دراسة تأثير درجة الحموضة وتركيز كبريتات النحاس على إكثار نبات الستيفيا مخبرياً

عبد المحسن السيد عمر[١]، أيمن بركات[٢]

الملخص العربي

أجري هذا البحث على نبات الستيفيا *Stevia rebaudiana* المكاثر مخبرياً بهدف دراسة تأثير درجة الحموضة pH على إكثار، نمو و تجذير نبات الستيفيا وتحديد أفضل درجة حموضة للبيئة الغذائية.

كما هدف البحث لتحديد التركيز الأمثل لكبريتات النحاس في البيئة بعد تحديد أفضل درجة حموضة. استعملت بيئة MS (Murashige and Skoog.,1962) في كل مراحل التجربة وبدرجات حموضة مختلفة(5.8 , 5.5 ,5 ,4.5 ,4)، وفي التجربة الثانية استخدمت تركيزات مختلفة من كبريتات النحاس هي 0.10 µM, 0.15 µM, 0.20 µM, 0.25 µM). حيث كانت جميع البيئات المذكورة بدون إضافة هرمونات. أظهرت نتائج التحليل الإحصائي أن أفضل بيئة لإكثار ونمو وتجذير نبات الستيفيا هي بيئة MS بدرجة حموضة pH 4.5 حيث كان هناك تفوق معنوي لصفة طول الأفرع في البيئة MSpH4.5على كافة البيئات وبمتوسط طول 8 سم و كان الفرق جوهريا في متوسط عدد الأفرع ومتوسط طول الجذور على بقية البيئات.

كما بينت الدراسة أن أفضل تركيز لكبريتات النحاس في بيئة MSpH4.5 هو 0.15µM و أظهرت نتائج التحليل الإحصائي أن هذا التركيز تفوق في صفة طول الأفرع و عددها و عدد الجذور على كافة التركيزات وان نمو نبات الستيفيا في بيئة MSpH4.5 و تركيز كبريتات النحاس 0.15µM كان الأفضل بين كافة البيئات المدروسة.

يمكن من خلال زراعة العقلة في هذه البيئة ان نحصل على نبات كامل جاهز للنقل والتقسية في الصوبة الزجاجي بعد 30 يوم من الزراعة.

وقد سجلت كافة القراءات لكلا التجربتين بعد أربعة أسابيع من الزراعة المخبرية في أنابيب الاختبار.

الكلمات المفتاحية: نبات الستيفيا-MS- pH-كبريتات النحاس.

المقدمــــة والمشكلة البحثية

يتبع نبات الستيفيا *Stevia rebaudiana* لعائلة *Astraceae* والستيفيا نبات عشبي معمر وواحد من 154 نوع من جنس *STEVIA* وهي عشبه حلوة المذاق استعملت من قبل الهنود الحمر كنبات طبي و اهتمت العديد من الدول بزراعتها وأجريت الكثير من الأبحاث عليها (Ramesh, *et al*., 2006)

يحتوي النبات على حلاوة طبيعية وتعتبر أوراق الستيفيا مصدر لمواد الجليكوسايد والستيفوسايد والريبدسايد حيث يزرع النبات وتحش الأوراق للحصول على الستيفوسايد (Ahmed,*et al*., 2007) وتتميز أوراقه باحتوائها على مجموعة من مواد التحلية الطبيعية التي تستخرج من أوراق الستيفيا دون التدخل الكيميائي حيث يبلغ تأثيرها وقدرتها على التحلية (200–300)مرة قدر سكر القصب. في حين إن سعراتها الحرارية لا تزيد عن1/ 300 من قيمة السعرات الحرارية لسكر القصب. (Stauss, 1995)
(Ferreira, and Handro, 1988)

كما أن منافع نبتة "*Stevia rebaudiana*" لا تكمن في احتوائها على المادة السكرية فقط، وإنما لمزايا أخرى مثل صفاتها العلاجية . و لم ترد حتى الآن أي أثار ضارة ناجمة عن استخدام منتجات الستيفيا من قبل البشر (Brandel, and Rosa.1992).

فنبات الستيفيا من النباتات المعروفة للإنسان والذي يتوقع أن يكون أحد أهم المحاصيل الصناعية السكرية في القرن الواحد والعشرين. حيث كان السكان الأصليين لأمريكا الجنوبية يستخدمونها لتحليه طعامهم وشرابهم (Soejarto, 1983).

يعتبر الموطن الأصلي لنبات الستيفيا هو المناطق الشمالية من أمريكا الجنوبية (الباراغوي) وهو ينمو بشكل بري في الأراضي المرتفعة(Felippe,1978) وينمو النبات البري في الاراضي الحامضية

[١] جامعة حلب- كلية الزراعة

[٢] المؤسسة العامة لاكثار البذار-سوريا

استلام البحث في ١٥ سبتمبر٢٠١١والموافقة على النشر في ٢٨ سبتمبر٢٠١١

دائمة الرطوبة على الا تكون غدقة (Brandle, *et al.*1998).

الستيفيا يمكن ان تعيش بنجاح في معظم المناخات، ففي أمريكا الشمالية تزرع الستيفيا في المناطق الدافئة كنباتات معمرة تعاد زراعتها كل عدة سنوات، أما في المناطق الأكثر برودة تزرع الستيفيا كنبات حولي بعد انتهاء وقت الصقيع (David, 1996). تنتشر زراعة هذا النبات في العديد من دول العالم ففي قارة آسيا ينتشر في كل من اليابان والصين والهند وفي أمريكا الجنوبية البرازيل وكوبا، وأمريكا الشمالية فى كندا والولايات المتحدة الامريكية كما تنتشر في روسيا وأكراني (Brandel, and Rosa1992) .

يتكاثر نبات الستيفيا برياً إما بالبذور حيث تنبت البذور الناتجة في الأرض أو أن ينمو مجموع خضري جديد من منطقة التاج في قاعدة النبات الأم بعد موت المجموع الخضري للنبات الأم. أما زراعياً فيتكاثر نبات الستيفيا إما بالبذور أو بالعقلة أو بتقنية زراعة الأنسجة. و زراعة البذور شائعة في المناطق المدارية حيث لا توجد ظروف مناخية تحد من طول فصل النمو أما في المناطق الباردة حيث فصل النمو قصير يتم إنبات البذور في البيوت الزجاجية وهذه الطريقة قليلة النجاح بسبب صعوبة إنبات بذور نبات الستيفيا (David, *et.al*, 2002). كما إن الإكثار الخضري لنبات الستيفيا يكون محدود بعدد العقل الممكن الحصول عليها من النبات الواحد (Sakaguchi and Kan 1982). أما الإكثار بالبذور فلا يعطي نباتات لها نفس الصفات الموفولوجية والتكنولوجية

.(Tamura *et at*. 1984)

كما أن نسبة الإنبات في بذور نبات الستيفيا منخفضة (Felippe and Lucas1971). لذلك يعتبر إكثار الستيفيا بتقنية إكثار الأنسجة أسرع وأفضل طرق الإكثار الاخرى .(Janarthanam, *et.al*.2009)

وبما إن الستيفيا تعيش برياً في الاراضي الحامضية (Brandle *et al*.1992) لذلك يجب تحديد أفضل درجة حموضة للبيئة الغذائية التي سيتم فيها الإكثار المخبري للنبات. وقد بين (pierik,1997) انه بالرغم من عدم وجود معلومات كافية حول تأثير درجة الحموضة pH على نمو العقل مخبرياً الا ان الـــ pH من 5-6.5 الأفضل للنمو لأن pH أقل من 4,5 أو أكثر من 7 يوقف النمو وتطور النبات.

اما(Gulsen, and Domanoglu, 1991) درسا تأثير مستويات مختلفة من السكر وpH في البيئة الغذائية على معدلات الاكثار ونوعية الشتول على بعض الأنواع النباتية، في حين (Modarres, and jaim, 2003) بينا ان pH بين 4,5-5 يزيد النمو والتجذير لبراعم بعض النباتات. وإن انخفاض pH عن 4 سيؤدي إلى انخفاض امتصاص الايونات في جذورمعظم النباتات (Asher 1978).

وقد قام(Pourvi Jain *et.al.*,2008) بدراسة تأثير زيادة النحاس في بيئة MS على الستيفيا واكتشفوا أن لها تأثير ايجابي في محتوى الكلوروفيل والكتلة الكلية للنبات وهذه الزيادة في محتوى الكلوروفيل ستؤثر على إنتاج الستيفوسايد كما ادت زيادة كبريتات النحاس الى زيادة عدد البراعم لكل نبات وتحسين إكثار العقل الجديدة وكانت النباتات الناتجة جيدة النمو واوراقها خضراء.

المبررات:

أكدت المراجع بأن بيئة MS بدرجة حموضة 5.8 تعتبرمناسبة لإكثار نبات الستيفيا في حين أن بعض المراجع أكدت بأن الوسط المناسب لنمو الستيفيا هو الحامضي الواقع بين(pH 4-5) (David, *et.al*.,2002)

ومن أجل تحديد الحموضة المناسبة وبدقة لابد من إجراء بحث في هذا الاتجاه وذلك لقلة المراجع الخاصة بمحصول الستيفيا.

وحيث إن العناصر المعدنية هي مركبات أساسية في بيئات زراعة الأنسجة وان سرعة نمو النسيج النباتي وتطوره تتأثر بنوع العناصر الغذائية (Niedz and Evens , 2007)

كما أن العديد من الأنواع والأصناف النباتية لا تستجيب جيداً للمستويات التقليدية من العناصر الغذائية باستعمال بيئة MSكبيئة تقليدية وإن تعديل معدلات الهرمونات ليست الآلية الوحيدة للتحكم بعمليات التطور (Ramage and Willams,2002)

هذا وقد تم دراسة تأثير مستويات عالية من النحاس في البيئات الغذائية على أحاديات وثنائيات الفلقة من قبل العديد من الباحثين، وان النحاس عنصر أساسي لعمليات نقل الالكترونات لتفاعلات البروتين المستخدمة في التصنيع الحيوي (Clemens,2001).

كما ان مستويات النحاس في MS تؤثر ايجابيا على تطور محتوى الكلوروبلاست والكلوروفيل وتؤثرعلى كتلة النبات الناتجة

وفي نقل الإلكترون والبروتين والكربوهيدرات وللنحاس دور هام في إكثار النبات (Nieds and Eveus, 2007).

كما أن النحاس والكوبالت يؤثران على اليخضور والتركيب الضوئي وإن الارتباط الايجابي بين تطور ونمو اليخضور وبين التركيب الضوئي ينتج عنه الستيفوسايد فإن زراعة الستيفيا تتأثر بالاصطناع الحيوي للكلوروبلاست(البلاستيدات الخضراء) وهي متعلقة بالكلوروبلاست في الستيفيا لذلك انتاج الاصطناع الحيوي في الكلوروبلاست(البلاستيدات الخضراء) يمكن أن يزداد بزيادة تركيز النحاس في البيئة. (Fujita *et al*., 1981, Furze *et al*., 1991 and Narula *et al*., 2005)

و إن تراكم المواد في خلايا الستيفيا في المخبر وفي الحقل متصل بمدى تطور الكلوروبلاست ومحتوى اليخضور Ladygin *et al*.,2008)).

أهداف البحث

1- دراسة أفضل درجة حموضة pH لبيئة إكثار نبات الستيفيا.

2– دراسة التركيز الأمثل للنحاس في بيئة MS المستخدمة في إكثار نبات الستيفيا.

الطريقة البحثية

مكان تنفيذ البحث:المؤسسة العامة لإكثار البذار– مختبرات زراعة الأنسجة

المادة النباتية: شتول مخبرية من نبات الستيفيا *Stevia rebaudiana* تم إكثارها سابقاً في مختبرات زراعة الأنسجة في بيئة MS

وسط الزراعة: استخدمت بيئة موراشيج وسكوك (Murashige and Skoog 1962) بعد تعديل درجة الحموضة pH فيها ثم عدلت تراكيز كبريتات النحاس وقد وزعت الأوساط الغذائية المذكورة في أنابيب اختبار بطول 20سم وقطر 2.2سم ووزع فيها 10 مل من البيئة ثم تم تغطيتها بالقطن و تعقيمها بجهاز التعقيم بالحرارة الرطبة (اوتوكلاف) على درجة حرارة 121درجة مئوية وضغط 1 بار وزمن 20 دقيقة

الصورة رقم ١. توضح زراعة العقل ضمن جهاز العزل

ولقد أجري البحث على مرحلتين (تجربتين):

- **التجربة الاولى:** تم اختيار أفضل وسط حامضي pH للبيئة المدروسة للاكثار.
- **التجربة الثانية:** تم اختيار أفضل تركيز من مادة كبريتات النحاس في افضل بيئة من التجربة الاولى وذلك نظراً لان الحموضة تزيد من امتصاص العناصر المعدنية مما يظهر اثار نقص العناصر ومنها النحاس على النبات لذا كان لابد من اجراء التجربة الثانية.

أي أن البحث قسم الى تجربتين الاولى لتحديد درجة الحموضة pH و الثانية لتحديد أفضل تركيز لكبريتات النحاس

التجربة الاولى: دراسة تأثير درجة الحموضة pH في البيئة

الزراعة التأسيسية: أخذت شتول مخبرية من نبات الستيفيا والموجودة في مختبرات زراعة الأنسجة وزرعت ضمن بيئة MS بعد تعديل درجة الحموضة pH إلى عدة مستويات المستوى الأول pH تساوي 5.8 كشاهد و5.5 ,5 , .5 ,4 وقد كان تركيز السكر في كل البيئات 30 غ/ل و5.5 اجار/ل وقد تمت الزراعة ضمن جهاز العزل كما في الصورة رقم(١)حيث زرعت العقل الناتجة من الشتول المخبرية بعد استبعاد القمة وزرعت ضمن البيئات المذكورة وبمعدل 4 مكررات لكل بيئة وحضنت على درجة حرارة 25 درجة مئوية وبمعدل 16 ساعة إنارة و8 ساعات ظلام وإضاءة 3000 لوكس.

الإكثار: تم إكثار الشتول المخبرية على البيئات المذكورة وبعدد أربعة مكررات لكل بيئة وسجلت القراءات بعد أربعة أسابيع من الزراعة المخبرية والصورة رقم(2) تبين الشتول قبل تسجيل القراءات لكل المعاملات في التجربة الاولى وكانت الصفات المدروسة هي

الصورة رقم ٢. يبين الشتول قبل تسجيل القراءات في تجربة pH

عدد الافرع وطولها وعدد الجذور وطولها لاقرب سم بواسطة المسطرة. واما عن دراسة درجة الحموضة pH : يبين الجدول رقم (1) تأثير pH على الصفات المدروسة.

التحليل الإحصائي: استخدم برنامج التحليل الإحصائي MSTAT لتحليل بيانات البحث الذي صمم بالتصميم العشوائي الكامل وطبق تحليل التباين NOVA على تلك البيانات كما قورنت المتوسطات باستخدام طريقة أقل فرق معنوي (LSD 1%).

النتائج ومناقشتها

يبين الجدول رقم (1) نتائج التحليل الإحصائي لتجربة تعديل درجات الحموضة ودراسة الصفات:

–طول الأفرع: يتبين من جدول التحليل بأن البيئة ذات درجة الحموضة 4.5 تفوقت وبفارق معنوي ($p<0.01$) بهذه الصفة على كافة البيئات الأخرى وأعطت متوسط طول أفرع 8سم وهذا يتوافق مع (Modarres and jaim 2003) والذي بين أن ال pH 4.5-5 يزيد النمو والتجذير لبراعم النبات. والصورة رقم (٣) توضح النمو الجيد في بيئة MSpH 4.5، وتلاها البيئة ذات درجة الحموضة4 وكان متوسط طول الأفرع 7,1سم وإن هذا الانخفاض يتوافق مع (Pierik,1997) الذي أكد بأن انخفاض درجة الحموضة عن 4,5 يؤدي إلى توقف نمو وتطور النبات معمليا.

وتؤكد نتائج البحث ما ذكره Anderson .1975, Skirvin.) (1981 ان بعض الأنواع النباتية والتي تنمو في الاراضي الحامضية فإنها تنمو بشكل افضل في البيئة عند pH 4.5.

الصورة ٣. توضح النمو الجيد في بيئة MSpH 4.5

–عدد الأفرع: نلاحظ من جدول التحليل الإحصائي رقم (1) بأنه لا توجد فروق معنوية في هذه الصفة بين كافة البيئات إلا ان النباتات ذات درجة الحموضة(4,5-5,5- 5,8)تساوت فيما بينها وبمتوسط عدد أفرع(2,5) وتفوقت وبدون فروق معنوية على البيئات الاخرى مع ملاحظة أن أقل عدد أفرع كان في البيئة ذات درجة الحموضة4 وكان عدد الأفرع1,75 مما يتوافق مع (Pierik,1997) والذي اكد بان انخفاض pH عن 4.5 يؤدي الى توقف نمو النبات.

–عدد الجذور: يلاحظ بأن البيئة التي أعطت أكبر متوسط لعدد الجذور هي البيئة ذات درجة الحموضة 5,5 وبعدد جذور قدره 8,25 متفوقة وبفرق معنوي على بيئة الشاهد والبيئة الأقل درجة حموضة(4) وهذا يتوافق مع أبحاث(Pierik,1997) الذي بين أن pH البيئة بين(5-6,5) هو الأفضل لنمو وتطور النبات. مع ملاحظة بأنه لم تكن هناك فروق معنوية في متوسط عدد الجذور بين النباتات المزروعة في البيئات MSpH4.5, MSpH5, MSpH5.5 .

–طول الجذور: يلاحظ من النتائج في الجدول رقم (1) بأن متوسط طول الجذور كان الأعلى عند النباتات المزروعة في بيئة MSpH4.5 و قد تفوقت البيئة وبفروق معنوية على النباتات الناتجة عن الزراعة في بيئة الشاهد والبيئة MSpH5.5 كما أنها تفوقت وبدون فروق معنوية وبدون فروق معنوية على النباتات المزروعة في البيئةMSpH5 ولكنها تساوت في طول الجذور مع نباتات البيئة MSpH4 وبطول 2,3سم وهذا ما أكده (Davi.1969, and Davi *et al*2002)

جدول١. تأثير pH وسط الزراعة على طول الأفرع(سم) وعدد الأفرع وطول الجذور وعددها

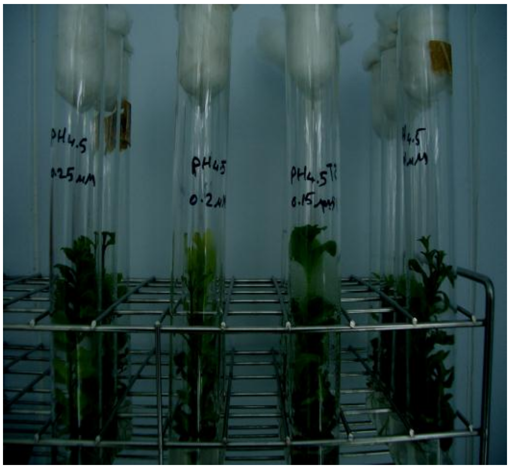
pH	متوسط طول الأفر ع (سم)	متوسط عدد الأفر ع	متوسط عدد الجذور	متوسط طول الجذور (سم)
MSpH5.8	5.68c	2.5 a	6.0 bc	1.8ab
MSpH 5.5	6.0 c	2.5 a	8.25 a	1.65 b
MSpH 5	6.58 bc	2.25 a	7.5 ab	2.13 ab
MSpH 4.5	8.0 a	2.5 a	7.0 ab	2.3 a
MSpH 4.O	7.1 b	1.75 a	6.25 b	2.3 a
L.S.D.= 0.01	0.83	1.07	1.33	0.57

والذي بين بأن الوسط المناسب لنمو نبات الستيفيا هو الحامضي الواقع بين (4-5) وتطابقت هذه النتيجة مع ماتوصل إليه (Brandle *et.al.*1998) الذي أكد بأن الستيفيا تنمو برياً في الاراضي الحامضية. كما ان (Zatkyo and Molnar1986) بينا ان البيئة الحامضية تساعد على نمو الجذور وانه يوجد ارتباط بين درجة حموضة البيئة وبين نمو الجذور حيث تعمل الاوكسينات في الاوساط الحامضية

التجربة الثانية دراسة تركيز كبريتات النحاس:

نتيجة ظهور أعراض نقص النحاس على الشتلات الناتجة في المخبر، فقد درس تعديل تركيز كبريتات النحاس على أفضل بيئة وهي pH4.5 واستخدمت التراكيز التالية

0.10 µM–0.15 µM–0.20 µM– 0.25 µM وسجلت القراءات بعد أربعة أسابيع من الزراعة المخبرية والصورة رقم(٣) تبين الشتول قبل تسجيل القراءات



الصورة رقم ٣. تبين الشتلات قبل تسجيل القراءات في تجربة كبريتات النحاس

التحليل الإحصائي:

حللت النتائج وفق برنامج MSTST وسجلت فروقاً معنوية على مستوى1% وذلك وفق الجدول رقم (2)

المناقشـــة

يلاحظ من الجدول رقم (2) ما يلي:

- طول الافرع: قد تأثرت معنوياً باضافة كبريتات النحاس اذ كان التفوق واضحاً لبيئةµM 0.15 وبقراءة 8.75 على بيئة 0.20 µM والتي قراءتها 8.25 ولكن بدون فرق معنوي مع بيئة 0.10 µM وقراءتها8 وهي بيئة الشاهد أما بيئة 0.25 µM وبقراءة 7.18 فكانت في المرتبة الأخيرة والتي اختلفت معنوياً عن بيئة 0.15 µM ويستدل من هذه النتيجة ان اضافة كبريتات النحاس الى البيئة يجب ان يكون بين 0.15 µM – 0.20 µM

–عدد الأفرع: لم يلاحظ أي فرق معنوي بين التركيزات الأربعة المدروسة بالرغم من تفوق بيئة 0.15 µM على كل البيئات وبقراءة 3.25

–عدد الجذور: تفوقت بيئة 0.15 µM وبقراءة 8 ولكن بدون فرق معنوي مع بيئة 0.20 µM والتي قراءتها 7.8 وبيئة 0.10 µM وقراءتها 7 وكانت بيئة 0.25 µM في المرتبة الأخيرة بقراءة 6.25 والتي اختلفت معنوياً $p<0.01$ عن بيئة 0.15 µM

– طول الجذور: لم يلاحظ أي فرق معنوي بين التركيزات الاربع وكان ترتيب البيئات في صفة طول الجذور ,0.25 µM, 0.15 µM 0.10 µM, 0.20 µM وبقراءة(2.45 –2.3 –2.25–2.1) على التوالي

ان نتائج هذه الدراسة تتطابق مع ما ذكر كل من (Fujita *et al.*,1981, Furze *et al*., 1991 Narula *et al*., 2005) الذي

جدول٢. تأثير مستويات مختلفة لكبريتات النحاس على طول الأفرع (سم) وعددها وعدد الجذور وطولها (سم) في الزراعة المخبرية لنبات الستيفيا

كبريتات النحاس	طول الأفرع سم	عدد الأفرع	عدد الجذور	طول الجذور (سم)
0.10 µM	8.0 ab	2.5 a	7.0 ab	2.3 a
0.15 µM	8.75 a	3.25 a	8.0 a	2.25 a
0.20 µM	8.25ab	2.5 a	7.8 ab	2.45 a
0.25 µM	7.18 b	2.25 a	6.25 b	2.1 a
LSD = 0.01	1.31	1.39	1.2	0.42

درس انتاج الاصطناع الحيوي في الكلوروبلاست(البلاستيدات الخضراء) وزيادته بزيادة تركيز النحاس في البيئة.

كما ان(Pourvi Jain *et.al.*,2008) اكد تأثير زيادة النحاس في بيئة MS على الستيفيا وتأثيرها الايجابي في محتوى الكلوروفيل والكتلة الكلية للنبات وزيادة عدد البراعم للنبات وتحسين اكثار العقل الجديدة ونمو النباتات الناتجة بشكل افضل.

النتائج و المقترحات:

١- استعمال بيئة MS بعد تعديل درجة الحموضة إلى 4.5 في بيئات اكثار نبات الستيفيا.

٢- استخدام تراكيز كبريتات النحاس 0.15µM في بيئات اكثار نبات الستيفيا.

٣- عدم استخدام البيئات المضاف إليها هرمونات لإكثار نبات الستيفيا لأنها تتطلب استخدام عدة بيئات لانتاج الشتلة الواحدة.

٤- ان اضافة الهرمونات الى بيئات اكثار نبات الستيفيا قد يؤدي لحدوث طفرات في الاجيال اللاحقة لذلك ينصح بعدم باستخدامها.

المـــراجـــع

:Ahmed M.B., M. Salahin, R. Karim, M. A. Razvy, M. M. Hannan, R. Sultana, M. Hossain and R. Islam (2007) American Eurasian Journal of Scientific Research IDOSI Publications,2(2):121-125

Anderson W.C. (1975) Propagation of rhododendrons by tissue culture. I. Development of a culture medium for multiplication of shoots. Comb. Proc. Int. Plant Prop. Soc. 25, 129-135.

Asher C.J. (1978) Natural and synthetic culture media for spermatophytes. pp. 575-609 in Recheige M. Jr. (ed.). CRC *Handbook Series in Nutrition and Food*. Section G., *Culture Media and Food Supplements. Diets* Vol *3*

Brandle, J.E.; A. N. Starratt,; and M. Gijzen, (1998)"Stevia rebaudiana: Its biological, chemical and agricultural properties." Canadian Journal of Plant Science. 78, pp 527-536.

Brandle, J.E and N. Rosa.(1992).Heritability for yield leaf stem ratio and stevioside content estimated from landrace cultivar of *Stevia rebaudiana* Can.J.Plant Sci.,72:1263-1266

Clemens, S., (2001) .Molecular mechanism of plant metal tolerance and homeostasis. Planta 212, 475–486.

David J; mid more and Andrew H Rank August (2002). A new rural industry Stevia To replace imported chemical sweeteners A report forth Rural Industries Research And Development Corporation

David R (1996) *Stevia rebaudiana*, Natures sweet secret. Published by Blue Heron Press. P. O. BOX 544 Bloomingdale, IL 60108.pp 56.

Felippe G.M. and N.M.C. Lucas, (1971) Estudo da viabilidade dos fructos de Stevia rebaudiana Bert, Hoehnea 1, pp. 95–105.

Felippe, G.M., (1978) Stevia rebaudiana, a review. [Portuguese].Journal of Chromatography,(1978)

Ferreira, C.M. and W.Handro, (1988). Micropropagation of Stevia Rebaudiana through leaf explants from adult plants. Planta Medica, 54:157-160.

Fujita, Y., Y. Hara, C. Suga, T. Morimoto, (1981). Production of shikonin derivatives by cell suspension culture of Lithospermum erythrorhizon II. A new medium for the production of shikonin derivatives. Plant Cell Rep.1, 61-63.

Furze, J.M., M.J.C. Rhodes, A.J. Parr, J. Robins, I.M. Whitehead, D.R. Threlfall, (1991). Abiotic factors elicit sesquiter penoid phytoalexin production but not alkaloid production in transformed roots of Datura Stramonium. Plant Cell Rep.10, 111–114.

Gulsen Y. and H**.** Domanoglu (1991). The effect of sucrose, agar and pH on shoot multiplication and quality in Quince A micro propagation. Acta Horticulture 289:115-116.

Janarthanam B., M. Gopalakrishnan, Sai G Lakshmi, and T. Sekar (2009) Plant Tissue Cult. & Biotech. 19(2): 133-141.

Ladygin, V.G.; N.I.Bondarev, G.A., Semenova, A.A Smolov, O.V. Reshetnyav and A.M Nosov. (2008).Chloroplast ultrastructure, photosynthetic apparatus activities and production of steviol glycosides in Stevia rebaudiana in vivo and in vitro. Biol. Plant. 52, 9–16.

Modarres S.A.M. and M.M. Jami (2003) Plant Tissue Culture 13(2):151-154

Murashige,T., and F.Skoog, (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant 15, 473–497.

Narula, A., S.Kumar and P.S Srivastava. (2005). Abiotic metal stress enhances diosgenin yield in Dioscorea bulbifera L.cultures.Plant Cell Rep.24, 250-254.

Niedz, R.P., and T.J. Evens, (2007). Regulating plant tissue growth by mineral nutrition. In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant 43, 370–381.

Pierik R.L.M. (1997) *In Vitro Culture of Higher Plants.* Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands.

Pourvi Jain, S.L. Sumita Kachhwaha, and a,b Kothari (2008) Improved micropropagation protocol and enhancement in biomass and chlorophyll content in Stevia rebaudiana (Bert.) Bertoni by using high copper levels in the culture medium. Scientia Horticulturae 119 ,315–319

Ramage,C.M., and R.R. Willams, ,(2002). Mineral nutrition and plant morphogenesis. In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant. 38, 116–124.

Ramesh K.,Singh Virendra and NW W. Megeji (2006) Cultivation of stevia rebaudiana a comprehensive review91:NO1 P.P1-27

Sakaguchi, M. and T. Kan, (1982) Japanese researches on stevia rebaudiana Bertoni and stevoside .Ci Cult.,34:235-248

Skirvin R.M. (1981) Fruit crops. in Conger B.V. (ed.) *Cloning Agricultural Plants via In Vitro Techniques.*CRC Press, Inc., Boca Raton,Florida pp. 51-139

Soejarto, D.D.; C. Compardre, P.J. Medon, S.K. Kamath, and A.D. kinghorn, (1983) Potencial sweeting agents of plant origin.2.Field research for sweet-tasting stevia species.Economic Botany, 37:71-75

Stauss,S (1995).The perfect sweetener? Technol. Rev.98:18-20

Tamura, Y., S. H. Nakamura, Fukui and M.Tabata.(1984).Clonal propagation of Stevia rebaudiana Bertoni by stem tip culture plant cell rep. 3:183-185

Zatyko J.M. and I. Molnar (1986) Adventitious root formation of different fruit species influenced by the pH of medium. In Abstracts VI Intl. Cong. Plant Tissue & Cell Culture. Minneapolis, Minn. p. 29

ABSTRACT

Study the Effect of Ph Degree and Concentration of Copper Sulphate on *Stevia rebaudiana* Which Propagated in Vitro

Omar A.A. and Barakat A.

This research was conducted on *Stevia rebaudiana* which propagated in vitro to study the effect of pH on propagation, plant growth, rooting and to determine the optimum pH of the media.

The research aimed to determine the concentration of copper sulphate in the media after determining the best pH.

MS media (Murashige and Skoog, 1962) was used in all stages of the experiment and different pH (4, 4.5, 5, 5.5, and 5.8), in the second experiment used different concentrations of copper sulphate (0.10 µM, 0.15 µM ،0.20 µM and 0.25 µM), all the media were without hormones, the best media for the propagation, growth and rooting *stevia rebaudiana* was MS pH 4.5.

Statistical analysis showed statistically significant superiority to the recipe the long of branches in MS pH4.5 the average of length was 8 cm also outperformed in the average number of branches and average length of roots. The study also demonstrated that the best concentration of copper sulphate in the media MSpH4.5 was 0.15 µM and statistical analysis showed that this concentration in the recipe the long and the number of branches and the number of roots at all concentrations has been shown that plant growth in MSpH4.5 and 0.15 µM concentration of copper sulphate was the best in all studied media that we get. The whole plant is ready for transfer and hardening in the greenhouse after 30 days of in vitro cultivation. All readings were recorded for both experiments after four weeks of in vitro cultivation in test tubes.

KEY WORDS: STEVA – MS – pH – CuSO