

واکنش رشد و عملکرد گیاه دارویی استویا (*Stevia rebaudiana* Bertoni) به فاصله کاشت و زمان برداشت

لیلا تبریزی^{۱*}، علیرضا زواری^۲ و داراب یزدانی^۳

۱ و ۲. استادیار و دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه مهندسی علوم باغبانی و فضای سبز، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه

تهران، کرج، ایران

۳. دانشیار، گروه فارماکوتوزی و داروسازی، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی، تهران، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۰/۲۱ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۳/۲۲)

چکیده

به منظور بررسی تأثیر سطوح مختلف فاصله کاشت (۲۰، ۲۵، ۳۰ و ۳۵×۵۰ سانتی متر) و زمان برداشت (۲۶ مرداد و ۲۶ شهریورماه) بر ویژگی‌های رشد و عملکرد کمی و کیفی گیاه دارویی استویا (*Stevia rebaudiana* Bertoni)، آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار در ایستگاه تحقیقات گروه مهندسی علوم باغبانی و فضای سبز دانشگاه تهران در سال زراعی ۹۳-۱۳۹۲ انجام شد. نتایج نشان داد تأثیر فاصله کاشت بر بیشتر صفات به جز ارتفاع گیاه، نسبت وزن برگ به ساقه و میزان سبزینه (کلروفیل)ها معنی‌دار بود. با کاهش فاصله کاشت از ۳۵×۵۰ به ۲۰×۵۰، وزن خشک اندام‌های هوایی و برگ، عملکرد استویوزید و ربودیوزید A افزایش یافت. همچنین، تأثیر زمان برداشت بر همه صفات به جز میزان سبزینه‌ها معنی‌دار بود. بیشترین ارتفاع گیاه و قطر تاج پوشش، وزن خشک اندام‌های هوایی، عملکرد استویوزید و ربودیوزید A در برداشت ۲۶ شهریور و بیشترین نسبت برگ به ساقه در برداشت ۲۶ مرداد بود. اثر متقابل تنها بر صفت وزن خشک برگ معنی‌دار بود و بیشترین وزن خشک برگ در برداشت ۲۶ شهریور و فاصله کشت ۲۰ و ۵۰×۲۵ به دست آمد. صفت میزان سبزینه‌ها تحت تأثیر هیچ‌یک از تیمارها قرار نگرفت. به‌طور کلی می‌توان گفت فاصله کشت ۲۰ و ۵۰×۲۵ سانتی متر و برداشت گیاه در ۲۶ شهریورماه نسبت به دیگر تیمارها در منطقه مورد بررسی در کرج، نتیجه بهتری برای کشت و استقرار استویا داشته است.

واژه‌های کلیدی: استویوزید، تراکم بوته، ربودیوزید A، گیاه دارویی.

Response of growth and yield of *Stevia (Stevia rebaudiana Bertoni)* to planting space and harvesting time

Leyla Tabrizi^{1*}, Ali Reza Zavvari² and Darab Yazdani³

1, 2. Assistant Professors and M. Sc. Student, University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

3. Associate Professor, Department of Pharmacognosy and Pharmaceutic, Institute of Medicinal Plants, ACECR, Tehran, Iran
(Received: Jan. 11, 2016 - Accepted: Jun. 11, 2016)

ABSTRACT

In order to investigate the effect of harvesting time (17 August and 17 September) and planting space (20, 25, 30 and 35 × 50 cm) on growth criteria, quantitative and qualitative yield of *Stevia rebaudiana* Bertoni, a factorial experiment based on randomized complete block design with three replications was carried out in Research Station of Department of Horticultural Science and Landscape Engineering, University of Tehran during years of 2013-2014. Based on results, planting space significantly affected the most measured traits except plant height, leaf to stem ratio and chlorophyll content. By decreasing of planting space from 35×50 to 20×50 cm, fresh and dry weight of the aerial part and leaf and yield of Stevioside and Rebaudioside A were increased. Also, harvesting time significantly affected the measured traits except chlorophyll content in which the highest plant height and diameter, fresh and dry weight of the aerial part and yield of Stevioside and Rebaudioside A were obtained at 17 September. Harvesting at 17 August caused the highest leaf to stem ratio. The interaction effect of planting space and harvesting time significantly affected leaf dry weight in which the highest leaf dry weight obtained by the planting space 20×50 cm and 25×50 cm at 17 September. There was no significant effect on chlorophyll content. In general, based on these results, planting space of 20 and 25 × 50 cm and harvesting time at 17 September compared to other treatments pronounced better for cultivation of *Stevia* in studied area of Karaj.

Keywords: Medicinal plant, plant density, rebaudioside A, stevioside.

* Corresponding author E-mail: L.tabrizi@ut.ac.ir

مقدمه

گیاه دارویی استویا با نام علمی *Stevia rebaudiana* Bertoni متعلق به تیره کاسنی (Asteraceae) بومی پاراگوئه و برزیل بوده و در ارتفاع ۲۰۰ تا ۵۰۰ متری از سطح دریا می‌روید. برگ‌های استویا مجموعه‌ای از گلیکوزیدهای دی‌ترین با عنوان گلیکوزیدهای استویول دارند. استویوزید یکی از اصلی‌ترین گلیکوزیدهای موجود در این گیاه است که ۱۱۰ تا ۲۷۰ بار شیرین‌تر از ساکاروز است. گلیکوزیدهای موجود در این گیاه جذب بدن نمی‌شوند و بدون کالری هستند (Brandle & Rosa, 1992; Yadav *et al.*, 2011;) (Tavarini & Angelini, 2013) بنابراین، این گیاه برای مبتلایان دیابت نوع دو و افرادی که از اضافه‌وزن و چاقی رنج می‌برند، سودمند است (Mohd-Radzman *et al.*, 2013). همچنین این گیاه خواص پادکسندگی (آنتی‌اکسیدانی) و ضد فشارخون (Tadhani *et al.*, 2007)، مواد ضد سرطان و ضدالتهاب دارد (Mohd-Radzman *et al.*, 2013).

بیش از صد ترکیب در برگ‌های گیاه استویا شناسایی شده است که بهترین و شناخته‌شده‌ترین آن‌ها استویوزید و ربودیوزید A است (Kennelly, 2002). عملکرد و غلظت گلیکوزیدهای استویول این گیاه در قسمت‌های مختلف آن به‌طور شایان‌توجهی تحت تأثیر شرایط محیطی تجمع می‌یابد، به‌طوری‌که گلیکوزیدهای استویول همبستگی و رابطه مستقیمی با وزن خشک برگ‌ها دارد (Bondarev *et al.*, 2001). عامل‌های زراعی چندی مانند فاصله کاشت و زمان برداشت نقش مهمی در بهینه‌سازی عملکرد استویوزید بازی می‌کنند (Ramesh *et al.*, 2006). بنابراین رشد گیاه در شرایط روزهای بلند فرصت کافی برای افزایش زیست‌توده و عملکرد گلیکوزیدهای استویول، فراهم می‌کنند، تراکم مطلوب بوته، تراکمی است که در نتیجه آن همه عامل‌های محیطی (آب، نور، مواد غذایی و خاک) به‌طور کامل مورد استفاده گیاه قرار گرفته و درعین‌حال رقابت‌های درون بوته‌ای و بین بوته‌ای در کمینه باشند تا بیشینه عملکرد به دست آید (Ghanbari & Taheri, 2002). از آنجاکه تراکم مطلوب برای یک محصول به‌طور شایان‌توجهی بسته

به شرایط آب و هوایی منطقه در حال رشد و وضعیت خاک متفاوت است، بنابراین لازم است برای انتخاب یک تراکم مطلوب در هر منطقه تحقیقات لازم صورت گیرد (Jamshidi, 1999). تعیین تراکم مناسب به‌منظور بهره‌وری مطلوب از انرژی تابشی، رطوبت و مواد غذایی موجود در خاک و افزایش کارایی مصرف آب برای دستیابی به عملکرد بالاتر الزامی است (Jovicich *et al.*, 1999).

مهم‌ترین مرحله پدیدشناختی (فنولوژی) که محتوای گلیکوزیدهای استویول را تحت تأثیر قرار می‌دهد، گلدهی است، که خود از طول روز و دما متأثر است و بهترین زمان برداشت نیز که تجمع گلیکوزیدهای استویول به اوج خود می‌رسد، آغاز گلدهی است (Serfaty *et al.*, 2013). باید در نظر داشت که عامل‌های دیگری مانند تنوع رقم‌ها، دما، میزان تابش نور و مواد مغذی در دسترس می‌توانند غلظت گلیکوزید استویوزید موجود در برگ را تحت تأثیر قرار دهند (Mizukami *et al.*, 1983; Ermakov & Kochetov, 1996; Bondarev *et al.*, 2003). تغییرپذیری‌های فصلی به‌طور شایان‌توجهی محتوای استویوزید را تحت تأثیر قرار می‌دهند (Naser *et al.*, 2013) که بنابر گزارش (Ceunen & Geuns, 2013) *al.* (2001) بیشترین عملکرد استویوزید در برداشت تابستان نسبت به برداشت فصل زمستان بود. نتایج تحقیقات Serfaty *et al.* (2013) برای زمان برداشت فاصله کاشت استویا نشان داد، بیشترین عملکرد گلیکوزید استویوزید و عملکرد اندام‌های رویشی در هنگام پیش از گلدهی تا آغاز ماه شهریور (سپتامبر) و تراکم ده بوته در مترمربع است. همچنین Megeji *et al.* (2005) با مقایسه دو زمان مختلف برداشت (خرداد-تیر و شهریور-مهر) گیاه استویا گزارش کردند، بهترین زمان برداشت در زمان شهریور-مهر ماه (سپتامبر) است به‌طوری‌که بالاترین وزن خشک و تر گیاه در این زمان به دست آمد. کشت و استقرار استویا در استان البرز، نیاز به بررسی جامع اثرگذاری محیطی و شرایط رشد گیاه دارد. این تحقیق برای بررسی تأثیر سطوح مختلف فاصله کاشت و زمان برداشت بر ویژگی‌های کمی و کیفی گیاه دارویی استویا در منطقه کرج صورت گرفت.

شامل ارتفاع گیاه و قطر تاج پوشش، وزن تر و خشک بوته، وزن خشک برگ، نسبت برگ به ساقه، میزان سبزینه‌ها، میزان و عملکرد استویوزید و ربودیوزید A بودند.

اندازه‌گیری گلیکوزیدهای ربودیوزید A و استویوزید
روش عصاره‌گیری بر پایه گزارش Kolb *et al.* (2001) و اندازه‌گیری گلیکوزیدهای استویا بر پایه گزارش Woelwer-Rieck (2010) صورت گرفت. در آغاز برگ‌های شش نمونه خشک‌شده مربوط به هر تیمار، پس از جدا شدن با آسیاب پودر شدند و در نهایت به نسبت‌های یکسان با هم مخلوط شده و یک نمونه به آزمایشگاه فیتوشیمی پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی برای تجزیه و تحلیل فرستاده شد. برای عصاره‌گیری در آغاز میزان ۰/۵ گرم از پودر برگ خشک گیاه برداشته و در میزان ۵۰ میلی‌لیتر حلال اتانول ۷۰ درصد، در دمای ۷۰ درجه سلسیوس و به مدت ۳۰ دقیقه با دور ۱۴۵ دور در دقیقه استخراج انجام گرفت. پس از آن محلول با کاغذ صافی واتمن یک صاف شد، در ادامه محلول استخراج‌شده از پالایشگر (فیلتر) سرنگ ۰/۲ μm عبور داده شد تا مواد جامد و زائد موجود در آن گرفته شود. برای فام‌نگاری (کروماتوگرافی) گلیکوزیدهای استویول از فام‌نگاری مایع با کارایی بالا (HPLC) مدل Knaure 1001 ساخت کشور آلمان با ستون NH₂ (250×4.6 mm, 5μ) و آشکارساز (دتکتور) UV-2501 استفاده شد، در ادامه استاندارد Rebaudioside A با رقت ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دستگاه تزریق شد و با توجه به سطح زیر نقطه اوج (پیک) منحنی به دست آمده درصد مقادیر دیگر گلیکوزیدهای مورد نظر در گیاه بنا بر روش زیر محاسبه شدند. توجه شود که میزان غلظت گلیکوزیدهای اندازه‌گیری شده بر پایه درصد آن ماده در وزن خشک برگ است (شکل ۱).

$$\% \text{ Rebaudioside A} = \left[\frac{Ws}{W} \right] \times \left[\frac{Aa}{As} \right] \times 100$$

$$\% \text{ Stevioside} = \left[\frac{Ws}{W} \right] \times Ast \times \left[\frac{0.83}{As} \right] \times 100$$

Ws = میزان وزن استاندارد rebaudioside A (برحسب میلی‌گرم) در محلول استاندارد.

مواد و روش‌ها

این آزمایش در سال زراعی ۹۳-۱۳۹۲ به صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار در ایستگاه تحقیقات گروه مهندسی علوم باغبانی و فضای سبز دانشگاه تهران واقع در منطقه محمد شهر کرج به مرحله اجرا درآمد. منطقه آزمایش در طول جغرافیایی ۵۹ درجه شرقی و ۳۸ دقیقه شمالی و عرض جغرافیایی ۳۶ درجه و ۱۹ دقیقه شمالی و ارتفاع ۱۳۲۰ متر از سطح دریا واقع شده است. میانگین بارندگی سالانه منطقه آزمایش در حدود ۲۵۰ میلی‌متر و میانگین دمای بیشینه و کمینه آن به ترتیب ۲۲/۴ و ۹/۴ بود (IRIMO, 2014). تیمارهای آزمایشی شامل عامل تراکم (D) بر پایه فاصله روی ردیف کاشت در چهار سطح ۲۰ (D1)، ۲۵ (D2)، ۳۰ (D3) و ۳۵ سانتی‌متر (D4) و زمان برداشت (H) در دو سطح ۲۶ مرداد (H1) و ۲۶ شهریور (H2) در نظر گرفته شدند. گیاهان به صورت قلمه‌های ریشه‌دار در اواخر اردیبهشت‌ماه در ۲۴ کرت در سه تکرار و فاصله ۱ متر بین تکرارها کاشته شدند. ابعاد هر کرت آزمایشی ۲/۵×۲ متر و شامل چهار ردیف کشت بود. در این تحقیق فاصله بین ردیف‌ها بر پایه توصیه منابع معتبر ۵۰ سانتی‌متر در نظر گرفته شد (Taleie *et al.*, 2012). آبیاری به روش قطره‌ای با نوارهای مخصوص با قطره‌چکان‌هایی به فاصله ۳۰ سانتی‌متر دو بار در هفته و در شرایط هوای گرم سه بار در هفته صورت گرفت. کنترل علف‌های هرز با وجین دستی در فصل رشد صورت گرفت. از آنجاکه بیشترین میزان تجمع گلیکوزیدها در اندام‌های رویشی این گیاه در مرحله پیش از آغاز گلدهی است (Serfaty *et al.*, 2013) با توجه به تیمار زمان برداشت پس از حذف اثر حاشیه‌ای (انتخاب شش بوته از هر کرت) از ارتفاع حدود ۵ تا ۱۰ سانتی‌متری بالاتر از سطح خاک برداشت و در سایه و دمای محیط خشک شدند (Donalizio *et al.*, 1982). اندازه‌گیری سبزینه کلروفیل) گیاه با سبزینه‌متر دستی (SPAD 502 DL, MINOLTA) پیش از برداشت گیاه با توجه به تیمار زمان برداشت اندازه‌گیری شد. صفات مورد اندازه‌گیری

تجزیه و تحلیل داده‌ها

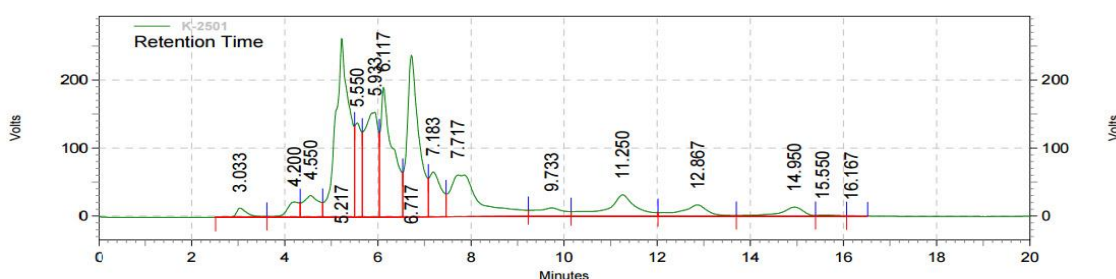
داده‌های به دست آمده از آزمایش بر پایه طرح آماری مورد استفاده، با استفاده از نرم افزار SAS تجزیه و تحلیل شدند و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد صورت گرفت. برای رسم نمودارها از نرم افزار اکسل استفاده شد.

W = میزان وزن نمونه

As = سطح زیر نقطه اوج منحنی استاندارد rebaudioside A

Aa = سطح زیر نقطه اوج منحنی rebaudioside A در نمونه مجهول

Ast = سطح زیر نقطه اوج منحنی stevioside در نمونه مجهول



شکل ۱. فام‌نگاری عصاره هیدروالکلی برگ خشک گیاه استویا

Figure 1. Chromatogram of hydroalcoholic extract of the dry leaves of stevia

(جدول ۲)، به طوری که بیشترین قطر تاج پوشش در فاصله کاشت ۳۵×۵۰ (۳۳/۱ سانتی‌متر) و کمترین میزان قطر تاج پوشش در فاصله کاشت ۲۰×۵۰ (۲۷/۵ سانتی‌متر) مشاهده شد به طوری که با کاهش فاصله روی ردیف گیاهان از ۳۵ سانتی‌متر به ۲۰ سانتی‌متر قطر گیاهان حدود ۱۷ درصد کاهش می‌یابد (جدول ۴). تأثیر زمان برداشت روی قطر تاج پوشش نشان داد، بیشترین میزان قطر تاج پوشش در زمان برداشت ۲۶ شهریورماه (۳۳/۲ سانتی‌متر) و کمترین قطر تاج پوشش در زمان برداشت ۲۶ مردادماه (۲۸/۳ سانتی‌متر) مشاهده شد به طوری که قطر تاج پوشش در زمان برداشت ۲۶ شهریورماه ۱/۱۷ برابر بیشتر از زمان برداشت ۲۶ مردادماه بود (جدول ۳).

نتایج

نتایج تجزیه واریانس داده‌های مربوط به ارتفاع بوته نشان داد، عامل تراکم روی ارتفاع بوته تأثیر معنی‌داری نداشت. در حالی که زمان برداشت ارتفاع بوته را به طور معنی‌داری تحت تأثیر قرار داد ($P < 0.01$) (جدول ۲) به طوری که بیشترین میزان ارتفاع بوته در زمان برداشت ۲۶ شهریورماه و کمترین آن در برداشت ۲۶ مردادماه به دست آمد، بنا بر نتایج ارتفاع گیاهان در هنگام برداشت ۲۶ شهریور حدود ۱/۶ برابر بیشتر از ارتفاع گیاهان در زمان برداشت ۲۶ مرداد بود (جدول ۳). تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد، تأثیر فاصله کاشت و زمان برداشت روی قطر تاج پوشش به ترتیب در سطح ۵ و ۱ درصد معنی‌دار بود

جدول ۲. نتایج تجزیه واریانس تأثیر سطوح فاصله کاشت و زمان برداشت بر ویژگی‌های رویشی گیاه استویا

Table 2. Analysis of variance of harvesting time and planting space on growth characteristics of stevia

Sources of variation	df	Mean squares						
		Plant height	Canopy diameter	Herbal Fresh weight	Herbal dry weight	Leaf dry weight	Leaf to stem ratio	Chlorophyll content
Replication	2	801.7**	44.2 ^{ns}	39047077.7**	275722.8**	53400.3**	0.2**	2.5 ^{ns}
Harvesting time (H)	1	5462**	129.9**	22086347.6**	1647822.8**	301784.4**	0.9**	0.5 ^{ns}
Planting space (S)	3	17.9 ^{ns}	33.7*	1036240.9*	59013.1**	15599.3**	0.1 ^{ns}	5 ^{ns}
S × H	3	32.1 ^{ns}	26.1 ^{ns}	712627.9 ^{ns}	35065.8 ^{ns}	8406.5**	0.1 ^{ns}	3.6 ^{ns}
Error	16	16.1	5.5	245966.2	9156.7	1514.6	0.0	1.1

*, **, ns: به ترتیب معنی‌داری در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد و عدم معنی‌داری است.

*, **, ns: significant at 5% and 1% probability levels and non-significant, respectively.

جدول ۳. تأثیر زمان برداشت بر صفات رویشی استویا

Table 3. Effect of harvesting time on growth characteristics of stevia

Harvesting time	Plant height (cm)	Canopy diameter (cm)	Fresh weight (kg/ha)	Dry weight (kg/ha)	Leaf to stem ratio
17 August	51	28.4	1455.4	378.1	1.3
17 September	81.2	33.0	3374	902.2	0.9

جدول ۴. تأثیر فاصله کاشت بر تاج پوشش، وزن تر و خشک اندام‌های هوایی استویا

Table 4. Effect of planting space on the canopy diameter, herbal fresh and dry weight of stevia

Planting space (cm)	Canopy diameter (cm)	Herbal Fresh weight (kg/ha)	Herbal dry weight (kg/ha)
20 x 50	27.5 b	2895.9 a	772.1 a
25 x 50	31.4 ab	2615.2 ab	655.1 ab
30 x 50	30.8 ab	2157.4 ab	589.9 b
35 x 50	33.2 a	1990.3 b	543.5 b

در هر ستون، میانگین‌های دارای حرف‌های مشترک اختلاف معنی‌داری با یکدیگر بر پایه آزمون دانکن ندارند.

Means in each column with similar letters are not significantly different by the Duncan's multiple range test (5%).

حدود ۱/۴ برابر بیشتر است (جدول ۳). همان‌طور که در جدول ۲ نشان داده شده است، تأثیر زمان برداشت و فاصله کاشت بر میزان سبزینه‌ها که با دستگاه سبزینه‌متر SPAD صورت گرفت معنی‌دار نبود ($P > 0.05$).

نتایج موجود نشان داد، اثر متقابل تیمار تراکم و زمان برداشت تنها بر صفت وزن خشک برگ معنی‌دار بود ($P < 0.01$) (جدول ۲) به‌طوری‌که بیشترین عملکرد وزن خشک برگ در هکتار در تراکم ۲۰ و ۲۵ × ۵۰ سانتی‌متر و زمان برداشت شهریورماه به دست آمد (شکل ۲).

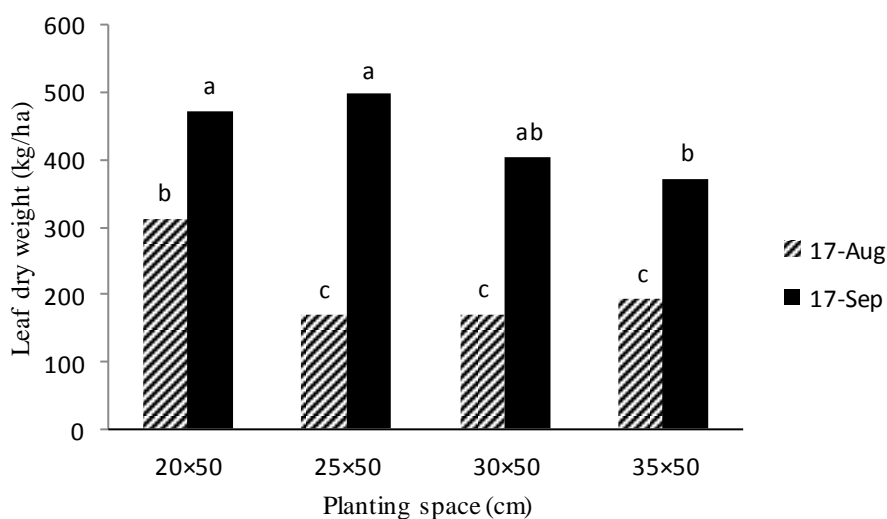
میزان گلیکوزیدهای اصلی موجود در برگ خشک استویا

نتایج آزمایش فام‌نگاری مایع با کارایی بالا (HPLC) در جدول ۴ آمده است، برابر با این نتایج میزان عملکرد گلیکوزیدهای استویوزید و ربودیوزید A با افزایش فاصله کاشت گیاهان روی خط از ۲۰ سانتی‌متر به فاصله ۳۵ سانتی‌متر کاهش یافت و همچنین همان‌طور که در شکل‌های ۶ و ۷ مشاهده می‌شود، در برداشت ۲۶ شهریورماه عملکرد گلیکوزیدهای استویوزید و ربودیوزید A نسبت به برداشت ۲۶ مرداد بالاتر بود. همان‌طور که در جدول ۳ مشاهده می‌شود، اگرچه درصد گلیکوزیدهای استویا در برداشت ۲۶ مردادماه بیشتر از ۲۶ شهریورماه است، اما این غلظت با کمترین میزان ماده خشک به‌دست‌آمده است، در نتیجه میزان عملکرد گلیکوزیدها در مردادماه به مراتب پایین‌تر از برداشت شهریورماه بود (شکل‌های ۳ و ۴) (جدول ۵).

نتایج تجزیه واریانس بیانگر تأثیر معنی‌دار تراکم بوته بر وزن خشک و تر بوته بود ($P < 0.01$) (جدول ۲) به‌طوری‌که بیشترین وزن تر بوته گیاه استویا در تراکم ۲۰ × ۵۰ سانتی‌متر و کمترین وزن تر بوته این گیاه در تراکم ۳۵ × ۵۰ سانتی‌متر مشاهده شد این در حالی است هنگامی‌که فاصله گیاه روی ردیف از ۳۵ به ۲۰ سانتی‌متر کاهش یافت وزن تر گیاه تا ۲۸ درصد افزایش یافت. همچنین بیشترین وزن خشک بوته استویا در فاصله کاشت ۲۰ × ۵۰ سانتی‌متر مشاهده شد و کمترین میزان وزن خشک در فاصله‌های ۳۰ و ۳۵ × ۵۰ (به ترتیب ۵۸۹/۹ و ۵۴۳/۵ کیلوگرم در هکتار) بود (جدول ۴).

همان‌طور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود تأثیر زمان برداشت بر وزن تر و خشک بوته معنی‌دار بود ($P < 0.01$) بیشترین میزان وزن تر در هکتار در برداشت شهریورماه و کمترین وزن تر بوته استویا در برداشت مردادماه به دست آمد، به‌طوری‌که حدود ۲/۳ برابر وزن تر در برداشت شهریورماه بیشتر از مردادماه بود. بیشترین میزان وزن خشک در هکتار در برداشت ۲۶ شهریورماه و کمترین وزن خشک در برداشت ۲۶ مردادماه به دست آمد به‌طوری‌که وزن خشک بوته در برداشت شهریورماه حدود ۲/۴ برابر بیشتر از مردادماه بود (جدول ۳).

نتایج به‌دست‌آمده از تجزیه واریانس داده‌ها، گویای این بود که تأثیر زمان برداشت بر نسبت برگ به ساقه معنی‌دار بود ($P < 0.01$) (جدول ۲)، به‌طوری‌که بیشترین نسبت برگ به ساقه در زمان برداشت ۲۶ مردادماه بود که نسبت به برداشت ۲۶ شهریورماه



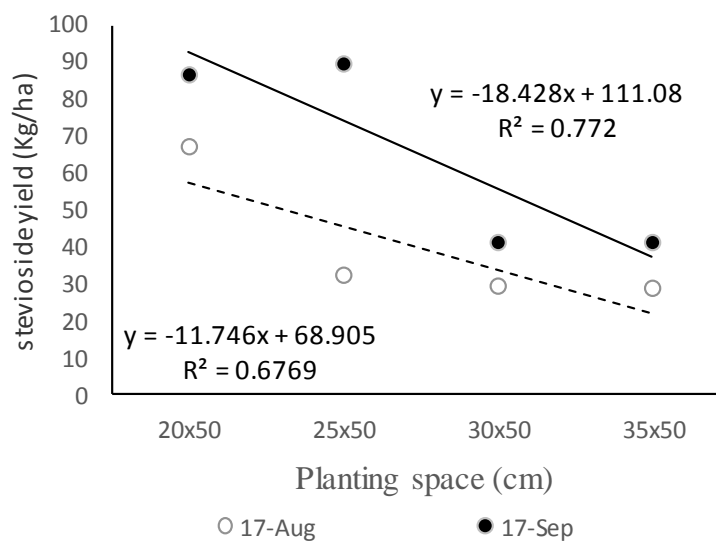
شکل ۲. اثر متقابل زمان برداشت و فاصله کاشت بر وزن خشک برگ استویا
Figure 2. Interaction effect of harvesting time and planting space on leaf dry weight of stevia

جدول ۵. نتایج آزمایش فام‌نگاری مایع با کارایی بالا برگ‌های خشک استویا

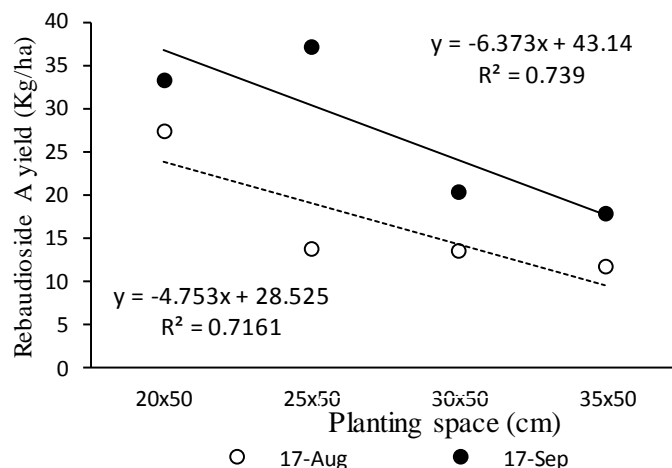
Table 4. The results of high performance liquid chromatography assay of stevia dried leaves

Treatment	Stevioside (%)	Rebaudioside A (%)	Stevioside yield (Kg.ha ⁻¹)	Rebaudioside A yield (Kg.ha ⁻¹)
H1D1	21.9	9	67.1	27.4
H1D2	19	8	32.6	13.9
H1D3	15.5	7.7	29.5	13.6
H1D4	17.5	6.0	29	11.7
H2D1	18.3	7.0	86.8	33.4
H2D2	22.4	7.4	90.6	37.2
H2D3	10.0	5.0	41.7	20.3
H2D4	11.3	4.8	41.5	17.8

H: harvesting time (H1: 17 August, H2: 17 September) and D: planting density (D1: 20x50, D2: 25x50, D3: 30x50, D4: 35x50).



شکل ۳. روند تغییر عملکرد استویوزید در فواصل کاشت مختلف گیاه استویا
Figure 3. Variation trend of Stevioside yield at different planting space of stevia



شکل ۴. روند تغییر عملکرد ربودیوزید A در فواصل کاشت مختلف گیاه استویا
Figure 4. Variation trend of Rebaudioside A yield in different planting space of stevia

در تراکم ۲۰×۵۰ سانتی متر به دست آمده است. همچنین در نتایج بررسی‌های خود گزارش کردند، بهترین عملکرد گیاه استویا در تراکم ۱۰ گیاه در مترمربع نسبت به تراکم‌های ۶ و ۸ بوته در مترمربع به دست آمد. Ezz (2009) نیز با بررسی تراکم بین بوته‌های *Thymus vulgaris* (فاصله گیاهان روی خط ۱۵، ۳۰ و ۴۵ سانتی متر) به این نتیجه رسید که فاصله بین بوته‌ها بر وزن تر و خشک و شمار برگ‌های گیاه تأثیر معنی‌داری دارد و اظهار داشت که کاهش فاصله کاشت باعث افزایش وزن تر و خشک گیاه آویشن می‌شود، موضوع ممکن است به دلیل دریافت بیشتر نور خورشید و شمار بالای گیاه در تراکم‌های بالا نسبت به تراکم‌های پایین باشد.

زمان برداشت در گیاهان دارویی یکی از مهم‌ترین عامل‌های مدیریتی است که نقش بسیار ارزنده‌ای در افزایش کمیت و کیفیت تولید و مواد مؤثره گیاهان دارویی دارد (Naghdi Badi et al., 2004; Hemm et al., 2004)، همان‌طور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود تأثیر زمان برداشت بر ارتفاع گیاه و قطر تاج پوشش، وزن تر و خشک بوته، نسبت برگ به ساقه به‌طور شایان توجهی معنی‌دار بود. نتایج تحقیقات Serfaty et al. (2013) روی زمان برداشت استویا نشان داد، بیشترین میزان عملکرد اندام‌های رویشی در زمان پیش از گلدهی در آغاز ماه شهریور (سپتامبر) بود، این موضوع به دلیل وجود زمان کافی برای رشد گیاه و

بحث

نتایج این آزمایش نشان داد، بالاترین قطر تاج پوشش در بیشترین فاصله کاشت (۳۵×۵۰) است (جدول ۴). به نظر می‌رسد کاهش تراکم بوته به علت افزایش فضای کافی برای گسترش بوته‌ها و مواد غذایی و دیگر عامل‌های محیطی باعث افزایش قطر تاج پوشش در مقایسه با تراکم‌های بالاتر بوته می‌شود. افزایش تراکم گیاهی، رقابت گیاهان برای آب، مواد کانی و نور را افزایش می‌دهد (Forbes & Watson, 1994). این نتیجه همسان گزارش نتایج بررسی‌های Naghdi Badi et al. (2004) است، وی گیاه آویشن را در سه تراکم مختلف که فاصله بین ردیف‌ها ۵۰ سانتی متر و فاصله گیاهان روی ردیف به ترتیب شامل: ۱۵، ۳۰ و ۴۵ سانتی متر بود، کشت کردند. این محققان در نتایج بررسی‌های خود گزارش کردند، تراکم اثر معنی‌داری بر قطر تاج پوشش و دیگر فراسنجه‌های رشدی دارد به طوری که بیشترین قطر تاج پوشش در کمترین تراکم (۴۵×۵۰) مشاهده شد.

همان‌طور که در جدول ۲ آمده است، فاصله کاشت بر وزن خشک و تر گیاه تأثیر معنی‌داری داشت به طوری که بیشترین وزن تر و خشک استویا در کمترین فاصله کاشت (۲۰×۵۰ سانتی متر) به دست آمد، در تأیید این نتایج Taleie et al. (2012) نیز با بررسی تأثیر تراکم‌های مختلف گیاه استویا (۲۰، ۲۵ و ۳۵×۵۰ سانتی متر) گزارش کردند، بیشترین وزن خشک و تر گیاه

به دست آمده است می‌توان دریافت که میزان وزن خشک برگ این گیاه در برداشت ۲۶ مردادماه حدود ۵۷ درصد وزن خشک اندام‌های هوایی است. اما بالاترین میزان وزن خشک اندام‌های هوایی در برداشت ۲۶ شهریورماه بود، این در حالی است که وزن خشک برگ آن حدود ۴۹ درصد از وزن خشک اندام‌های هوایی است. در تأیید این نتایج *Serfaty et al.* (2013) نیز نتایج همسانی را روی این گیاه گزارش کردند.

همان‌طور که در جدول ۴ مشاهده می‌شود، میزان عملکرد گلیکوزیدهای استویوزید، ربودیوزید A با افزایش فاصله کاشت گیاهان روی خط از ۲۰ سانتی‌متر به فاصله ۳۵ سانتی‌متر کاهش یافت و همچنین عملکرد گلیکوزیدهای استویوزید و ربودیوزید A در برداشت ۲۶ شهریورماه نسبت به برداشت ۲۶ مرداد بالاتر بود. نتایج تحقیقات *Serfaty et al.* (2013) در زمان برداشت و فاصله کاشت استویا نشان داد، بیشترین عملکرد گلیکوزیدهای استویوزید و عملکرد اندام‌های رویشی در زمان پیش از گل‌دهی در آغاز ماه شهریور (سپتامبر) و تراکم ده بوته در مترمربع است. وی همچنین عنوان کرد که مهم‌ترین عامل ریخت‌شناختی (مورفولوژیکی) استویا که محتوای گلیکوزیدها را تحت تأثیر قرار می‌دهد، گل‌دهی است که این عامل خود تحت تأثیر دما و طول روز است. به‌طوری‌که بهترین زمان برداشت که محتوای استویوزید و عملکرد رویشی در بالاترین میزان خود باشد، در آغاز گل‌دهی است. بنابر گزارش *Kalandia et al.* (2004) میزان گلیکوزیدهای دی‌ترپن‌های موجود در استویا پس از آغاز گل‌دهی کاهش یافت، البته عامل‌های دیگری چون حضور برگ‌های خشک و پیر میزان آن را می‌تواند بسیار کاهش دهد. همچنین با افزایش رشد گیاه در مرحله زایشی میزان زیست‌توده برگ کاهش می‌یابد (Kienle, 2010) و حتی فعالیت آنزیم‌های درون برگ مانند گلیکوزیدازها میزان گلیکوزیدها برگ را کاهش می‌دهند (Madore, 2000). آنچه در این آزمایش نظرها را به خود جلب می‌کند، میزان غلظت استویوزید و ربودیوزید A موجود در برگ خشک استویا است که بسیار بالاتر از دیگر گزارش‌ها است که می‌توان میزان ۲۱ درصد استویوزید

تغییرپذیری دمایی و طول روز است. بنابر نتایج بررسی‌های *Serfaty et al.* (2013) در زمینه زمان برداشت گیاه استویا نشان می‌دهد، بالاترین وزن تر و خشک بوته در زمان برداشت شهریورماه (سپتامبر) پیش از گل‌دهی است، همچنین میزان گلیکوزیدهای استویوزید در این زمان در بالاترین سطح خود بود. همچنین *Megeji et al.* (2005) با مقایسه دو زمان مختلف برداشت (خرداد-تیر و شهریور-مهر) گیاه استویا گزارش کردند، بهترین زمان برداشت در زمان شهریور-مهر ماه (سپتامبر) است به‌طوری‌که بالاترین وزن خشک و تر گیاه در این زمان به دست آمد. بنا بر بررسی *Naghdi Badi et al.* (2004) تأخیر در برداشت گیاه آویشن باعث افزایش ارتفاع گیاه و قطر تاج پوشش می‌شود، به‌طوری‌که ارتفاع و قطر تاج پوشش در زمان رسیدن بذرها بیشتر از زمان آغاز گل‌دهی و مرحله تمام گل بود. *Kumar et al.* (2012) نیز نتایج همسانی در رابطه با تأثیر زمان برداشت بر وزن خشک و تر ساقه و برگ و ارتفاع گیاه استویا گزارش کردند.

نتایج این آزمایش نشان داد، بیشترین نسبت برگ به ساقه در برداشت اول (۲۶ مرداد) بود. در تأیید نتایج به دست آمده *Mekonnen & Kassahun* (2011) در نتایج بررسی‌های خود گزارش کردند، اثر ساده فاصله کاشت و اثر متقابل فاصله کاشت و زمان برداشت در نسبت برگ به ساقه معنی‌دار نبود و تنها اثر ساده زمان برداشت بر این صفت معنی‌دار شد، به‌طوری‌که نسبت برگ به ساقه گیاه نعنای در برداشت ۶۰ روز پس از انتقال نشاء ۶۶ درصد بیشتر از برداشت در زمان ۱۵۰ روز پس از انتقال نشاء است. نتایج بررسی *Megeji et al.* (2005) روی مقایسه دو زمان مختلف برداشت (خرداد-تیر و شهریور-مهر) گیاه استویا در طی دو سال، نشان می‌دهد، نسبت برگ به ساقه در زمان شهریور-مهر کمتر از زمان برداشت خرداد-تیر است. این موضوع نشان می‌دهد، سهم برگ در عملکرد کل زیست‌توده گیاه استویا در مراحل رشد اولیه بیشتر است و از آنجاکه غلظت گلیکوزیدهای موجود در ساقه استویا ناچیز است در نتیجه این نسبت اهمیت بالایی دارد (*Bondarev et al.*, 2001). با نتایجی که از میزان نسبت برگ به ساقه

Naghd Badi *et al.* (2004) گیاه آویشن را در سه تراکم مختلف که فاصله بین ردیف‌ها ۵۰ سانتی‌متر و فاصله گیاهان روی ردیف به ترتیب شامل ۱۵، ۳۰ و ۴۵ سانتی‌متر بود، بررسی کردند. بنابر گزارش آنان بیشترین عملکرد اسانس در بیشترین تراکم (۱۵×۵۰) به‌دست آمد. *Danalasio et al.* (1982) در نتایج بررسی‌های خود گزارش کردند، تراکم ۸ تا ۱۰ بوته استویا در مترمربع بهترین تراکم است و عنوان داشتند که افزایش بیش‌ازحد آن ممکن است باعث کاهش عملکرد زیست‌توده گیاه شود. لازم به یادآوری است که تراکم‌های بالای استویا (حدود ۲۴ تا ۳۰ گیاه در مترمربع) که توسط *Basuki* (1990) ارزیابی شد، می‌تواند به‌طور مؤثری علف‌های هرز را کنترل کند اما باعث افت بیش‌ازحد عملکرد زیست‌توده گیاه می‌شود، بنابراین بررسی روی تراکم بالاتر استویا لازم است.

نتیجه‌گیری کلی

بنابر نتایج به‌دست‌آمده از کشت گیاه دارویی استویا در این تحقیق در منطقه کرج، می‌توان چنین استنباط کرد، هنگامی که فاصله کاشت از ۳۵×۵۰ به ۲۰×۵۰ سانتی‌متر کاهش یابد وزن تر و خشک بوته و وزن خشک برگ، عملکرد استویوزید و ربودیوزید A افزایش می‌یابد اما میزان قطر تاج پوشش با افزایش تراکم (کاهش فاصله کاشت) کاهش می‌یابد. برداشت گیاه در مرحله پیش از آغاز گلدهی (۲۶ شهریور) نسبت به مرحله رویشی (۲۶ مرداد) بهتر است به‌طوری‌که عملکرد وزن تر و خشک گیاه، عملکرد وزن خشک برگ، قطر تاج پوشش، ارتفاع گیاه و قطر تاج پوشش، عملکرد استویوزید و ربودیوزید A در برداشت شهریورماه بیشتر از مردادماه است. به‌طورکلی، نتایج گویای تأثیر مثبت فاصله کاشت ۲۰×۵۰ سانتی‌متر و زمان برداشت ۲۶ شهریور بر عملکرد کمی و کیفی گیاه استویا در منطقه مورد بررسی است، بااین‌وجود ارائه نتایج قطعی‌تر منوط به انجام آزمایش‌های بیشتر در طی سال‌های مختلف در منطقه مورد بررسی است تا بهتر بتوان به تأثیر سهم عامل‌های اقلیمی و مدیریت زراعی بر استقرار، ویژگی‌های رشد و عملکرد کمی و کیفی استویا پرداخت.

و ۹ درصد ربودیوزید A (درصدها بر پایه میزان ماده در وزن خشک برگ) در مقابل گزارش *Serfaty et al.* (2013) در منطقه فلسطین اشغالی (مدیترانه‌ای) که میزان استویوزید موجود در برگ استویا را ۱۲/۵ درصد و یا در مقایسه با گزارش *Moraes et al.* (2013) در منطقه میسیسیپی (نیمه گرمسیری و مرطوب) که غلظت استویوزید و ربودیوزید A موجود در برگ خشک استویا را به ترتیب ۱۲ و ۶/۵ بیشترین درصد گزارش کردند. در تحقیقی که توسط *Taleie et al.* (2012) در منطقه گیلان (معتدل و مرطوب) صورت گرفت بیشترین میزان غلظت استویوزید را ۱۴ درصد گزارش کردند. رشد گیاه نه‌تنها تحت تأثیر ژنوتیپ قرار دارد بلکه به‌شدت توسط طیف گسترده‌ای از عامل‌های زنده و غیرزنده محیطی مانند نور، طول روز، دما، رطوبت، در دسترس بودن مواد غذایی و نوع خاک قرار می‌گیرد (*Ceunen & Geuns, 2013*). زیستگاه اصلی استویا، منطقه‌ای با اقلیم نیمه گرمسیری، مرطوب و آفتابی با ارتفاع ۲۰۰ تا ۵۰۰ متر از سطح دریا است (*Brandle & Rosa, 1992*)، لذا رشد این گیاه در کرج با اقلیم نیمه‌خشک با زمستان به نسبت سرد و تابستان معتدل و ارتفاع ۱۳۲۰ متر از سطح دریا می‌تواند به‌شدت تحت تأثیر محیط قرار گیرد.

بنابر نتایج تحقیقات صورت گرفته، یکی از مهم‌ترین عامل‌هایی که محتوای گلیکوزیدهای استویا را تحت تأثیر قرار می‌دهد طول روز و شدت تابش نور است که افزایش آن‌ها باعث افزایش غلظت گلیکوزیدهای موجود در برگ استویا می‌شود که برای تعیین مهم‌ترین عامل تأثیرگذار نیاز به آزمایش دقیق است (*Ceunen & Geuns, 2013*).

بررسی‌های *Murayama et al.* (1980) و *Lee et al.* (1980) برای گیاه استویا نشان داد، تراکم بالا باعث افزایش عملکرد زیست‌توده و گلیکوزیدهای آن شده است. *Taleie et al.* (2012) نیز با بررسی تأثیر تراکم‌های مختلف (۲۰، ۲۵ و ۳۵×۵۰ سانتی‌متر) و زمان کاشت گیاه استویا گزارش کردند، با کاشت زودهنگام و افزایش تراکم عملکرد گلیکوزید استویوزید افزایش یافت به‌طوری‌که بیشترین میزان گلیکوزید استویوزید در تراکم ۲۰×۵۰ سانتی‌متر بود. همچنین

REFERENCES

- Basuki, S. (1990). Effects of black plastic mulch and plant density on the growth of weeds and stevia. *BIOTROP special publication*, 38, 107-1.
- Bondarev, N., Reshetnyak, O., & Nosov, A. (2001). Peculiarities of diterpenoid steviol glycoside production in in vitro cultures of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Plant Science*, 161(1), 155-163.
- Bondarev, N. I., Sukhanova, M. A., Reshetnyak, O. V. & Nosov, A. M. (2003). Steviol glycoside content in different organs of *Stevia rebaudiana* and its dynamics during ontogeny. *Biologia Plantarum*, 47(2), 261-264.
- 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.
- Ceunen, S. & Geuns, J. M. C. (2013). Influence of photoperiodism on the spatio-temporal accumulation of steviol glycosides in *Stevia rebaudiana* (Bertoni). *Plant Science*, 198, 72-82.
- Danalizio, M., Duarte, F., Pinto, A. & Souza, C. (1982). *Stevia rebaudiana*. *Agronomics*, 34, 64-68.
- Ermakov, E. I. & Kochetov, A. A. (1996). Specificities of the growth and development of Stevia, Stevia plants under different controllable light conditions. *Russian journal of Agricultural Science*, 1, 9-11.
- Ezz, A. L. (2009). Plant growth strategies of *Thymus vulgaris* L. in response to population density. *Industrial Crops and Products*, 30(3), 389-394.
- Forbes, J. C. & Watson, R. D. (1994). *Plants in agriculture*. Cambridge, Britain. Pp: 72-78.
- Ghanbari, A. & Taheri Mazandarani, M. (2002). Effect of planting date and plant density on yield of Pinto Bean. *Journal of Plant Seed Science*, 19(4), 483-496.
- Hemm, M. R., Rider, S. D., Ogas, J., Murry, D. J. & Chapple, C. (2004). Light induces phenylpropanoid metabolism in Arabidopsis roots. *Plant Journal*, 38, 765-778.
- IRIMO. (2014). Islamic Republic of Iran Meteorological Organization. <http://www.irimo.ir>
- Jamshidi, K. H. (1999). The effect of row spacing and plant density on quantitative aspects of chamomile. *Iranian Journal of Agricultural Sciences*, 3(1), 203-210. (in Farsi)
- Jovicich, E., Cantliffe, D. J. & Hochmuth, G. J. (1999). Plant density and shoot pruning on yield and quality of a summer greenhouse sweet pepper crop in North Central Florida. In: *Proceedings 28th National Agricultural Plastics Congress* (pp. 184-190).
- Kalandia, A., Papunidze, G., Vanidze, M. & Papunidze, S. (2004). HPLC of Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) diterpene glycosides. *Bulletin of the Georgian Academy of Sciences*, 169, 147-150.
- Kennelly, E. J. (2002). Sweet and non-sweet constituents of *Stevia rebaudiana*. *Stevia, the Genus Stevia (Medical and Aromatic Plants-Industrial Profiles)*, 19, 68-85.
- Kienle, U. (2010). Welches Stevia hätten Sie denn gerne? Anbau und Herstellung–Perspektiven weltweit. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, 5(2), 241-250.
- Kolb, N., Herrera, J. L., Ferreyra, D. J. & Uliana, R. F. (2001). Analysis of sweet diterpene glycosides from *Stevia rebaudiana*: Improved HPLC method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(10), 4538-4541.
- Kumar, R., Sharma, S., Ramesh, K., Prasad, R., Pathania, V. L., Singh, B. & Singh, R. D. (2012). Effect of agro-techniques on the performance of natural sweetener plant–stevia (*Stevia rebaudiana*) under western Himalayan conditions. *Indian Journal of Agronomy*, 57(1), 74-81.
- Lee, J. I., Kang, K. H., Park, H. W., Ham, Y. S. & Park, C. H. (1980). Studies on the new sweetening source plant, *Stevia rebaudiana* in Korea. II. Effects of fertilizer rates and planting density on dry leaf yields and various agronomic characteristics of *Stevia rebaudiana*. *Research Reports of the Office of Rural Development. (Crop Suwon)*, 2, 138-144.
- Madore, M. A. (2000). Synthesis and degradation of diterpene glycosides in source leaves of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni. *Journal of Plant Biology*, 129.
- Megeji, N. W., Kumar, J. K., Singh, V., Kaul, V. K. & Ahuja, P. S. (2005). Introducing *Stevia rebaudiana*, a natural zero-calorie sweetener. *Current science*, 88(5), 801-804.
- Mekonnen, S. A. & Kassahun, M. B. (2011). Effect of inter row spacing and harvesting time on growth and essential oil yield of Spearmint (*Mentha spicata* L.). *International Journal of Sustainable Agriculture*, 3(2), 39-43.
- Mizukami, H., Shiba, K., Satoshi, I. & Ohashi, H. (1983). Effect of temperature on growth and stevioside formation of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Japan Journal of Shoyakugaku Zasshi*, 37, 175-179.
- Mohd-Radzman, N. H., Ismail, W. I. W., Adam, Z., Jaapar, S. S. & Adam, A. (2013). Potential roles of *Stevia rebaudiana* Bertoni in abrogating insulin resistance and diabetes: a review. *Journal of Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 10.
- Moraes, R. M., Donega, M. A., Cantrell, C. L., Mello, S. C. & McChesney, J. D. (2013). Effect of harvest timing on leaf production and yield of diterpene glycosides in *Stevia rebaudiana* Bert: A specialty perennial crop for Mississippi. *Industrial Crops and Products*, 51, 385-389.

27. Murayama, S., Kayano, R., Miyazato, K. & Nose, A. (1980). Studies on the cultivation of *Stevia rebaudiana*: Effects of fertilizer rates, planting density and seedling clones on growth and yield. *Science Bulletin of the College of Agriculture*, 27, 1-8.
28. Naghdi Badi, H., Yazdani, D., Mohammad Ali, S. & Nazari, F. (2004). Effects of spacing and harvesting time on herbage yield and quality/quantity of oil in thyme, *Thymus vulgaris* L. *Industrial Crops and Products*, 19, 231-236.
29. Nassar, A. M., Besheit, S. Y. & Allam, A. I. (2001). Effect of sowing dates, harvesting dates and their interaction on yield and quality of stevia (*Stevia rebaudiana* Bert. (Bertoni)). *Journal of Applied Sciences*, 16, 442-459.
30. Ramesh, K., Singh, V. & Megeji, N. W. (2006). Cultivation of *stevia rebaudiana* (Bert) Bertoni a comprehensive review. *Advance in Agronomy*, 89, 137-177.
31. Serfaty, M., Ibdah, M., Fischer, R., Chaimovitch, D., Saranga, Y. & Dudai, N. (2013). Dynamics of yield components and stevioside production in *Stevia rebaudiana* grown under different planting times, plant stands and harvest regime. *Industrial Crops and Products*, 50, 731-736.
32. Shivanna, N., Naika, M., Khanum, F. & Kaul, V. K. (2012). Antioxidant, anti-diabetic and renal protective properties of *Stevia rebaudiana*. *Journal of Diabetes and its Com-Plications*, 27(2), 103-113.
33. Tadhani, M. B., Patel, V. H. & Subhash, R. (2007). In vitro antioxidant activities of *Stevia rebaudiana* leaves and callus. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20(3), 323-329.
34. Taleie, N., Hamidoghli, Y., Rabiei, B. & Hamidoghli, S. (2012). Effects of plant density and transplanting date on herbage, stevioside, phenol and flavonoid yield of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*, 4(6), 298-302.
35. 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.
36. Woelwer-Rieck, U., Lankes, C., Wawrzun, A. & 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.
37. 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.