مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم البيولوجية المجلد (32) العدد (4) 2010
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Biological Sciences Series Vol. (32) No. (4) 2010

إكثار نبات الستيفيا *Stevia rebaudiana*
بوساطة زراعة الأنسجة النباتية

الدكتور وسيم محسن *
خزامة القنطار**
الدكتور سليم زيد ***
الدكتور أحمد عبد القادر****

(تاريخ الإيداع 26 / 10 / 2009. قبل للنشر في 22 / 6 / 2010)

□ ملخّص □

أوضحت التجارب أن المعاملة رقم 5 المحتوية على: MS+ 4.44µM BA+ 1.07 µM NAA، أعطت أفضل النتائج من حيث متوسط عدد النموات الخضرية الجديدة المتشكلة/ خزعة (4.9 نمو) ومتوسط عدد الأوراق/نمو (20.5 ورقة) مقارنة بباقي المعاملات، بينما كانت المعاملة رقم 8 المحتوية على:
MS+ 4.64 µM Kin+ 1.07 µM NAA+ 0.58 µM GA_3 ، الأفضل لجهة متوسط طول النموات الخضرية (3.5 سم) . نقلت النموات الحديثة بطول 3-2 سم إلى أوساط تجذير مختلفة شملت:
(MS, $^{1/2}$MS, MS+2.46 or 4.92 µM IBA)، حيث أظهرت النتائج أن نسبة التجذير الأعلى كانت 100 % وعدد الجذور المتشكلة 15.7 جذر/نبات في الوسط المحتوي على 4.92 µM IBA. نقلت النباتات المجذرة إلى أوعية تحتوي خليط بنسبة 1/2 من تورب/ برليت من أجل عملية الأقلمة التي تمت تدريجيا خلال مدة 2–4 أسابيع وبلغت نسبة نجاح التقسية 89.4%.

الكلمات المفتاحية: الإكثار الخضري، زراعة الأنسجة النباتية، الستيفيا

الإختصارات Abbreviations:

MS = وسط موراشيج وسكوج (1962)، IBA = اندول–3–حمض الزبدة، BA= بنزيل أدنين،
GA3 = حمض الجبريلين، NAA = نفتالين حمض الخل، Kinetin= الكينيتين.

* الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية– قسم التقانات الحيوية– دوما– دمشق سورية
**الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية– قسم التقانات الحيوية– دوما– دمشق سورية
*** قسم علم الحياة النباتية كلية العلوم– جامعة دمشق– دمشق– سورية.
**** الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية– قسم التقانات الحيوية– دوما– دمشق سورية

مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم البيولوجية المجلد (32) العدد (4) 2010
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Biological Sciences Series Vol. (32) No. (4) 2010

Micro propagation of Stevia (*Stevia rebaudiana*) by plant tissue culture techniques

Dr. Waseem Mohsen*
khuzama AL-kountar**
Dr. Saleem Zaid ***
Dr. Ahmed Abdul Kader****

(Received 26 / 10 / 2009. Accepted 22 / 6 /2010)

□ ABSTRACT □

The results have shown that MS medium containing: 4.44 µM BA + 1.07 µM NAA had the best effect on number of new shoots formed with average of 4.9 per explant, while medium containing: MS+ 4.64 µM Kin. + 1.07 µM NAA and 0.58 µM GA_3 had the best effect on average shoots length (3.5 cm). 2-3 cm length proliferating shoots were transferred into different rooting media (MS, $^{1/2}$MS, with 2.46 µM or 4.92 µM IBA) with a maximum efficiency of 100% rooting with average of 15.7 roots per rooted plantlet obtained in case of MS medium with 4.92 µM IBA. Rooted plantlets were transplanted into pots with a mixture of 2:1 (v/v) peat/perlite for acclimatization gradually to field conditions within 2-4 weeks. Acclimatization percentage was 89.4%.

Key word: Micro propagation**,** *in vitro,* Stevia
Abbreviations:
MS: Murashige and Skoog (1962); GA_3: Gibberellic acid NAA: naphthalene acetic acid; IBA: indole-3-butyric acid; BA: benzyl adenine; Kin.: Kinetin

***GCSAR, Biotechnology Department, Damascus , Douma, Syria.**
****GCSAR, Biotechnology Department, Damascus , Douma, Syria.**
***** Department of Biology, Faculty of Sciences, Damascus University, Damascus , Syria.**
******GCSAR, Biotechnology Department, Damascus , Douma, Syria.**

مقدمة:

عرف الإنسان النباتات الطبية منذ الحضارات القديمة وأدرك أهميتها في علاج بعض الأمراض التي تصيبه. في عام 1887، اكتشفت الستيفيا لأول مرة من قبل Antonio Birtony في مناطق البراغوي وعرف وقتها بالنبات الحلو (Soeharto *et al*. 1983). بقي هذا النبات لغزا" محيرا" حتى عام 1931 حيث قام عالمان كيميائيان فرنسيان هما Bridel- Lavieille بالحصول على مركب بلوري أبيض نقي من هذا النبات سموه Stevioside ووجدوا أن هذا المركب أحلى من سكر الطعام بـ 300 مرة (Ishima *et al* 1976 وTanaka 1982) بدون أن يكون له تأثير سلبي على تركيز السكر في الدم وهو بالتالي هام لعلاج مرضى السكري. وفيما بعد، حدد أن 2–3 ورقة منه كافية لتحلية كوب من الشاي أو القهوة وبعد هذا الاكتشاف بدأ تصنيف الستيفيا ضمن قائمة النباتات المعدة للتصدير. لذا يعرف نبات الستيفيا بالنبات ذو الأوراق الحلوة حيث يستخرج منها بعض الغليكوسيدات (Steviosid) المسؤولة عن الطعم الحلو في الأوراق. وتعد التجربة اليابانية من التجارب الجديرة بالاهتمام حيث أن هذا النبات لم يكن موجوداً فيها قبل عام 1954 حين أعلنت الحكومة اليابانية البدء بزراعته وبمساحات شاسعة بهدف الاستخدام الصناعي له، وبحلول عام 1987 حصدت اليابان حوالي 1700 طن من أوراق الستيفيا واستخلصوا منها حوالي 190 طن من Stevioside (Sumida 1980). أدخل مصنعو الأغذية في اليابان بعد هذا الاكتشاف هذا المركب في عدة مجالات أهمها: تصنيع المربيات– اللبن– الآيس كريم– الشاي– معاجين الأسنان– أغذية الحميات– الأطعمة المالحة– الأغذية ذات الطعم اللاذع واستخدموه أيضاً كحبوب للتحلية وغيرها.

Stevia شجيرة صغيرة من العائلة *Asteraceae* ويضم الجنس *Stevia* حوالي 150 نوع أهمها *Stevia rebaudiana* وهو نبات معمر، موطنهالأصلي أمريكا الجنوبية والوسطى، وتزرع الستيفيا اليوم بعدة مناطق من العالم (شرق آسيا– الصين– كوريا– تايوان– ماليزيا– اليابان– أجزاء من جنوب أمريكا). يتطلب هذا النبات حرارة بين 15–38 درجة مئوية ورطوبة نسبية جيدة. وفي عام 2003، تمكن Latha and Usha بإكثار الستيفيا من أجزاء الساق و العقد الخضرية، وفي عام 2006 أيضاً، تمكن Sreedhar *et al.* من إكثار الستيفيا باستخدام أجزاء مأخوذة من الأوراق(0.5–1 سم) على وسط MS يحتوي BA 8.88 μM و4.65-,6.98 μM Kenitin كما وضع Ibrahim *et al.* في عام 2008 بروتوكول لإكثار الستيفيا بهدف إدخاله إلى مصر كنبات محلي. درست طرائق إكثار الستيفيا بواسطة زراعة الأنسجة النباتية من قبل العديد من الباحثين يذكر منهم:

Tamura *et al.* (1984),Ukiyoshi *et al.* (1984), Ferrerira and Handro (1988), Swanson *et al.* (1992), Patil and Reddy (1996), Morini, *et al.* (2003), Sivaram and Mukundan(2003) Kuntal *et al.* (2005), Mitra and Pal (2007).

أهمية البحث وأهدافه:

تعد نسبة الإنبات عند بذور الستيفيا ضعيفة جدا (Toffler and Orio1981) ومعدل الإكثار الخضري ممكن إلا أن عدد النموات الناتجة من نبات واحد قليلة ونظراً لهذه الصعوبات في إكثاره، تبدو طريقة الإكثار بزراعة الأنسجة النباتية الأفضل لأنها تضمن توفير أعداد كبيرة من النباتات و بمواصفات جيدة في زمن قصير.

ويهدف هذا البحث إلى دراسة تأثير منظمات النمو النباتية في إكثار وتجذير نبات الستيفيا باستخدام تقانة زراعة الأنسجة النباتية.

طرائق البحث ومواده:

1. المادة النباتية Plant material:

مصدر المادة النباتية الأولية من هذا النبات هو جمهورية مصر العربية على شكل عقلة نباتية مجذرة، حيث تمت زراعتها وتقديم كافة العمليات الزراعية الضرورية لضمان نموها وبقائها في البيت الزجاجي.

نفذ البحث في قسم التقانات الحيوية بالهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية بدمشق.

2. طرائق البحث:

1.2 الزراعة الأولية Initial culture:

الأجزاء النباتية المستخدمة: استخدمت لهذه التجربة أجزاء نباتية مختلفة أخذت من نبات الستيفيا النامي تحت الظروف البيئية في البيت الزجاجي وهذه الأجزاء هي:

- القمم النامية والتي أخذت من التفرعات الجانبية للنبات و كان معدل طولها 2-1 سم
- العقد النباتية والتي أخذت أيضاً من التفرعات الجانبية للنبات حيث احتوت كل عقدة على برعم وكان معدل طولها 1 سم

جمعت الأجزاء النباتية ووضعت في أوعيةٍ زجاجيةٍ ثم غسلت تحت الماء الجاري لمدة ساعة قبل إخضاعها للتعقيم السطحي، عقمت بعد ذلك بالكحول 70% لمدة دقيقة واحدة تلا ذلك التعقيم بواسطة محلول الكلوروكس التجاري (هيبوكلوريت الصوديوم NaOCl تجاري تركيز المادة الفعالة فيه 5.25%) بتركيز20% ولمدة 15 دقيقة. وقد أضيف محلول Tween 20 وبمعدل قطرة واحدة لكل 100 مل من محلول التعقيم من أجل خفض التوتر السطحي وزيادة تماس الأجزاء النباتية مع مادة التعقيم، وجرت عمليات التعقيم ضمن جهاز العزل، وبعد التعقيم غسلت ثلاث مرات بالماء المقطر المعقم. زرعت الأجزاء النباتية المعقمة بطول 0.5 – 1 سم في أنابيب الاختبار على وسط MS يتضمن: 0.56 µM ميواينوزيتول،µM 40.62 حمض النيكوتين، µM 2.43 بيرودكسين هيدروكلوريد µM، 1.19 ثيامين هيدرو كلوريد، إضافة إلى 30 غ/ل سكر، 7 غ/ل آجار ودون إضافة منظمات النمو وذلك لمدة أسبوعين حيث استبعدت خلالهما الأنابيب الملوثة، وبعد ذلك نقلت الأجزاء النباتية الحية السليمة إلى أوعية تحوي الوسط السابق ولمدة 3–4 أسبوع، حيث اعتبرت هذه الأجزاء السليمة الأساس للتجارب اللاحقة.

2.2 إكثار النموات الخضرية Multiplication stage:

بعد 4 أسابيع من الزراعة الأولية أخذت التفرعات الخضرية المتشكلة وقسمت إلى أجزاء يحمل كل جزء منها 2 عقدة نباتية وزرعت على عدة معاملات (أوساط غذائية) موضحة بالجدول رقم(1). تمت الزراعة بأوعية زجاجية (11.5× 4.5) سم وبمعدل 30 مكرر/معاملة (نبات واحد لكل وعاء) حيث أضيف للوعاء 30 مل من الوسط المغذي. حضنت الزراعات في غرفة نمو growth room بدرجة حرارة 23 ±1ْم و فترة إضاءة 16 ساعة و8 ساعات ظلام أثناء النمو (شدة إضاءة حوالي 2000–3000 لوكس). أخذت النتائج في الأسبوع الثالث من الزراعة ودرست المعايير التالية:

- دراسة تأثير التوافق Kin + NAA و BA + NAA على إكثار الستيفيا
- دراسة تأثير وجود الجبرلين مع التوافقات السابقة في إكثار الستيفيا

جدول(1): التراكيب المختلفة من منظمات النمو المستخدمة في إكثار النموات الخضرية للستيفيا

المعاملة \ منظم النمو (µM)	BA	GA_3	Kin	NAA
1	0	0	0	0
2	0	0	2.32	1.07
3	0	0	4.64	1.07
4	2.22	0	0	1.07
5	4.44	0	0	1.07
6	0	0.58	0	0
7	0	0.58	2.32	1.07
8	0	0.58	4.64	1.07
9	2.22	0.58	0	1.07
10	4.44	0.58	0	1.07

3.2 تجذير النموات الخضرية Rooting stage: زرعت النموات الخضرية المأخوذة من الأمهات المخبرية و المتشكلة في مرحلة الإكثار السابقة وبطول 2−3 سم على عدة معاملات (أوساط غذائية) موضحة بالجدول رقم (2). نفذت عملية الزراعة بأوعية زجاجية (11.5× 4.5) سم وبمعدل 20 مكرر/معاملة (نبات واحد لكل وعاء) أضيف للوعاء 30 مل من الوسط المغذي. حضنت الزراعات في غرفة النمو وأخذت النتائج في الأسبوع الرابع من النقل إلى وسط التجذير ودرست المعايير التالية:

- دراسة تأثير التراكيز المختلفة من IBA على التجذير
- دراسة تأثير خفض تركيز الأملاح الكبرى في الوسط على التجذير

جدول(2): الأوساط الغذائية المستخدمة في تجذير النموات الخضرية للستيفيا

المعاملة	تركيب الوسط
R_1	MS0
R_2	$^{1/2}$ MS
R_3	MS + 2.46 µM IBA
R_4	MS + 4.92 µM IBA

4.2. تقسية النباتات الناتجة عن الزراعة المخبرية: نقلت النباتات التي اجتازت مرحلة التجذير بنجاح إلى أوعية تحتوي خليط مؤلف من 1/2 حجم/حجم من تورب/ برليت من أجل عملية الأقلمة حيث حضنت في ظروف غرف النمو وذلك لمدة أربع أسابيع مع فتح تدريجي للأكياس حتى إزالتها تماماً. حسبت بنهاية عملية التقسية نسبة النباتات المتبقية بحالة جيدة، ثم نقلت هذه النباتات لمتابعة النمو في ظروف البيت الزجاجي.

التحليل الإحصائي: حللت المعطيات والقراءات لجميع التجارب بواسطة الحاسوب باستخدام البرنامج الاحصائي GenStat. وقورن بين المتوسطات باختبار أقل فرق معنوي $LSD_{0.05}$ وذلك حسب Steel و Torrie (1988). وبشكل عام أُخِذ 30 مكرراً لكل معاملة إكثار و20 مكرراً لكل معاملة تجذير وكررت التجارب ثلاث مرات وبنفس الشروط.

النتائج والمناقشة:

1. تكاثر النموات الخضرية في الستيفيا:

يتبين من خلال النتائج المتحصل عليها أن المعاملة رقم 5 (4.44 µM BA + 1.07 µM NAA) أعطت أفضل النتائج من حيث تأثيرها في متوسط عدد النموات الجديدة المتشكلة/ خزعة/3 أسابيع (4.9) ومتوسط عدد الأوراق/كافة النموات (20.5) مقارنة بباقي المعاملات. بينما كانت المعاملة رقم 8 : ($4.64.\ \mu M\ Kin + 1.07\ \mu M\ NAA + 0.58\ \mu M\ GA_3$) الأفضل من حيث تأثيرها في متوسط طول النموات المتشكلة (3.55 سم) (الشكل2 و جدول 3).

يوضح الجدول رقم (3) نتائج تأثير العوامل المدروسة في إكثار الستيفيا مخبريا

جدول(3): تأثير المعاملات المختلفة للوسط في إكثار الستيفيا بعد ثلاثة أسابيع من الزراعة

المعاملة	متوسط عدد االنموات الجديدة المتشكلة/ الخزعة	متوسط طول النموات المتشكلة (سم)	متوسط عدد الأوراق/كافة النموات
1	1.500 d ± 0.106	2.524 c ± 0.146	8.68 e ± 0.528
2	1.765 d ± 0.174	3.153 ab ± 0.261	10.71 cde ± 0.943
3	2.353 cd ± 0.256	2.847 bc ± 0.219	12.29 cd ± 1.354
4	3.912 b ± 0.449	2.732 bc ± 0.152	17.56 ab ± 1.648
5	4.912 a ± 0.435	2.597 bc ± 0.146	20.50 a ± 1.582
6	1.941 cd ± 0.163	3.071 abc ± 0.208	8.88d e ± 0.569
7	2.235 cd ± 0.235	2.968 bc ± 0.221	11.59 cde ± 1.136
8	2.765 c ± 0.274	3.553 a ± 0.267	14.12 bc ± 1.408
9	4.765 ab ± 0.394	2.862 bc ± 0.171	18.26 a ± 1.323
10	4.029 b ± 0.399	2.550 c ± 0.170	17.68 a ± 1.402
L.S.D 5%	0.8667	0.559	4.569

ملاحظة:

- تشير الأحرف المختلفة التي تلي المتوسطات إلى وجود فروق معنوية على مستوى 0.05%.
- تمثل المعطيات متوسط 30 مكرر ± الخطأ المعياري
- الخزعة هي الجزء النباتي المزروع *in vitro*.

وجد أن استخدام BA قد أعطى نتائج أفضل من الكينيتين و بفروق معنوية على المستوى 5% ولكافة المعاملات المدروسة من حيث متوسط عدد النموات الجديدة المتشكلة و متوسط عدد الأوراق وهذا يتطابق مع ما أشار إليه Tamura *et al.* 1984 و Patil and Reddy 1996 و Mitra and Pal 2007 ، بينما أعطى الكينيتين نتائج أفضل من البنزيل أدنين من حيث متوسط طول النموات المتشكلة. ويتبين من الجدول السابق أن المعاملات رقم 4,5,9,10 المحتوية على هرمون BA أعطت نتائج أفضل من المعاملات 2,3,7,8 المحتوية الكينيتين من حيث عدد النموات وعدد الأوراق، وبشكل عام كان التوافق: BA+NAA أفضل من التوافق: Kin + NAA.

لم تؤد إضافة حمض الجبرليك لوسط الزراعة إلى حدوث تأثيرات هامة في أي من المعايير المدروسة حيث كانت الفروق الملاحظة غير معنوية بالرغم من أن التوافقات التي أضيف إليها الجبرلين أظهرت نتائج أفضل من تلك التوافقات الخالية منه ولكلا التوافقين المدروسين BA+NAA و Kin + NAA.

وقد لوحظ بعد الأسبوع الثالث من الزراعة بغرض الإكثار تماوت الأجزاء السفلية من النبات لذلك ينصح إجراء subculture كل 21 يوم من بدء الزراعة ولهذا السبب اخذت نتائج الإكثار بعد 3 أسابيع.

تطابقت نتائج البحث الحالي مع ما توصل إليه Latha and Usha 2003 حيث حدد أن التوافق NAA+BA أعطى حوالي 3−4 نموات جديدة على الجزء النباتي المزروع *in vitro*.

وعموماً، يعد وجود السيتوكينين في الوسط الغذائي ذا أهمية قصوى من أجل تشكل النموات الخضرية الجديدة والتغلب على السيادة القمية وتحريض نمو النموات الخضرية الجديدة والتثبيط الكلي أو الجزئي لتشكل الجذور (Nordstorm and Eliasson, 1986). وإن وجود الأوكسين ضروري لتعزيز دور السيتوكينين في التشكل العضوي وتحسين نوعية النموات المورقة، فقد أوضح (Skoog & Miller, 1957) بأن التشكل يتم تحت سيطرة العلاقة ما بين الأوكسين والسيتوكينين.

الشكل(2): إكثار الستيفيا مخبريا

2. تجذير الستيفيا:

يتبين من خلال النتائج المتحصل عليها أن نسبة التجذير القصوى (100%) قد تم الحصول عليها على وسط يحوي IBA بينما كانت نسبة التجذير 90% في الوسط الشاهد الخالي IBA وهذا يتطابق مع ما توصل إليه Ibrahim *et al.* 2008 حيث كانت نسبة التجذير على وسط MS خالي الهرمون 92.3% ومع نتائج Latha and Usha 2003 حيث كانت نسبة التجذير 100% في الوسط المحتوي IBA، كما ونجح Ferreira and Handro 1988 بالحصول على نسبة تجذير عالية باستخدام IBA وهذا يتطابق مع نتائج البحث الحالي.

كان لإضافة IBA بتركيز 4.92 µM دور في زيادة نسبة التجذير من جهة وعدد الجذور من جهة أخرى، وبالنسبة لمتوسط عدد الجذور، كان هناك فرق معنوي لكل المعاملات التي أضيف لها IBA (10.15 و 15.7) مقارنة بالشاهد، بينما المعاملات الخالية كان متوسط عدد الجذور (5.05 و 4.45)، وكذلك بالنسبة لمتوسط طول النبات الذي بلغ (7.895 و 8.27) على الأوساط الحاوية IBA مقارنة بـ (4.955 و 4.82) على الأوساط الشاهد وبفروق معنوية على المستوى 5% (جدول 4، شكل 4). أما متوسط طول الجذر الرئيسي فلم يكن هناك فروق معنوية بين الأوساط المضاف لها IBA مقارنة بالوسط الشاهد MS، بينما كان الفرق معنوي مع الوسط 1/2 MS بالرغم من أن التراكيز المرتفعة (المعاملةR4) خفضت طول الجذور مقارنة بالمعاملات R1, R2, R3. يوضح الجدول رقم (4) نتائج تأثير العوامل المدروسة في تجذير الستيفيا.

جدول(4): تأثير المعاملات المختلفة للوسط على تجذير الستيفيا مخبرياً

المعاملة	تركيب الوسط المغذي	نسبة التجذير (%)	متوسط عدد الجذور (جذر/نبات)	متوسط طول الجذر الرئيسي (سم)	متوسط طول النبات (سم)
R_1	MS	90	5.05 c ± 0.49	2.025 b ± 0.24	4.95 cb± 0.29
R_2	$^{1/2}$ MS	90	4.45 c ± 0.43	2.465 a ± 0.13	4.82 cb ± 0.46
R_3	MS + 2.46 µM IBA	100	10.15 b ±0.97	b1.74 c ± 0.169	7.89 b± 0.66
R_4	MS + 4.92 µM IBA	100	15.7 a ± 1.19	1.495 d ± 0.08	8.73 a ± 0.61
L.S.D 5%			3.350	0.503	1.470

ملاحظات:

-تشير الأحرف المختلفة التي تلي المتوسطات إلى وجود فروق معنوية على مستوى 0.05%.

-تمثل المعطيات متوسط 20 مكرر ± الخطأ المعياري

يلاحظ من الجدول أن خفض تركيز الأملاح المعدنية الكبرى إلى النصف (1/2 MS) لم يؤثر في نسبة التجذير ومتوسط عدد الجذور وطولها حيث كانت الفروق الملاحظة غير معنوية.

الشكل(4): تجذير الستيفيا *in vitro* في الأوساط الحاوية هرمون IBA

3. التقسية Acclimatization:

نقلت النباتات المجذرة إلى أصص تحوي خليط من التورب والبرليت بنسبة 2:1 (حجم/حجم) وحضنت بغرف النمو وغطيت بأكياس بلاستيكية شفافة للمحافظة على الرطوبة العالية، وأجريت عملية التقسية بالفتح التدريجي للأكياس حتى إزالتها تماماً خلال 4 أسابيع (الشكل 5 و6 و7). نقلت بعدها النباتات إلى البيت الزجاجي حيث أمضت حوالي 2 شهرين قبل نقلها إلى الأرض الدائمة وسمدت أسبوعياً بمحلول $^{1/10}$ MS. وكانت نسبة الأقلمة مرتفعة وصلت إلى 89.4%. غرست النباتات في الحقل تحت الشروط الطبيعية وبلغ طولها حوالي 60 سم في نهاية فصل النمو. كما اجتازت فصل الشتاء وابتدأت النمو في بداية الربيع التالي وهي سليمة من الأمراض وخالية من الانحرافات المورفولوجية الظاهرية وجيدة النمو. وتعد نسبة نجاح عملية التقسية في البحث الحالي جيدة بالمقارنة مع ما توصل إليه Sreedhar *et al.* 2006 حيث كانت نسبة النباتات المتبقية 94%، أما Latha and Usha 2003 فقد كانت نسبة نجاح التقسية 75% وحصل على 27000 نبات مقسى خلال ستة أشهر.

الشكل(5) نبات الستيفيا أثناء الأقلمة

الشكل(6) نبات الستيفيا في البيت الزجاجي

الشكل(7) بذور نبات الستيفيا الناتجة من نباتات مزروعة في الحقل

الاستنتاجات والتوصيات:

تم الإكثار الخضري الدقيق لنبات الستيفيا *Stevia rebaudiana bertoni* بطرائق زراعة الأنسجة النباتية *in vitro* بهدف الحصول على أعداد كبيرة من هذا النبات ذات مواصفات جيدة وخالية من الأمراض وبوقت قصير.ولهذا يمكن تحديد التوصيات التالية:

- اعتماد طريقة الإكثار بواسطة زراعة الأنسجة النباتية *in vitro* كتقنية أساسية في إكثار نبات الستيفيا
- زراعة هذا النبات في مراكز الأبحاث أو المراكز الزراعية الحكومية وبمساحات محدودة كمرحلة أولى كونه نبات جديد في سورية يتم خلالها دراسة الظروف البيئية الملائمة لزراعته.
- استثماره كمحصول صناعي استراتيجي بهدف إنتاج مادة فعالة على المستوى التجاري.
- إنشاء حقول أمهات كمصدر للعقل و محاولة إكثاره بالعقل حقلياً.

المراجع:

1. FERREIRA. C.M., HANDRO. W. *Micropropagation of Stevia rebaudiana through leaf explants from adult plants.* Planta Med., 54, 1988 , 157-160
2. IBRAHIM, I. A., NASR, M.I., MOHANNED, B.R., El-ZEFZAFI, M.M. *Nutrient Factors Affecting In Vitro Cultivation of Stevia rebaudiana*. Sugar Tech. 10,3, 2008,248-253
3. ISHIMA, N., KATAYAMA, O. SENSORY. *Evaluation of Stevioside as a Sweetener*. Rep. Natl. Food Resp. Inst., 31, 1976,80- 85.

4. KUNTAL Das, RAMAN DANG, SALMA KHANAM, SHIVANANDA, B. G., RAJASEKHARAN, P. E. *In vitro Methods for Production of Stevioside from Stevia*. Indian Journal of Natural Products, Vol. 21 No. 1, 2005 , 14-15.
5. LATHA, S., USHA, M. *In vitro Studies on Stevia rebaudiana*. *In Vitro Cell*. Dev. Biol. Plant 39, 2003 , 520-523.
6. MITRA. A., PAL. A. *In Vitro regeneration of Stevia rebaudiana from Nodal Explants*. Plant Biochem. Biotechnol. 16, 2007 , 59-62
7. MORINI, S., FIASCHI, G., ANDOLFI, L., MACCHIA, M. *In vitro Propagation of Stevia rebaudiana Bertoni: Results with Different Genotypes*. Agricoltura Mediterranea, Vol. 133, No. 2, 2003 , 117-123
8. MURASHIGE, T., SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant, 15, 1962 , 473-497
9. NORDSTORM, A.C., ELIASSON, L. *Uptake and translocation of C^{14}-labeled benzylaminopurine in apple shoots grown in vitro in relation to shoot development*. Physiol Plantarium 68 ,3, 1986 , 431-435.
10. PATIL. V., REDDY. P.C. *In Vitro Multiplication of Stevia rebaudiana*. Curr. Sci. 70, 1996 , 960
11. SIVARAM. L., MUKUNDAN. U. *In Vitro Culture Studies on Stevia rebaudiana*. *In Vitro* Cell. Dev. Biol. Plant 39, 2003 ,520-523
12. SKOOG, F., MILLER, C.O. *Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro Symp*. Soc. Expt. Biol., II ,9, 1957 , 118-140.
13. SOEHARTO, D.D., COMPADRE, C. M., MEDON. P. J., KAMATH. S.K., KINGHORN. A.D, *Potential Sweetening Agents of Plant Origin*. II. Field search for sweet-tasting *Stevia* species. Econ Bot 37, 1983 ,71-79
14. SREEDHAR, R.V., VENKATACHALAM, L., THIMMARAJU, R., BHAGYALAKSHMI, N., NARAYAN, M.S., RAVISHANKAR, G.A. *Direct Organogenesis from Leaf Explants of Stevia rebaudiana and Cultivation in Bioreactor*. Biologia Plantarium 52 ,2, 2006 , 355-360
15. STEEL. G. D., TORRIE. J.H. *Principles and Procedures of Statistics*, Mc Grow Hill Boot- Col. New York. 1988
16. SUMIDA, T. *Studies on Stevia rebaudiana Bertoni as a New Possible Crop for Sweetening Resource in Japan*. Journal of the Central Agricultural Station. 31, 1980 , 67-71
17. SWANSON SM, MAHADY GB, BEECHER CWW. *Stevioside Biosynthesis by Callus, Root, shoot and Rooted-shoot Cultures In Vitro*. Plant Cell Tissue and Organ Culture 28, 1992 , 151-157
18. TAMURA. Y., NAKAMURA. S., FUKUI. H., TABATA. M., *Clonal Propagation of Stevia rebaudiana Bertoni by Stem Tip Culture*. Plant Cell Rep. 3, 1984 ,183-185
19. TANAKA, O. *Steviol- Glycosides: new natural sweeteners*. Trends Anal. Chem.1, 1982, 246-248.
20. TOFFLER, F., ORIO, O. *Acceni Sulla Pinata Tropicale*. Rev. Soc. It. Sci. Aliment. 4, 1981 , 2285-230.
21. UKIYOSHI TAMURA, SHIGEHARU NAKAMURA, HIROSHI FYUKUI and MAMORU TABATA. *Clonal Propagation of Stevia rebaudiana Bertoni by Stem-tip Culture*. Plant Cell Reports, Volume 3, 1984 , 183-185.