

Potential of Plant Extracts as Biostimulants to Enhance Growth, Sugar Metabolism, and Rebaudioside A Accumulation in *Stevia rebaudiana* Bertoni under *In Vitro* Conditions

N. kazemi¹, A. Hatamzadeh¹, M. Khanahmadi² and O. Sohrabi³ 

¹ Plant Production Department, University of Guilan, Rasht, Iran

² Department of Chemistry, Academic Center for Education, Culture & Research (ACECR), Kermanshah, Iran.

³ Department of Horticultural Science and Engineering, Razi University, Kermanshah, Iran.

Received: 13 Jun 2026

Accepted: 16 Sep 2026

Published: 11 Oct 2026

Corresponding

Author:

Omid Sohrabi

Email:

o.sohrabi@razi.ac.ir

Keywords:

Bon-sorkh, HPLC, Glycoside, Biostimulant, Tissue culture.

Citation:

kazemi, N., Hatamzadeh, A., Khanahmadi, M., & Sohrabi, O. (2026). Potential of Plant Extracts as Biostimulants to Enhance Growth, Sugar Metabolism, and Rebaudioside A Accumulation in *Stevia rebaudiana* Bertoni under *In Vitro* Conditions. *Journal of Research in Plant Metabolites*, 4(3), 31-48.
Doi:10.22034/jrpsm.2026.597016.1133

Extended Abstract

Background and Objective: *Stevia rebaudiana* is one of the most important medicinal plants and natural sweeteners, valued for producing glycosides such as stevioside and Rebaudioside A. Rebaudioside A is particularly important in the food industry and natural sweetener production because of its greater sweetness and more desirable taste. On the other hand, the extensive use of chemical growth regulators in micropropagation and *in vitro* culture, in addition to increasing production costs, may affect plant growth, metabolism, and secondary metabolite production. In recent years, the use of naturally derived biostimulants has received increasing attention as an approach more compatible with sustainable agriculture. Accordingly, this study aimed to investigate the potential of natural extracts of Bon-sorkh (*Allium jesdianum*) and dandelion (*Taraxacum officinale*) as biostimulants for improving growth and increasing Rebaudioside A content in *Stevia rebaudiana*.

Materials and Methods: In this study, explants were cultured on basal MS medium supplemented with different concentrations of hydroalcoholic extracts of Bon-sorkh and dandelion and compared with treatments containing BAP and NAA and a growth regulator-free control. The extracts were applied at 100, 200, and 400 mg/L, sterilized by cold filtration, and added to the sterile culture medium. Morphological traits, including leaf number, number of lateral branches, fresh weight, and dry weight, as well as chlorophyll a, chlorophyll b, and soluble sugar content, were evaluated. Finally, Rebaudioside A content was determined and compared by high-performance liquid chromatography (HPLC) to assess the effects of the treatments on *Stevia*-specific metabolite production.

Results: The results showed that the response of *Stevia rebaudiana* to the natural extracts depended on both extract type and concentration. Among the extract treatments, application of 400 mg L⁻¹ Bon-sorkh extract had the greatest effect on leaf number, resulting in 12.00 leaves, which represented an approximately 38.56% increase compared with the control. This treatment did not differ significantly in leaf number from the 2 BAP + 1 NAA treatment, which had a mean of 12.66 leaves. Fresh weight of plantlets treated with 400 mg L⁻¹ Bon-sorkh extract increased by 240.7% compared with the control, whereas the corresponding increase in the 2 BAP + 1 NAA treatment was 529.3%. Regarding dry weight, the 400 mg L⁻¹ Bon-sorkh extract treatment had a mean value of 0.60 g, representing a 361.5% increase compared with the control, whereas the corresponding PGR treatment resulted in a 515.4% increase in dry weight relative to the control. In addition to growth-related traits, the treatments significantly affected photosynthetic pigments and soluble sugars. The highest soluble sugar contents were recorded in the 400 mg L⁻¹ Bon-sorkh and dandelion extract treatments, with values of 4.73 and 4.44 mg g⁻¹ fresh weight, respectively, representing increases of 57.67% and 48% compared with the control (3 mg g⁻¹ fresh weight). HPLC analysis of four selected treatments showed that some of the selected treatments were associated with increased rebaudioside A content. Among the four selected treatments, the highest value was recorded in the 100 mg L⁻¹ dandelion extract treatment, with a mean of 8.64%, which was approximately three times that of the control. This was followed by the 2 BAP + 1 NAA and 400 mg L⁻¹ Bon-sorkh extract treatments, with mean rebaudioside A contents of 6.66% and 5.55%, respectively.

Conclusion: Based on the results, Bon-sorkh and dandelion extracts may be considered natural plant extracts with potential biostimulant activity for modulating growth and certain metabolic responses of *Stevia rebaudiana* under *in vitro* conditions. Bon-sorkh extract at 400 mg L⁻¹, particularly in terms of leaf number, showed a response comparable to that of the 2 BAP + 1 NAA treatment; however, its fresh and dry weights were lower than those obtained with the PGR treatment. Therefore, the findings of this study do not demonstrate the direct or complete replacement of BAP and NAA with natural extracts. However, because HPLC analysis was not performed for the other treatments, this finding cannot be generalized to all experimental treatments. Overall, the findings indicate the potential of natural extracts to modulate certain growth and metabolic traits of *Stevia rebaudiana*. Further characterization of the bioactive compounds present in these extracts and investigation of their mechanisms of action may provide a more comprehensive understanding of these responses in future studies.

پتانسیل عصاره‌های گیاهی به‌عنوان محرک زیستی برای بهبود رشد، متابولیسم قند و تجمع Rebaudioside A در استویا (*Stevia rebaudiana* Bertoni) در شرایط درون‌شیشه‌ای

نسترن کاظمی^۱، عبدالله حاتم‌زاده^۱، معصومه خان‌احمدی^۲ و امید سهرابی^۳

^۱گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.

^۲گروه شیمی، مرکز آموزش، پژوهش و فرهنگ جهاد دانشگاهی (ACECR)، کرمانشاه، ایران.

^۳گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران.

تاریخ انتشار: ۱۴۰۵/۰۷/۱۹

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۵/۰۶/۲۵

تاریخ دریافت: ۱۴۰۵/۰۳/۲۳

نویسنده مسئول:

امید سهرابی

ایمیل:

o.sohrabi@razi.ac.ir

واژه‌های کلیدی: بن‌سرخ،

HPLC، گلیکوزید، محرک

زیستی، کشت بافت.

چکیده

سابقه و هدف: استویا (*Stevia rebaudiana*) یکی از مهم‌ترین گیاهان دارویی و شیرین‌کننده‌های طبیعی است که به دلیل تولید گلیکوزیدهایی مانند استویوزاید و ریبادیوزاید A، ارزش بالایی دارد. ریبادیوزاید A به دلیل شیرینی بیشتر و طعم مطلوب‌تر، اهمیت ویژه‌ای در صنایع غذایی و تولید شیرین‌کننده‌های طبیعی دارد. از سوی دیگر، استفاده گسترده از تنظیم‌کننده‌های رشد شیمیایی در ریزازدیادی و کشت درون‌شیشه‌ای، علاوه بر افزایش هزینه‌های تولید، می‌تواند بر رشد، متابولیسم و تولید متابولیت‌های ثانویه اثر بگذارد. در سال‌های اخیر، استفاده از محرک‌های زیستی با منشأ طبیعی به‌عنوان رویکردی سازگارتر با کشاورزی پایدار مورد توجه قرار گرفته است. بر همین اساس، پژوهش حاضر با هدف بررسی قابلیت عصاره‌های طبیعی بن‌سرخ (*Allium jesdianum*) و گل‌قاصدک (*Taraxacum officinale*) به‌عنوان محرک‌های زیستی برای بهبود رشد و افزایش محتوای ریبادیوزاید A در استویا انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش، ریزنمونه‌های گیاه استویا در محیط کشت پایه MS حاوی غلظت‌های مختلف عصاره‌های هیدروالکلی بن‌سرخ و گل‌قاصدک کشت شدند و پاسخ آنها با تیمارهای حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد شیمیایی شامل BAP و NAA و همچنین شاهد بدون تنظیم‌کننده رشد مقایسه گردید. عصاره‌های گیاهی در غلظت‌های مختلف، از جمله ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر، مورد استفاده قرار گرفتند. استریل‌سازی عصاره‌ها با استفاده از روش فیلتراسیون سرد انجام شد و پس از آماده‌سازی، به محیط کشت استریل افزوده شدند. در طول دوره کشت، صفات مورفولوژیک شامل تعداد برگ، تعداد شاخه جانبی، وزن تر و وزن خشک مورد ارزیابی قرار گرفتند. همچنین، رنژهای فتوسنتزی شامل کلروفیل a، کلروفیل b، در کنار محتوای قندهای محلول اندازه‌گیری شدند. در نهایت، به‌منظور ارزیابی تأثیر تیمارها بر تولید متابولیت‌های اختصاصی استویا، محتوای ریبادیوزاید A با استفاده از روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) تعیین و مقایسه شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که پاسخ گیاه استویا به عصاره‌های طبیعی به نوع و غلظت عصاره وابسته بود. کاربرد ۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر عصاره بن‌سرخ بیشترین اثر را بر تعداد برگ نشان داد؛ به‌طوری‌که تعداد برگ در این تیمار به ۱۲ برگ رسید و نسبت به شاهد حدود ۳۸/۵۶ درصد افزایش یافت. این تیمار از نظر تعداد برگ با تیمار ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP + ۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA، با میانگین ۱۲/۶۶ برگ، اختلاف معنی‌داری نداشت. همچنین، وزن تر گیاهچه‌ها در تیمار ۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر عصاره بن‌سرخ با افزایش ۲۴۰/۷ درصدی نسبت به شاهد همراه بود، در حالی که این افزایش در تیمار ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP + ۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA برابر با ۵۲۹/۳ درصد بود. در مورد وزن خشک نیز، تیمار ۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر عصاره بن‌سرخ با میانگین ۱۰/۶۰ گرم، افزایش ۳۶۱/۵ درصدی نسبت به شاهد نشان داد، در حالی که افزایش وزن خشک در تیمار هورمونی مذکور ۵۱۵/۴ درصد نسبت به شاهد بود. بیشترین میزان قندهای محلول در تیمارهای ۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر عصاره بن‌سرخ و گل‌قاصدک به‌ترتیب با مقادیر ۴/۷۳ و ۴/۴۴ میلی‌گرم بر گرم وزن تر مشاهده شد که نسبت به شاهد (۳ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) به‌ترتیب ۵۷/۶۷ و ۴۸ درصد افزایش نشان داد. نتایج تجزیه HPLC نشان داد که برخی تیمارهای منتخب با افزایش محتوای Rebaudioside A همراه بودند که بیشترین مقدار در چهار تیمار منتخب، با میانگین ۸/۶۴ درصد در تیمار ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر عصاره گل‌قاصدک مشاهده شد که تقریباً سه برابر شاهد بود. پس از آن، تیمار ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP + ۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA و تیمار ۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر عصاره بن‌سرخ، به‌ترتیب با میانگین ۶/۶۶ و ۵/۵۵ درصد، قرار گرفتند.

نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج، عصاره‌های بن‌سرخ و گل‌قاصدک می‌توانند به‌عنوان عصاره‌های گیاهی با پتانسیل محرک زیستی برای تعدیل رشد و برخی پاسخ‌های متابولیکی استویا در شرایط درون‌شیشه‌ای مورد توجه قرار گیرند. عصاره بن‌سرخ در غلظت ۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر، به‌ویژه از نظر تعداد برگ، عملکردی مشابه تیمار ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP + ۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA نشان داد، اما از نظر وزن تر و وزن خشک پایین‌تر از تیمار هورمونی بود. البته نتایج این پژوهش جایگزینی مستقیم یا کامل عصاره‌های طبیعی به جای BAP و NAA را اثبات نمی‌کند و باید بیشتر ارزیابی گردد. با این حال، به دلیل انجام نشدن آنالیز HPLC برای سایر تیمارها، این نتیجه قابل تعمیم به تمام تیمارهای آزمایشی نیست. در مجموع، یافته‌ها نشان‌دهنده ظرفیت بالقوه عصاره‌های طبیعی برای تعدیل برخی صفات رشدی و متابولیکی استویا هستند و شناسایی ترکیبات زیست‌فعال موجود در عصاره‌ها و بررسی سازوکار اثر آنها می‌تواند در مطالعات آینده به درک دقیق‌تر این پاسخ‌ها کمک کند.

نحوه استناد:

کاظمی، ن.، حاتم‌زاده، ع.، خان محمدی، م.، و سهرابی، ا. (۱۴۰۵). پتانسیل عصاره‌های گیاهی به‌عنوان محرک زیستی برای بهبود رشد، متابولیسم قند و تجمع Rebaudioside A در استویا (*Stevia rebaudiana* Bertoni) در شرایط درون‌شیشه‌ای. مجله پژوهش در متابولیت‌های گیاهی، دوره ۴، شماره ۳، صفحات: ۳۱-۴۸.

Doi:10.22034/jrpsm.2026.597016.1133

مقدمه

امروزه با رشد شدید جمعیت و بروز بیماری‌های مختلف، نگرانی تأمین غذا، امنیت غذایی و همچنین گرایش به زندگی و تغذیه سالم به یک رویکرد جهانی تبدیل شده است. گیاهان دارویی به دلیل دارا بودن ترکیبات متابولیتی بسیار متنوع، پتانسیل بالایی برای کاربرد در زمینه‌های مختلف علوم زیستی از جمله پزشکی (Alum et al., 2024)، داروسازی (Singh et al., 2024)، از آنجایی که بخش کشاورزی به صورت مستقیم با تغذیه جامعه بشری و دام در ارتباط است، اهمیت کاربرد گیاهان دارویی و ترکیبات طبیعی در این حوزه دوجندان می‌گردد (Saleem et al., 2025). بر همین اساس، کشاورزی مدرن امروزه به طور جدی تحت تاثیر استفاده از ترکیبات استخراج شده از گیاهان قرار گرفته است و محققان بسیاری در حال تحقیق و توسعه این رویکردها هستند (Kumar et al., 2025).

از سوی دیگر، همان‌گونه که در دانش بومی نیز مشخص شده است، گیاهان از طریق ترشح ترکیبات درونی خود بر رشد و نمو گیاهان همجوار تاثیر می‌گذارند که این پدیده امروزه آلوپاتی نامیده می‌شود (Dang Xuan et al., 2025). اثرات آلوپاتیک می‌توانند بسته به نوع و غلظت ترکیب، مثبت (تحریک‌کننده) یا منفی (بازدارنده) باشند (Kamanga et al., 2025). در همین راستا، پژوهش‌های گذشته نشان داده‌اند که عصاره گیاه پرپلا به دلیل دارا بودن محتوای بالای رزمارینیک‌اسید، اثر بازدارنده شدیدی بر رشد علف‌های هرز دارد (Kang et al., 2024). در مقابل، در بررسی اثر عصاره شش گیاه دارویی (از جمله بن‌سرخ و گل‌قاصدک) بر کالوس‌زایی گوجه‌فرنگی، مشخص شد که تمام عصاره‌های گیاهی توانستند رشد و حجم کالوس را به طور معنی‌داری بیش از ۵۰ درصد افزایش دهند (Sohrabi et al., 2025). موفقیت‌های مشابهی نیز در زمینه کاربرد عصاره‌های گیاهی به عنوان محرک زیستی (Biostimulant) گزارش شده است؛ برای مثال، تیمار با شیر نارگیل موجب بهبود ریشه‌زایی در کالانکوه و بنت‌القدسول شده (Ehiagbonare et al., 2008) و محلول‌پاشی با عصاره مورینگا منجر به افزایش ۲۰ تا ۳۵ درصدی عملکرد کل، محتوای قند و مواد معدنی گیاه هدف گردیده است (Foidl et al., 2001). در همین راستا، سهرابی و همکاران اثر شش گیاه دارویی شامل گل‌قاصدک (*Taraxacum officinale*)، بن‌سرخ (*Allium jesdianum*)، ریواس (*Rheum ribes*)، کندل (*Dorema*)، ارس (*Juniperus sabina*) و کهور (*Conocarpus erectus*) را بر رشد گیاه گوجه‌فرنگی در شرایط گلخانه‌ای بررسی کردند. نتایج این پژوهش نشان داد که پاسخ گیاه به عصاره‌ها وابسته به نوع گیاه دارویی و غلظت مصرف بوده و این عصاره‌ها می‌توانند به عنوان بیواستیمولانت‌های طبیعی بر صفات رشدی و باززایی گیاه

تأثیرگذار باشند به گونه ای که کمترین طول ساقه در تیمار شاهد مقایسه گردید (Sohrabi et al., 2021).

تلفیق مفاهیم آلوپاتی مثبت و ترکیبات دارویی در چارچوب کشاورزی سبز و ارگانیک (Mahedi et al., 2025)، رویکرد جدیدی را برای جایگزینی تنظیم‌کننده‌های رشد سنتزی با محرک‌های طبیعی در سیستم‌های درون‌شیشه‌ای (*In vitro*) گشوده است. در این میان، گیاه بن‌سرخ (*Allium jesdianum*)، گیاهی پیازی و چندساله از خانواده Amaryllidaceae است که در مناطق کوهستانی ایران رشد می‌کند (Nehzomi et al., 2024). این گیاه سرشار از ترکیبات ارگانوسولفور و فنول‌های چرب با خواص بیولوژیک متمایز است (Shirani et al., 2023). از سوی دیگر، گل‌قاصدک (*Taraxacum officinale*) متعلق به خانواده Asteraceae، گیاهی علفی است که به دلیل غنای بیوشیمیایی از فیتوستروئول‌ها و اسیدهای ارگانیک، پتانسیل بالایی در تحریک رشد و تقسیم سلولی نشان داده است (Hao et al., 2024; Masciulli et al., 2025). وجود این ویژگی‌ها، تاکنون اثر آلوپاتیک یا پتانسیل محرک‌زایی عصاره هیدروالکلی این دو گونه بر فرآیندهای فیزیولوژیک در شرایط کشت‌بافت ارزیابی نشده است.

گیاه استویا (*Stevia rebaudiana*)، از خانواده Asteraceae، یکی از گیاهان دارویی ارزشمند و کاربردی است که به دلیل دو ترکیب شاخص استویوزاید و ریبادیوزاید A، جایگزینی طبیعی و مناسب برای قندهای شیمیایی در بیماران دیابتی محسوب می‌شود (Alhalawi et al., 2025; Sichanova et al., 2022). گسترده‌ای در صنایع دارویی، آرایشی-بهداشتی و غذایی دارد (Ram et al., 2025). از آنجا که تکثیر بذری استویا به دلیل قوه نامیه پایین و محدودیت‌های ژنتیکی با چالش‌های جدی مواجه است، تکثیر درون‌شیشه‌ای آن اهمیت بالایی دارد. با توجه به ضرورت بهینه‌سازی محیط‌های کشت بافت با استفاده از ترکیبات ارگانیک، پژوهش حاضر با هدف بررسی تاثیر عصاره هیدروالکلی دو گیاه دارویی بن‌سرخ و گل‌قاصدک بر ویژگی‌های کمی، مرفولوژیک و شاخص‌های کیفی گیاه کشت‌بافتی استویا انجام شد.

مواد و روش‌ها

عصاره‌ها با استفاده از یک حلال هیدروالکلی متشکل از اتانول و آب مقطر (۷۰:۳۰، حجمی/حجمی)، طبق روش شرح داده شده توسط سهرابی و همکاران (۲۰۲۴) تهیه شدند. برای استخراج، ۵ گرم از ماده گیاهی با ۵۰ میلی‌لیتر حلال با نسبت گیاه به حلال ۱:۱۰ w/v مخلوط شد. استخراج به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق با استفاده از روش خیساندن روی شیکر، انجام شد. عصاره‌های حاصل، متعاقباً از طریق کاغذ صافی میکرومتری فیلتر شدند تا مواد گیاهی حذف

غشایی سرنگی ۰/۴۵ میکرومتری زیر هود جریان هوای آرام عبور داده شدند تا ذرات معلق حذف شده و خطر آلودگی میکروبی کاهش یابد. حجم مورد نیاز هر محلول پایه برای غلظت تیمار مربوطه با استفاده از رابطه غلظت-حجم محاسبه شد:

$$M_1 V_1 = M_2 V_2 \quad \text{رابطه ۱:}$$

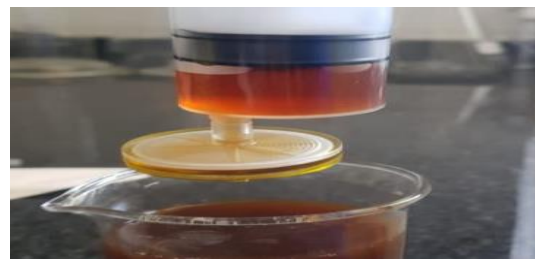
که در آن (M1) و (V1) به ترتیب غلظت و حجم محلول پایه و (M2) و (V2) به ترتیب غلظت نهایی مورد نظر و حجم نهایی در محیط کشت را نشان می‌دهند. سپس حجم‌های محاسبه شده قبل از انجماد کامل آگار به محیط کشت پایه موراشیگ و اسکوگ (MS) استریل شده اضافه شدند تا توزیع یکنواخت تضمین شود (شکل ۱).

شوند. حلال با استفاده از یک تبخیرکننده دوار مدل IKA HB10 ساخت کشور آلمان در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد حذف شد. رطوبت باقیمانده متعاقباً با استفاده از یک خشک‌کن انجمادی (Christ Beta 2-8 LB plus ساخت کشور آلمان) حذف شد تا عصاره خشک شده به دست آید. عصاره‌های خشک شده در دمای یخچال، در شرایط تاریک و دور از هوا در ظرف در بسته، تا زمان استفاده بیشتر نگهداری شدند (شکل ۱).

برای تهیه محلول‌های پایه، ۱ گرم از هر عصاره گیاهی خشک شده انجمادی در آب مقطر استریل حل شد و حجم نهایی به ۱۰۰ میلی‌لیتر تنظیم شد که منجر به غلظت پایه ۱۰۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر شد. محلول‌ها تحت شرایط آسپتیک تهیه و دو بار از فیلترهای



A



B



C

شکل ۱- (A)- پودر تهیه شده از عصاره گیاهان دارویی (B)- استریل نمودن عصاره گیاهان دارویی از طریق فیلتر سرسنگی (C)- محیط‌های کشت حاوی تیمارهای مختلف جهت کشت قلمه گیاه استویا

Figure 1- (A)- Powder prepared from medicinal plant extracts (B)- Sterilization of medicinal plant extracts through a syringe filter (C)- Culture media containing different treatments for cultivating stevia plant cuttings

پایه MS حاوی تیمارهای آزمایشی مربوطه کشت داده شدند. کشت‌ها به مدت یک ماه در دمای ۱۸ تا ۲۲ درجه سانتیگراد تحت دوره نوری ۱۵ ساعت روشنایی و ۹ ساعت تاریکی با استفاده از نور فلورسنت سفید با شدت تقریبی ۲۰۰۰ لوکس نگهداری شدند. (شکل ۲).

تیمارهای آزمایشی: این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۱۰ تیمار و ۳ تکرار طراحی گردید. آرایش تیمارها به شرح زیر پایه‌ریزی شد:

تیمار شاهد: محیط کشت پایه MS بدون افزودن هیچگونه هورمون و عصاره گیاهی.

تیمارهای عصاره گل‌قاصدک و بن‌سرخ (جداگانه): محیط کشت MS حاوی غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر عصاره.

کشت بافت گیاه استویا و تهیه ریزنمونه استریل: گیاهچه‌های حاصل از کشت بافت استویا از یک شرکت کشت بافت تجاری در تهران، جمهوری اسلامی ایران خریداری شدند. هیچ رقم یا ژنوتیپ خاصی برای گیاهچه‌های تهیه شده در دسترس نبود. گیاهچه‌ها در زمان تهیه ریزنمونه تقریباً سه ماهه بودند و قبلاً در شرایط استریل آزمایشگاهی مستقر شده بودند. قطعات ساقه به طول تقریباً ۲ سانتی‌متر، حاوی حداقل یک گره و به طور متوسط دو برگ، از گیاهچه‌ها جدا شده و به عنوان ریزنمونه استفاده شدند. سه ریزنمونه در هر ظرف کشت قرار داده شد و هر ظرف کشت به عنوان یک تکرار مستقل (واحد آزمایشی) در نظر گرفته شد. برای هر تیمار از سه ظرف کشت استفاده شد که در نتیجه سه تکرار مستقل در هر تیمار به دست آمد. بنابراین، هر تیمار شامل نه ریزنمونه بود که بین سه ظرف کشت مستقل توزیع شده بودند. ریزنمونه‌ها در محیط کشت

لیتر NAA و ۲ میلی گرم بر لیتر BAP + ۱ میلی گرم بر لیتر NAA به عنوان کنترل‌های مثبت هورمونی (هر دو غلظت هورمون باهم، یک تیمار در نظر گرفته شد) (Ashrafi et al., 2022).

تیمارهای هورمونی: شامل محیط‌های کشت حاوی ترکیبات ۱ میلی گرم بر لیتر BAP + ۱ میلی گرم بر لیتر NAA، و همچنین نسبت‌های دوگانه شامل ۱ میلی گرم بر لیتر BAP + ۲ میلی گرم بر



A



B

شکل ۲- (A) - گیاهان کشت بافتی استریل استویا (B) - قلمه های تهیه شده و کشت شده در محیط کشت بافت

Figure 2- (A)- Sterile tissue cultured Stevia plants (B)- Cuttings prepared and cultured in tissue culture medium

طول موج ۴۸۸ نانومتر توسط دستگاه الیزایدر (BioTek PowerWave XS2) قرائت شد.

سنجش میزان ریبادیوزلید A: تعیین مقدار دی‌ترین گلیکوزید (ریبادیوزلید A) بر اساس روش شرح داده شده توسط Joshi (2025) با تغییرات جزئی انجام شد. برای استخراج، ۰/۵ گرم بافت گیاهی خشک با ۵ میلی‌لیتر آب مقطر (۱:۱۰، w/v) مخلوط و به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق روی شیکر استخراج شد. عصاره متعاقباً از طریق کاغذ صافی فیلتر شده و به سیستم HPLC (مدل Agilent 1100 ساخت کشور آمریکا) تزریق شد. تجزیه و تحلیل کروماتوگرافی با استفاده از یک سیستم HPLC (Agilent 1100) مجهز به ستون Nucleosil-100-NH₂ (Knaur، ۱۵۰ میلی‌متر × ۴/۶ میلی‌متر) انجام شد. دمای ستون در ۲۵ درجه سانتیگراد حفظ شد، حجم تزریق ۲۰ میکرولیتر بود و تشخیص در ۲۱۰ نانومتر انجام شد. فاز متحرک شامل آب (A) و استونیتریل (B) بود. برنامه کروماتوگرافی به شرح جدول ۱ بود:

جدول ۱- زمانبندی تغییرات فاز متحرک در دستگاه HPLC

Table 1- Mobile phase gradient schedule for the HPLC system

زمان Time	درصد حلال B B Solvent Percentage	جریان (میلی لیتر / دقیقه) Flow(ml/min)
0	75	0.5
30	75	0.5
31	75	1
35	60	1
37	50	1
45	50	1

صفات مورفولوژیک مورد سنجش: پس از طی دوره رشد، صفات رویشی شامل تعداد برگ، تعداد شاخه جانبی، وزن تر و وزن خشک یادداشت‌برداری شدند.

سنجش قندهای محلول کل: اندازه‌گیری قندهای محلول کل به روش فنل - اسید سولفوریک با اندکی تغییرات بر اساس روش (Dubois et al., 1956) انجام شد. بدین منظور، ۰/۵ گرم از بافت خشک پودر شده با ۱/۵ میلی‌لیتر اتانول ۸۰٪ مخلوط و به مدت ۲۰ ثانیه ورتکس شد. نمونه‌ها به مدت ۶۰ دقیقه در حمام آب گرم (۸۰ درجه سانتی‌گراد) انکوبه شده و پس از خنک شدن، به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۱۳۰۰۰ g سانتریفیوژ شدند. فاز مایع رویی جدا شده و به مدت ۴۸ ساعت در دمای اتاق جهت تبخیر کامل الکل قرار گرفت. پس از خشک شدن، ۱/۵ میلی‌لیتر آب مقطر به نمونه‌ها افزوده و ورتکس گردید. در ادامه، ۱۰ میکرولیتر از عصاره به ۲۵۰ میکرولیتر محلول فنل ۰/۵٪ اضافه شد و سپس ۱۲۵۰ میکرولیتر اسید سولفوریک ۹۸٪ به مخلوط افزوده گردید. پس از ۱۰ دقیقه سکون در دمای اتاق، میزان جذب نوری نمونه‌ها در

کل زمان تجزیه و تحلیل ۴۵ دقیقه بود. منحنی کالیبراسیون برای ریبادیوزلید A با استفاده از غلظت‌های مشخص استاندارد ریبادیوزلید

A خالص تهیه شد. منحنی استاندارد ریبادیوزاید A با تزریق غلظت‌های مشخص از استاندارد خالص رسم شد که معادله خط کالیبراسیون رابطه ۲ به صورت زیر تعیین گردید:

$$1-Y: 307741x + 17.068$$

رابطه ۲:

$$R^2 = 0.9995$$

سنجش رنگیزه‌های فتوسنتزی: برای استخراج کلروفیل‌ها، ۰/۱ گرم از بافت برگ تازه در ۵ میلی‌لیتر استون ۸۰٪ کاملاً همگن شد. همگن به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰ × g سانتریفیوژ شد و جذب محلول رویی حاصل با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج‌های ۶۴۵ و ۶۶۳ نانومتر اندازه‌گیری شد. غلظت کلروفیل a رابطه ۳ و کلروفیل b رابطه ۴ طبق معادلات شرح داده شده توسط Lichtenthaler (1987) محاسبه شد.

$$2- \text{Chl.a} = 12.25 (\text{A663}) - 2.79 (\text{A645})$$

رابطه ۳:

رابطه ۴: $3- \text{Chl.b} = 21.50 (\text{A645}) - 5.10 (\text{A663})$
غلظت‌های کلروفیل محاسبه شده بر اساس وزن تازه (میلی گرم بر گرم وزن تازه) با در نظر گرفتن حجم استخراج و وزن بافت تازه برگ مورد استفاده برای استخراج بیان شدند. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی (CRD) با سه تکرار مستقل انجام شد. داده‌ها با استفاده از تجزیه واریانس (ANOVA) و مقایسه میانگین تیمارها با آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) در سطح احتمال ۵ درصد، با استفاده از نرم‌افزار SAS نسخه ۹، تجزیه و تحلیل شدند. نمودارها نیز با استفاده از نرم‌افزار Microsoft Excel ترسیم شدند.

نتایج و بحث

نتایج جدول تجزیه واریانس (جدول ۲)، در تمام تیمارهای آزمایشی بین صفات مورفولوژیک مورد مطالعه در سطح یک درصد و پنج درصد، تفاوت معنی‌داری مشاهده شد.

جدول ۲- تجزیه واریانس داده‌های مورفولوژیکی مربوط به کشت درون شیشه‌ای گیاه استویا

Table 2- Analysis of variance (ANOVA) of morphological traits in *in vitro* culture of Stevia (*Stevia rebaudiana*)

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean Squares			
		تعداد برگ Number of leaves	تعداد شاخه جانبی Number of lateral branches	وزن تر Fresh weight	وزن خشک Dry weight
تیمار Treatment	9	6.162 *	3.262 **	0.156 **	0.0016 **
خطای آزمایش Error	20	2.00	0.36	0.003	0.000028
ضریب تغییرات (%) CV		14.33	67.28	14.02	15.37

* و ** به ترتیب معنی‌داری در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد

* and ** are significant at 1 and 5% probability levels, respectively

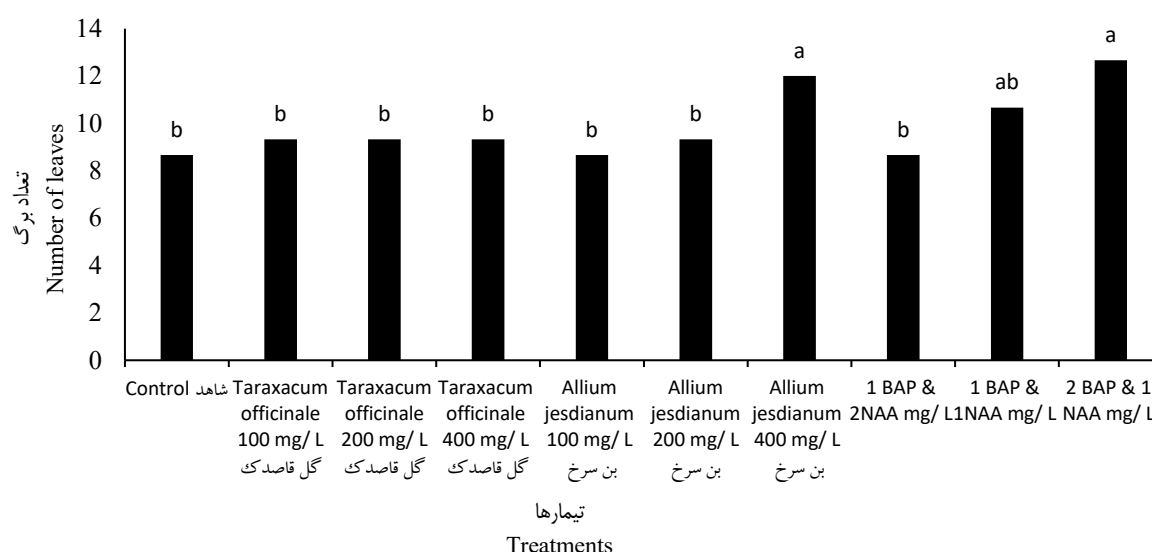
شیمیایی، حالتی صعودی و وابسته به دوز را با افزایش غلظت سیتوکینین نشان داد؛ به گونه‌ای که روند کلی افزایش تعداد برگ با افزایش غلظت عصاره بن‌سرخ نیز مشاهده شد (شکل ۳).

در کشت درون شیشه‌ای، سیتوکینین‌ها با تحریک تقسیم سلولی و رشد بافت‌های مریستمی، نقش مهمی در تشکیل و توسعه برگ‌ها دارند و حضور اکسین در غلظت‌های مناسب می‌تواند از طریق برهم‌کنش با سیتوکینین، روند رشد و تمایز اندام‌ها را تحت تأثیر قرار دهد (Taiz et al., 2015). هم‌سوبا این یافته‌ها، در بررسی ریزازدیادی سوسن شرقی گزارش شد که عدم حضور هم‌زمان اکسین و سیتوکینین می‌تواند رشد برگ‌ها را کاهش دهد و حداکثر تعداد برگ در شرایطی حاصل می‌شود که غلظت‌های مناسب سیتوکینین با سطح مشخصی از اکسین همراه گردد (Javaheri and Kaviani, 2022). نتایج پژوهش‌های دیگر نیز بر نقش غلظت‌های مناسب سیتوکینین در افزایش تعداد برگ در شرایط کشت بافت تأکید

تعداد برگ: بر اساس نتایج تجزیه واریانس داده‌ها، تعداد برگ گیاهچه درون شیشه‌ای استویا تحت تأثیر معنی‌دار تیمارهای آزمایشی در سطح احتمال پنج درصد قرار گرفت (جدول ۲). نتایج مقایسه میانگین (شکل ۳) نشان داد که حداکثر تعداد برگ با میانگین ۱۲/۶۶ عدد در تیمار هورمونی ۲ میلی گرم بر لیتر BAP + ۱ میلی گرم بر لیتر NAA به دست آمد که البته اختلاف معنی‌داری با تیمار عصاره طبیعی بن‌سرخ در غلظت ۴۰۰ میلی گرم بر لیتر نداشت. اعمال تیمار هورمونی مذکور و عصاره بن‌سرخ (۴۰۰ میلی گرم بر لیتر) به ترتیب موجب افزایش ۴۶/۱۸ و ۳۸/۵۶ درصدی تعداد برگ در مقایسه با محیط کشت شاهد گردید. از سوی دیگر، کمترین تعداد برگ در محیط کشت شاهد و غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر عصاره بن‌سرخ مشاهده شد و سایر تیمارهای آزمایشی تفاوت آماری معنی‌داری را با شاهد نشان ندادند (شکل ۳). روند تکوین و افزایش تعداد برگ در تیمارهای

مستقیم تعیین نشده است، نمی‌توان پاسخ مشاهده‌شده را به یک ترکیب یا گروه ترکیبات خاص نسبت داد. بنابراین، می‌توان فرض کرد که مجموعه‌ای از ترکیبات موجود در عصاره ممکن است از طریق اثرات فیزیولوژیک و متابولیکی بر بافت ریزنمونه، در پاسخ رشدی مشاهده شده نقش داشته باشند؛ با این حال، تعیین ترکیبات مسئول و شناسایی سازوکار دقیق این اثر نیازمند مطالعات تکمیلی است. بررسی پروفایل فیتوشیمیایی عصاره‌ها، همراه با اندازه‌گیری تنظیم‌کننده‌های رشد درون‌زاد و شاخص‌های مولکولی مرتبط با رشد و اندام‌زایی، می‌تواند در مطالعات آینده به روشن‌شدن سازوکار احتمالی اثر عصاره بن‌سرخ بر رشد برگ در استویا کمک کند.

کرده‌اند (Han *et al.*, 2004; Youssef *et al.*, 2019). در پژوهش حاضر، در میان محرک‌های زیستی طبیعی مورد مطالعه، تیمار ۴۰۰ میلی گرم بر لیتر عصاره بن‌سرخ بیشترین تعداد برگ را ایجاد کرد و از نظر آماری با تیمار هورمونی تفاوت معنی‌داری نداشت. این پاسخ می‌تواند نشان‌دهنده ظرفیت بالقوه این عصاره در بهبود برخی ویژگی‌های مورفوتناتیکی ریزنمونه‌های استویا باشد. مطالعات پیشین، حضور گروه‌های مختلفی از ترکیبات فیتوشیمیایی، از جمله ترکیبات گوگردی، ترپنوئیدی و سایر ترکیبات زیست‌فعال را در بن‌سرخ گزارش کرده‌اند (Askari, 2022). با این حال، از آنجا که ترکیب فیتوشیمیایی عصاره‌های مورد استفاده در مطالعه حاضر به‌طور



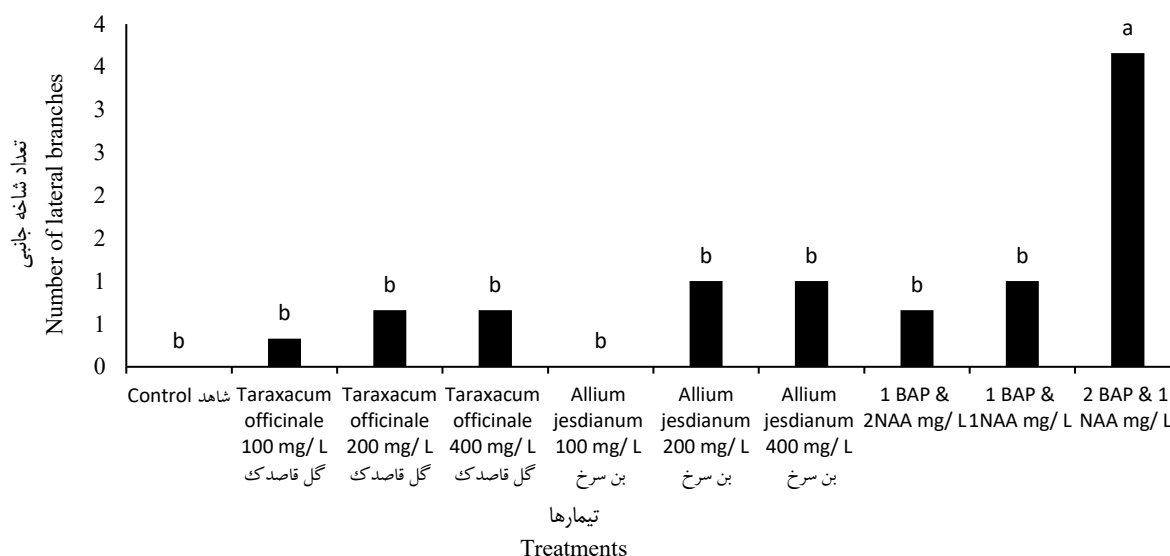
شکل ۳- مقایسه میانگین اثر عصاره‌های گیاهان آزمایشی بر تعداد برگ در گیاهچه استویا

Figure 3- Comparison of the mean effects of experimental plant extracts on the number of leaves of *Stevia rebaudiana*.

سیتوکینین‌ها در فرآیندهای مورفوژنز درون‌شیشه‌ای، به‌ویژه از طریق تحریک تقسیم سلولی، القای چرخه سلولی در بافت مریستمی و تفکیک توده‌های سلولی نقش مهمی دارند (Sosnowski *et al.*, 2023; Tarakhovskaya *et al.*, 2013). در کشت بافت، افزایش تعداد شاخه‌های جانبی به طور مستقیمی با شکستن چیرگی رأسی (Apical Dominance) در ارتباط است. افزایش نسبت سیتوکینین به اکسین در محیط کشت می‌تواند با کاهش چیرگی رأسی و تحریک رشد جوانه‌های جانبی همراه باشد (Taiz *et al.*, 2015). با این حال، تعادل یا نسبت هورمونی (Auxin/Cytokinin Ratio) متضمن موفقیت در شاخساره‌زایی است؛ به طوری که حضور دوزهای کم اکسین (۱ میلی گرم بر لیتر NAA) در کنار سیتوکینین، با تسریع فرآیند سست شدن دیواره سلولی و افزایش انعطاف‌پذیری مکانیکی غشا، خروج و طویل شدن جوانه‌های نابه جا و شاخه‌های جانبی را تسهیل می‌کند (Siddiqui *et al.*, 2019). همسو با این نتایج در تحقیقی دیگر بر گیاه استویا، با افزودن هورمون BAP به محیط

تعداد شاخه جانبی: نتایج تجزیه واریانس (جدول ۲) نشان داد که اثر تیمارهای آزمایشی بر تعداد شاخه جانبی گیاهچه استویا در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار است. بر اساس نتایج مقایسه میانگین (شکل ۴)، تیمار هورمونی ۲ میلی گرم بر لیتر BAP + ۱ میلی گرم بر لیتر NAA با میانگین ۳/۶۶ شاخه جانبی، بیشترین تعداد شاخه جانبی را تولید کرد؛ در حالی که در تیمار شاهد هیچ شاخه جانبی مشاهده نشد. اگرچه سایر تیمارهای آزمایشی (شامل غلظت‌های مختلف عصاره بن‌سرخ و گل‌قاصدک) از نظر آماری در گروه مشترکی با شاهد قرار گرفتند، اما روندی افزایشی را در تحریک شاخه‌زایی جانبی القا نمودند؛ در این میان، تنها تیمار عصاره بن‌سرخ در غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر فاقد اثر محرک بر این صفت بود و عملکردی کاملاً مشابه با شاهد داشت (شکل ۴).

IBA یا NAA) در باززایی بهینه شاخساره مطابقت دارد (Youssef *et al.*, 2019). از یافته‌های قابل توجه در این صفت، مشاهده مقادیر عددی بالاتر تعداد شاخه‌های جانبی در برخی غلظت‌های عصاره‌های بن‌سرخ و گل‌قاصدک نسبت به شاهد بود؛ اگرچه این تفاوت‌ها از نظر آماری معنی‌دار نبودند (شکل ۴).



شکل ۴- مقایسه میانگین اثر عصاره‌های گیاهان آزمایشی بر میزان تعداد شاخه جانبی گیاهچه استویا

Figure 4- Comparison of the mean effects of experimental plant extracts on the number of lateral branches of *Stevia rebaudiana*.

چشمگیری و ۶/۳ برابر بیوماس تر (۵۲۹/۳٪) در مقایسه با محیط کشت شاهد است. از سوی دیگر، محرک زیستی عصاره بن‌سرخ در غلظت ۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر در رتبه بعدی قرار گرفت و توانست وزن تر گیاهچه استویا را به میزان ۳/۴۱ برابر (۲۴۰/۷٪) نسبت به تیمار شاهد افزایش دهد. به طور کلی، روند تغییرات وزن تر در ریزنمونه‌ها با افزایش غلظت عصاره‌های گیاهی کاربردی، حالتی صعودی و وابسته به دوز را نشان داد (شکل ۵).

ارزیابی میانگین‌های وزن خشک (شکل ۶) نیز نشان داد که توازن تجمع ماده خشک در بافت‌ها با الگوی همسو بهبود یافته است؛ به طوری که بیشترین میزان وزن خشک در تیمار ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP + ۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA (افزایش ۵۱۵/۴ درصدی نسبت به شاهد، معادل رسیدن وزن خشک به حدود ۶/۱۵ برابر مقدار شاهد) و سپس در غلظت ۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر عصاره طبیعی بن‌سرخ با میانگین ۰/۶ گرم (افزایش ۳۶۱/۵ درصدی نسبت به شاهد، به طوری که وزن خشک به حدود ۴/۶۲ برابر مقدار شاهد رسید) ثبت گردید. همچنین در تیمار عصاره گل‌قاصدک نیز با افزایش غلظت از ۱۰۰ به ۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر، روند تجمع ماده خشک گیاهچه رو به افزایش بود (شکل ۶).

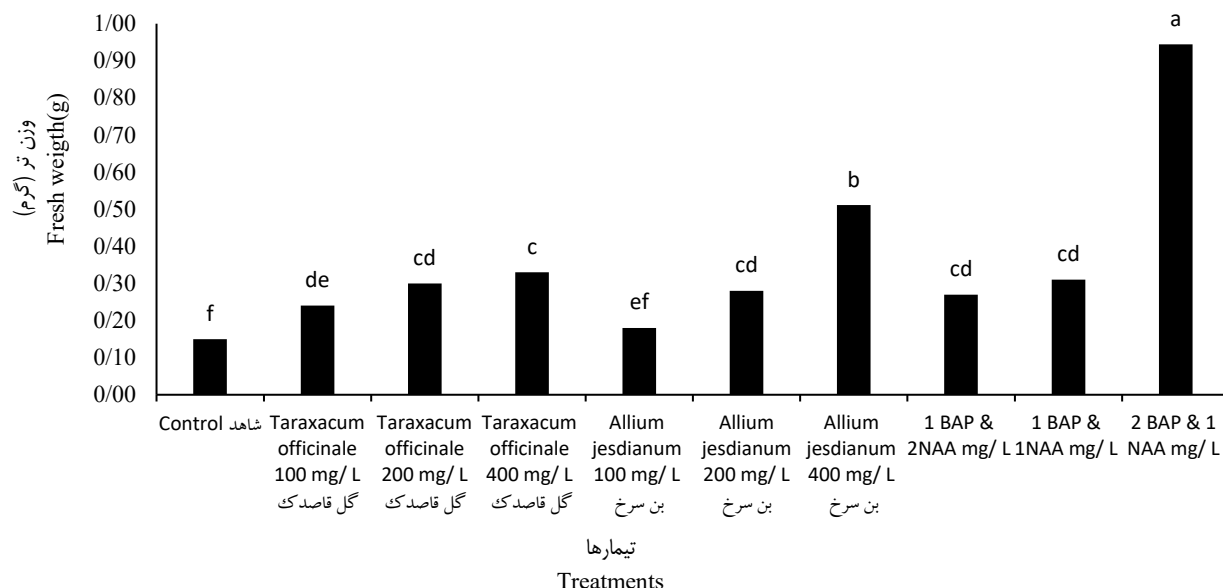
موراشیک و اسکوک (MS)، در تعداد شاخه جانبی افزایش معناداری مشاهده گردید (Tuyuc *et al.*, 2025). پتانسیل تکثیر نوشاخه‌ها به شدت تحت تأثیر توازن تنظیم‌کننده‌های رشد خارجی و نوسانات هورمون‌های درون‌زاد گیاهی است که این امر با یافته‌های محققان دیگر در خصوص لزوم هم‌افزایی کارکردی BAP و اکسین (مانند

از آنجا که شرایط محیطی کشت، شامل نور، دما، رطوبت و ترکیبات پایه محیط MS، برای تمامی تیمارها یکسان و کنترل‌شده بود، می‌توان احتمال داد که ترکیبات زیست‌فعال موجود در عصاره‌های گیاهی در این پاسخ رشدی نقش داشته باشند. مطالعات پیشین نشان داده‌اند که عصاره‌های گیاهی می‌توانند حاوی گروه‌های مختلفی از ترکیبات فیتوشیمیایی باشند که بسته به نوع گیاه و شرایط استخراج، ممکن است بر فرآیندهای فیزیولوژیک و رشدی گیاه تأثیرگذار باشند (De Saeger *et al.*, 2020). بنابراین، با توجه به پاسخ مشاهده شده در این مطالعه، می‌توان احتمال داد که ترکیبات موجود در عصاره‌ها در تنظیم رشد شاخه‌های جانبی نقش داشته باشند؛ با این حال، تعیین ترکیبات و مسیرهای فیزیولوژیک مسئول این پاسخ، مستلزم بررسی‌های تکمیلی در مطالعات آینده است.

وزن تر و خشک گیاهچه: نتایج تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۲) نشان داد که صفت وزن تر و وزن خشک گیاهچه درون‌شیشه‌ای استویا به شدت تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار گرفته و این پاسخ در سطح احتمال یک درصد کاملاً معنی‌دار گردید. براساس نتایج مقایسه میانگین صفت وزن تر (شکل ۵)، بیشترین میزان وزن تر گیاهچه با میانگین ۰/۹۴ گرم در تیمار هورمونی سنتزی ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP + ۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA حاصل شد که نشان‌دهنده افزایش

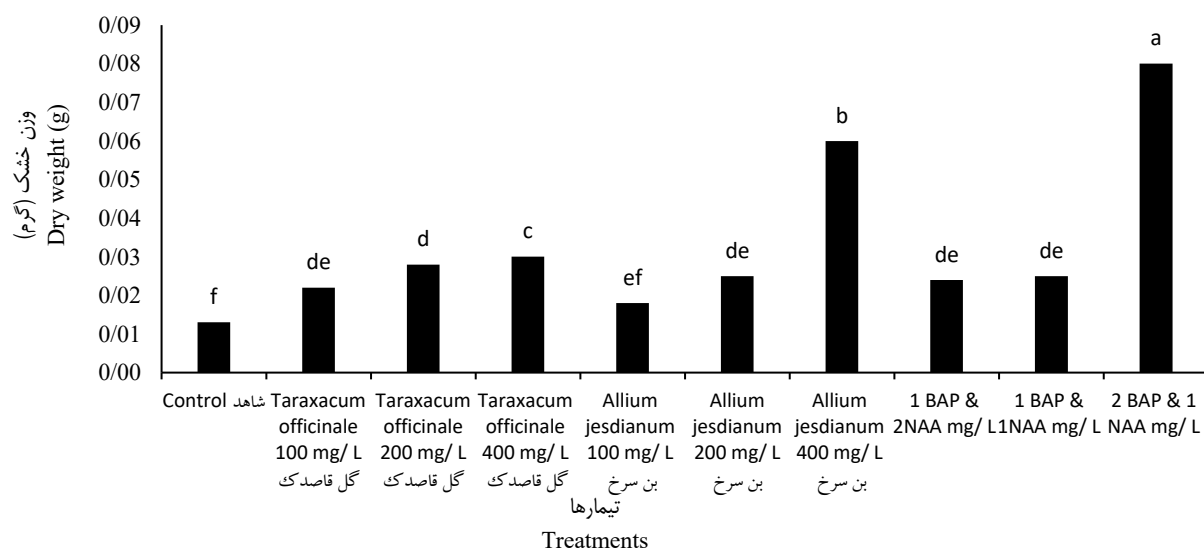
سیتوکینین بر ویژگی‌های رشدی و تولید زیست‌توده در سطح یک درصد معنی‌دار بوده و غلظت‌های بالای سیتوکینین در کنار سطوح بهینه اکسین، وزن مرطوب بافت را به حداکثر می‌رساند (Saremi *et al.*, 2016).

نوسانات وزن تر و خشک تولید شده در هر ریزنمونه به طور مستقیمی بازتاب‌دهنده نرخ تقسیم سلولی، طولیل شدن سلول‌ها و میزان ظرفیت جذب آب و مواد غذایی در بافت‌های در حال تکوین است. همسو با یافته‌های تحقیق حاضر، محققان دیگر در بررسی توازن هورمونی گیاه استویا گزارش کردند که اثرات متقابل اکسین و



شکل ۵- مقایسه میانگین اثر عصاره‌های گیاهان آزمایشی بر وزن تر گیاهچه استویا

Figure 5- Comparison of the mean effects of experimental plant extracts on fresh weights of *Stevia rebaudiana*.



شکل ۶- مقایسه میانگین اثر عصاره‌های گیاهان آزمایشی بر وزن خشک گیاهچه استویا

Figure 6- Comparison of the mean effects of experimental plant extracts on dry weights of *Stevia rebaudiana*

دادند (Javaheri and Kaviani, 2022; Wu *et al.*, 2019). در مطالعه‌ای گزارش گردید که غلظت‌های نامتعادل فیتوهورمون‌ها زمان القای باززایی را طولانی کرده و افزایش بیش از حد اکسین به دلیل تحریک بیوسنتز اتیلن داخلی، وزن زیست‌توده را کاهش می‌دهد که این امر نمایانگر اهمیت تنظیم دوزهای بهینه هورمونی است

در تحقیقی دیگر، کاربرد بنزیل آدنین را عامل اصلی بهبود بیوماس در گیاه صبر زرد (*Aloe vera*) دانستند (Hazrati Yadkori and Tahmasebi Sarvestani, 2011). همچنین در تحقیقات دیگر محققان تفاوت در وزن و ابعاد اندام‌های باززایی شده در شرایط کشت درون‌شیشه‌ای را به کارایی غلظت و نوع هورمون‌های مصرفی نسبت

سرکوب می‌کنند (Taiz et al., 2015). از آنجا که عصاره بن‌سرخ واجد ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بسیار بالایی است، اعمال غلظت‌های بهینه آن احتمالاً با مهار و خنثی‌سازی مؤثر این رادیکال‌های آزاد، سد دفاعی سلول را تقویت کرده و بستر فیزیولوژیک مناسبی را برای بیان ژن‌های مرتبط با رشد و مریستم‌زایی فراهم آورده است. این سازوکار حمایتی در کنار وجود قندها و عناصر مغذی اساسی در عصاره، در تلاقی با نتایج سایر محققان، مبنی بر نقش عصاره‌های بیولوژیک در افزایش بیوماس پایدار عملکرد گیاهان (De Saeger et al., 2022)، توجیه‌کننده افزایش چند برابری وزن تر و خشک گیاهچه‌های استویا در این دوز مشخص است. بن‌سرخ ۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر در برخی صفات، از نظر آماری تفاوت معنی‌داری با تیمار هورمونی نشان نداد.

صفات بیوشیمیایی: بر اساس نتایج تجزیه واریانس جدول ۳، اثر تیمارهای مختلف مورد مطالعه بر قند محلول در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود.

(Heydargholinejad et al., 2024). در این پژوهش، عصاره بن‌سرخ در غلظت ۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر، در میان تیمارهای طبیعی، بیشترین وزن تر و خشک گیاهچه را ایجاد کرد که نشان‌دهنده پاسخ رشدی مطلوب گیاهچه‌های استویا به این تیمار در شرایط آزمایش حاضر است. همان‌طور که پیش‌تر اشاره شد، این عصاره سرشار از ترکیبات فنلی، فلاونوئیدها و ترپن‌ها است (Askari, 2022). این بیومولکول‌ها پس از جذب توسط بافت ریزنمونه، احتمالاً تمایل دارند وارد مسیرهای متابولیسمی سلول (مانند مسیر شیکیمیک اسید) شده و به عنوان ساختارهای پیش‌ساز یا تعدیل‌کننده آنزیمی، سطح فیتوهورمون‌های داخلی (اکسین و سیتوکینین درون‌زاد) را به نفع رشد و پدیده‌زایی شاخساره تغییر دهند (Sohrabi et al., 2024). مضاف بر این نکته، از منظر فیزیولوژی کشت بافت، جداسازی ریزنمونه از گیاه مادری و فرآیند واکشت، به دلیل ایجاد آسیب مکانیکی به بافت‌ها (Wounding)، منجر به تولید شدید گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) و بروز استرس اکسیداتیو در سلول‌ها می‌شود. این رادیکال‌های آزاد با حمله به غشاهای سلولی و اندامک‌ها (مانند کلروپلاست و میتوکندری)، پتانسیل رشد ریزنمونه را به شدت

جدول ۳- تجزیه واریانس داده‌های بیوشیمیایی مربوط به کشت درون شیشه‌ای گیاه استویا

Table 3- Analysis of variance (ANOVA) of biochemical traits in *in vitro* culture of Stevia (Stevia rebaudiana)

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean Squares		
		کلروفیل a Chlorophyll a	کلروفیل b Chlorophyll b	قند محلول Soluble Sugars
Treatment تیمار	9	0.17112 **	1.021492 **	0.2190 **
Error خطای آزمایش	20	0.00852	0.047677	0.015
CV (%) ضریب تغییرات		11.27	10.596	6.46

** معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد.

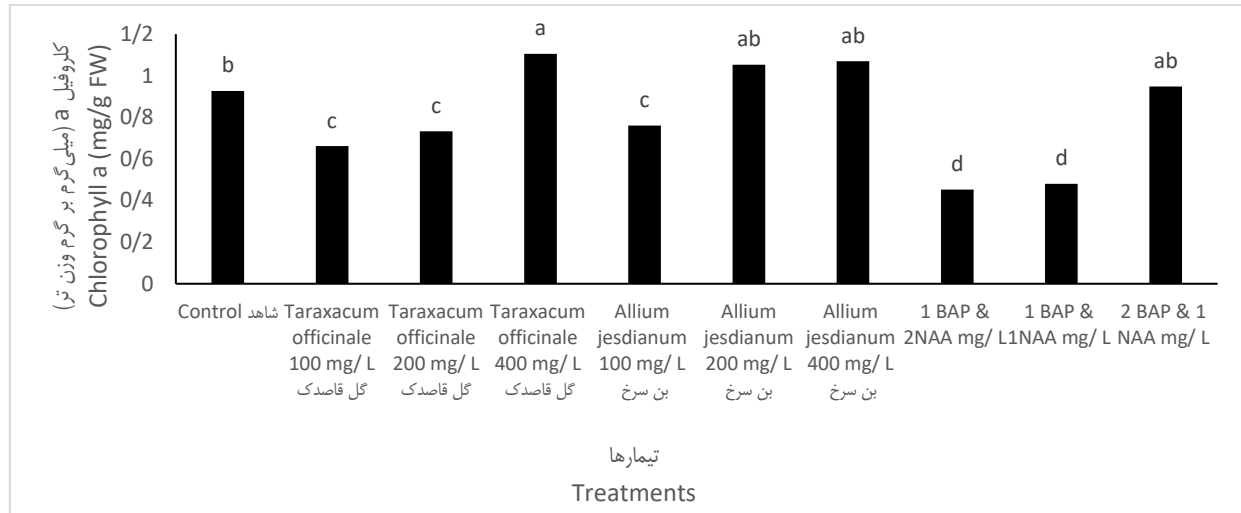
** Significant at 1 percent probability levels

کلروفیل a به تیمارهای هورمونی ۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP + ۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA و ۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP + ۲ میلی‌گرم بر لیتر NAA تعلق یافت که به ترتیب موجب کاهش ۵۱/۱ و ۴۸/۲۴ درصدی این رنگیزه فتوسنتزی در مقایسه با شاهد شدند. ارزیابی الگوی نوسانات نشان داد که با افزایش غلظت عصاره‌های طبیعی، محتوای کلروفیل a روندی صعودی و کاملاً مشابه با تیمارهای هورمونی دارای غلظت بالای سیتوکینین نشان می‌دهد؛ در حالی که دوزهای پایین عصاره اثر بازدارندگی داشتند (شکل ۷). این رفتار فیزیولوژیک نشان‌دهنده آن است که دوزهای بالاتر عصاره‌ها واجد ترکیبات شبه سیتوکینینی منحصربه‌فردی هستند که بیوسنتز رنگیزه‌ها را فعال می‌کنند. از منظر مکانیسم هورمونی، این پاسخ ممکن است با تغییر در تعادل اکسین/سیتوکینین و پیامدهای احتمالی آن بر متابولیسم

محتوای کلروفیل a (Chlorophyll a Content): نتایج تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۳) نشان داد که محتوای کلروفیل a گیاهچه‌های درون‌شیشه‌ای استویا تحت تأثیر معنی‌دار تیمارهای آزمایشی در سطح احتمال یک درصد قرار گرفت. بر اساس نتایج مقایسه میانگین (شکل ۷)، تیمار محرک زیستی عصاره گل‌قاصدک در غلظت ۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر (میلی‌گرم بر لیتر) با میانگین ۱/۱۰۶ میلی‌گرم بر گرم وزن تر، بالاترین میزان کلروفیل a را به خود اختصاص داد و نسبت به محیط کشت شاهد (۰/۹۲۷)، افزایش ۱۹/۳۲ درصدی این صفت را ایجاد نمود. تیمارهای ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر عصاره بن‌سرخ و نیز تیمار هورمونی ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP + ۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA بدون اختلاف آماری معنی‌دار با تیمار برتر، در رتبه‌های بعدی قرار گرفتند (شکل ۷). در سمت مقابل، کمترین محتوای

غلظت‌های بالا (۴۰۰ میلی گرم بر لیتر) به دلیل غنای سیتوکینینی، مانع از بروز این پدیده شده‌اند.

اتیلن و تخریب کلروفیل مرتبط باشد (Taiz et al., 2015). احتمالاً عصاره‌های گیاهی در غلظت‌های پایین با برهم زدن توازن اکسین/سیتوکینین داخلی، این چرخه تخریبی را کلید زده‌اند، اما در

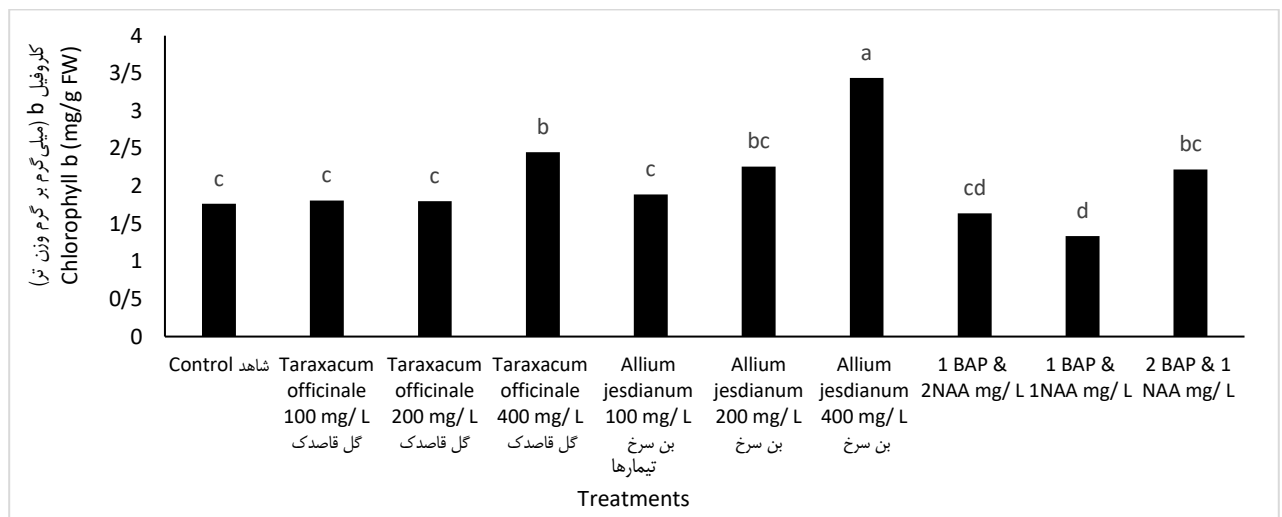


شکل ۷- مقایسه میانگین اثر عصاره‌های گیاهان آزمایشی بر میزان کلروفیل a گیاهچه استویا

Figure 7- Comparison of the mean effects of experimental plant extracts on the number of dry chlorophyll a of *Stevia rebaudiana*

شاهد نشان داد. غلظت ۴۰۰ میلی گرم بر لیتر عصاره گل قاصدک نیز با القای افزایش ۳۸/۹۰ درصدی در مرتبه بعدی قرار گرفت؛ در حالی که کمترین سطح کلروفیل b در تیمار هورمونی ۱ میلی گرم بر لیتر BAP + ۲ میلی گرم بر لیتر NAA با ۲۴/۱۴ درصد کاهش نسبت به شاهد به ثبت رسید (شکل ۸).

محتوای کلروفیل b (Chlorophyll b Content): طبق نتایج تجزیه واریانس (جدول ۳)، محتوای کلروفیل b گیاهچه استویا نیز به طور معنی داری در سطح احتمال یک درصد تحت تأثیر تیمارها قرار گرفت. نتایج مقایسه میانگین (شکل ۸) نشان داد که بیشترین میزان کلروفیل b با میانگین ۳/۴۳۹ میلی گرم بر گرم وزن تر در غلظت ۴۰۰ میلی گرم بر لیتر عصاره بن سرخ حاصل شد که افزایش ۹۵ درصدی را نسبت به



شکل ۸- مقایسه میانگین اثر عصاره‌های گیاهان آزمایشی بر میزان کلروفیل b گیاهچه استویا

Figure 8- Comparison of the mean effects of experimental plant extracts on the number of dry chlorophyll b of *Stevia rebaudiana*

مشابه مطابقت دارد؛ به طوری که در مطالعه‌ای بهبود قابل توجه محتوای کلروفیل a و b تحت تأثیر عصاره برگ مورینگا گزارش شده

کارایی ممتاز عصاره‌های طبیعی بن سرخ و گل قاصدک در غلظت‌های بالا در ارتقای محتوای رنگیزه‌ها با یافته‌های گزارش شده در مطالعات

بنابراین، نقش احتمالی این مسیر باید در مطالعات آینده از طریق سنجش فعالیت آنزیمی و یا بیان ژن‌های مرتبط مورد بررسی قرار گیرد.

محتوای قندهای محلول (Soluble Sugars Content): نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۳) نشان داد که اثر تیمارهای آزمایشی بر میزان قندهای محلول گیاهچه‌های درون‌شیشه‌ای استویا در سطح احتمال یک درصد کاملاً معنی‌دار است. بر اساس نتایج مقایسه میانگین داده‌ها (شکل ۹)، بیشترین میزان تجمع قندهای محلول در تیمار غلظت ۴۰۰ میلی گرم بر لیتر عصاره تغییر یافته گیاه بن‌سرخ با میانگین ۴/۷۳ میلی گرم بر گرم وزن تر مشاهده شد که این تیمار فاقد اختلاف آماری معنی‌دار با تیمار عصاره گل‌قاصدک در غلظت ۴۰۰ میلی گرم بر لیتر بود. این دو تیمار محرک زیستی برتر به ترتیب موجب افزایش چشمگیر ۵۷/۶۷ و ۴۸ درصدی محتوای قندهای محلول در مقایسه با محیط کشت شاهد (بدون عصاره) شدند (شکل ۹).

اگرچه استفاده از عصاره گیاه گل‌قاصدک در غلظت‌های پایین موجب کمترین میزان افزایش قند محلول گردید، اما این تغییرات در دوزهای پایین نسبت به شاهد از نظر آماری معنی‌دار ارزیابی نشد. به طور کلی، ارزیابی روند نوسانات نشان داد که با افزایش غلظت عصاره‌های طبیعی و تیمارهای فیتوهورمونی، میزان انباشت قندهای محلول در بافت‌های درون‌شیشه‌ای گیاهچه استویا روندی کاملاً صعودی و معنی‌دار را طی می‌کند (شکل ۹). احتمالاً، مکانیزم اصلی ارتقای قندهای محلول تحت تأثیر محرک‌های زیستی بن‌سرخ و گل‌قاصدک، بر پایه پاسخ‌های تنشی و تغییرات متابولیکی پیشرفته گیاه درون‌شیشه‌ای استوار است. یافته‌های این پژوهش با گزارش‌های الگوهای مشابه فیزیولوژیک مطابقت دارد؛ به طوری که محققان انباشت قندهای محلول را به عنوان یک پاسخ دفاعی پایدار در مواجهه با محرک‌های فیتوشیمیایی تأیید کردند (Afzal et al., 2021). به نظر می‌رسد احتمالاً ترکیبات ثانویه موجود در این دو عصاره از طریق سه مسیر فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی زیر، متابولیسم کربن را در استویا دستخوش تغییر کرده‌اند که در مطالعات آتی باید به تفکیک مورد بررسی قرار گیرند:

۱. القای فرآیند الیستاسیون و مکانیسم تنظیم اسمزی (Osmotic Adjustment):

مواد مؤثره پیشران در عصاره گل‌قاصدک (نظیر ترکیبات فنلی و لاکتون‌های سزکوئی‌ترین) و عصاره بن‌سرخ (به‌ویژه ترکیبات گوگردی آلی مانند دی-متیل‌تری‌سولفید و اسیدهای فنولیک) (Shirani et al., 2023; Grauso et al., 2019)، هنگامی که در دوزهای بالایی نظیر ۴۰۰ میلی گرم بر لیتر در محیط کشت اعمال می‌شوند، احتمالاً به عنوان یک القاگر زیستی (Elicitor) یا محرک

است (Abdalla, 2013). علاوه بر این، در مطالعه‌ای گزارش گردید که عصاره‌های گیاهی مرزنجوش و آویشن کوهی می‌توانند از طریق افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی سلولی، به حفظ پایداری سیستم فتوسنتزی کمک کنند (Ansar et al., 2019). ترکیبات زیستی موجود در عصاره بن‌سرخ و قاصدک، از جمله ویتامین C، فلاونوئیدها و پلی‌فنل‌ها، دارای ظرفیت بالقوه برای جاروب کردن گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) هستند و ممکن است از طریق کلاته کردن برخی عناصر غذایی و بهبود دسترسی گیاه به عناصر ضروری، از ساختار و عملکرد دستگاه فتوسنتزی حمایت کنند (Ramak et al., 2020; Kusvuran et al., 2021; Sohrabi et al., 2024). یک یافته قابل توجه در این بخش، افزایش ۹۵ درصدی محتوای کلروفیل b در غلظت ۴۰۰ میلی گرم بر لیتر عصاره بن‌سرخ بود. در شرایط معمول، نسبت کلروفیل a به b حدود ۳ به ۱ گزارش شده است؛ با این حال، تغییرات مشاهده شده که نسبت این دو رنگیزه در شرایط کشت درون‌شیشه‌ای می‌تواند تحت تأثیر عوامل مختلف فیزیولوژیک و محیطی قرار گیرد (Taiz et al., 2015). با توجه به اینکه در مطالعه حاضر فعالیت آنزیم‌های دخیل در متابولیسم کلروفیل و همچنین بیان ژن‌های مرتبط با این مسیرها اندازه‌گیری نشد، سازوکار دقیق افزایش کلروفیل b را نمی‌توان به‌طور قطعی تعیین کرد. با این وجود، چند مکانیسم احتمالی می‌تواند در تبیین این پاسخ نقش داشته باشد:

۱. سازگاری احتمالی با شرایط نوری (Shade Adaptation): ترکیبات فنلی و سایر ترکیبات زیست‌فعال موجود در عصاره‌ها ممکن است بر شرایط نوری و سیگنالینگ فیزیولوژیک گیاهچه‌ها اثر گذاشته و در نتیجه، تغییراتی در توسعه مجموعه‌های آنتنی گیرنده نور (LHCII) و سنتر کلروفیل b ایجاد کرده باشند. با این حال، این فرضیه در مطالعه حاضر مستقیماً مورد ارزیابی قرار نگرفته است.

۲. تغییرات احتمالی در پایداری ساختاری رنگیزه‌ها: تفاوت مشاهده شده در تجمع کلروفیل a و b ممکن است با تغییرات در پایداری رنگیزه‌ها و کمپلکس‌های پروتئینی غشای تیلاکوئید مرتبط باشد. با این حال، از آنجا که میزان تخریب اکسیداتیو یا پایداری ساختاری کمپلکس‌های فتوسنتزی در این مطالعه اندازه‌گیری نشده است، این احتمال نیازمند بررسی‌های تکمیلی است.

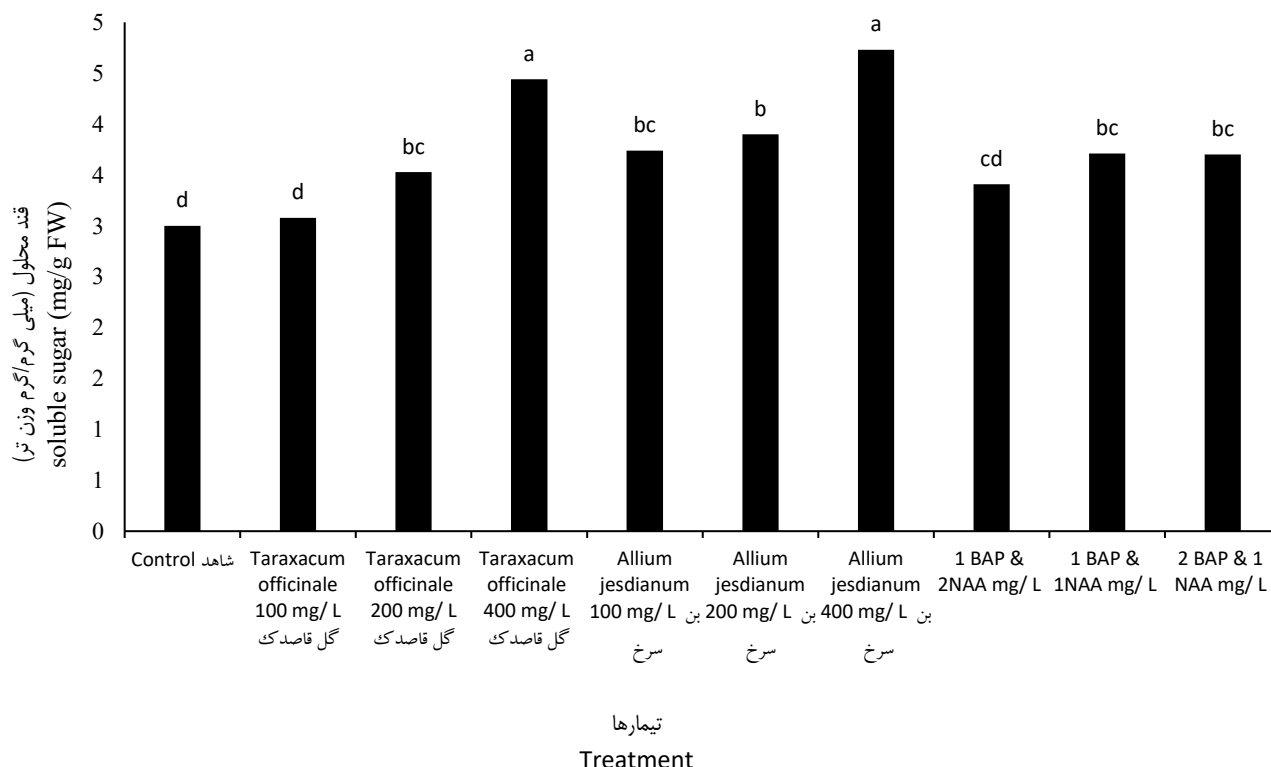
۳. نقش احتمالی مسیر تبدیل کلروفیل a به b: افزایش کلروفیل b ممکن است تا حدی با تغییر در تنظیم مسیر متابولیسم کلروفیل و فعالیت آنزیم‌هایی مانند chlorophyllide a oxygenase (CAO) مرتبط باشد؛ این آنزیم در مسیر تبدیل کلروفیل a به کلروفیل b نقش دارد. با این حال، از آنجا که فعالیت CAO یا بیان ژن مربوط به آن در مطالعه حاضر اندازه‌گیری نشده است، نمی‌توان افزایش فعالیت این آنزیم را به‌عنوان علت مستقیم افزایش کلروفیل b در نظر گرفت.

کلروپلاست‌ها کاهش می‌دهد. ثبات غشای تیلاکوئید منجر به بهبود کارایی کوانتومی فتوسنتز و تولید بیشتر قندهای اولیه در واحد زمان می‌شود. علاوه بر این، غنای بن‌سرخ از نظر گوگرد آلی، پیش‌نیازهای ساختاری برای سنتز اسیدهای آمینه گوگرددار (سیستئین و متیونین) و آنزیم‌های چرخه‌ی کلونین را فراهم آورده و راندمان کربوکسیلاسیون را بهبود می‌بخشد.

۳. تعدیل فعالیت آنزیم‌های چرخه ساکارز: احتمالاً ترکیبات فیتوشیمیایی موجود در عصاره‌ها می‌توانند به طور مستقیم یا غیرمستقیم فعالیت آنزیم‌های کلیدی جابه‌جایی و هیدرولیز قندها را تعدیل کنند. انباشت شدید قندهای ساده در برگ‌ها (شکل ۹) نشان‌دهنده آن است که دوزهای بالای این عصاره‌ها احتمالاً فعالیت آنزیم‌های کلتابولیکی مانند اینورتازهای واکوئلی و سیتوپلاسمی (Invertases) یا ساکارز سنتتاز پتانسیل شکافت را مهار کرده و در مقابل، بیوسنتز را از طریق آنزیم ساکارز فسفات سنتاز (SPS) تقویت نموده‌اند. این انسداد ساختاری در مسیر مصرف قندها، منجر به انباشت استراتژیک اسیدهای آمینه و کربوهیدرات‌های محلول در بافت‌های برگ گیاهچه استویا شده است.

تنش ملایم (Mild Stressor) عمل می‌کنند. گیاهچه استویا در پاسخ به این سیگنال‌های شیمیایی و جهت محافظت از ساختارهای سلولی خود در برابر دهیدراتاسیون احتمالی و اختلالات هیدروفوب پروتئینی، مکانیسم تنظیم اسمزی را فعال می‌سازد (Blum, 2017). این فرآیند با هماهنگی در بیان ژن‌های کلیدی، کربن تثبیت‌شده طی فتوسنتز را از مسیرهای ذخیره‌ای (مانند پلیمریزاسیون نشاسته) به سمت سنتز اسیدهای آمینه و قندهای محلول سازگار (Osmolytes) نظیر ساکارز، گلوکز و فروکتوز هدایت می‌کند تا تورژسانس سلولی حفظ گردد.

۲. صیانت آنتی‌اکسیدانی و ارتقای کارایی فتوسنتز: هر دو گیاه بن‌سرخ و گل‌قاصدک منابعی غنی از پلی‌فنل‌ها، فلاونوئیدها و غلظت بالای ویتامین C هستند که واجد پتانسیل بالایی در جاروب کردن رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌باشند (Sohrabi et al., 2024). در شرایط کشت درون‌شیشه‌ای که تنش‌های محیطی ناخواسته (نظیر رطوبت نسبی بالا و تبادل گازی محدود) به دستگاه فتوسنتزی آسیب می‌زند، احتمالاً دسترسی به این آنتی‌اکسیدان‌های برون‌زاد به عنوان یک لایه حفاظتی عمل کرده و استرس اکسیداتیو را در



شکل ۹- مقایسه میانگین اثر عصاره‌های گیاهان آزمایشی بر میزان قند محلول گیاهچه استویا

Figure 9- Comparison of the mean effects of experimental plant extracts on the soluble sugar of *Stevia rebaudiana*

مطالعه حاضر تنها بر روی چهار تیمار منتخب شامل شاهد، عصاره گل‌قاصدک با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر، عصاره بن‌سرخ با غلظت

گلیکوزیدهای استویا: به دلیل محدودیت‌های اقتصادی و هزینه بالای آنالیز، ارزیابی کمی Rebaudioside A با استفاده از HPLC در

۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر و تیمار هورمونی ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP + ۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA انجام شد. انتخاب این تیمارها بر اساس شاخص‌های رشد و میزان قندهای محلول انجام گرفت و از آنجا که

جدول ۴- تجزیه واریانس داده‌های مربوط به ریبادیوزاید A استویا در شرایط کشت درون شیشه‌ای

Table 4- Analysis of variance (ANOVA) of Rebaudioside A under *in vitro* culture conditions

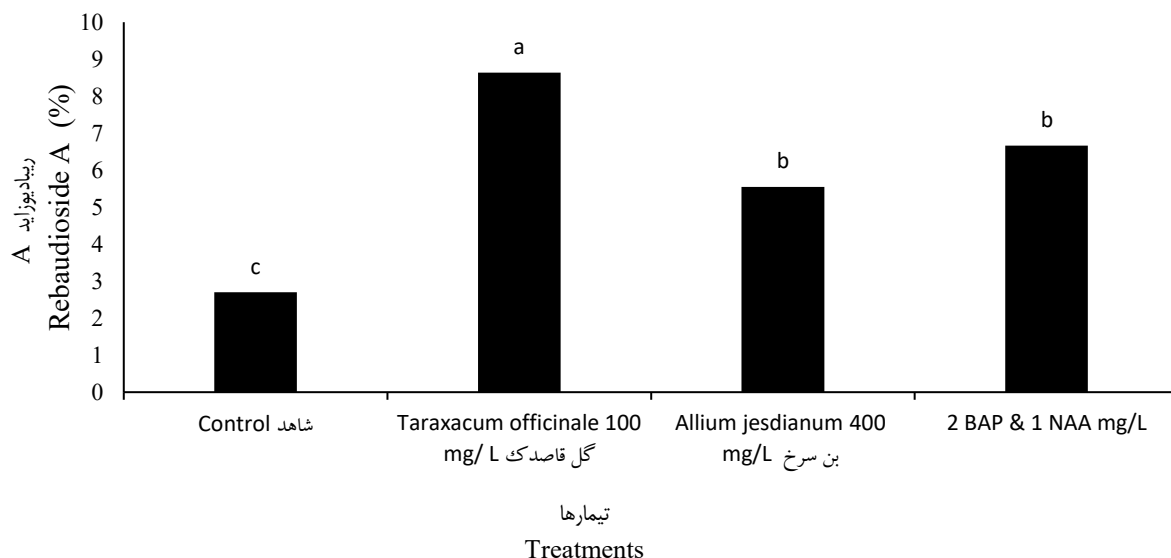
منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
s.o.v	df	Rebaudioside A
Treatment تیمار	3	18.416 **
Error خطای آزمایش	8	0.843
CV (%) ضریب تغییرات		15.592

** معناداری در سطح احتمال ۱ درصد

** Significant at the 1% probability level

بیشتر بود. تیمار هورمونی ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP + ۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA و عصاره بن‌سرخ ۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نیز به ترتیب با میانگین‌های ۶/۶۶ و ۵/۵۵ درصد در رتبه‌های بعدی قرار گرفتند و از نظر آماری اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نداشتند. بنابراین، در شرایط این آزمایش، تیمارهای منتخب مورد ارزیابی HPLC نسبت به شاهد مقادیر بالاتری از Rebaudioside A نشان دادند؛ با این حال، به دلیل انجام نشدن آنالیز HPLC برای سایر تیمارها، نمی‌توان این نتایج را به تمامی تیمارهای آزمایشی تعمیم داد (شکل ۱۰).

محتوای ریبادیوزاید A (Rebaudioside A Content): نتایج تجزیه واریانس داده‌های حاصل از HPLC (جدول ۴) نشان داد که بین چهار تیمار منتخب از نظر محتوای Rebaudioside A اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد وجود داشت. بر اساس مقایسه میانگین‌ها (شکل ۱۰)، بیشترین مقدار Rebaudioside A در تیمار عصاره گل‌قاصدک با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر با میانگین ۸/۶۴ درصد مشاهده شد که در مقایسه با شاهد تقریباً سه برابر



شکل ۱۰- مقایسه میانگین اثر عصاره‌های گیاهی بر میزان ریبودیوزاید گیاهچه استویا

Figure 10- Comparison of the mean effects of plant extracts on the rebaudioside content of Stevia seedlings.

عمل کنند (Ramak *et al.*, 2025). این ترکیبات احتمالاً از طریق تحریک برخی مسیرهای سیگنالینگ، پاسخ‌های دفاعی گیاه را تعدیل کرده و در نتیجه بر تجمع متابولیت‌های ثانویه تأثیر بگذارند. از آنجا که گلیکوزیدهای استویول علاوه بر نقش شیرین‌کنندگی، ممکن است در پاسخ‌های دفاعی و سازگاری گیاه با تنش‌های محیطی نیز نقش داشته باشند، تغییر در وضعیت دفاعی گیاه می‌تواند به‌طور احتمالی با تغییر در تجمع این ترکیبات همراه باشد (Wahyuni *et al.*, 2025).

بیشترین احتمال برای افزایش تجمع ترکیبات ثانویه در گیاه استویا، از جمله ریبودیوزاید A که از خانواده دی‌ترپنوئیدها است، می‌تواند از طریق ایجاد یک تنش ملایم و کنترل‌شده زیستی یا القاگری (Elicitation) صورت گیرد (Ashrafi *et al.*, 2022). در این راستا، ترکیبات موجود در عصاره بن‌سرخ، شامل ترکیبات فنلی و گوگردی آلی مانند آلیسین و دی‌سولفیدها، در صورت اعمال در غلظت‌های مناسب، ممکن است به‌عنوان القاگرهای زیستی (Bio-elicitors)

که از UDP-glucose به‌عنوان منبع قند فعال شده استفاده می‌کنند (Wang et al., 2016). همچنین، تفاوت ژنوتیپی در میزان تجمع Rebaudioside A می‌تواند با سطح بیان و فعالیت برخی از این آنزیم‌ها، از جمله UGT91D2، ارتباط داشته باشد. بر این اساس، می‌توان فرض کرد که تغییرات فیزیولوژیک ناشی از کاربرد عصاره‌های گیاهی ممکن است بر این فرآیندها تأثیرگذار باشد؛ با این حال، در مطالعه حاضر بیان ژن، فعالیت آنزیم‌ها یا سایر شاخص‌های مستقیم مرتبط با مسیر بیوسنتز گلیکوزیدهای استویول اندازه‌گیری نشده است و بنابراین این مکانیسم‌ها را نمی‌توان به‌عنوان علت قطعی تغییرات مشاهده شده در Rebaudioside A مطرح کرد. از سوی دیگر، باید توجه داشت که در مطالعه حاضر، ارزیابی Rebaudioside A با HPLC تنها برای چهار تیمار منتخب انجام شد و سایر تیمارها از نظر این ترکیب مورد ارزیابی قرار نگرفتند. بنابراین، تفاوت مشاهده شده در محتوای Rebaudioside A را باید صرفاً در چارچوب همین چهار تیمار تفسیر کرد و نمی‌توان بر اساس نتایج موجود، اثر کلی نوع یا غلظت عصاره‌های گیاهی را بر تجمع Rebaudioside A به تمامی تیمارهای آزمایشی تعمیم داد. همچنین، انتخاب تیمارهای منتخب بر اساس نتایج قندهای محلول، به‌تنهایی نمی‌تواند افزایش Rebaudioside A را پیش‌بینی کند. از این رو، بررسی تمامی تیمارها از نظر گلیکوزیدهای استویول، همراه با ارزیابی شاخص‌های مولکولی و بیوشیمیایی مرتبط با مسیر بیوسنتز، می‌تواند در مطالعات آینده به روشن شدن رابطه بین کاربرد عصاره‌های گیاهی و تجمع Rebaudioside A کمک کند.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این پژوهش نشان داد که کاربرد عصاره‌های بن‌سرخ (*Allium jesdianum*) و گل‌قاصدک (*Taraxacum officinale*) می‌تواند برخی ویژگی‌های رشدی، زیست‌توده و شاخص‌های فیزیولوژیک گیاهچه‌های استویا را در شرایط کشت درون‌شیشه‌ای تحت تأثیر قرار دهد. در میان تیمارهای مورد بررسی، عصاره بن‌سرخ در غلظت ۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر، در برخی صفات مهم رشدی از جمله تعداد برگ و تولید زیست‌توده، پاسخ مطلوبی ایجاد کرد. در این غلظت، تعداد برگ و همچنین وزن تر و خشک گیاهچه در مقایسه با شاهد افزایش یافت و در برخی صفات، تفاوت معنی‌داری با تیمار هورمونی 2BAP+1NAA مشاهده نشد. این نتایج نشان می‌دهد که عصاره بن‌سرخ ۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر می‌تواند به‌عنوان یک تیمار طبیعی امیدبخش در بهبود برخی شاخص‌های رشد استویا در شرایط درون‌شیشه‌ای مورد توجه قرار گیرد. از نظر تولید زیست‌توده نیز عصاره بن‌سرخ در غلظت ۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر در میان تیمارهای طبیعی بیشترین وزن تر و خشک را ایجاد کرد. وزن خشک گیاهچه

(al., 2025). از طرفی، ترکیبات طبیعی موجود در عصاره‌های گیاهی، از جمله پلی‌فنول‌ها، ممکن است به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی عمل کرده یا بر سیستم‌های سیگنالینگ هورمونی استویا تأثیر بگذارند (Ahlawat et al., 2024). همچنین، این ترکیبات فنلی ممکن است از طریق اثرگذاری بر فعالیت برخی آنزیم‌های مرتبط با متابولیسم هورمون‌های درون‌زاد، به‌طور غیرمستقیم بر رشد، تأخیر در پیری سلولی و تجمع ترکیبات متابولیکی تأثیرگذار باشند. علاوه بر این، گوگرد یک عنصر غذایی ضروری برای سنتز اسیدهای آمینه گوگرددار، پروتئین‌ها و آنزیم‌های گیاهی است؛ بنابراین، ترکیبات گوگرددار موجود در بن‌سرخ ممکن است از طریق بهبود وضعیت متابولیکی گیاه، به‌طور غیرمستقیم بر فرآیندهای مرتبط با تولید گلیکوزیدهای استویول تأثیر بگذارند (ul Islam et al., 2024). با این حال، این توضیحات در مطالعه حاضر در سطح فرضیه‌های احتمالی باقی می‌مانند و برای تأیید آنها به بررسی‌های مستقیم‌تر نیاز است. علاوه بر بن‌سرخ، ترکیبات موجود در عصاره گل‌قاصدک نیز ممکن است به‌طور غیرمستقیم بر متابولیسم و تجمع ترکیبات ثانویه در گیاه استویا تأثیرگذار باشند. یکی از سازوکارهای احتمالی، القاگری زیستی است؛ زیرا گل‌قاصدک حاوی ترکیبات ثانویه فعالی از جمله ترکیبات فنلی و فلاونوئیدها است که ممکن است در شرایط مناسب به‌عنوان محرک‌های فیزیولوژیک عمل کنند (Masciulli et al., 2025). در چنین شرایطی، پاسخ گیاه به این محرک‌ها می‌تواند با تغییر در متابولیسم ثانویه همراه باشد. اگرچه گلیکوزیدهای استویول عمدتاً به‌عنوان ترکیبات شیرین‌کننده شناخته می‌شوند، از نظر بیوشیمیایی در گروه متابولیت‌های ثانویه قرار می‌گیرند و می‌توانند با پاسخ‌های دفاعی گیاه ارتباط داشته باشند (Ghaderi et al., 2024). بنابراین، می‌توان احتمال داد که تغییر در وضعیت فیزیولوژیک و دفاعی گیاه در اثر تیمار با عصاره‌های گیاهی، با تغییر در تجمع گلیکوزیدهای استویول، از جمله Rebaudioside A، همراه باشد. همچنین، برخی ترکیبات موجود در گل‌قاصدک، از جمله لاکتون‌های سزکوئی‌ترپن، ممکن است بر وضعیت متابولیکی و تخصیص کربن در گیاه اثرگذار باشند؛ با این حال، ارتباط مستقیم این ترکیبات با افزایش تولید گلیکوزیدهای استویول در استویا در مطالعه حاضر مورد بررسی قرار نگرفته است.

به‌طور کلی، بیوسنتز گلیکوزیدهای استویول از مسیرهای متابولیکی مرتبط با تولید اسکلت دی‌ترپنی استویول آغاز شده و با مراحل متوالی گلیکوزیل‌اسیون ادامه می‌یابد. در مراحل نهایی این مسیر، اتصال واحدهای گلوکز به مولکول استویول در تشکیل گلیکوزیدهای استویول، از جمله استویوزاید و Rebaudioside A، اهمیت دارد. این واکنش‌های گلیکوزیل‌اسیون توسط خانواده‌ای از آنزیم‌ها به نام اوریدین دی‌فسفات-گلوکوزیل ترانسفرازها (UGTs) کاتالیز می‌شوند

۴۰۰ میلی گرم بر لیتر، به عنوان یک محرک زیستی طبیعی برای بهینه سازی برخی شرایط کشت درون شیشه‌ای استتویا حمایت می کند. اگرچه عملکرد این تیمار در برخی صفات به تیمار هورمونی نزدیک بود، نتایج حاضر برای توصیه آن به عنوان جایگزین قطعی تنظیم کننده های رشد سنتزی کافی نیست. بنابراین، مطالعات آینده با تمرکز بر تعیین ترکیبات فیتوشیمیایی عصاره، بررسی سازوکارهای احتمالی اثر، ارزیابی پاسخ در مراحل مختلف تکثیر و بررسی سازگاری و بقای گیاهچه ها در شرایط برون شیشه ای می تواند زمینه لازم برای ارزیابی کاربرد گسترده تر این محرک های زیستی را فراهم کند.

در این تیمار حدود ۴/۶۲ برابر شاهد بود که بیانگر افزایش قابل توجه تجمع ماده خشک تحت شرایط آزمایش حاضر است. همچنین، برخی تیمارهای عصاره ای با تغییرات معنی دار در محتوای کلروفیل a و b و قندهای محلول همراه بودند که می تواند نشان دهنده تغییر در برخی فرآیندهای فیزیولوژیک گیاهچه ها در پاسخ به کاربرد عصاره های گیاهی باشد. با این حال، از آنجا که ترکیب فیتوشیمیایی عصاره های مورد استفاده در این پژوهش به طور مستقیم تعیین نشده است، نسبت دادن این پاسخ ها به ترکیبات یا سازوکارهای فیزیولوژیک مشخص نیازمند بررسی های تکمیلی است. در مجموع، یافته های این پژوهش از پتانسیل عصاره بن سرخ، به ویژه در غلظت

منابع

- Abdalla, M. M. (2013). The potential of *Moringa oleifera* extract as a biostimulant in enhancing the growth, biochemical and hormonal contents in rocket (*Eruca vesicaria* subsp. *sativa*) plants. *Int. J. Plant Physiol. Biochem*, 5(3), 42-49. <https://doi.org/10.5897/IJPPB2012.026>
- Afzal, S., Chaudhary, N., & Singh, N. K. (2021). Role of soluble sugars in metabolism and sensing under abiotic stress. In *Plant growth regulators: signalling under stress conditions* (pp. 305-334). Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-61153-8_14
- Ahlawat, Y. K., Singh, M., Manorama, K., Lakra, N., Zaid, A., & Zulfikar, F. (2024). Plant phenolics: neglected secondary metabolites in plant stress tolerance. *Brazilian Journal of Botany*, 47(3): 703-721. <https://doi.org/10.1007/s40415-023-00949-x>
- Alhalawi, Z., & Ervita, L. (2025). The Effect of Stevia Consumption on Glycemic Control in Elderly Patients with Diabetes: A Literature Review. *Journal of Community Development and Disaster Management*, 7(2): 551-562. <https://doi.org/10.37680/jcd.v7i2.7630>
- Kusvuran, S. (2021). Microalgae (*Chlorella vulgaris* Beijerinck) alleviates drought stress of broccoli plants by improving nutrient uptake, secondary metabolites, and antioxidative defense system. *Horticultural Plant Journal*, 7(3), 221-231. <https://doi.org/10.1016/j.hpj.2021.03.007>
- Alum, E. U. (2024). The role of indigenous knowledge in advancing the therapeutic use of medicinal plants: challenges and opportunities. *Plant signaling & behavior*, 19(1): 2439255. <https://doi.org/10.1080/15592324.2024.2439255>
- Ashrafi, K., Iqar, S., Saifi, M., Khan, S., Qamar, F., Quadri, S. N., ... & Abidin, M. Z. (2022). Influence of plant growth regulators on glandular trichome density and steviol glycosides accumulation in *Stevia rebaudiana*. *ACS omega*, 7(35): 30967-30977. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c02957>
- Askari, Y. (2022). Composition of essential oil of *Dorema aucheri* Boiss. and *Allium jesdianum* Boiss. medicinal plants. *Int. J. Adv. Biol. Biomed. Res*, 10(1): 72-83. DOI: 10.22034/IJABBR.2022.545885.1374
- Ansar, Z., Baradaran Firouzabadi, M., Galeshi, S., Gholami, A., Parsaeian, M. (2019). Effects of marjoram and mountain thyme extracts on yield, yield components, and antioxidant enzymes of sesame under drought stress conditions. *Journal Crop Improvement*, 21:149-166. <https://doi.org/10.22069/ejcp.2020.15979.2204> (in persian)
- Blum, A. (2017). Osmotic adjustment is a prime drought stress adaptive engine in support of plant production. *Plant, cell & environment*, 40(1): 4-10. <https://doi.org/10.1111/pce.12800>
- Dang Xuan, T., Xuan Chien, N., Dang Khanh, T., Duc Viet, T., & Ngoc Minh, T. T. (2025). Advancements and challenges in allelopathy: a global perspective on agricultural practices. *Journal of Crop Health*, 77(5): 151. <https://doi.org/10.1007/s10343-025-01217-6>
- De Saeger, J., Van Praet, S., Vereecke, D., Park, J., Jacques, S., Han, T., & Depuydt, S. (2020). Toward the molecular understanding of the action mechanism of *Ascophyllum nodosum* extracts on plants. *Journal of Applied Phycology*, 32(1): 573-597. <https://doi.org/10.1007/s10811-019-01903-9>
- DuBois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry*, 28(3): 350-356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
- Ehiagbonare, J. E., Onyibe, H. I., & Ehiagbonare, P. O. (2008). Conservation studies on four medicinal taxa of Southern Nigeria. *Scientific Research and Essays*, 3(2): 40-45.
- Foidl, N., Makkar, H. P. S., & Becker, K. (2001). The potential of *Moringa oleifera* for agricultural and industrial uses. *What development potential for Moringa products*, 20. https://moringatrees.org/moringa-doc/the_potential_of_moringa_oleifera_for_agricultural_and_industrial_uses.pdf
- Ghaderi, A., Moghaddam, M., & Rezvan, S. (2024). Assessment of the relationship between rebaudioside-A and stevioside content and growth, yield, and root characteristics of stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) under drought Stress. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research*, 40(3): 596-616. <https://doi.org/10.22092/ijmapr.2024.365043.3428>
- Grauso, L., Emrick, S., de Falco, B., Lanzotti, V., & Bonanomi, G. (2019). Common dandelion: A review of its botanical, phytochemical and pharmacological

profiles. *Phytochemistry Reviews*, 18(4): 1115-1132. <https://doi.org/10.1007/s11101-019-09622-2>

Han BongHee, H. B., Yu HeeJu, Y. H., Yae ByeoungWoo, Y. B., & Peak KeeYeoup, P. K. (2004). *In vitro* micropropagation of *Lilium longiflorum* 'Georgia' by shoot formation as influenced by addition of liquid medium. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2004.04.020>

Hao, F., Deng, X., Yu, X., Wang, W., Yan, W., Zhao, X., & Han, L. (2024). Taraxacum: A review of ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacological activity. *The American Journal of Chinese Medicine*, 52(01): 183-215. <https://doi.org/10.1142/S0192415X24500083>

Hazrati Yadkori, S., & Tahmasbi Sarvestani, Z. A. (2011). Effects of different levels of nitrogen fertilizer and foliar application of benzyl adenine (BA) hormone on growth and sucker production of aloe vera (*Aloe vera* L.). *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research*, 28(2): 210-223. (In Persian). <https://doi.org/10.22092/ijmapr.2012.3023>

Heydargholinejad, F., Hamidoghli, Y., Ghasemi Omran, V. A., & Biparva, P. (2024). Effect of auxin and cytokinin on *in vitro* culture of water pennywort (*Centella asiatica* L.). *Iranian Journal of Horticultural Science and Technology*, 25(1): 119-128. (In Persian). <http://journal-irshs.ir/article-1-635-fa.html>

Javaheri, N., & Kaviani, B. (2022). Effect of auxin and cytokinin hormonal combination on micropropagation of Oriental lily (*Lilium oriental* hybrid "Casablanca") using bulb scale explants. *Journal of Horticultural Science*, 36(1): 57-69. (In Persian).

Joshi, J. R. (2025). Extraction of stevioside and rebaudioside A from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. Unpublished thesis). Gujarat Technological University.

Kamanga, B. M., Cartmill, D. L., McGill, C., & Clavijo McCormick, A. (2025). Allelopathic effects of *Moringa oleifera* Lam. on cultivated and non-cultivated plants: Implications for crop productivity and sustainable agriculture. *Agronomy*, 15(8):1766. <https://doi.org/10.3390/agronomy15081766>

Kang, G., Yun, Q., Bao, G., Bao, L., Min, S. and Bai, L. (2024). Exploration of the Application of Allelopathy in Medicinal Plants in Agriculture and Medicine. *International Journal of Frontiers in Medicine*, 6(7).

Kumar, V., Zadokar, A., Kumar, P., Sharma, R., Sharma, R., Siddiqui, M. W., ... & Chandora, R. (2025). Advancing medicinal plant agriculture: integrating technology and precision agriculture for sustainability. *PeerJ*, 13: e19058. <https://doi.org/10.7717/peerj.19058>

Lichtenthaler, H. K. (1987). Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. In *Methods in enzymology* (Vol. 148, pp. 350-382). Academic Press.

Mahedi, M., Shaili, S. J., Nurnobi, M., Sakil, A. R., & Rahman, A. (2025). Adoption of organic farming practices: A comprehensive review of trends, determinants, and challenges. *Journal of Agricultural and Rural Research*, 8(1): 26-45.

Masciulli, F., Ambroselli, D., Libero, M. L., Acquaviva, A., Di Simone, S. C., Chiavaroli, A., ... & Ingallina, C. (2025). Phytochemical composition and bioactivity of edible *Taraxacum officinale*: potential as an ingredient in brain

health-oriented functional foods. *Food & Function*, 16(18): 7217-7229. <https://doi.org/10.1039/d5fo02646f>

Nehzomi, Z. S., & Shirani, K. (2024). A comprehensive review of the pharmacological properties and medicinal uses of *Allium jesdianum* Boiss. & Buhse. *Journal of Medicinal Plants*, 23(90): 1-16. <http://dx.doi.org/10.61186/jmp.23.90.1>

Nematillaevna, K. M. (2024). STUDING MEDICINAL PLANTS (PHYTONYMS) IN THE SECTION OF PHARMACEUTICAL TERMINOLOGY. *Central Asian Journal of Multidisciplinary Research and Management Studies*, 1(2): 4-7. <https://doi.org/10.5281/zenodo.10673840>

Ram, S., Yadav, S. K., Rathore, D., & Nema, R. K. (2025). Review on *Stevia Rebaudiana*: A Comprehensive Analysis of its Properties and Applications. *Int. J. Adv. Multidiscip. Res. Stud.*, 5: 347-351.

Ramak, P., & Karimian, V. (2023). Effects of planting times on the chemical compositions, antioxidant activity and nutritional properties of *Allium jesdianum* Boiss. & Buhse leaves in Lorestan province. *Ecopersia*, 11(3): 175-185. <https://doi.org/10.22034/ecopersia.11.3.175>

Sadak, M. S., Dawood, M. G., Bakry, B. A., & El-Karamany, M. F. (2013). Synergistic effect of indole acetic acid and kinetin on performance, some biochemical constituents and yield of faba bean plant grown under newly reclaimed sandy soil. *World Journal of Agricultural Sciences*, 9 (4): 335-344. [http://www.idosi.org/wjas/wjas9\(4\)13/5.pdf](http://www.idosi.org/wjas/wjas9(4)13/5.pdf)

Saleem, M., Nadeem, M. S. A., & Naz, S. (2025). Medicinal crops as a pathway to sustainable agriculture, food security, farmers' income, and sustainable development in Pakistan. *Journal of Climate and Community Development*, 4(1): 157-167. <https://joccd.com/index.php/joccd/article/view/74/65>

Saremi, R., Omidi, H., & Bostani, A. (2016). Effects of auxin and cytokinin on some morphophysiological characteristics of seedling and seed germination of *stevia (Stevia rebaudiana* Bertoni). *Iranian Journal of Seed Research*, 3(2): 57-70. (In Persian). <https://sid.ir/paper/263518/fa#:~:text=https%3A//doi.org/10.29252/yujs.3.2.57>

Shirani, M., Aghazadeh, E., Yousefsani, B. S., & Shirani, K. (2024). Anticancer activity of *Allium jesdianum* extract: A potential therapeutic approach for Melanoma. <https://doi.org/10.5812/jjnpp-139022>

Sichanova, M., Geneva, M., Petrova, M., Miladinova-Georgieva, K., Kirova, E., Nedev, T., ... & Trendafilova, A. (2022). Improvement of *Stevia rebaudiana* Bertoni *in vitro* propagation and steviol glycoside content using aminoacid silver nanofibers. *Plants*, 11(19): 2468. <https://doi.org/10.3390/plants11192468>

Siddiqui, H., Sami, F., Faizan, M., Faraz, A., & Hayat, S. (2019). Brassinosteroid mediated regulation of photosynthesis in plants. In *Brassinosteroids: Plant Growth and Development* (pp. 185-217). Singapore: Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-6058-9_7

Singh, P., Nayak, S. L., Sharkar, R., Sarkar, A., Dutta, S., & Paul, D. (2025). Application of modern techniques in cultivation of medicinal plants: A review. *Plant Arch*, 25(1): 1947-1962.

Sohrabi, O., Hatamzadeh, A., Ghasemnezhad, A., Samizadeh, H., & Erfani-Moghadam, V. (2025). A Preliminary Experimental Protocol for Enhanced Tomato Callus Formation and Growth via Several Medicinal Plant

Extracts. *International Journal of Horticultural Science and Technology*, 12(1): 83-100.
<https://doi.org/10.22059/ijhst.2024.363254.677>

Sohrabi, O., Hatamzadeh, A., Ghasemnezhad, A., Samizadeh, H., & Erfani-Moghadam, V. (2024). Exploring the effects of Medicinal Plant extracts on Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) morphology, Biochemistry, and Plant Growth regulators under greenhouse conditions. *International Journal of Horticultural Science and Technology*, 11(3): 285-298.
<https://doi.org/10.22059/ijhst.2023.360638.649>

Sohrabi, O., Hatemzadeh, A., Ghasemnezhad, A., Samizadeh Lahiji, H., & Erfani Moghadam, V. (2021). Study of the effects of some plant extracts on growth changes of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) under *in vitro* and ex vitro conditions. *Journal of Vegetable Science*, 5(10): 181-197. (In Persian).
<https://doi.org/10.22034/iuvs.2022.543372.1184>

Sosnowski, J., Truba, M., & Vasileva, V. (2023). The impact of auxin and cytokinin on the growth and development of selected crops. *Agriculture*, 13(3): 724.
<https://doi.org/10.3390/agriculture13030724>

Taiz, L., Zeiger, E., Møller, I. M., & Murphy, A. (2015). *Plant physiology and development* (No. Ed. 6, pp. 761-pp).

Tarakhovskaya, E. R., Kang, E. J., Kim, K. Y., & Garbary, D. J. (2013). Influence of phytohormones on morphology and chlorophyll a fluorescence parameters in embryos of *Fucus vesiculosus* L.(Phaeophyceae). *Russian journal of plant physiology*, 60(2): 176-183.
<https://doi.org/10.1134/S1021443713020192>

Tuyuc Amezquita, I. V. (2025). Micropropagation of *Stevia rebaudiana*: Optimizing Shoot Multiplication and Ex vitro Rooting Establishment.

ul Islam, S. N., Arshad, M., Ahmad, S., & Asgher, M. (2024). Role of sulfur and its crosstalk with phytohormones under abiotic stress in plants. *Improving stress resilience in plants*, 225-247. <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-18927-2.00010-8>

Wahyuni, R., Solin, N. W. N. M., Hanum, C., Mawarni, L., & Septirosya, T. (2025). Environmental Stress, Elicitors and Steviol Glycoside Production in *Stevia rebaudiana*: A Systematic Literature Review.
<https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-8073139/v1>

Wang, Y., Chen, L., Li, Y., Li, Y., Yan, M., Chen, K., ... & Xu, L. (2016). Efficient enzymatic production of rebaudioside A from stevioside. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 80(1): 67-73.
<https://doi.org/10.1080/09168451.2015.1072457>

Wu, Y., Sun, M., Zhang, J., Zhang, L., Ren, Z., Min, R., ... & Xia, Y. (2019). Differential effects of paclobutrazol on the bulblet growth of oriental lily cultured *in vitro*: growth behavior, carbohydrate metabolism, and antioxidant capacity. *Journal of Plant Growth Regulation*, 38(2): 359-372. <https://doi.org/10.1007/s00344-018-9844-5>

Youssef, N. M., Shaaban, S. A., Ghareeb, Z. F., & Taha, L. S. (2019). *In vitro* bulb formation of direct and indirect regeneration of *Lilium orientalis* cv. "Starfighter" plants. *Bulletin of the National Research Centre*, 43(1): 211.
<https://doi.org/10.1186/s42269-019-0246-z>