پاسخ‌های فیتوشیمیایی و مرفوفیزیولوژیکی گیاه استویا (*Stevia rebaudiana* Bertoni) به بسترهای مختلف کشت و تلقیح قارچ مایکوریزا (*Glomus intraradices* N.C. Schenck & G.S. Sm.)

علی مهرآفرین[۱]، علیرضا اطمینان[۲]*، اردشیر قادری[۱]، محمدرضا دهقانی‌مشکانی[۱]، مرضیه گلرخان[۳]

۱- مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، پژوهشکده گیاهان دارویی، جهاد دانشگاهی، کرج، ایران
۲- استادیار، گروه بیوتکنولوژی و اصلاح نباتات، واحد کرمانشاه، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمانشاه، ایران
۳- دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد، گروه زراعت، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
*آدرس مکاتبه: کرمانشاه، میدان فردوسی، انتهای شهرک متخصصین، مجتمع دانشگاه آزاد اسلامی امام خمینی (ره)
کدپستی: ۶۷۱۸۹۹۷۵۵۱
تلفن و نمابر: ۶-۱۷۲۴۳۱۸۱ (۰۸۳)
پست الکترونیک: Alietminan55@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۶/۲/۲۶ **تاریخ تصویب:** ۹۷/۵/۲۷

چکیده

مقدمه: ترکیب بستر کشت و ریزسازواره‌های موجود در آن تأثیر بسیار مهمی در استقرار، عملکرد رشدی و فیتوشیمیایی گیاهان دارویی دارد.

هدف: تعیین تأثیر بسترهای مختلف کشت و تلقیح قارچ مایکوریزا بر تغییرات محتوای استویوزید، ریبادیوزیدها و خصوصیات مورفوفیزیولوژیکی در گیاه دارویی استویا بود.

روش بررسی: این تحقیق به صورت آزمایشی فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با ۱۰ تیمار و ۴ تکرار انجام شد. فاکتور اول شامل تیمارهای تلقیح و عدم تلقیح قارچ مایکوریزا (*Glomus intraradices*) و فاکتور دوم شامل ترکیب تیمارهای مختلف از پیت ماس، کوکوپیت، پرلیت و خاک به عنوان بسترهای کاشت بود.

نتایج: تلقیح قارچ مایکوریزا به طور معنی‌داری موجب افزایش ارتفاع بوته، تعداد ساقه فرعی، قطر ساقه، قطر ریشه، تعداد برگ، وزن تر و خشک برگ، وزن خشک ساقه، وزن خشک ریشه و میزان استویوزید، ریبادیوزید A و C شد. بسترهای مختلف کشت نیز تأثیر معنی‌داری بر ارتفاع بوته، وزن تر و خشک ساقه، وزن تر برگ، وزن تر و خشک ریشه و میزان استویوزید، ریبادیوزید A و C داشت.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد ترکیب بستر کشت پیت ماس + کوکوپیت + خاک (۲:۱:۱) همراه با تلقیح قارچ مایکوریزا بیشترین تأثیر مثبت را در میان تیمارهای اعمال شده بر وزن خشک برگ و قندهای گلوکوزیدی در گیاه استویا داشته است.

گل‌واژگان: استویوزید، پیت ماس، ریبادیوزید، کوکوپیت، گلیکوزید

مقدمه

استویا (*Stevia rebaudiana* Bertoni) گیاهی علفی چندساله متعلق به خانواده *Asteraceae* است [۱]. برگ‌های بیضوی استویا ۳۰۰–۲۰۰ بار شیرین‌تر از ساکارز است. شیرینی برگ‌های استویا به دلیل حضور مخلوط پیچیده‌ای از گلیکوزیدها است. گلیکوزیدهای عمده برگ استویا شامل استویوزید (۹/۱ درصد)، ریبادیوزید A (۳/۸ درصد)، ریبادیوزید C (۰/۶ درصد) و دولکوزید (۰/۳ درصد) است [۲]. گلیکوزیدها ترکیباتی اغلب درشت مولکول و دارای گروه‌های مختلفی هستند. این ترکیبات همگی دارای یک یا چند قند روی اسکلت مرکزی هستند. این اسکلت مرکزی یک گروه چربی‌دوست است که روی آن قند مونوساکارید قرار می‌گیرد. اسکلت اصلی گلوکوزیدهای استویا که گلوکز روی آن متصل می‌شود، مولکول استویول است که شبیه اسکلت انت–کائورن برای سنتز جیبرلین است. بنابراین ساخت اسکلت اصلی از مسیر ترپنوئیدها صورت می‌پذیرد و یک دی ترپن است. استویوزید دارای ۳ مولکول گلوکز متصل به مولکول استویول است و ریبادیوزید A با یک گلوکز بیشتر از استویوزید ساخته می‌شود. ساختار ریبادیوزید C مشابه ریبادیوزید A است با این تفاوت که یک مولکول قند رامنوز با مولکول قند گلوکز جایگزین می‌شود [۴، ۳]. استفاده اصلی این گیاه در مواد غذایی به عنوان شیرین کننده و قند رژیمی است. تاکنون گزارشی مبنی بر عوارض جانبی مصرف قند استویا گزارش نشده است. بنابراین می‌تواند جایگزین بسیار مناسبی برای تغذیه نامطلوب و مشکلات ناشی از مصرف قند بویژه برای بیماران مبتلا به دیابت و چاقی باشد [۶، ۵].

یکی از محدودیت‌های تکنیک کشت بافت برای باززایی گیاهان در سطح انبوه و تجاری، استقرار و رشد گیاهچه‌ها پس از انتقال از محیط *in vitro* به *ex vitro* می‌باشد. تحت شرایط *in vitro* گیاهچه‌ها در محیطی بسته بدون تبادلات گازی، با رطوبت بالا و شدت نور کم رشد کرده و از قندهای محیط کشت به عنوان منبع کربن و انرژی استفاده می‌کنند [۷]. بنابراین این گیاهان از نظر فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی با گیاهان رشد یافته در مزرعه تفاوت دارند به طوری که برگ‌های گیاهان ریزازدیادی شده نازک بوده و به دلیل سازمان‌دهی ضعیف کلروپلاست‌های دارای مقادیر کم کلروفیل می‌باشند. همچنین فعالیت آنزیم فتوسنتزی روبیسکو و عملکرد روزنه‌ها در برگ‌های گیاهچه‌های حاصل از *in vitro* پائین است و این عوامل منجر به کاهش کارایی فتوسنتزی در گیاهچه‌های منتقل شده به *ex vitro* می‌شود. مقاومت گیاهان باززایی شده تحت شرایط *in vitro* نسبت به پاتوژن‌های بیماری‌زا ضعیف است که به دلیل بیوسنتز ناچیز فیتوآلکسین‌ها می‌باشد. علاوه بر این گیاهان باززایی شده اغلب ارتباطات آوندی ضعیفی را نشان می‌دهند که بر جذب آب از ریشه‌ها و انتقال آن به بافت‌های اندام هوایی اثر می‌گذارد [۱۰–۸]. این گیاهچه‌ها هنگامی که به *ex vitro* منتقل می‌شوند در معرض انواع تنش‌های غیرزیستی (تغییرات دمایی، نور زیاد و رطوبت بالا و ...) و تنش‌های زیستی مانند میکروفلور خاک قرار می‌گیرند، به همین دلیل نیاز به فرآیند سازگاری برای استقرار موفق و بقای گیاهچه‌ها می‌باشد [۱۱].

تلقیح ریشه گیاهچه‌های حاصل از کشت بافت با قارچ‌های مایکوریزا نقش مفیدی در سازگاری آنها به شرایط *ex vitro* دارد [۱۲]. برخی گزارش‌ها نشان دادند که تلقیح قارچ مایکوریزا موجب بهبود جذب عناصر غذایی در گیاهچه‌های کشت بافتی موز، گواوا (*Psidium guajava* L.) و *Tapeinochilos ananassae* شد که این عامل موجب رشد بهتر و بقای گیاهچه‌ها تحت شرایط *ex vitro* شد [۱۵–۱۳]. همچنین تلقیح دو گونه قارچ مایکوریزا (*Glomus mosseae* و *Acaulospora laevis*) موجب افزایش وزن تر، وزن خشک، میزان پروتئین و کلروفیل در گیاهچه‌های کشت بافتی شیرین‌بیان در شرایط *ex vitro* شد. همچنین تلقیح قارچ *Glomus mosseae* موجب بقای ۱۰۰ درصدی گیاهچه‌های شیرین‌بیان در شرایط *ex vitro* شد [۱۳]. همچنین تلقیح گونه‌های مختلف قارچ مایکوریزا در گیاه پروانش نیز موجب افزایش بقاء گیاهچه‌ها پس از انتقال به محیط *ex vitro* شد. به طوری که تحت شرایط بدون تلقیح قارچ مایکوریزا ۴۲ درصد از گیاهچه‌ها در محیط *ex vitro* زنده مانند اما بسته به گونه قارچ مایکوریزا مورد استفاده، بقاء گیاهچه‌های پروانش بین ۶۲

تا ۹۵ درصد گزارش شد. علاوه بر این وزن خشک، میزان کلروفیل و پروتئین گیاهچه‌های تلقیح یافته با قارچ مایکوریزا نیز افزایش معنی‌داری داشت [۱۶].

از سوی دیگر بستر مناسب کشت نیز می‌تواند در فرآیند سازگاری گیاهچه‌های کشت بافتی تعیین کننده باشد. گزارش شده است که ورمی‌کولیت به عنوان بستر کشت کارایی کمی در سازگاری گیاهچه‌های سیب و *Sinningia speciosa* دارد [۱۷]. کاربرد نسبت‌های متفاوت پیت ماس، ورمی‌کولیت و پرلیت در بستر کشت گیاهچه‌های چای طی فرآیند سازگاری موجب افزایش استقرار و رشد گیاهچه‌های چای شد. بیشترین میزان بقا و رشد گیاهچه‌های چای در بستر کشت حاوی ۵۰ درصد پیت ماس، ۲۵ درصد ورمی‌کولیت و ۲۵ درصد پرلیت مشاهده شد که علت آن فراهمی بیشتر آب، اکسیژن و عناصر غذایی توسط این مخلوط برای رشد ریشه و اندام هوایی گیاهچه‌های چای گزارش شد [۱۸]. بنابراین این تحقیق با هدف بررسی تأثیر بسترهای مختلف کشت و تلقیح قارچ مایکوریزا بر خصوصیات مورفوفیزیولوژیکی و تغییرات میزان استویوزید و ریبادیوزید در گیاهان استویای حاصل از کشت بافت طی مرحله سازگاری انجام شد.

مواد و روش‌ها

این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با ۴ تکرار در گلخانه تحقیقاتی پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی در سال ۱۳۹۵ انجام شد. تیمارهای آزمایش شامل تلقیح و عدم تلقیح قارچ مایکوریزا (*Glomus intraradices*) و ۵ ترکیب مختلف از پیت‌ماس، کوکوپیت، پرلیت و خاک به عنوان بستر بود. ترکیبات و تیمارهای مختلف بستر کشت شامل پیت‌ماس، پیت ماس + کوکوپیت (۱:۱)، پیت ماس + خاک (۱:۳)، پیت ماس + کوکوپیت + خاک (۲:۱:۱) و کوکوپیت + پرلیت + خاک (۲: ۱: ۱) بود.

تهیه مایه تلقیح قارچ

مایه تلقیح شامل خاک دارای اسپور، هیف و میسلیوم قارچ مایکوریزا بود که طبق روش ارائه شده توسط موکرجی و همکاران (۲۰۰۲) تکثیر شد. بدین صورت که قارچ مایکوریزا در مجاورت ریشه گیاه ذرت در گلدان ۶ کیلوگرمی که حاوی سه قسمت ماسه و یک قسمت خاک با بافت لوم بود، تحت شرایط نور طبیعی و دمای ۲۸ و ۱۶ (روز / شب) درجه سانتی‌گراد و فوتوپریود ۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت خاموشی در گلخانه تکثیر یافت. پس از یک دوره کشت شش ماهه، اندام هوایی ذرت حذف شد و قسمت‌های زیرزمینی برای مدت دو ماه در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند [۱۹].

تهیه گیاهچه‌های کشت‌بافتی

ساقه‌های گره‌دار جوان گیاه استویا به طول ۱/۵ تا ۲ سانتی‌متر از گیاهان رشد یافته در گلخانه جمع‌آوری شدند و پس از انتقال به آزمایشگاه تحت تاثیر تیمارهای مختلف سترون‌سازی قرار گرفت. ابتدا نمونه‌ها به مدت ۳۰ ثانیه در اتانول ۷۰ درصد پیش سترون‌سازی شدند و سپس توسط آب مقطر کاملاً شستشو داده شدند. سترون‌سازی نمونه‌ها با استفاده از سدیم هیپوکلراید ۲/۵ درصد به مدت پنج دقیقه انجام شد و پس از آن ریز نمونه‌ها سه بار با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. هر ریزنمونه در مرحله پرآوری به شیشه‌های کوچک حاوی ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت MS پایه حاوی ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر هورمون اسید جیبرلیک (GA_3) منتقل شدند. پس از ۴ هفته ریز نمونه‌های دارای ساقه‌های مناسب به محیط کشت ریشه‌زایی انتقال یافتند. محیط کشت ریشه‌زایی شامل محیط کشت یک دوم MS دارای ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر هورمون ایندول بوتریک اسید و ۲ میلی‌گرم بر لیتر زغال فعال بود. pH محیط کشت در ۵/۸ تنظیم شد و ۰/۷ درصد آگار از قبل اتوکلاو شده نیز به آن اضافه شد. ریز نمونه‌ها در اتاق رشد و فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی با دمای ۱ ± ۲۵ درجه سانتی‌گراد و ۸ ساعت تاریکی با دمای ۱ ± ۱۹ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ هفته نگهداری شدند.

استقرار گیاهچه‌ها و اعمال تیمارها

گیاهچه‌های حاصل از کشت بافت بعد از استقرار تحت تأثیر پنج ترکیب مختلف بستر کاشت و تلقیح قارچ مایکوریزا به گلخانه منتقل شدند. ۳۰ عدد گلدان‌های یک شکل و هم اندازه (قطر دهانه بالا و پائین و ارتفاع گلدان‌ها به ترتیب ۲۰، ۱۵ و ۱۸ سانتی‌متر بود) در دو گروه تلقیح و عدم تلقیح قارچ مایکوریزا فراهم شدند. تیمارهای بستر کشت شامل P: پیت ماس، P+C: پیت ماس + کوکوپیت، P+C+S: پیت ماس + کوکوپیت + خاک، P+PR+S: پیت ماس + پرلیت + خاک، P+S: پیت ماس + خاک بودند. بسترهای مختلف کاشت قبل از استفاده اتوکلاوه شده و به میزان ۳ کیلوگرم درون گلدان‌ها ریخته شدند. همچنین ۱۰ گرم مایه تلقیح قارچ در گروه تلقیح قارچ مایکوریزا به بسترهای کشت اضافه شد. گیاهچه‌ها در گلخانه تحت دمای ۲۵/ ۱۸ درجه سانتی‌گراد (روز / شب) و ۱۶ ساعت روشنایی رشد کردند. پس از ۴ هفته بوته‌های استویا از گلدان‌ها خارج شده و به آزمایشگاه منتقل شدند و پس از اندازه‌گیری صفات مورفوفیزولوژیکی، بوته‌ها به مدت یک هفته در شرایط سایه خشک شدند.

سنجش میزان گلوکوزیدها

سنجش گلوکوزیدهای گیاه استویا طبق روش Kailasam (۲۰۱۱) با کمی تغییر انجام شد. جهت استخراج ۰/۱ گرم از پودر خشک گیاهی توزین شد و درون ویال‌های ۲۰ میلی‌لیتری ریخته شد و ۱۰ میلی‌لیتر استونیتریل ۸۰ درصد به آن اضافه و توسط شیکر لوله تکان داده شد. سپس عملیات استخراج با قرار دادن مخلوط درون اولتراسونیک به مدت ۶۰ ثانیه انجام شد و در پایان به مدت چهار دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ شد و محلول رویی به نسبت ۱ به ۵ با استونیتریل ۸۰ درصد رقیق شد و برای آنالیز با دستگاه HPLC مورد استفاده قرار گرفت. دستگاه HPLC مدل KNAUER مجهز به ستون NH_2 (طول ستون ۲۵ سانتی‌متر و قطر داخلی ستون ۰/۴۶ سانتی‌متر) و دتکتور KNAUER-UV (K2501) بود. فاز متحرک شامل آب - استونیتریل (۲۰ — ۸۰) با سرعت جریان ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه بود. سنجش گلوکوزیدها در طول موج ۲۱۰ نانومتر انجام شد [۲۰]. میزان استویوزید، ریبادیوزید A و C طبق فرمول‌های زیر محاسبه شدند:

$$\text{Rebaudioside A } \% = [Ws/W] \times [Aa/As] \times 100$$
$$\text{Stevioside } \% = [Ws/W] \times Astv \times [0.83/As] \times 100$$
$$\text{Rebaudioside C } \% = [Ws/W] \times Ac \times [0.98/As] \times 100$$

Ws = مقدار وزن استاندارد Rebaudioside A (بر حسب میلی‌گرم) در محلول استاندارد.

W= مقدار وزن نمونه گیاه (بر حسب میلی‌گرم)

As = سطح زیر پیک استاندارد Rebaudioside A

Aa= سطح زیر پیک Rebaudioside A نمونه مجهول

Astv = سطح زیر پیک Stevioside نمونه

Ac = سطح زیر پیک Rebaudioside C نمونه

تجزیه و تحلیل آماری

محاسبات آماری داده‌های حاصل از این آزمایش با استفاده از نرم‌افزارهای آماری SAS و SPSS انجام شد و میانگین‌ها بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن مقایسه شدند. همچنین برای رسم نمودارها از نرم‌افزار اکسل (Excel) استفاده شد.

نتایج

ارتفاع بوته

اثر ساده تلقیح قارچ مایکوریزا و بسترهای مختلف کشت ($P \leq ۰/۰۱$) و اثر متقابل آنها ($P \leq ۰/۰۵$) تأثیر معنی‌داری بر ارتفاع بوته داشتند (جدول شماره ۱). بیشترین ارتفاع بوته در بستر کشت پیت ماس + کوکوپیت + خاک با تلقیح قارچ مایکوریزا (۲۵/۷۴ سانتی‌متر) مشاهده شد و کمترین میزان آن در بستر کشت پیت ماس + کوکوپیت بدون تلقیح قارچ مایکوریزا (۱۷/۷۳ سانتی‌متر) حاصل شد (شکل شماره ۱).

جدول شماره ۱- تجزیه واریانس اثرات ساده و متقابل قارچ مایکوریزا و بستر متفاوت کشت بر برخی صفات مورد بررسی استویا

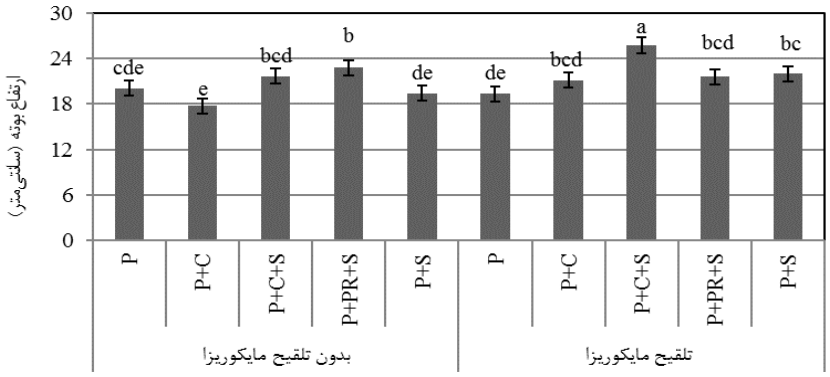
منابع تغییرات (S.O.V)	درجه آزادی D.f.	میانگین مربعات						
		ارتفاع بوته	تعداد ساقه فرعی	قطر ساقه	تعداد برگ	وزن تر ساقه	وزن خشک ساقه	وزن تر برگ
بلوک	۳	۶/۸۹ ns	۰/۱۹ ns	۰/۰۱۴ ns	۱۹/۲۳ ns	۰/۰۵۶ ns	۰/۱۰۱ ns	۰/۲۱ ns
قارچ مایکوریزا	۱	۲۶/۴۲ **	۰/۸ *	۰/۸۴۱ **	۲۷۸/۹ **	۰/۰۵ ns	۱/۱۰۲ **	۷/۳۴ **
بستر کشت	۴	۲۵/۶۹ **	۰/۳۷ ns	۰/۰۷ ns	۳۶/۲ ns	۱/۳۸ **	۰/۳۹ **	۱/۲۷ *
قارچ مایکوریزا × بستر کشت	۴	۱۱/۹۸ *	۰/۱۴۳ ns	۰/۰۹۲ ns	۴۰/۴ ns	۰/۲۳۵ ns	۰/۲۱۹ *	۰/۶۱ ns
خطای آزمایشی	۲۷	۳/۰۲	۰/۱۷۵	۰/۰۳۶	۱۵/۶	۰/۱۸۵	۰/۰۵۸	۰/۳۴
ضریب تغییرات (CV%)		۸/۲۲	۱۹/۷۲	۱۲/۸۳	۱۷/۴۴	۱۶/۸۶	۱۴/۲۴	۲۲/۶

ns، *، **: به ترتیب غیر معنی‌دار بودن و معنی‌دار بودن در سطوح احتمال ۵ و ۱ درصد.

ادامه جدول شماره ۱-

منابع تغییرات (S.O.V)	درجه آزادیD.f.	میانگین مربعات						
		وزن خشک برگ	قطر ریشه	وزن تر ریشه	وزن خشک ریشه	میزان استویوزید	میزان ریبادیوزید A	میزان ریبادیوزید C
بلوک	۳	۰/۲۱ ns	۰/۰۷۴ ns	۰/۲۱۷ ns	۰/۰۹۸ ns	۰/۰۰۸ ns	۰/۲۷ ns	۰/۰۲۶ ns
قارچ مایکوریزا	۱	۲/۶۸ **	۰/۷۹ **	۰/۵۰ ns	۰/۵۲ **	۱۵/۱ **	۲۸/۹۸ **	۴/۱۳ **
بستر کشت	۴	۰/۱۸ ns	۰/۰۹ ns	۱/۲۵ **	۰/۱۹ *	۲/۴۶ **	۵/۰۴ **	۳/۴۶ **
قارچ مایکوریزا × بستر کشت	۴	۰/۷۷ **	۰/۰۷ ns	۰/۲۱ ns	۰/۰۹ ns	۰/۸۲۵ **	۸/۶۴ **	۱/۲۵ **
خطای آزمایشی	۲۷	۰/۱۲	۰/۰۸	۰/۱۹	۰/۰۵۹	۰/۱۸۹	۰/۳۰۸	۰/۰۱۹
ضریب تغییرات (CV%)		۱۹/۹	۱۹/۹	۱۸/۹	۱۶/۳۶	۱۵/۰۶	۲۰/۶۳	۱۴/۰۶

ns، *، **: به ترتیب غیر معنی‌دار بودن و معنی‌دار بودن در سطوح احتمال ۵ و ۱ درصد.



شکل شماره ۱- اثر متقابل تلقیح قارچ مایکوریزا و بسترهای مختلف کشت بر ارتفاع بوته استویا. P: پیت ماس، P+C: پیت ماس + کوکوپیت، P+C+S: پیت ماس + کوکوپیت + خاک، P+PR+S: پیت ماس + پرلیت + خاک، P+S: پیت ماس + خاک

تعداد ساقه فرعی و قطر ساقه

تلقیح قارچ مایکوریزا تأثیر معنی‌داری بر تعداد ساقه فرعی ($P \leq ۰/۰۵$) و قطر ساقه ($P \leq ۰/۰۱$) داشت اما بسترهای مختلف کشت و اثر متقابل آن با تلقیح قارچ مایکوریزا تأثیر معنی‌داری بر میزان این صفات نداشت (جدول شماره ۱). تلقیح قارچ مایکوریزا به ترتیب موجب افزایش ۱۴ و ۲۱/۶ درصدی تعداد ساقه فرعی و قطر ساقه در گیاه استویا نسبت به عدم تلقیح آن شد (شکل شماره ۲).

تعداد برگ

تلقیح قارچ مایکوریزا در سطح احتمال ۱ درصد تأثیر معنی‌داری بر تعداد برگ گیاهچه‌های استویا داشت. در حالی که بسترهای مختلف کشت و اثر متقابل تلقیح قارچ مایکوریزا در بسترهای مختلف کشت تأثیر معنی‌داری بر تعداد برگ استویا نداشتند. تعداد برگ تحت تأثیر تلقیح قارچ مایکوریزا در مقایسه با عدم تلقیح قارچ سبب افزایش ۲۶ درصدی آن شد.

وزن تر و خشک ساقه

اگرچه استفاده از بسترهای کشت مختلف نیز تأثیر معنی‌داری ($P \leq ۰/۰۱$) بر وزن تر و خشک ساقه داشت ولی تلقیح قارچ مایکوریزا تنها تأثیر معنی‌داری ($P \leq ۰/۰۱$) بر وزن خشک ساقه داشت. همچنین اثر متقابل آنها فقط بر وزن خشک ساقه تأثیر معنی‌داری ($P \leq ۰/۰۵$) داشت (جدول شماره ۱). بیشترین میزان وزن تر ساقه در بستر کاشت پیت ماس (۳/۰۹ گرم) حاصل شد که تفاوت معنی‌داری با بسترهای کشت پیت ماس + کوکوپیت (۲/۷۲ گرم) و پیت ماس + پرلیت + خاک (۲/۶۸ گرم) نداشت و کمترین میزان آن در بسترهای پیت ماس + کوکوپیت + خاک (۲/۲ گرم) و پیت ماس + خاک (۲/۰۶ گرم) مشاهده شد (جدول شماره ۳). تلقیح قارچ مایکوریزا در بسترهای کشت پیت‌ماس + خاک و پیت‌ماس + کوکوپیت + خاک موجب افزایش معنی‌دار وزن خشک ساقه شد و در سایر بسترهای کشت، تفاوت معنی‌دار در وزن خشک ساقه مشاهده نشد. بیشترن وزن خشک در بستر کاشت پیت‌ماس و تلقیح قارچ مایکوریزا (۲/۰۵ گرم) مشاهده شد و کمترین میزان آن در بستر کاشت پیت‌ماس + خاک و عدم تلقیح قارچ مایکوریزا (۱/۱۲ گرم) به دست آمد (شکل شماره ۲).

وزن تر و خشک برگ

تلقیح قارچ مایکوریزا تاثیر معنی‌داری ($P \leq ۰/۰۱$) بر وزن تر بوته داشت و موجب افزایش ۳۹/۸ درصدی وزن تر بوته شد. بسترهای مختلف کشت تأثیر معنی‌داری ($P \leq ۰/۰۵$) بر وزن تر برگ داشتند و بیشترین میزان آن در بستر کشت پیت‌ماس (۳/۰۹ گرم) مشاهده شد و سایر بسترهای کشت تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نداشتند. همچنین تلقیح قارچ مایکوریزا تأثیر معنی‌داری ($P \leq ۰/۰۱$) بر وزن خشک برگ داشت در حالی که بسترهای مختلف کشت تأثیر معنی‌داری بر آن نداشتند. اثر متقابل تلقیح قارچ مایکوریزا و بسترهای مختلف کشت نیز تأثیر معنی‌داری ($P \leq ۰/۰۱$) بر وزن خشک برگ داشت (جدول شماره‌های ۱، ۲ و ۳). تلقیح قارچ مایکوریزا در بسترهای مختلف کشت به غیر از بستر کشت پیت‌ماس + پرلیت + خاک، موجب افزایش وزن خشک برگ استویا شد. بیشترین میزان وزن خشک برگ با تلقیح قارچ مایکوریزا در بستر کشت‌های پیت‌ماس (۲/۳ گرم) و پیت‌ماس + خاک (۲/۲۵ گرم) مشاهده شد و کمترین میزان آن در بستر کشت پیت‌ماس + خاک بدون تلقیح مایکوریزا (۰/۹۹ گرم) به دست آمد (شکل شماره ۳).

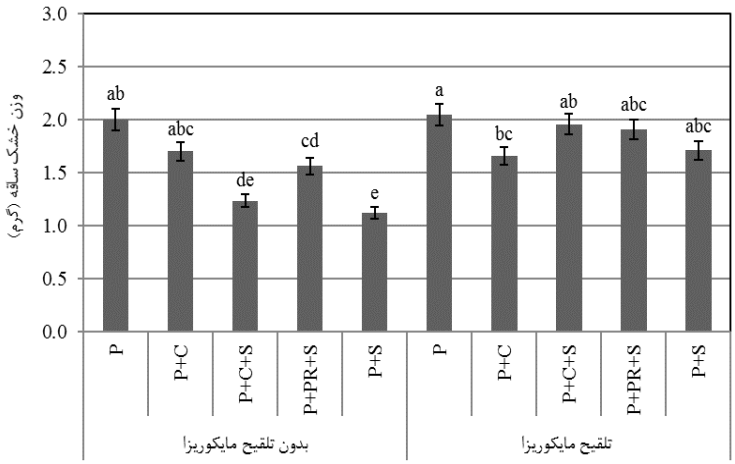
قطر ریشه، وزن تر و خشک ریشه

تلقیح قارچ مایکوریزا تأثیر معنی‌داری ($P \leq ۰/۰۱$) بر قطر ریشه و وزن خشک ریشه داشت. بسترهای مختلف کشت نیز تأثیر معنی‌داری بر وزن تر ($P \leq ۰/۰۱$) و خشک ($P \leq ۰/۰۵$) ریشه داشتند (جدول شماره ۱). استفاده از قارچ مایکوریزا در بسترهای مختلف کشت موجب افزایش ۱۴ درصدی قطر ریشه و وزن خشک ریشه نسبت به عدم تلقیح قارچ شد (جدول شماره ۲). بیشترین وزن تر و خشک ریشه در بستر کاشت پیت‌ماس + کوکوپیت (به ترتیب ۲/۸۵ و ۱/۶۱ گرم) به دست آمد و کمترین میزان آن در بستر کشت پیت‌ماس + خاک (به ترتیب ۱/۹۷ و ۱/۲۳ گرم) مشاهده شد (جدول شماره ۳).

میزان استویوزید و ریبادیوزید A و C

اثرات ساده و متقابل تلقیح قارچ مایکوریزا و بسترهای مختلف کشت تأثیر معنی‌داری ($P \leq ۰/۰۱$) بر میزان استویوزید و ریبادیوزید A و C داشتند (جدول شماره ۱). تلقیح قارچ مایکوریزا موجب افزایش معنی‌دار میزان استویوزید در بسترهای مختلف کشت به غیر از بستر کشت پیت‌ماس شد. بیشترین میزان استویوزید با تلقیح مایکوریزا در بستر کشت پیت ماس + کوکوپیت + خاک مشاهده شد و کمترین میزان آن در بستر کاشت پیت ماس + پرلیت + خاک بدون تلقیح قارچ

مایکوریزا حاصل شد (شکل شماره ۴). بیشترین میزان ریبادیوزید A تحت شرایط تلقیح مایکوریز در بسترهای کشت پیت ماس + کوکوپیت + خاک (۵/۴۸ درصد) و پیت ماس + خاک (۴/۹۵ درصد) مشاهده شد و کمترین میزان آن در تیمار پیت‌ماس + پرلیت + خاک بدون تلقیح مایکوریزا (۱/۳۵ گرم) به دست آمد (شکل شماره ۵). همچنین بیشترین میزان ریبادیوزید C تحت شرایط تلقیح مایکوریزا در بستر کاشت پیت‌ماس (۲/۹۸ درصد) حاصل شد و کمترین میزان آن در تیمارهای پیت‌ماس + پرلیت + خاک و پیت‌ماس + خاک تحت شرایط بدون تلقیح مایکوریزا (۰/۳۴ درصد) به دست آمد (شکل شماره ۶).



شکل شماره ۲- اثر متقابل تلقیح قارچ مایکوریزا و بسترهای مختلف کشت بر وزن خشک ساقه استویا. P: پیت ماس، P+C: پیت ماس + کوکوپیت، P+C+S: پیت ماس + کوکوپیت + خاک، P+PR+S: پیت ماس + پرلیت + خاک، P+S: پیت ماس + خاک

جدول شماره ۲- مقایسه میانگین اثر تلقیح قارچ مایکوریزا بر برخی از صفات مورفوفیزیولوژیکی استویا

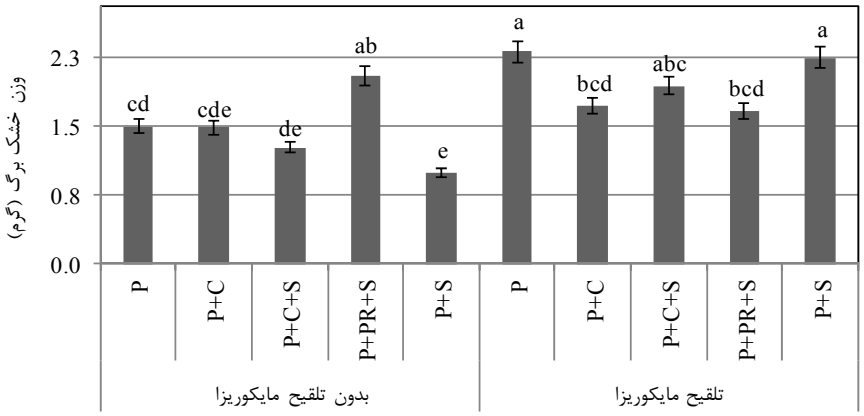
مایکوریزا	تعداد ساقه فرعی	قطر ساقه (میلی‌متر)	تعداد برگ	وزن تر برگ (گرم)	قطر ریشه (میلی‌متر)	وزن خشک ریشه (گرم)
عدم تلقیح قارچ	۱/۹۸ b	۱/۳۴ b	۲۰/۰۳ b	۲/۱۶ b	۱/۲۸ b	۱/۳۷ b
تلقیح قارچ	۲/۲۶ a	۱/۶۳ a	۲۵/۳۱ a	۳/۰۲ a	۱/۵۶ a	۱/۶ a

میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک در هر ستون مطابق آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌دار ندارند.

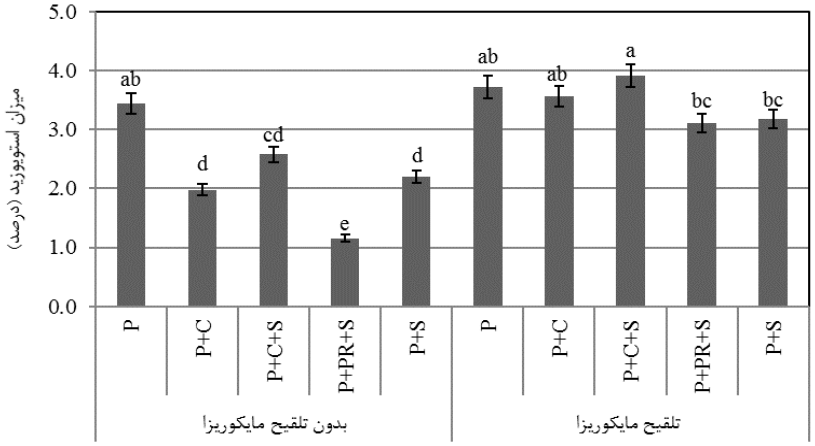
جدول شماره ۳- مقایسه میانگین اثر بسترهای مختلف کشت بر برخی از صفات مورفوفیزیولوژیکی استویا

بستر کشت	وزن تر ساقه (گرم)	وزن تر برگ (گرم)	وزن تر ریشه (گرم)	وزن خشک ریشه (گرم)
پیت ماس	۳/۰۹ a	۳/۲۲ a	۲/۵۸ a	۱/۶ a
پیت ماس + کوکوپیت	۲/۷۲ a	۲/۱۲ b	۲/۸۵ a	۱/۶۱ a
پیت ماس + کوکوپیت + خاک	۲/۲۱ b	۲/۴۸ b	۲/۰۲ b	۱/۵۱ a
پیت ماس + پرلیت + خاک	۲/۶۸ a	۲/۵۶ b	۲/۰۸ b	۱/۴۷ ab
پیت ماس + خاک	۲/۰۶ b	۲/۵۴ b	۱/۹۷ b	۱/۲۳ b

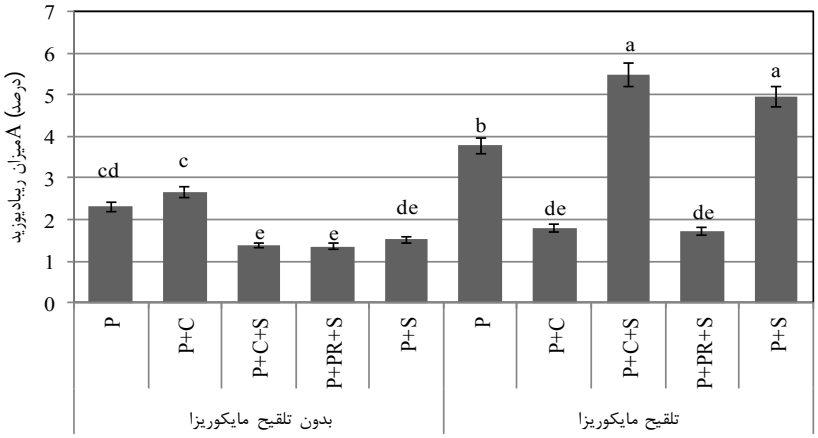
میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک در هر ستون مطابق آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌دار ندارند.



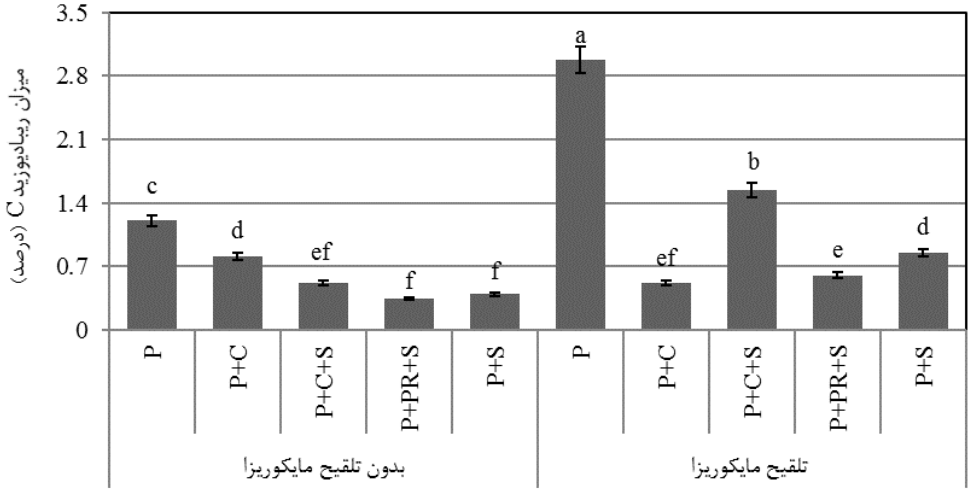
شکل شماره ۳- اثر متقابل تلقیح قارچ مایکوریزا و بسترهای مختلف کشت بر وزن خشک برگ استویا. P: پیت ماس، P+C: پیت ماس + کوکوپیت، P+C+S: پیت ماس + کوکوپیت + خاک، P+PR+S: پیت ماس + پرلیت + خاک، P+S: پیت ماس + خاک



شکل شماره ۴- اثر متقابل تلقیح قارچ مایکوریزا و بسترهای مختلف کشت بر میزان استویوزید برگ استویا. P: پیت ماس، P+C: پیت ماس + کوکوپیت، P+C+S: پیت ماس + کوکوپیت + خاک، P+PR+S: پیت ماس + پرلیت + خاک، P+S: پیت ماس + خاک



شکل شماره ۵- اثر متقابل تلقیح قارچ مایکوریزا و بسترهای مختلف کشت بر میزان ریبادیوزید A در برگ استویا. P: پیت ماس، P+C: پیت ماس + کوکوپیت، P+C+S: پیت ماس + کوکوپیت + خاک، P+PR+S: پیت ماس + پرلیت + خاک، P+S: پیت ماس + خاک



شکل شماره ۶- اثر متقابل تلقیح قارچ مایکوریزا و بسترهای مختلف کشت بر میزان ریبادیوزید C در برگ استویا. P: پیت ماس، P+C: پیت ماس + کوکوپیت، P+C+S: پیت ماس + کوکوپیت + خاک، P+PR+S: پیت ماس + پرلیت + خاک، P+S: پیت ماس + خاک

بحث

بررسی نتایج حاصل از برهم کنش قارچ مایکوریزا و بسترهای مختلف کشت بر گیاهچه‌های کشت بافتی استویا نشان داد که قارچ مایکوریزا بخصوص در بسترهای مناسب کشت، اثر مثبتی بر خصوصیات رشدی و فیتوشیمیایی بوته‌های استویا داشتند. قارچ مایکوریزا سبب افزایش ارتفاع بوته، تعداد ساقه فرعی، تعداد برگ، قطر ساقه و ریشه، وزن تر و خشک ساقه، برگ و ریشه، میزان استویوزید و ریبادیوزید A و C شد. این نتایج با یافته‌های سایر محققین مطابقت داشت [۱۶، ۱۳، ۱۲].

قارچ‌های مایکوریزا از طریق نفوذ اندام هیف خود به درون منافذ ریز خاک، موجب توسعه سیستم ریشه گیاه میزبان می‌شوند [۲۱] و با توسعه سیستم ریشه، جذب آب و عناصر معدنی نظیر فسفر در خارج از منطقه ریزوسفر افزایش می‌یابد. تحقیقات نشان داده است که تلقیح قارچ‌های مایکوریزا میزان فتوسنتز گیاه میزبان را از طریق افزایش مقدار فسفر در کلروپلاست افزایش می‌دهند و این قارچ‌ها نقش مهمی در کاهش اثرات تنش‌های محیطی دارند. همچنین قارچ‌های مایکوریزا موجب بیان ژن پروتئین‌های آکواپورین مستقر در واکوئل سلول‌های دارای هیف قارچ می‌گردند و از این طریق اثر مثبتی در جذب آب تحت شرایط تنش خشکی دارند [۲۲، ۸]. علاوه بر این تلقیح قارچ مایکوریزا می‌تواند از ریشه گیاهان در برابر حمله میکروارگانیسم‌های بیماریزای خاک حفاظت کند [۱۶]. نقش مؤثر دیگر قارچ‌های مایکوریزا، تأثیر آنها بر میزان هورمون‌های گیاهی بویژه IAA است. افزایش مقدار IAA، جیبرلین و سیتوکینین در گیاه *Prosopis juliflora* همزیست با *G. fasciculatum* ثابت شده است [۲۳]. به این ترتیب تلقیح قارچ مایکوریزا موجب بهبود ویژگی‌های رویشی و مورفوفیزیولوژیکی گیاهان می‌شود، به طوری که Karthikeyan و همکاران (۲۰۰۸) نشان دادند که همزیستی گیاه پروانش با قارچ *G. mosseae* موجب افزایش ارتفاع گیاه شده است [۲۴] و علاوه بر این، گزارش‌های بسیاری در مورد اثر تلقیح قارچ‌ها بر بهبود شاخص‌هایی نظیر وزن تر و خشک اندام هوایی گیاهان وجود دارد [۲۵].

تغییرات کمی و کیفی در تولید متابولیت‌های ثانویه در برخی از گیاهان در شرایط هم‌زیستی با قارچ‌های مایکوریزا گزارش شده است. چنانکه قارچ‌های اندومایکوریزا با افزایش فعالیت‌های آنزیمی متفاوت سبب تغییرات فیزیولوژیکی در گیاهان و متابولیت‌های ثانویه‌ی آنها می‌شوند [۲۶]. تحقیقات نشان داده است که وزن ریشه‌ها، ساقه‌ها و تولید ترپنوئید در

Euphorbia pekinensis بعد از تلقیح با قارچ مایکوریزا افزایش می‌یابد، همچنین بررسی سیتوپلاسمی نشان داده است که فعالیت آنزیم‌های PAL (فنیل آلانین آمونیا لیاز) و DXR (1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate رداکتو ایزومراز) در بافت گیاهی تلقیح شده با قارچ مایکوریزا افزایش می‌یابد [۲۷]. سیگنال‌های مختلف و مسیرهای سیگنالی فراوانی در یک هم زیستی مایکوریزایی، بیان ژن‌های کد کننده‌ی متابولیت‌های ثانویه را کنترل می‌کنند. قارچ‌های مایکوریزا آربسکولار انباشتگی میکورادیسین را از مسیری غیر از مسیر موالونات یعنی در مسیر MEP القا می‌کنند. در این مسیر cDNA دو آنزیم مهم کد کننده 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate سنتتاز (DXS) و 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate رداکتو ایزومراز (DXR) دیده شده که القا شدیدی در سطح رونویسی این دو آنزیم در گیاهان مایکوریزای اتفاق می‌افتد [۲۸].

یکی از مهم‌ترین آثار مرحله سازگاری بر گیاهان انتقال یافته به محیط *ex vitro* قرار گرفتن گیاهان تحت تنش رطوبتی است. گزارش‌های متعدد نشان دادند که قارچ‌های مایکوریزا موجب بهبود هدایت هیدرولیکی ریشه در پتانسیل‌های پایین آب و درنهایت بهبود پتانسیل آب گیاهچه‌ها می‌شود [۳۱-۲۹]. همچنین قارچ‌های مایکوریزا قدرت بقای گیاهچه‌های حاصل از *in vitro* را از طریق گسترش سیستم ریشه، افزایش شدت فتوسنتز و ظرفیت هدایت آب، افزایش جذب عناصر غذایی و کاهش تنش‌های محیطی در طول دوره سازگاری افزایش می‌دهند [۳۲، ۱۳، ۱۲]. در این راستا اثر مثبت چند گونه از قارچ‌های مایکوریزا بر رشد و ارتفاع گیاهچه‌های *Vitis vinifera* در طول دوره سازگاری (*ex vitro*) گزارش شده است [۲۲].

به طور کلی نتایج نشان داد بسترهای مختلف کشت سبب بهبود ارتفاع بوته، وزن تر و خشک ساقه، وزن تر برگ، وزن تر و خشک ریشه، میزان استویوزید و ریبادیوزید A و C شد که با یافته‌های سایر محققین تطابق داشت [۳۵، ۳۴، ۳۳، ۱۸]. بستر مناسب کشت عامل تعیین کننده در بقا، رشد و سازگاری گیاهچه‌های کشت بافتی می‌باشد. در تحقیقی مشخص شد که کاربرد نسبت‌های متفاوت پیت ماس، ورمی‌کولیت و پرلیت در بستر کشت بوته‌های چای طی فرآیند سازگاری موجب افزایش بقا و رشد گیاهچه‌های چای شد. بیشترین میزان بقا و رشد گیاهچه‌ها در بستر کشت حاوی ۵۰ درصد پیت ماس، ۲۵ درصد ورمی‌کولیت و ۲۵ درصد پرلیت مشاهده شد که علت آن به فراهمی بیشتر آب، اکسیژن و عناصر غذایی توسط این مخلوط برای رشد ریشه و اندام هوایی گیاهچه‌های چای نسبت داده‌اند [۱۸].

بیشترین میزان وزن تر ساقه، وزن تر برگ، وزن تر ریشه و وزن خشک ریشه تحت شرایط تلقیح یا عدم تلقیح قارچ مایکوریزا در بستر کاشت پیت ماس به دست آمد و افزودن کوکوپیت، پرلیت و خاک به آن موجب کاهش میزان این صفات شد. یافته‌های سایر محققین این نتایج را تأیید کرد [۳۸-۳۶]. تحت شرایط بدون تلقیح قارچ مایکوریزا، بیشترین میزان ارتفاع بوته و وزن خشک برگ در بستر کاشت پیت ماس + پرلیت + خاک حاصل شد. پرلیت یک ترکیب مهم در مخلوط بستر کشت است، البته زمانی که با پیت ماس مخلوط شود. افزودن پرلیت به پیت ماس موجب نگهداری هوای بیشتر در پیت ماس می‌شود و علاوه بر این مقدار آب نگهداری شده در پیت ماس افزایش می‌یابد [۱۸]. بیشترین وزن خشک ساقه، میزان استویوزید و ریبادیوزید A و C در بستر کاشت پیت ماس مشاهده شد. به نظر می‌رسد در بستر کشت پیت ماس به دلیل فراهمی بیشتر ماده آلی و عناصر غذایی، میزان قندهای گلیکوزیدی گیاه استویا افزایش یافته است.

تحت شرایط تلقیح قارچ مایکوریزا، بیشترین ارتفاع بوته در بستر کشت پیت ماس + کوکوپیت + خاک مشاهده شد و بیشترین میزان وزن خشک ساقه و برگ نیز در تیمار کشت پیت ماس حاصل شد. اما از نظر آماری تفاوت معنی‌داری با بستر کشت پیت ماس + کوکوپیت + خاک نداشت. بیشترین میزان ریبادیوزید A و استویوزید در بستر کشت پیت ماس + کوکوپیت + خاک مشاهده شد و بیشترین میزان ریبادیوزید C در بستر کشت پیت ماس به دست آمد. تلقیح قارچ مایکوریزا به دلیل توسعه سیستم امکان دسترسی به عناصر غذایی بیشتر را فراهم می‌کند و با کاهش اثرات تنش‌های محیطی و تحریک بیوسنتز هورمون‌های گیاهی موجب رشد بیشتر و افزایش متابولیت‌های ثانویه می‌شوند [۳۹، ۲۸، ۱۸]. بنابراین تلقیح قارچ مایکوریزا در بستر کشت پیت ماس + کوکوپیت + خاک ممکن است به دلیل فراهمی بیشتر آب، اکسیژن و عناصر

غذایی یا تولید مواد محرک رشد گیاهی موجب بهبود ویژگی کمی و کیفی گیاهچه‌های استویا شده است.

نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق نشان داد که بسترهای مختلف کشت و تلقیح قارچ مایکوریزا بر خصوصیات رشدی و فیتوشیمیایی گیاه استویا اثر معنی‌داری داشته است. همچنین با توجه به اهمیت وزن خشک برگ بوته و میزان قندهای گلوکوزیدی در گیاه استویا، بستر کشت پیت‌ماس + کوکوپیت + خاک (۲:۱:۱) همراه با تلقیح قارچ مایکوریزا بهترین تیمار بود.

منابع

1. Lemus-Mondaca R, Vega-Galvez A, Zura-Bravo L and Ah-Hen K. *Stevia rebaudiana* Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. *Food Chem*. 2012; 132: 1121–32.

2. Abdullateef R.A and Osman M. Studies on effects of pruning on vegetative traits in *Stevia rebaudiana* Bertoni (Compositae). *International J. Biol*. 2012; 4 (1): 146.

3. Gupta E, Purwar S, Sundaram S, Tripathi P and Rai G. Stevioside and Rebaudioside A – Predominant Ent-KaureneDiterpene Glycosides of Therapeutic Potential: a Review. *Czech J. Food Sci.* 2016; 34(4): 281 - 299.

4. Brahmachari G, Mandal L.C, Roy R, Mondal S and Brahmachari AK. Stevioside and Related Compounds – Molecules of Pharmaceutical Promise: A Critical Overview. *Archiv der Pharmazie Chemistry in Life Sciences* 2011; 1: 5-19.

5. Saad A, Khan F.A, Hayee A and Nazir MS. A Review on Potential Toxicity of Artificial Sweetners vs Safety of Stevia: A Natural Bio-Sweetner. *J. Biology, Agriculture and Healthcare* 2014; 4 (15): 137- 147.

6. Goyal S.K, Samsher and Goyal R.K. Stevia (*Stevia rebaudiana*) a bio-sweetener: a review. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 2010; 61 (1): 1 - 10.

7. Kumar K and Rao I.U. Morphophysiologicals Problems in Acclimatization of Micropropagated Plants in - Ex Vitro Conditions- A Reviews. *Journal of Ornamental and Horticultural Plants* 2012; 2 (4): 271-283.

8. Kapoor R, Sharma D and Bhatnagar AK. Arbuscular mycorrhizae in micropropagation systems and their potential applications. Scientia Horticulturae 2008; 116: 227-239.

9. Rasmia S.S.D. Morphology, physiology and anatomy in vitro affected acclimatization ex vitro date palm plantlets: A Review. International *Journal of Chemical, Environmental & Biological Sciences* 2015; 3(2): 183- 190.

10. Pospisilova J, Ticha I, Kadlecek P, Haisel D and Plzakova S. Acclimatization of micropropagated plants to ex vitro conditions. *Biologia Plantarum* 1999; 42 (4): 481-497.

11. Chandra Sh, Kumar V, Bandopadhyay R and Chandra R. Acclimatization of tissue cultured plantlets: from laboratory to land. *Biotechnology Letters* 2010; 32: 1199 - 1205.

12. Azcon-Aguilar C, Cantos M, Troncoso A, Barea J.M. Beneficial effect of arbuscular mycorrhizas on acclimatization of micropropagated cassava plantlets. *Scientia Horticulture* 1997; 72: 63- 71.

13. Yadav K, Aggarwal A and Singh N. Arbuscular Mycorrhizal Fungi Induced Acclimatization and Growth Enhancement of *Glycyrrhiza glabra* L.: A Potential Medicinal Plant. *Agriculture Res*. 2013; 2 (1): 43 - 47.

14. De Oliveira J.R.G, De Lima Morais T.A, De Melo N.F and Yano-Melo A.M. Acclimatization of *Tapeinochilos ananassae* plantlets in association with arbuscular mycorrhizal fungi. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 2011; 46 (9): 1099-1104.

15. Estrada-Luna A.A, Davies F.T and Egilla J.N. Mycorrhizal fungi enhancement of growth and gas exchange of micropropagated guava plantlets (*Psidium guajava* L.) during ex vitro acclimatization and plant establishment. *Mycorrhiza* 2000; 10: 1-8.

16. Rahmatzadeh S and Kazemitabar S.K. Biochemical and antioxidant changes in regenerated periwinkle plantlets due to mycorrhizal colonization during acclimatization. *International J. Agriculture and Crop Sci*. 2013; 5 (4): 1535-1540.

17. Rodrigues P.H.V, Lima A.M.L.P, Ambrosano G.M.B and Dutra M.F.B. Acclimatization of micropropagated *Heliconia bihai* (Heliconiaceae) plants. *Scientia Agricola* 2005; 62 (3): 299-301.

18. Azadi Gonbad R, Siavash Moghaddam S, Sinniah U.R, Abdul Aziz M and Safarpor M. Determination of Potting Media for Effective Acclimatization in Micropropagated Plants of Tea Clone Iran. *International Journal of Forest, Soil and Erosion* 2013; 3 (1): 40-44.

19. Mukerji K.G., Manoharachary C. and Chamola B.P. Techniques in Mycorrhizal Studies. Kluwer Academic Publisher. Springer Netherlands. 2002, 554 p. DOI: 10.1007/978-94-017-3209-3

20. Kailasam S. Quantifi cation of stevioside and rebaudioside A in *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves using the Agilent 1260 Infi nity LC. Application Note. Food Testing & Agriculture. Agilent Technologies, Inc. Bangalore, India. 2011; P. 1-4. https://www.agilent.com/cs/library/applications/5990-9524EN.pdf

21. Karandashov V and Bucher M. Symbiotic phosphate transport in arbuscular mycorrhizas. *Trends Plant Sci.* 2005; 10: 22 - 29.

22. Krishna H, Singh S.K and Sharma R.R. Biochemical changes in micropropagated grape (*Vitis vinifera* L.) plantlets due to arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) inoculated during ex vitro acclimatization. *Scientia Horticulturae* 2005; 106: 554-567.

23. Selvaraj T and Chellappan P. Arbuscular mycorrhizae: a diverse personality. *J. Central European Agriculture* 2006; 7: 349-358.

24. Karthikeyan B, Abdul Jaleel C and Changxing Z. The effect of AM fungi and phosphorous level on the biomass yield and ajmalicine production in *Catharanthus roseus*. *Eurasian J. Biosciences* 2008; 2: 26- 33.

25. Morone-Fortunato I and Avato P. Plant development and synthesis of essential oils in micropropagated and mycorrhiza inoculated plants of *Origanum vulgare* L. ssp. *Hirtum* (Link) Ietswaart. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 2008; 93: 139-149.

26. Mathur N. and Vyas A. Changes in isozyme patterns of peroxidase and polyphenol oxidase by VAM fungi in roots of Ziziphus species. *Plant Physiology* 1995; 4: 498-500.

27. Yuan Z.L., Dai C. and Chen L. Regulation and accumulation of secondary metabolites in plant-fungus symbiotic system. *African J. Biotechnol.* 2010; 6: 1266-1271.

28. Walter M.H., Fester T. and Strack D. Arbuscular mycorrhizal fungi induce the non-mevalonate methylerythritol phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis correlated with accumulation of the 'yellow pigment' and other apocarotenoids. *Plant J*, 2000; 21: 571-578.

29. Birhane E, Sterck F.J, Fetene M, Bongers F and Kuyper T.W. Arbuscular mycorrhizal fungi enhance photosynthesis, water use efficiency, and growth of frankincense seedlings under pulsed water availability conditions. *Oecologia* 2012; 169 (4): 895 - 904.

30. Porcel R and Ruiz-Lozano J.M. Arbuscular mycorrhizal influence on leaf water potential,

solute accumulation, and oxidative stress in soybean plants subjected to drought stress. *J. Experimental Botany* 2004; 55 (403): 1743-1750.

31. Bagheri V, Shamshiri M.H, Shirani H and Roosta H.R. Nutrient Uptake and Distribution in Mycorrhizal Pistachio Seedlings under Drought Stress. *J. Agricultural Science and Technol*. 2012; 14: 1591-1604.

32. Hazarika B.N and Bora A. Use of Bio-agents in Acclimatizing Micropropagated Plants- a Review. *Agricultural Reviews* 2006; 27 (2): 152 -156.

33. Yahya M.F, Hassan N.H, Abdullah N, Abd. Rahman S.S, Ismail H, Abdullah M.Z, Mohd Ariff F.F, Ngah M.L, Koter R, Khalid R, Abdullah R, Zakaria N and Zakaria N. Acclimatization of *Eurycoma longifolia* (Tongkat Ali) Plantlets to Ex Vitro Conditions. *J. Trop. Resour. Sustain. Sci.* 2015; 3: 129-131.

34. Sardoei A.S and Rahbarian P. Effect of different media on chlorophyll and carotenoids of ornamental plants under system mist. *European Journal of Experimental Biol.* 2014; 4 (2): 366-369.

35. Sardoei A.S, Shahmoradzadeh Fahraji S and Ghasemi H. Effects of different growing media on growth and flowering of zinnia (*zinnia elegans*). *International J. Advanced Biological and Biomedical Res*. 2014; 2 (6): 1894-1899.

36. Arenas M, Vavrina C.S, Cornell J.A, Hanlon E.A and Hochmuth G.J. Coir as an Alternative to Peat in Media for Tomato Transplant Production. *Horticulture Science* 2002; 37 (2): 309 - 312.

37. Rahimi Z, Aboutalebi A and Hasanzadeh H. Effect of various culture media on tomato transplant production. *International Research Journal of Applied and Basic Sciences* 2013; 4 (2): 326-328.

38. Pestrepo A.P, Medina E, Perez-Espinosa A, Agullo E, Bustamsnte M.A, Mininni C, Bernal M.P and Moral R. Substitution of Peat in Horticultural Seedlings: Suitability of Digestate-Derived Compost from Cattle Manure and Maize Silage Codigestion. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 2013; 44: 668-677.

39. Smith S.E and Read D. Mycorrhizal Symbiosis. Third Edition. Academic press. USA. 2008, 800 p. Hardcover ISBN: 9780123705266.

Phytochemical and Morpho-physiological Responses of *Stevia rebaudiana* Bertoni to Different Planting Beds and Mycorrhizal Fungi inoculation (*Glomus intraradices* N.C. Schenck & G.S. Sm.)

Mehrafarin A (Ph.D.)[1], Etminan AR (Ph.D.)[2]*, Qaderi A (Ph.D.)[1], Dehghani Mashkani MR (Ph.D.)[1], Golrokhan M (M.Sc.)[3]

1- Medicinal Plants Research Center, Institute of Medicinal Plants, ACECR, Karaj, Iran
2- Department of Biotechnology and Plant Breeding, Kermanshah Branch, Islamic Azad University, Kermanshah, Iran
3- Department of Agronomy, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
*Corresponding author: Department of Biotechnology and Plant Breeding, Kermanshah Branch, Islamic Azad University, Kermanshah, Iran
Tel: +98-833-7243181, Fax: +98-833-7243196
E-mail: Alietminan55@yahoo.com

Abstract

Background: The composition of the planting beds and its microorganisms has a very important role on the establishment, growth and phytochemical performance of medicinal plants.

Objective: The aim of this study was to determine the effect of different planting beds and inoculation of mycorrhizal fungus on the changes of stevioside, rebaudioside, and morpho-physiological traits of stevia.

Methods: This study was conducted in a factorial experiment based on randomized complete blocks design (RCBD) with 10 treatments and 4 replications. The first factor consisted of inoculum and non-inoculum treatment of *Glomus intraradices*, and the second factor was the different combination of peat moss, coco peat, perlite and soil as planting beds.

Results: Mycorrhizal fungi inoculation significantly increased the plant height, number of lateral branches, stem and root diameter, number of leaves, leaf fresh/dry weight, shoot dry weight, root dry weight, and content of stevioside, rebaudioside A and C. Also, different combination of planting beds had a significant effect on the plant height, stem dry/fresh weight, leaf fresh weight, root dry/fresh weight, and content of stevioside, rebaudioside A and C.

Conclusion: The results of this study showed that the combination of peat moss + coco peat + soil (2:1:1) with mycorrhizal fungi inoculation among the treatments had the highest positive effect on leaf dry weight and glycoside carbohydrates in stevia plants.

Keywords: Coco peat, Glycoside, Peat moss, Rebaudioside, Stevioside