0.01$) (جدول ۴-۱).

۱-۱-۴- برگ

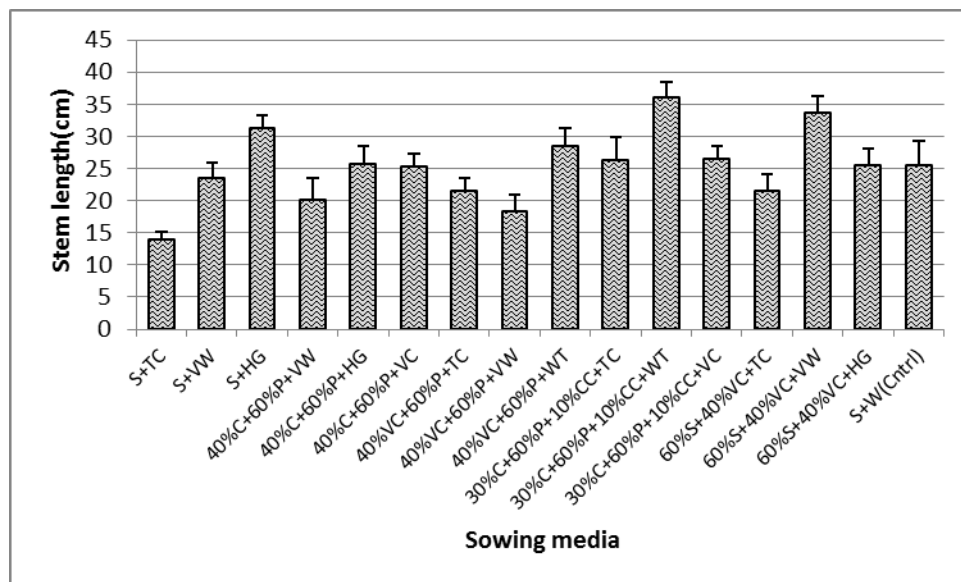
در مورد سطح برگ در محیط ۱۲ بیشترین مقدار اندازه گیری شده است و محیط‌های ۱۵، ۱۱ و ۹ به ترتیب با کمی تفاوت در مرتبه بعدی قرار می‌گیرند، در حالیکه کمترین مقدار این خصوصیت در محیط یک مشاهده می‌شود.



نمودار (۴-۱). رابطه سطح برگ و بسترهای کشت

۴-۱-۲- طول ساقه

در مورد صفت طول ساقه محیط ۱۱ بیشترین و در محیط یک کمترین مقدار نشان داده شده است. در مورد وزن تر برگ محیط ۱۵ و در مرتبه بعدی محیط ۱۱ و ۱۲ بالاترین میزان را نشان می-دهند که البته تفاوت این محیطها معنی دار نمی باشد و کمترین آن در محیط ۲ و با کمی تفاوت در محیطهای ۱ و ۶.



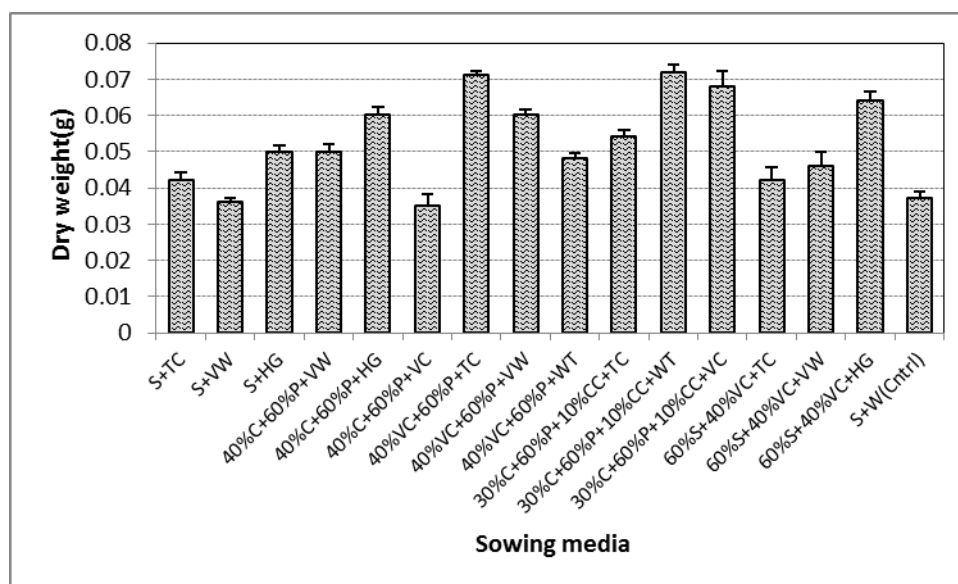
نمودار (۲-۴). رابطه طول ساقه و بسترهای کشت

جدول (۱-۴). تجزیه واریانس سطح برگ، طول ساقه و وزن خشک و تر

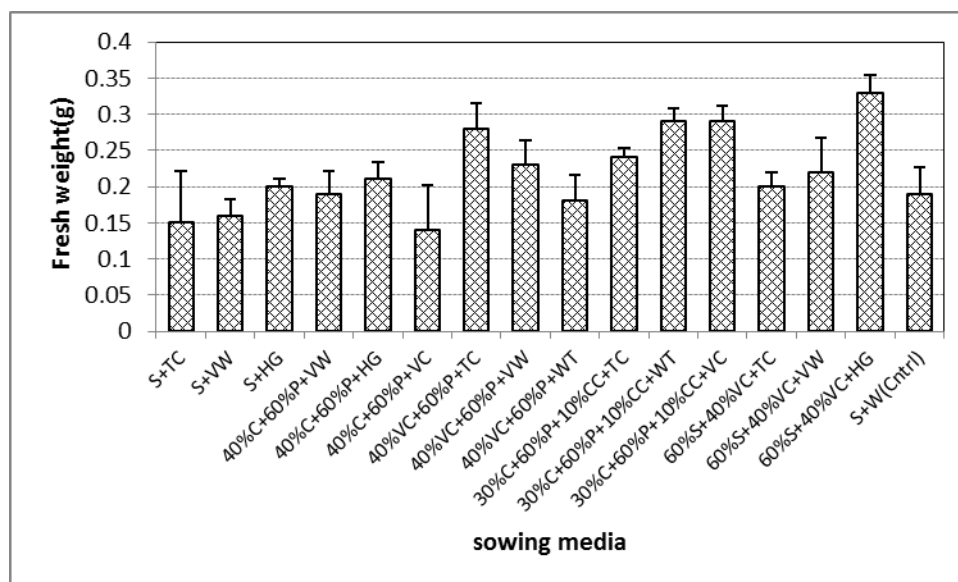
Changes sources	df	Leaf area(cm)	Stem length(cm)	Fresh weight(g)	Dry weight(g)
Treatment	15	22.24**	85.58**	0.00861**	0.000449**
Error	31	5.78	17.530	0.001	0.000083
CV		7.1	7.4	19.3	14.1

۴-۱-۳- وزن خشک برگ

در حالیکه در مورد وزن خشک برگ بالاترین مقدار در محیط ۱۱ و با کمی اختلاف در محیط ۷ و ۱۲ و کمترین مقدار در محیط ۶ مشاهده گردید (جدول ۴-۱). همانطور که مقادیر درج شده در جدول ۴-۱ نشان می‌دهد می‌توان در محیط ۱۱ شامل 30%vermicompost+60%pearlite+10%Cocopeat بدون استفاده از تیمار غذایی همه صفات مرفولوژیکی مورد بررسی در این پژوهش را، تقریباً در بالاترین و در محیط یک در پائین‌ترین میزان مشاهده کرد. همانطور که نتایج نشان می‌دهند بیش از اینکه نوع تیمار غذایی بر رشد گیاه تأثیر داشته باشد نوع بستر مورد استفاده تأثیرگذار است.



نمودار (۴-۳). رابطه وزن خشک و بسترهای کشت



نمودار (۴-۴). رابطه وزن تر و بسترهای کشت

۴-۱-۴- صفات بیوشیمیایی

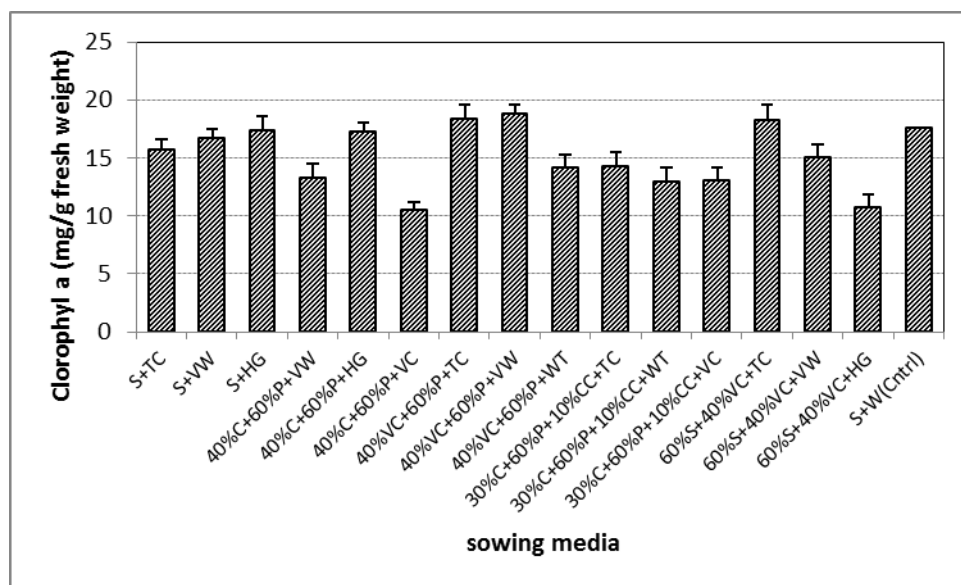
بررسی‌های انجام شده بر روی صفات بیوشیمیایی مورد مطالعه در این تحقیق شامل کلرفیل a و b، کاروتنوئیدها، پروتئین کل، قند کل، فنول کل و rebaudiosides نشان دادمحیط‌های مختلف استفاده شده به طور معنی‌داری بر میزان آنها اثر دارند ($P < 0.01$) (جدول ۴-۲).

همانطور که در جدول (۴-۲) نشان داده شده است بیشترین مقدار کلرفیل a، b و کاروتنوئیدها در محیط ۸ و کمترین آنها در محیط‌های ۶ و ۱۵ اندازه‌گیری شده است.

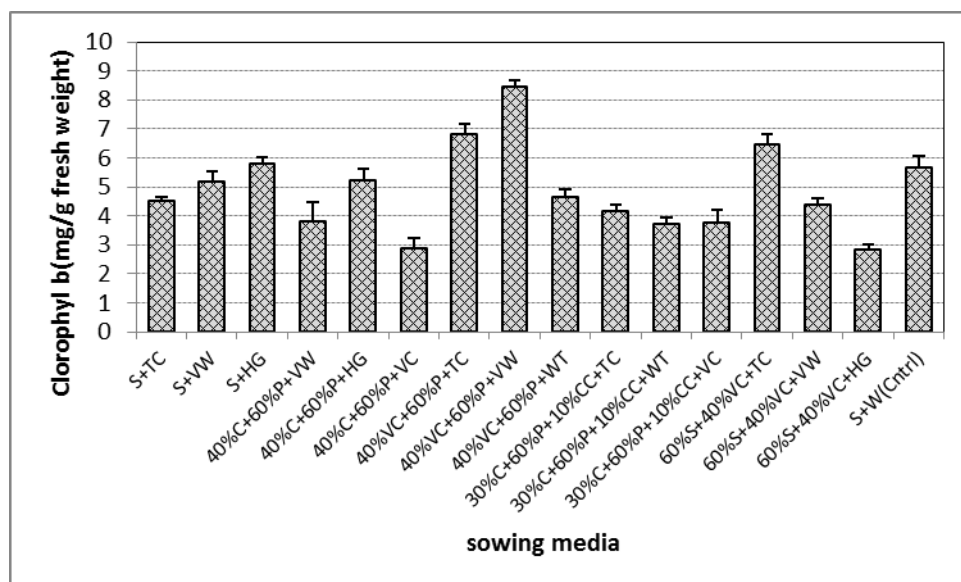
جدول (۴-۲). تجزیه واریانس کلروفیل، کارتونید و پروتئین

Changes	df	Chlorophylla	Chlorophyllb	Carotenoid	Protein %
---------	----	--------------	--------------	------------	-----------

sources		(mg/gFW)	(mg/gFW)	(mg/gFW)	
Treatment	15	21.332**	6.693**	0.996**	1.286**
Error	31	1.293	0.009	0.002	0.002
CV		7.4	2.1	3.1	2.5

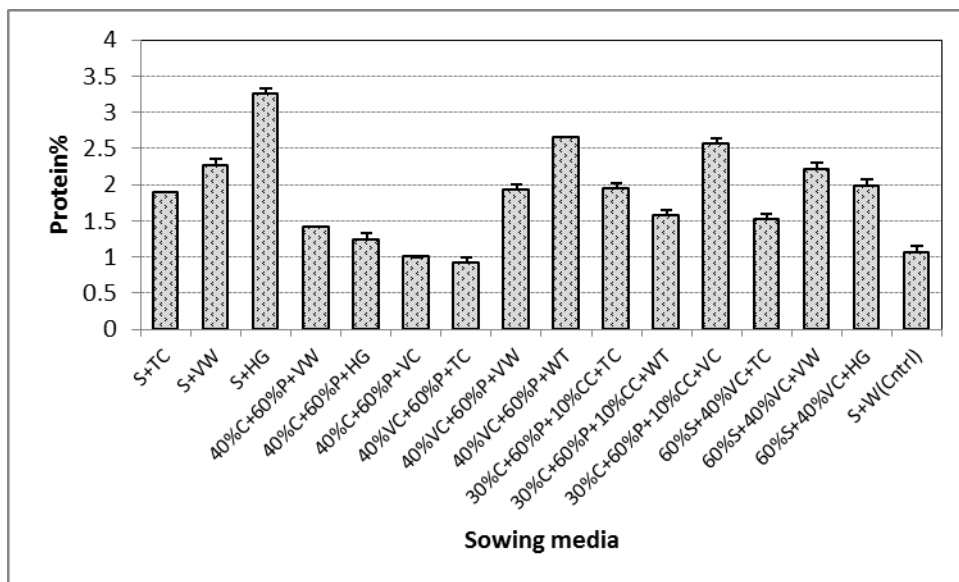


نمودار (۵-۴). رابطه کلروفیل و بستر های کشت



نمودار (۶-۴). رابطه کلروفیل b و بستر های کشت

در مورد پروتئین کل نیز همانطور که در جدول (۳-۴) نشان داده شده تغییرات معنی داری را در محیط های مختلف نشان داده که این تغییرات هم به نوع بستر و هم نوع تیمار غذایی بستگی دارد. بالاترین میزان در محیطی که بستر آن خاک و تیمار غذایی آن محلول هوگلند می باشد که همان محیط شماره ۳ است اندازه گیری شده است. و کمترین آن در در محیط ۷ اندازه گیری شده است. در این گیاه دیده شده در محیط ۳ نسبت به شاهد و سایر محیط ها بالاترین میزان پروتئین ساخته شده که البته با سایر صفات مورد بررسی متفاوت می باشد، بطوریکه در بستر بدون ورمی کمپوست و با افزودن کود شیمیایی یا همان محلول هوگلند بیشترین میزان پروتئین در برگ اندازه گیری شد. در حالیکه در مورد پروتئین بیشترین مقدار در محیط ۳ و کمترین آن در محیط ۷ مشاهده شده است.



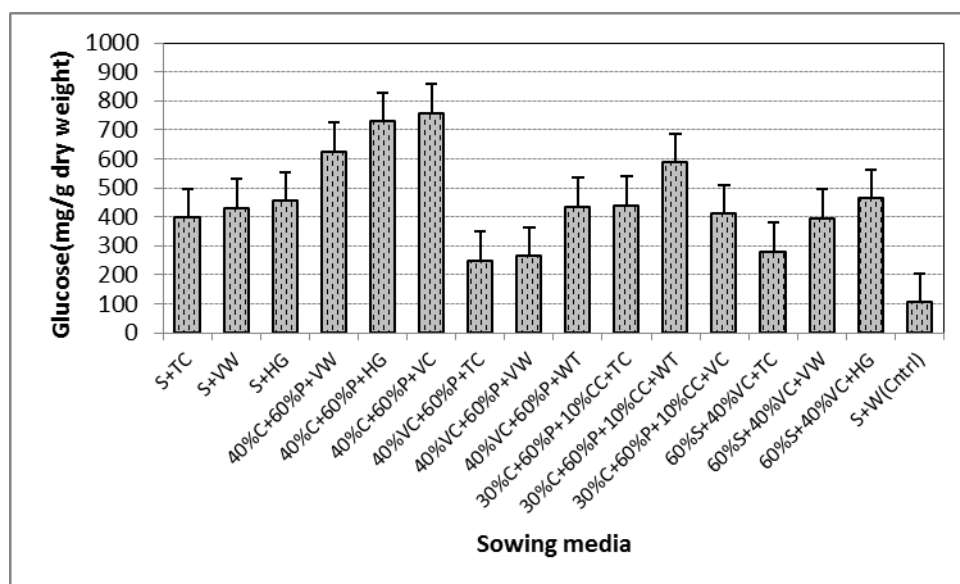
نمودار (۷-۴). رابطه پروتئین و بسترهای کشت

۴-۱-۵- قند خون و فنل

بالاترین مقدار قند کل و فنل در محیط ۶ و کمترین مقدار آنها در محیط ۱۶ نشان داده شده است.

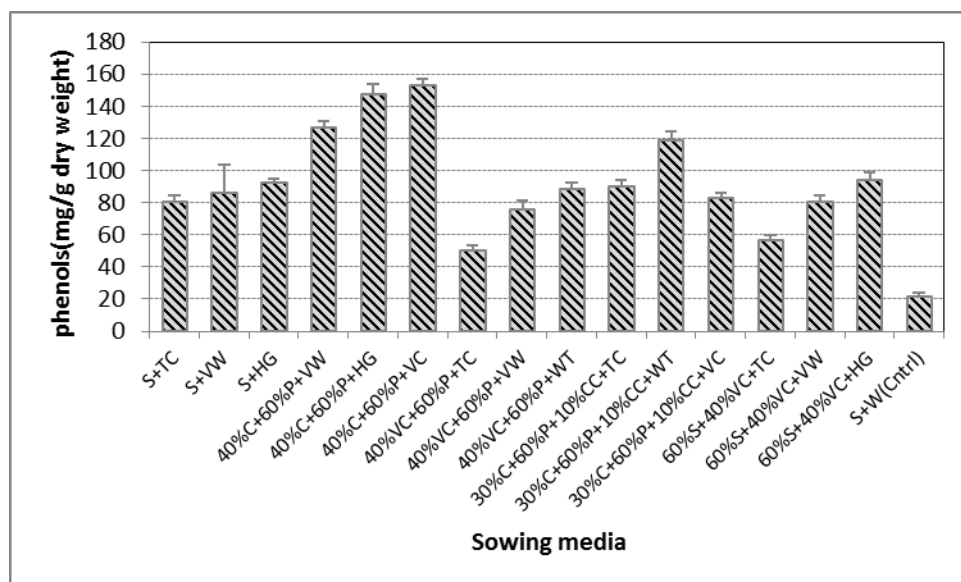
جدول (۳-۴). تجزیه واریانس

Changes sources	Df	Glucose (mg/gDW)	Phenols (mg/gDW)	Rebaudiosides (mg/gDW)
Treatment	7	90371.1**	3459.3**	7871.2**
Error	16	45.4	5.6	4.4
CV		15.3	2.6	3.5



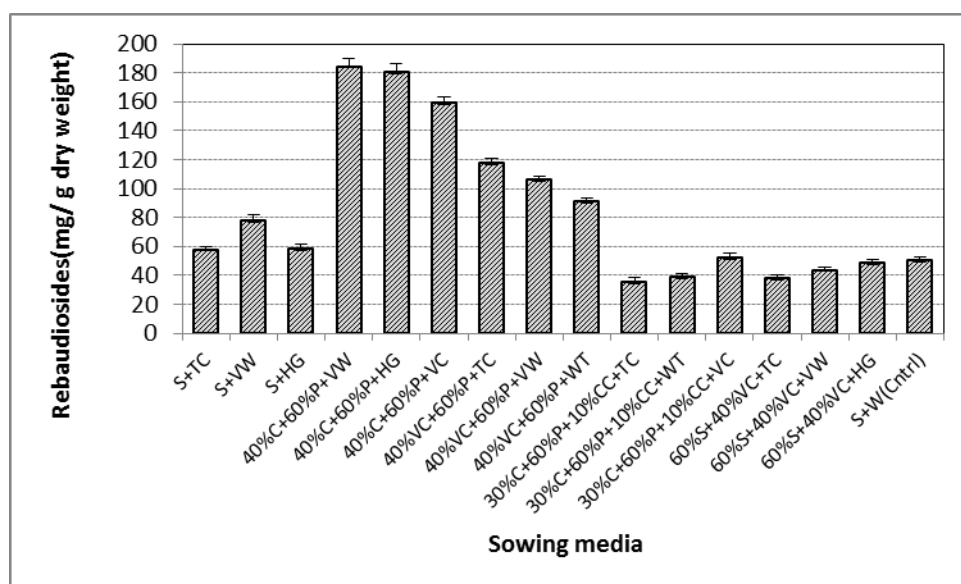
نمودار (۸-۴). رابطه گلوکوز و بسترهای کشت

در مورد rebaudiosides محیط ۴ بیشترین و محیطهای ۱۱، ۱۳ و ۱۰ کمترین مقادیر را نشان می‌دهند. همانطور که مشاهده می‌شود بالاترین میزان قند محلول، ترکیبات آنتی اکسیدانی که مقدار فنل معرف آن می‌باشد.



نمودار (۹-۴). رابطه فنل وز و بسترهای کشت

و نیز rebaudiosides از گروه قندهای دی ترپنی با خاصیت شیرین-کنندگی بالادر محیطهای که بستر کشت متشکل از پرلیت و کوکوپیت است مشاهده می شود اما میزان آنها با تیمار غذایی داده شده در محیطهای متفاوت تأثیرات متفاوتی گرفته اند بطوری که تی کمپوست موجب افزایش rebaudiosides و ورمی واش بر افزایش فنلها و قندهای محلول بیشترین تأثیر را دارد.



نمودار (۱۰-۴). رابطه کلروفیل b و بسترهای کشت

جدول (۴-۴). تیمارها و متغیرهای مورد مطالعه

Treatm ent	Leaf area (cm)	Stem length (cm)	Fresh weight (g)	Dry weight(g)	Chloro phylla (mg/gF W)	Chloro phyllb (mg/gF W)	Carote noid (mg/gF W)	Protein %	Glucos e (mg/gD W)	Phenol s (mg/gD W)	Rebaud iosides (mg/gD W)
G1	7.3d	13.9g	0.15e	0.042def	15.7de	4.50fg	1.44h	1.90f	398.2h	80.7i	57.8h
G2	9.7cd	23.5def	0.16e	0.036ef	16.7cd	5.18e	1.63f	2.26d	429.7f	86.2gh	77.8g
G3	12.8abc	31.3abc	0.20de	0.050cd	17.4bc	5.79d	1.74e	3.26a	454.5e	92.0ef	58.1h
G4	10.4bcd	20.2ef	0.19de	0.050cd	13.3f	3.81i	1.06k	1.42h	625.6c	126.3c	184.3a
G5	10.4bcd	25.7cde	0.21de	0.060abc	17.2bc	5.22e	1.67ef	1.23i	728.9b	147.2b	180.3b
G6	8.2d	25.3cde	0.14e	0.035f	10.5g	2.89j	0.84l	1.00j	758.2a	153.2a	158.9c
G7	14.1ab	21.4ef	0.28abc	0.071a	18.4ab	6.80b	2.70b	0.92k	248.1k	50.1l	117.3d
G8	12.7abc	18.3fg	0.23bcd	0.060abc	18.8a	8.46a	2.83a	1.92ef	263.3j	76.0j	106.2e
G9	14.9a	28.4bcd	0.18de	0.048cde	14.2ef	4.65f	1.54g	2.65b	435.0f	88.1g	91.3f
G10	13.1abc	26.2cde	0.24bcd	0.054bcd	14.3ef	4.16h	1.33i	1.95ef	439.1f	89.7fg	35.2k
G11	16.0a	36.0a	0.29a	0.072a	12.9f	3.70i	1.17j	1.57g	588.1d	119.0d	38.6k
G12	16.6a	26.5cde	0.29a	0.068a	13.0f	3.78i	1.21j	2.57c	411.1g	83.1hi	52.1i
G13	12.7abc	21.5ef	0.20de	0.042def	18.3ab	6.45c	2.17c	1.53g	280.1i	56.3k	38.0k
G14	14.2ab	33.7ab	0.22cd	0.046def	15.0e	4.39g	1.38hi	2.22d	395.3h	80.1i	43.6j
G15	16.2a	25.5cde	0.33a	0.064ab	10.7g	2.82j	0.89l	1.99e	464.3e	94.1e	48.5i
G16	10.7bcd	25.5cde	0.19de	0.037ef	17.6bc	5.66d	1.83d	1.07j	105.3k	21.5m	50.4i

فصل پنجم

خلاصه، نتیجه گیری و پیشنهادات

۱-۵- خلاصه و جمع بندی

بر اساس مطالعات انجام شده نوع و ترکیب محیط استفاده شده برای کشت گیاه استویا بر رشد و تولید این گیاه تأثیر گذار است و غالب صفات با بهبود محیطهای کشت نسبت به شاهد که بستر آن خاک است و تیمار غذایی در آن استفاده نشده است

(محمود^۱، ۲۰۰۹). همچنین گزارش شده استفاده از محیط‌های دارای کودهای زیستی نسبت به محیط شاهد موجب افزایش در میزان کلروفیل، پروتئین و قندها می‌شود (داس^۲ و همکاران، ۲۰۰۷؛ پتیل، ۲۰۱۰). تحقیق حاضر ضمن تأیید نتایج حاصل از تحقیقات گذشته مبنی بر تأثیرپذیری خصوصیات مورفولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه استویا از محیط کشت نشان می‌دهد برای بهبود رشد و تولیدات بیوشیمیایی گیاه بستر کشت و نوع ماده مغذی افزوده شده به بستر بسیار تأثیرگذارند، و با توجه به هدف کشت گیاه بایستی محیط مناسب انتخاب شود.

استویا، گیاهی با خاصیت دارویی و قدرت شیرین‌کنندگی ناشی از وجود قندهای دیترپنی که غالباً از برگ‌های آن استخراج می‌شود در بستر متشکل از کوکوپیت (۱۰٪)، پرلیت (۶۰٪) و ورمی کمپوست (۳۰٪) بهترین رشد را دارد. اگر چه تأثیر نوع مکمل غذایی بکار رفته نیز بر تغییرات این صفات ملموس می‌باشد. همانطور که نتایج نشان می‌دهند سطح برگ بیش از سایر صفات از وجود و نوع مکمل تأثیر می‌پذیرد. استفاده از ورمی واش (کود زیستی) بیش از محلول هوگلند (کود شیمیایی) رشد را تحت تأثیر قرار می‌دهند و رشد در محیطی که محلول هوگلند به آنها افزوده می‌شود نسبت به محیطی که فاقد تیمار کودی است، می‌شود تحریک می‌شود. البته لازم به ذکر است استفاده از تی کمپوست نه تنها اثر مثبتی بر صفات مورفولوژیک مورد مطالعه نداشته است بلکه تأثیر منفی داشته و استفاده از آن موجب کاهش رشد شده است. با این وجود نوع تیمار کودی و وجود آن موجب ایجاد تغییرات معنی‌دار در صفات مورفولوژیک نمی‌شود. بنابراین بستر بدون افزودن تیمار غذایی بیشتر

1. Mahmoud

2. Das

30%vermicompost+60%pearlite+10%Cocopeat برای رشد رویشی گیاه محیطی بهتر از شاهد و تمام محیطهای استفاده شده در این مطالعه می باشد. و گیاه در این محیط از سطح برگ، طول و وزن تر و خشک بیشتر یا به عبارتی توده زیستی بیشتری برخوردار است. میزان رنگدانه های فتوسنتزی شامل کلروفیل a,b در محیطهای بهبود یافته با استفاده از کودهای زیستی نسبت به محیط شاهد افزایش می یابد و نتایج بدست آمده از مطالعه حاضر ضمن تأیید آن نشان می دهد کاروتنوئیدها نیز از نوع محیط کشت تأثیر می پذیرند. بستر متشکل 40%vearmicompost+60%pearlite بدون نیاز به افزودن ماده مغذی بیشتر بهترین شرایط را از نظر رنگدانه های فتوسنتزی و در واقع فتوسنتز فراهم می آورد، که بالا بودن توده زیستی در گیاهان رویش یافته در این محیطها توجیح می نماید. در مورد رنگدانه های فتوسنتزی هم مانند رشد گیاه نوع بستر و نه تیمار غذایی مؤثر می باشد، به نظر می رسد در محیطهای با نسبت مناسب ورمی کمپوست شرایط بهتری برای انجام فتوسنتز و رشد فراهم می گردد. این محیط به اندازه کافی مغذی است و افزودن تیمارهای غذایی تأثیر معنی داری بر این صفات ندارد .

در مورد پروتئین کل نیز تغییرات معنی داری را در محیطهای مختلف نشان داده که این تغییرات هم به نوع بستر و هم نوع تیمار غذایی بستگی دارد. بالاترین میزان در محیطی که بستر آن خاک و تیمار غذایی آن محلول هوگلند می باشد که همان محیط شماره ۳ است اندازه گیری شده است و کمترین آن در در محیط ۷ اندازه گیری شده است. در این گیاه دیده شده در محیط ۳ نسبت به شاهد و سایر محیطها بالاترین میزان پروتئین ساخته شده که البته با سایر صفات مورد بررسی متفاوت می باشد، بطوریکه در بستر بدون ورمی کمپوست و با افزودن کود

شیمیایی یا همان محلول هوگلند بیشترین میزان پروتئین در برگ اندازه‌گیری شد.

در اندازه‌گیری میزان قندهای محلول و نیز میزان فنل‌ها همچون سایر صفات مورد بررسی تغییرات معنی‌داری مشاهده شده که وابسته به نوع بستری که گیاه در آن کشت شده و هم تیمار غذایی بکار رفته برای گیاه می‌باشند، بطوری که در محیط شماره ۶ با بستری مرکب از 40%cocopeat+60%perlite تیمار شده با ورمی واش بالاترین و در محیط شاهد یا محیط ۱۶ که بستر گیاه خاک می باشد بدون تیمار غذایی از کمترین مقدار برخوردار بود.

Rebaudiosides که از گروه قندهای دی ترپنوئیدی که در این تحقیق مورد اندازه گیری قرار گرفت هم مانند سایر ویژگی‌های مورد مطالعه در این گیاه با تغییر بستر و نوع ماده غذایی بکار رفته تغییرات معنی داری را نشان می‌دهد در بین محیط‌های مورد بررسی در این تحقیق بهترین شرایط از این نظر محیط ۴ که بستر آن مرکب از 40%Cocopeit+60%pearlite و با تی کمپوست تیمار شده است مناسبترین شرایط از نظر تولید rebaudiosides می‌باشد و نامناسبترین محیط ۱۰ و با تفاوت جزئی به ترتیب محیط‌های ۱۳ و ۱۱ می‌باشند. همانطور که ملاحظه می‌شود محیط ۴ و ۱۰ که در آنها به ترتیب بیشترین و کمترین مقدار rebaudiosides اندازه گیری شده هر دو توسط تی کمپوست تیمار شده است بنابراین می‌توان گفت بیش از ماده مغذی مورد استفاده نوع بستر کشت است که بر تولید آن مؤثر است.

بنابراین بستر مناسب از نظر تولید قندهای محلول، ترکیبات فنلی و قندهای ترپنی بستر مرکب از 40%Cocopeit+60%pearlite که البته با توجه به نوع تیمار غذایی بکار رفته مناسب برای

قندهای محلول و فنلها ورمی واش و برای rebaudiosides تی کمپوست می‌باشد. بدین ترتیب در مورد گیاه استویا که به دلیل تولید و استخراج قندهای دیترپنی اهمیت بیشتری دارد با استفاده از بستر بدون خاک ارگانیک و تیمار غذایی زیستی می‌توان تولید ماده مؤثره را بالا برد. البته در مورد قندهای محلول و فنلها همین ترکیب برای بستر و تی کمپوست برای تیمار غذایی می‌توان استفاده نمود. تنها میزان پرتئین در بستر خاکی با تیمار غذایی شیمیایی از تولید مناسبتری برخوردار بود.

بنابراین می‌توان گفت برای کشت استویا استفاده از بستر کشت بدون خاک ارگانیک دارای ۶۰٪ پرلیت و ۳۰-۴۰٪ ورمی کمپوست بدون نیاز به تیمار غذایی خاص مناسب‌ترین شرایط را فراهم می‌سازد. اگرچه میزان قندهای محلول، فنلها و rebaudiosides در واحد وزن برگ گیاهان رویش یافته محیط‌های مرکب از 40%Cocopeit+60%pearlite به همراه تیمار غذایی بیشتر است ولی گیاهان رویش یافته در محیط‌های دارای ورمی کمپوست برگ‌های بیشتر و بزرگتر و به عبارتی توده زیستی بیشتر در زمان مشخص تولید می‌کنند. از آنجائی‌که برگ بخش قابل استفاده از استویا می‌باشد هر چه میزان تولید آن بیشتر باشد مقدار بیشتری از فرآورده آن به دست می‌آید.

۲-۵-پیشنهادهای تحقیق

۱- تحقیق حاضر استفاده از ورمی واش (کود زیستی) را در تولید استویا مورد تایید قرار میدهد بدین جهت استفاده از کود های زیستی در بستر سازی برای تولید استویا توصیه می‌گردد.

۲- یکی از شرایط مناسب برای تولید استویا استفاده از محیط‌های با نسبت مناسب ورمی‌کمپوست می‌باشد بنابراین

برای تولیدکنندگان گیاه استویا بکارگیری کمپوست توصیه می‌گردد.

۳- برای بالابردن ماده موثره در روند تولید استویا بستر مناسب از نظر تولید قندهای محلول، ترکیبات فنلی و قندهای ترپنی بستر مرکب از 40%Cocopeit+60%pearlite توصیه می‌گردد و همچنین برای کشت استویا استفاده از بستر کشت بدون خاک ارگانیک دارای ۶۰٪ پرلیت و ۳۰-۴۰٪ ورمی کمپوست توصیه می‌گردد.

۳-۵- عناوین تحقیقاتی پیشنهادی

- ۱- انجام مطالعات تحقیقاتی در زمینه بررسی کالوس زایی گیاه استویا با استفاده از تنظیم کننده های رشد
- ۲- بررسی مقایسه اثر تیمارهای تغذیه ای و نوع بستر کشت بر برخی خصوصیات فیتوشیمیایی گیاه استویا
- ۳- اثر غلظت‌های مختلف محرک زیستی کیتوزان بر خصوصیات بیوشیمیایی و مورفوفیزیولوژیکی گیاه استویا^۱

۴-۵- محدودیت‌های تحقیق

۱. کمبود سوابق تحقیقاتی پیرامون موضوع تحقیق
۲. کمبود امکانات و تجهیزات آزمایشگاهی و گلخانه ای

1. Stevia rebaudiana Bertoni

منابع

- اصغري، ر. (۱۳۹۶). مقایسه اثر تیمار تغذیه ای و نوع بستر کشت بر برخی خصوصیات فیتوشیمیایی گیاه استویا. مجله پژوهش-های گیاهی (مجله زیست شناسی ایران). دوره ۳۰، شماره ۲. ص ۱۹۹-۱۹۱.
- اطرشی، محمود؛ وفادار اصفهان، فریناز و عموآقایی، ریحانه. (۱۳۹۲). اثر قارچ میکوریز و ریزوباکتری های محرک رشد گیاه بر سرعت رشد، زمان گلدهی و الگوی تجمع استویوزاید در گیاه استویا. دوماهنامه علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران. جلد ۳۱، شماره ۲، صفحه ۲۳۴-۲۲۰.
- افشار محمدیان، م و انصاری پیری، ز. (۱۳۹۶). تأثیر سطوح مختلف سرما روی پروتئین کل، پرولین و فعالیت برخی از آن تی اکسیدان های آنزیمی گیاه استویا (Stevia rebaudiana Bertoni). مقاله ۳، دوره ۳۰، صفحه ۱۵۴-۱۴۰.
- رسولی الموتی، م؛ قادری، ا و ابراهیمی، م.ع. (۱۳۹۴). بررسی اثر تنش شوری بر عملکرد فیتوشیمیایی و رشدی گیاه دارویی استویا در شرایط هیدروپونیک. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه پیام نور (وزارت علوم، تحقیقات و فناوری)، دانشگاه پیام نور استان البرز- دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی.
- سراج، ف؛ یعقوبیان، ی؛ قاسمی عمران، و و پیردشتی، ه. (۱۳۹۵). اثر قارچ اندوفیت در تحمل گیاه دارویی استویا

- به تلفیق تنش شوری و خشکی در شرایط کنترل شده. وزارت علوم، تحقیقات و فناوری. دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری- دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی.
- شهیدی نوقابی، م، نیازمند، روقایینی، ز. (۱۳۹۴). اثر شیر خشک و شیرین کننده استویا بر میزان آکریلآمید و خصوصیات شیمیایی فرآورده دونات. نشریه فرآوری و نگهداری مواد غذایی، ۸ (۱)، ص ۶۵-۴۱.
- صابرهمیشگی، ف؛ ترنگ، ع؛ مبلغی، م؛ دهپوری، ع و صابرهمیشگی، ز. (۱۳۹۱). بررسی اثر سطوح مختلف نیتروژن و پتاسیم بر خصوصیات مورفولوژی و شیمیایی گیاه استویا. یافته های نوین کشاورزی، ۷ (۲).
- کشوری، ط؛ زبرجدی، ع؛ نجفی، ع و کهریزی، د. (۱۳۹۵). بهینه سازی جنین زایی سوماتیک در گیاه دارویی استویا. پایان نامه کارشناسی ارشد. وزارت علوم تحقیقات و فناوری - دانشگاه رازی- دانشکده علوم کشاورزی.
- گرامی، م؛ عباسپور، ح؛ قاسمی عمران، و و پیردشتی، ه. (۱۳۹۶). تأثیر اتیل متان سولفونات (EMS) بر برخی ویژگی های بیوشیمیایی و مقدار استویوزید و ربادیوزید A در نمونه های باززایی شده از کالوس های گیاه استویا (*Stevia rebaudiana* Bertoni). پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی. ۹ (۲۳)، ص ۱۷۷-۱۸۶.
- مرادی، ف. (۱۳۹۶). استویا و تجارت آن در ایران و جهان. بخش فیزیولوژی مولکولی، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران. مقاله ۱، دوره ۶، شماره ۱، ص ۲۴-۱۳.

- مهرگان، م؛ مهرآفرین، ع؛ لبافی، م و نقدی بادی، ح. (۱۳۹۶). اثر غلظت‌های مختلف محرک زیستی کیتوزان بر خصوصیات بیوشیمیایی و مورفوفیزیولوژیکی گیاه استویا (*Stevia rebaudiana* Bertoni). کرج، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی. نشریه: گیاهان دارویی، دوره ۱۶ (دوره دوم)، (۶۲): ۱۸۱-۱۶۹.

- هاشمی، ن؛ ربیعی، ح؛ توکلی‌پور، ح و گازرانی، س. (۱۳۹۳). بررسی اثر جایگزینی قند گیاه استویا با ساکارز بر روی خصوصیات فیزیکیوشیمیایی، رئولوژیکی و حسی شربت رژیمی زعفران. نشریه زراعت و فناوری زعفران، جلد ۲، شماره ۴، صص ۳۱۰-۳۰۳.

- Abbas, S. M., Latif, H. H. and Magdy, N. 2013. Physiological and Biochemical Responses of Two Cultivars of *Phaseolus vulgaris* L. to Application of Organic Fertilizers and Nile Compost in Sandy Soil. *American Journal of Experimental Agriculture*, 3(4): 698-717
- Abdalbasit, A., Gasmalla, M., Yang, R., Musa, A., Hua, X., and Zhang, W. 2014. Physico-chemical assessment and rebauidioside A. productively of natural sweeteners (*Stevia rebaudiana* Bertoni). *Journal of Food and Nutrition Research*. 2(5): 209-214.
- Adari Bhaskar Rao, Ernala Prasad, Goka Roopa and Sundergopal Sridhar. Simple extraction and membrane purification process in isolation of steviosides with improved organoleptic activity. *Advances in Bioscience and Biotechnol.* 2012; 3:327-35.
- Ahmed, A., M.N. Huda, C. Mandal, K.A. Alam, M.S. H. Reza and A. Wadud 2007. In vitro morphogenic response of different explant of stevia (*Stevia rebaudiana*). *Int. J. Agric. Res.*, 2: 1006-1013
- Ahmed, M.B., Salahin, M., Karim, R., Razvy, M.A., and Hannan, M.M. (2011) An efficient method for in vitro clonal propagation of a newly introduced

sweetener plant (*Stevia rebaudiana* Bertoni.) in Bangladesh. American Eurasian Journal of Science Research, 2, 121- 25.

- Aira M, Monroy F, Dominguez J, Mato S (2002). How earthworm density affects microbial biomass and activity in Pig manure. European J Soil Biol. 38: 7-10.
- Ali A. , Gull, I., Naz, S. and Afghan, S.2010.Biochemical Investigation During Different stages Of In Vitro Propagation Of *Stevia Rebaudiana*. Pakistan Journal of Botany, 42(4): 2827-2837
- Alizadeh, M., Azizi-Lalabadi, M., Ansari, H., and Kheirouri, S. 2014. Effect of stevia as a substitute for sugar on physicochemical and sensory properties of fruit based milk shake. Journal of Research and Reports. 3(11): 1421-1429.
- Anbazhagan, M., M. Kalpana, R. Rajendran, V. Natarajan and D. Dhanave, 2010. In vitro production of *Stevia rebaudiana* Bertoni. Emirates J. Food and Agric., 22(3): 216-222.
- Bhosle, S. 2004. Commercial cultivation of *Stevia rebaudiana*. Agrobios News letter., 3: 43-45.
- Brandle, J. F. & Rosa, N. (1992). Heritability for yield, leaf: stem ratio and stevioside content estimated from landrace cultivar of *Stevia rebaudiana*. Canadian Journal of Plant Sciences, 72, 1263-1266.
- Cardello, H.M.A.B., Da Silva, M.A.P.A. and Damasio, M.H., 1999. Measurement of the relative sweetness of *Stevia* extract, aspartame and cyclamate/saccharin blend as compared to sucrose at different concentrations. Plant Food for Human Nutrition, 54(2): 119-129.
- Chalapathi, M. V., Thimmegowda, S., Deva Kumar, N., Gangadhar, E., Rao, G. and Chandraprakash, J. 1999. Influence of fertilizer levels on growth, yield and nutrient uptake of ratoon crop of Crop Res; 21: 947-949.
- Chatterjee B, Ghanti P, Thapa U, Tripathy P. Effect of organic nutrition in sprouting broccoli (*Brassica alaracea* var. *italica* Plenck). Vegetable Sci. 2005; 33(1):51-54.

- Das Kuntal , Raman Dang, Thippenahalli Narayanappa Shivananda, Nazim Sekeroglu. (2007). Influence of bio-fertilizers on the biomass yield and nutrient content in *Stevia rebaudiana* Bert. grown in Indian subtropics. *Journal of Medicinal Plants Research* Vol. 1(1), pp. 005-008.
- Debnath, M., 2008. Clonal propagation and antimicrobial activity of an endemic medicinal plant *Stevia rebaudiana*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 2: 45-51.
- Din, M.S.U., M.S. Chowdhury, M.M.H. Khan, M.B.U. Din, R. Ahmed and M.A. Baten. 2006. In vitro propagation of *Stevia rebaudiana* Bert in Bangladesh. *Afri J. of Biotech.*, 5: 1238-1240.
- Eghball B, Power JF, Gilley JE (1997). Nutrient, carbon and mass loss during composting of beef cattle feedlot manure. *J. Environ. Quality*, 26: 189- 193.
- Elikins Rita MH. (1997) *Stevia* nature's sweetener. Woodland publishing, Inc, 160: 1-29.
- European Commission. 2011. Commission Regulation (EU) No 1131/2011 of 11 November 2011 amending Annex II to Regulation (EC) No 1333/2008 of the European Parliament and of the Council with regard to steviol glycosides. *Official Journal of the European Union*, L295, 205–211. <http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:295:0205:0211:EN:PDF>.
- Fathima M. and Sekar M. (2014). Studies on Growth Promoting effects of Vermiwash on the Germination of Vegetable Crops, *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci* 3(6) 564-570
- Ferri, L.A., W. Alves-Do-Prado, S.S. Yamada, S. Gazola, M.R. Batista and R.B. Bazotte. 2006. Investigation of the antihypertensive effect of oral crude stevioside in patients with mild essential hypertension. *Phytother. Res.*, 20: 732-736.
- Goyal SK and Goyal RK. *Stevia* (*Stevia rebaudiana*) a bio-sweetener: a review. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 2010; 61: 1-10.

- Goyal, R., Samsher, K. and Goyal, S. K. 2010. Stevia (*Stevia rebaudiana*) a bio-sweetener: a review. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*.61 (1): 1–10.
- Gregersen, S., P.B. Jeppesen, J.J. Holst and K. Hermansen. 2004. Antihyperglycemic effects of stevioside in type 2 diabetic subjects. *Metabolism*, 53: 73-106.
- Gujaral R., 2004. 0% Calorie, 100% sweet, 100% Nature Science Tech, Entrepreneur, pp:10-12.
- Gupta E, Purwar S, Sundaram S, and Rai GK. (2013) Nutritional and therapeutic values of *Stevia rebaudiana*. A review, *Journal of Medicinal Plants Research*, 3344-3345.
- Hamzeliuie, M., Mirzayi, H. and Ghorbani, M. 2009. Evaluation effects of evaluation of sugar replace by glycosidic sweeteners of stevia on the peroxide index in biscuit. *Journal of agricultural sciences and natural resources*, Vol. 16(Special issue 1-a).
- Hassanen, S.A. and Khalil, R. M.A., 2013. Biotechnological Studies for Improving of *Stevia (Stevia rebaudiana Bertoni)* in vitro Plantlets. *Middle-East Journal of Scientific Research*, 14 (1), 93-106
- Homayouni Rad, A., Delshadian, Z., Arefhosseini, S.R., Alipour, B. and AsghariJafarabadi, M. 2012. Effect of inulin and stevia on some physical properties of chocolate milk. *Health Promotion Perspectives*. 2(1): 42-47.
- Jain, P., Kachhwahe S. and Kothari, S.L., 2009. Improved micro propagation protocol and enhancement in biomass and chlorophyll content in *Stevia rebaudiana Bertoni* by using high copper levels in the culture medium. *Scientia Horticulturae*, 119, 315- 319.
- Jat, M.L., Pal S.S. and Singh R.(2002). Crop residue treatment with mineral salts and its recycling under different tillage management practices and their impact on crop yields and soil health in a rice-wheat cropping system in Indo-Gangetic plains. In: 17th world Congress of Soil Science, August 14-21 2002, Bangkok, Thailand.

- Kapoor, R., Sharma, D. and Bhatnagar, A.K., 2008. Arbuscular mycorrhizal in micropropagation systems and their potential application. *Scientia Horticulturae*, 116(3): 227-239.
- Kedik, S.A., Fedorov, S.V., Yanul, N.A., Prokhorova, L.V., Smirnova, E.V. and Panov, A.V., 2003. Chromatographic determination of Stevioside in raw plant material. *Pharmaceutical Chem. J.*, 37(10): 19-22.
- Kennelly, E.J. 2002. Sweet and non-sweet constituents of *Stevia rebaudiana* (Bertoni). In: *Stevia, the genus Stevia. Journal of Medicinal and Aromatic Plants- Industrial Profiles*, 19(2):68-85.
- Madan, S., Ahmad, S., Singh, G.N., Kohli, K., Kumar, Y., Singh, R. and Garg, M., 2010. *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni-a review. *Indian Journal of Natural Products and Resources*, 1: 267-287.
- Mahmoud, E. K. (2009). Effects of Different Organic and Inorganic Fertilizers on Cucumber Yield and Some Soil Properties *World Journal of Agricultural Sciences*.5(4):408-414.
- Mondaca, L., A. Galve, L. Bravo and K. Hen. 2012 .*Stevia rebaudiana* Bertoni source of a highpotency natural Sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. *Food chemistry*, 132: 1121-1132.
- Patil, N.M. 2010. Biofertilizer effect on growth, protein and carbohydrate content in *stevia rebaudianavarbertoni*. *Recent Research in Science and Technology*, 2(10): 42-44
- Rai, M.K., 2001. Current advances in mycorrhizal in micropropagation. *In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 37(2): 158-167.
- Raiesi Ardali, F., Alipour, M., shariati, M.A., Taheri, S and Amiri, S. 2014. Replacing sugar by Rebaudioside A in orange drink and produce a new drink. *Indian Journal of Research in Pharmacy and Biotechnology*. 2(2): 1131-1135.
- Raina, R., S.K. Bhandari, R. Chand and Y. Sharma. 2013. Strategies to improve poor seed germination in *Stevia rebaudiana*, a low calorie sweetener. *J. Med. Plants Res.* 7(24): 1793-1799.

- Rathore, S., Singh, N. and Singh, S.K., 2014. Influence of NaCl on Biochemical Parameters of Two Cultivars of *Stevia rebaudiana* Regenerated in vitro, *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*, 10(2), 287-296.
- Russo, A., Vettori, L., Felici, C., Fiaschi, G., Morini, S. and Toffanin, A., 2008. Enhanced micropropagation response and biocontrol effect of *Azospirillum brasilense* on *Prunus cerasifera* plants. *Journal of Biochemistry*, 134(3-4): 312-319.
- Ryan J, Harik SN, Shwayri I. A short-term greenhouse evaluation of non-conventional organic wastes. *Amer. Univ. of Beirut Lebanon Agric. Wastes*. 1985;12(4):241-249.
- Saniah, K. and Sharifah. M. 2012. The application of *Stevia* as sugar substitute using response surface methodology. *Journal of Trop. Agriculture and Food. Science*. 40(1): 23– 34.
- Sivaram, L. and U. Mukundan. 2003. In vitro Culture study on *stevia rebaudiana*. *In Vitro Cellular and Development Biology of plant*, 39: 520-523.
- Soejarto, D.D., A.D. Kinghorn and N.R. Fransworth. 1982. Potential sweetening agents of plant origin. *J. Nat. Prod.*, 45: 590-599.
- Starratt AN, Kirby CW, Pocs R and Brandle JE. Rebaudioside F, a diterpene glycoside from *Stevia rebaudiana*. *Phytochem*. 2002; 59: 367 - 70.
- Tavarini, S. & Angelini, L. G. (2013). *Stevia rebaudiana* Bertoni as a source of bioactive compounds: the effect of harvest time, experimental site and crop age on steviol glycoside content and antioxidant properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(9), 2121-2129.
- Taware, A.S., Mukadam, D.S., Chavan, A.M. and Tawar, S.D. 2010. Comparative studies of in vitro and in vivo grown plants and callus of *Stevia rebaudiana* (Bertoni). *International Journal Integrative Biology*, 9(1), 10-15.
- Uddin, M.S., M.S.H. Chowdhury, M.M.M.H. Khan, M.B. Uddin, R. Ahmed and M.A. Baten, 2006. In vitro propagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni in Bangladesh. *African J. Biotech.*, 5(13): 1238-1240.

- Upadhyay, S., Sharma, S., Kumar, R. 2013. In vitro Morphological, Biochemical and Microbial Studies on Elite Clones of *Stevia rebaudiana* for Enhanced Production of Stevioside. *International Journal of Traditional and Herbal Medicine*. Vol., 1 (1), 6-12
- Woelwer-Rieck, U., Lankes, C., Wawrzun, A. and Wüst, M., 2010. Improved HPLC method for the evaluation of the major steviol glycosides in leaves of *Stevia rebaudiana*. *European Food Research and Technology*, 231(4): 581-588.
- Yadav, S. K. & Guleria, P. (2012). Steviol glycosides from *Stevia*: biosynthesis pathway review and their application in foods and medicine. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52(11), 988-998.
- Yasukawa, K., S. Kitanaka and S. Seo. 2002. Inhibitory effect of stevioside on tumor promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in two-stage carcinogenesis in mouse skin. *Biol. Pharm. Bull.*, 25: 1488-1490.
- Yousefi Asli, M., Goli, S., and Kadivar, M. 2012. . Optimizing the production of low-calorie jam "quince" Using artificial sweetener stevia. *Journal of Food Science Researches*, 22(2): 155-164.
-

ضمائم

Abstract

Stevia is a herbal medicinal product of the Asteraceae family of Brazil and Paraguay and one of the 154 members of the genus *Stevia*, which produces Steviol sugar from the Department Sugar Group. The compounds extracted from stevia extract from stevia can be up to 300 times sweeter than sugared sugar beet sugar. This ultra sweet, natural, calorie-free, heat-resistant, antioxidant property has been used extensively in various pharmaceutical, food, cosmetics industries. So different countries have taken industrial production of this plant and extracted this valuable compound. The present study was carried out to investigate the effect of growth media and fertilizers (chemical and biological) on growth characteristics (leaf area, plant length, fresh weight and dry weight) and biochemical composition (including photosynthetic pigmentation a, b and carotenoids, total protein, soluble sugars, Total phenol and ribodiosides) in a completely randomized design with three replications. In order to achieve the best culture and nutrient culture, it seems that the comparison of culture substrates containing organic substrates with different compositions together with substrates with soil with different compositions and different nutrient treatments with chemical and organic fertilizers can provide better conditions. Plant growth and, ultimately, more productive crops. The present study, confirming the results of past research on the effect of the morphological and biochemical characteristics of the stevia plant from the culture medium, is highly effective in improving the growth and biochemical properties of the plant and the type of nutrient added to the substrate, and according to the purpose Plant cultivation should be selected in a suitable environment. Carotenoids are also affected by the culture medium. The substrate consisting of 40% vearmicompost + 60% perlite, without the need for more nutrients, provides the best conditions for photosynthetic pigments and in fact photosynthesis, which highlights the high bioavailability of the plants grown in these environments. In the case of total protein, there are also significant changes in the various environments that depend on the type of substrate and the type of food treatment.

Key words: Stevia, Organic culture media, Stevic acids, Deuterine glycosides, Ribadioside

MINISTRY OF JAHAD – E- AGRICULTURE
RESEARCH , EDUCATION AND EXTENSION ORGANIZATION
INSTITUTE OF TECHNICAL AND VOCATIONAL HIGHER CENTER
IMAM KHOMAINI HIGHER EDUCATION CENTER

PROJECT TITLE:

PROJECT NO:

RESEARCH TITLE: Effect of culture media on growth and biochemical properties of Stevia plant in order to increase its production and its products, especially stevia sugars

RESEARCH NO: 2-01-01-89019

PROJECT/ RESEARCH LEADER:

RESEARCHER : Robabeh Asgari

COWORKERS-Mehrdad Teymouri

ADVISERS:

LOCATION: KARADJ

START DATE: 1-04-2014

DURATION: 18 MONTHS

PUBLISHER:IMAM KHOMAINI HIGHER EDUCATION CENTER

TIRAGE: Limited

DATE OF ISSUE: Winter 2016

MINISTRY OF JAHAD-E-AGRICULTURE
RESEARCH , EDUCATION AND EXTENSION ORGANIZATION
IMAM KHOMAINI HIGHER EDUCATION CENTER

Effect of culture media on growth and biochemical properties of
Stevia plant in order to increase its production and its products,
especially stevia sugars

PROJECT/RESEARCH LEADER/RESEARCHER
Robabeh Asgari