

بررسی اثر سطوح مختلف نیتروژن و پتاسیم بر خصوصیات مورفولوژی و شیمیایی گیاه استویا (*Stevia rebaudiana Bertoni*)

فاطمه صابرهمیشگی*، دانشجوی کارشناسی ارشد دانشگاه آزاد قائمشهر
علیرضا ترنگ، مدیریت پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی شمال کشور (رشت)
مرتضی مبلغی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد چالوس، گروه زراعت، چالوس، ایران
عباسعلی دهپوری، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قائمشهر، گروه زراعت، قائمشهر، ایران
زینب صابرهمیشگی، دانشجوی کارشناسی ارشد دانشگاه آزاد قائمشهر

چکیده

به منظور بررسی اثر سطوح مختلف نیتروژن و پتاسیم بر خصوصیات مورفولوژیکی و شیمیایی گیاه دارویی استویا تحت شرایط گلخانه، آزمایشی در سال زراعی ۱۳۸۹ در پژوهشکده بیوتکنولوژی شمال کشور به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب کامل تصادفی در چهار تکرار انجام شد که در آن نیتروژن در چهار سطح (صفر، ۶۰، ۴۰، ۲۰) کیلوگرم در هکتار و پتاسیم در چهار سطح (۲۰، ۳۰، ۴۰ و صفر) کیلوگرم در هکتار در نظر گرفته شد. صفات مورد اندازه گیری شامل طول ساقه، طول میانگره، وزن تر ریشه، وزن خشک ریشه، و میزان کربوهیدرات بود. بیشترین طول ساقه با ۹۰/۹۰ سانتی متر و بیشترین طول میانگره با ۴/۳۱ سانتی متر و بیشترین وزن تر ریشه به میزان ۱۵/۵ گرم در بوته و بیشترین وزن خشک ریشه با ۲/۹ گرم در تیمار N_۶ یا کاربرد کود ۶۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار مشاهده شد. بیشترین طول ساقه با ۷۷/۰۱ سانتی متر در تیمار K_۴ یا کاربرد کود پتاسیم ۴۰ کیلوگرم در هکتار به دست آمد. بیشترین میزان کربوهیدرات با ۰/۰۵۷ در تیمار (N_۶K_۲) یا کاربرد کود نیتروژن ۶۰ کیلوگرم در هکتار و کود پتاسیم ۲۰ کیلوگرم در هکتار مشاهده شد.

واژه های کلیدی: استویا، نیتروژن، پتاسیم، کربوهیدرات

* نویسنده مسئول: E-mail : sanaz_saber0098@yahoo.com

مقدمه

استویا با نام علمی *Stevia rebaudiana bertonii* به گیاه برگ عسلی، گیاه شیرین، علف شیرین، معروف می باشد، استویا گیاهی است علفی، چندساله، درختچه ای، دارویی و متعلق به خانواده آفتابگردان (۱۱، ۱۲، ۱۵ و ۲۳). ارتفاع گیاه استویا بسته به شرایط اقلیمی ۸۰-۶۰ سانتی متر متغیر بوده و طول عمرش ۳-۵ سال می باشد (۲۷). ساقه گیاه کرکدار و برگ ها بیضوی، دنداندار، نیزه ای و متقابل هستند و دارای گل های سفید کوچک به اندازه ۷-۱۵ میلی متر می باشند. برگ های استویا ۳۰۰-۲۰۰ بار شیرین تر از ساکارز هستند. برگ های استویا فاقد ساخارین و آسپارتام و کالری است (۶ و ۱۹).

بر اساس نمونه وزن خشک ۴ گلیکوساید عمده در برگ استویا موجود است که عبارتند از $\text{dulcoside } 0/3\%$ ، $\text{rebauside c } 0/6\%$ ، $\text{rebauside A } 3/8\%$ و $\text{stevioside } 9/1\%$. شیرینی استویا و اینکه فاقد هر گونه عوارض جانبی است عمدتاً به دلیل حضور مخلوط پیچیده ای از شیرین کننده های طبیعی دی ترپن گلیکوساید، استویوزاید، ریبایوساید به ترتیب ۳۵۰-۳۰۰ بار و ۴۵۰ بار شیرین تر از شکر هستند. استویا بطور طبیعی در خاک های شنی و خاک های اسیدی در مجاورت مرداب ها می روید و نیاز زیادی به آب دارد. خاک لومی شنی برای رشد استویا با $\text{pH} = 7/5 - 6/5$ مناسب است و از خاک های شور برای کشت گیاه باید اجتناب کرد (۶ و ۲۲). تاثیر کود N-P-K در رشد و عملکرد استویا موثر است. استویا گیاهی است که به مواد غذایی بویژه N-P-K نیاز دارد و کمبود آنها محدودیت عمده ای در کیفیت تولید بیوماس ایجاد می کند (۲۰). یکی از عناصر ضروری مورد نیاز گیاه نیتروژن است. وجود کلروفیل به عنوان عامل جذب نور و سنتز مواد لازم برای رشد و نمو گیاهان وابسته به این عنصر حیاتی است. وقتی در گیاه کمبود نیتروژن بروز کند کربوهیدرات در سلول های گیاهی ساخته و انباشته می شود و باعث ضخیم تر شدن دیوارها می شود. زمانی که ازت به مقدار کافی موجود باشد کربوهیدرات های درون گیاه ترکیب شده و پروتئین ساخته می شود (۲، ۴ و ۲۶). نیتروژن گیاه را قادر می سازد که سریعتر استقرار یابد و سطح فتوسنتزی بیشتری تولید کند و همچنین نیتروژن باعث افزایش تولید متابولیت های ثانویه می شود (۳). نیتروژن به صورت سیار است و بیشتر از تمام مواد مغذی جذب گیاه می شود (۲۹). پتاسیم در سنتز و انتقال کربوهیدرات ها و به طور کلی برای تشکیل دیواره ضخیم سلولی ضرورت دارد. جذب آب و تعادل جذب عناصر به پتاسیم در سلول ها نیاز دارد. پتاسیم کیفیت محصول را بالا می برد. راندمان فتوسنتز را افزایش داده و مقاومت گیاه را در برابر بعضی از امراض افزایش می دهد (۱). بالاترین جذب (N-P-K)، (۱۹۰/۱ و ۸/۸۳، ۱۶۱/۷۵) کیلوگرم در هکتار به ترتیب با کاربرد کود نیتروژن ۶۰ کیلوگرم در هکتار، فسفر ۳۰ کیلوگرم در هکتار، پتاسیم ۴۵ کیلوگرم در هکتار مشاهده شد (۲۵).

نتایج حاصل از آزمایشی با کاربرد (N-P-K) در سطوح (۴۰:۲۰:۳۰) کیلوگرم در هکتار، افزایش قابل توجهی در رشد و عملکرد استویا مشاهده شد. همچنین بر اساس آزمایش انجام شده با کاربرد (N-P-K)

در سطوح (۶۰:۳۰:۰:۴۵) کیلوگرم درهکتار افزایش عملکرد مشاهده شد. با توجه به اثر نیتروژن در سطح برگ تقریباً همه یافته‌ها نشان می‌دهد کود نیتروژن بر سطح برگ تاثیر دارد (۲۹). ارتفاع بوته و تعداد برگ با افزایش سطوح مختلف (N-P-K) و FYM (کودهای معدنی) افزایش می‌یابد (۶). مشاهدات نشان می‌دهد که ارتفاع بوته، تعداد برگ، ماده خشک کل، عملکرد گل با کاربرد بالاتر سطوح نیتروژن افزایش می‌یابد (۲۱). بررسی‌ها نشان می‌دهد تعداد شاخه، تعداد برگ، شاخص سطح برگ، ماده خشک با کاربرد نیتروژن ۲۰۰ کیلوگرم در هکتار افزایش می‌یابد (۲۸).

این تحقیق برای دستیابی به بهترین سطوح کود نیتروژن و پتاسیم جهت مدیریت بهینه کشت این گیاه و دستیابی به حداکثر عملکرد اجرا شد.

مواد و روش‌ها

این آزمایش در سال زراعی ۱۳۸۹ در پژوهشکده بیوتکنولوژی شمال کشور در شهر رشت اجرا گردید. محل اجرای طرح با طول جغرافیایی ۴۹ درجه و ۳۶ دقیقه شرقی و عرض جغرافیایی ۳۷ درجه و ۱۶ دقیقه شمالی قرار گرفته و ارتفاع آن از سطح دریا ۷ متر می‌باشد.

این آزمایش که به صورت فاکتوریل در قالب طرح کامل تصادفی در چهار تکرار و ۱۶ تیمار با ۵۱۲ گلدان حاوی ۳ کیلوگرم خاک بر گیاه *Stevia rebaudiana* انجام شد که در آن نیتروژن (اوره) عامل اول در چهار سطح (۲۰، ۴۰، ۶۰، صفر) کیلوگرم در هکتار و پتاسیم عامل دوم در چهار سطح (صفر، ۴۰، ۳۰، ۲۰) کیلوگرم در هکتار در نظر گرفته شد. استویا از طریق کشت بافت (ریزازدیادی) در محیط پایه موراشیگ_اسکوگ (M.S) (جدول ۱) در محیط استریل تکثیر یافت و بعد به فیتوترون با دمای 25 ± 2 و ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی منتقل شد. بعد از ۶ هفته گیاهچه‌های ۸ سانتی‌متری به گلدان‌های حاوی ۳ کیلوگرم خاک شامل ماسه، شن، خاک گلدان، کوکوپیت به نسبت (۱:۱:۱:۲) بود به گلخانه منتقل شدند. درجه حرارت گلخانه در روز ۲۷ درجه سانتی‌گراد و در شب ۲۳-۲۲ درجه سانتی‌گراد و طول روز ۱۶ ساعت و طول شب ۸ ساعت، درصد رطوبت ۷۵-۸۰٪ تنظیم شده بود. زمان دادن کود نیتروژن به صورت (تقسیم ۳ مرحله‌ای) شامل مرحله اول ۱۵ روز بعد از استقرار گیاهچه در گلدان انجام گرفت، مرحله دوم افزودن کود نیتروژن ۱۵ روز بعد به خاک گلدان اضافه شد و مرحله سوم دادن کود نیتروژن در حدود ۴۵ روز پس از کاشت، به خاک گلدان اضافه گردید، افزودن کود پتاسیم نیز در یک مرحله و ۱۵ روز بعد از استقرار گیاه به گلدان انجام شد. صفات مورد بررسی در این تحقیق عبارتند از: طول ساقه، طول میانگره، وزن تر ریشه، وزن خشک ریشه، و میزان کربوهیدرات بود. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS و مقایسه میانگین تیمارها با استفاده از آزمون توکی و رسم نمودار با استفاده از نرم افزار Excel انجام گرفت.

جدول ۱: ترکیب محیط موراشیگ_اسکوگ (M.S) (۱ لیتر)

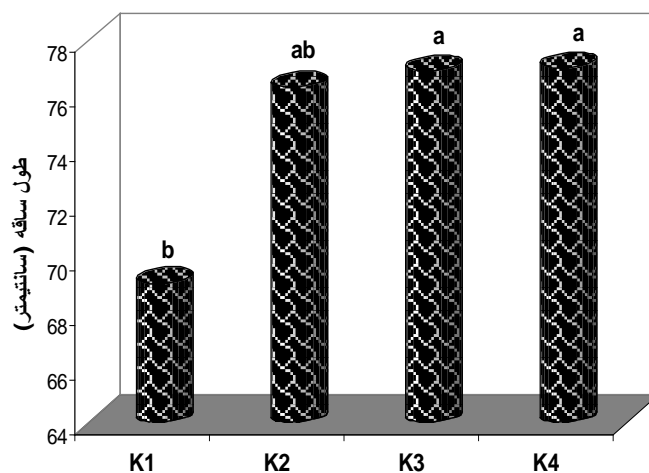
Category	Chemicals	Amount
Macro salts	NH ₄ NO ₃	۱/۶۵ g
	KNO ₃	۱/۹۰ g
	CaCl ₂ .2H ₂ O	۰/۴۴ g
	MgSO ₄ .7H ₂ O	۰/۳۷ g
	KH ₂ PO ₄	۰/۱۷ g
	FeSO ₄ .7H ₂ O	۲۷/۸۰ mg
	Na ₂ EDTA.2H ₂ O	۳۳/۶۰ mg
	KI	۰/۸۳ mg
Micro salts	H ₃ BO ₄	۶۲/۲۰ mg
	MnSO ₄ .4H ₂ O	۲۲/۳۰ mg
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	۸/۶۰ mg
	Na ₂ MoO ₄ .H ₂ O	۰/۲۵mg
	CuSO ₄ .5H ₂ O	۰/۰۲۵ mg
	CoCl ₂ .6 H ₂ O	۰/۰۲۵ mg
	Myoinositol	۱۰۰/۰۰ mg
	Nicotinic acid	۰/۰۵ mg
Organic supplements	Pyridoxine HCl	۰/۰۵mg
	Thiamine HCl	۰/۰۵ mg
	Glycine	۰/۰۲ mg
	Sucrose	۳۰/۰۰ g

نتایج و بحث

طول ساقه

اثر ساده سطوح مختلف نیتروژن بر طول ساقه همان طوری که در جدول تجزیه واریانس ملاحظه می گردد در سطح احتمال یک در صد معنی دار بود (جدول ۲). مقایسه میانگین ها نشان داد بیشترین طول ساقه در تیمار N₄ (کاربرد کود ۶۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار) به میزان ۹۰/۹۰ سانتی متر مشاهده شد که با تیمار N₃ (کاربرد ۴۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار) به میزان ۸۵/۰۳ سانتی متر تفاوت معنی داری نداشت ولی با تیمار N₂ (کاربرد ۲۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار) و تیمار N₁ (عدم کاربرد نیتروژن) دارای تفاوت معنی داری بود. کمترین طول ساقه در تیمار N₁ (عدم کاربرد نیتروژن) به میزان ۴۸/۸ سانتی متر مشاهده شد (جدول ۳).

در بررسی های انجام شده توسط شلاوانتا (۱۹۷۳) وی گزارش داد با افزایش کود نیتروژن، طول ساقه نیز افزایش می یابد که این بررسی با نتایج حاصل از پژوهش حاضر که بیشترین طول ساقه در تیمار N۴ (کاربرد کود ۶۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار) مشاهده گردید، همسو می باشد. اثر ساده سطوح مختلف پتاسیم بر طول ساقه از نظر آماری در سطح احتمال پنج درصد معنی دار بود (جدول ۲). بیشترین طول ساقه در تیمار K۴ (کاربرد کود پتاسیم ۴۰ کیلوگرم در هکتار) به میزان ۷۷/۰۱ سانتی متر به دست آمد که با تیمار K۳ (کاربرد کود پتاسیم ۳۰ کیلوگرم در هکتار) به میزان ۷۶/۹ سانتی متر و تیمار K۲ (کاربرد کود پتاسیم ۲۰ کیلوگرم در هکتار) به میزان ۷۶/۳ سانتی متر دارای اختلاف معنی داری نبود. کمترین طول ساقه در تیمار K1 (عدم کاربرد پتاسیم) به میزان ۶۹/۱ سانتی متر مشاهده شد (شکل ۱). براساس مطالعات نارایاناگودا (۱۹۸۵) با کاربرد کود نیتروژن ۱۸۰ کیلوگرم در هکتار و پتاسیم ۱۰۰ کیلوگرم در هکتار، بیشترین طول ساقه را مشاهده کرد.



شکل ۱- اثر ساده سطوح مختلف پتاسیم بر طول ساقه

طول میانگره

همان طوری که در جدول تجزیه واریانس ملاحظه می گردد اثر ساده سطوح مختلف نیتروژن بر طول میانگره در سطح احتمال پنج درصد معنی دار بود (جدول ۲).

جدول ۲: تجزیه واریانس اثر سطوح مختلف نیتروژن و پتاس بر صفات اندازه گیری شده

میانگین مربعات				درجه آزادی	منابع تغییرات
وزن خشک ریشه	وزن تر ریشه	طول میانگره	طول ساقه		
۰/۵۱ ^{**}	۵/۹۲ ^{**}	۲/۹ [*]	۵۵۳۵/۲ ^{**}	۳	N
۰/۰۶ ^{ns}	۰/۵۴ ^{ns}	۰/۵۹ ^{ns}	۲۰۰/۸ [*]	۳	K
۰/۰۴ ^{ns}	۰/۲۰ ^{ns}	۰/۲۲ ^{ns}	۴۶۷ ^{ns}	۹	N×K
۰/۰۶	۰/۲۴	۰/۷۸	۵۷/۴	۴۸	خطا
۱۵/۳۳	۱۴/۱۷	۲۲/۹	۱۰/۱۰		ضریب تغییرات (%)

^{**}، ^{*} و ^{ns}: به ترتیب اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۱٪، ۵٪ و غیر معنی دار

به طوری که بیشترین طول میانگره در تیمار N₄ (کاربرد کود نیتروژن ۶۰ کیلوگرم در هکتار) به میزان ۴/۳۱ سانتی متر و کمترین طول میانگره در تیمار N₁ (عدم کاربرد نیتروژن) به میزان ۳/۳ سانتی متر مشاهده شد. بین تیمار N₂ (کاربرد کود نیتروژن ۲۰ کیلوگرم در هکتار) با میانگین طول میانگره ۳/۷ سانتی متر و تیمار N₃ (کاربرد کود نیتروژن ۴۰ کیلوگرم در هکتار) با میانگین طول میانگره ۴/۰۶ سانتی متر با تیمارهای N₁ و N₄ اختلاف معنی داری وجود نداشت (جدول ۳).

بررسی ها نشان می دهد که ارتفاع بوته، تعداد گره، تعداد شاخه، شاخص سطح برگ، وزن خشک برگ با کاربرد ۱۸۰ کیلوگرم در هکتار نیتروژن و ۱۲۰ کیلوگرم در هکتار P₂O و ۱۰۰ کیلوگرم در هکتار K₂O افزایش می یابد (۱۸).

وزن تر ریشه

اثر ساده سطوح مختلف نیتروژن بر وزن تر ریشه از نظر آماری در سطح احتمال یک درصد معنی دار بود (جدول ۲).

با توجه به جدول مقایسه میانگین، بیشترین وزن تر ریشه در تیمار N₄ (کاربرد کود نیتروژن ۶۰ کیلوگرم در هکتار) با میانگین ۱۵/۵ گرم مشاهده شد که با تیمار N₃ (کاربرد کود نیتروژن ۴۰ کیلوگرم در هکتار) با میانگین ۱۴/۵۴ گرم دارای اختلاف معنی داری نبود. بین تیمار N₂ (کاربرد کود نیتروژن ۲۰ کیلوگرم در هکتار) با میانگین ۱۱/۵۱ گرم و تیمار N₃ (کاربرد کود نیتروژن ۴۰ کیلوگرم در هکتار) اختلاف معنی داری مشاهده نشد. کمترین وزن تر ریشه در تیمار N₁ (عدم کاربرد نیتروژن) با میانگین ۶/۴ گرم مشاهده شد که با تیمار N₂ و N₃ و N₄ دارای اختلاف معنی داری بود (جدول ۳).

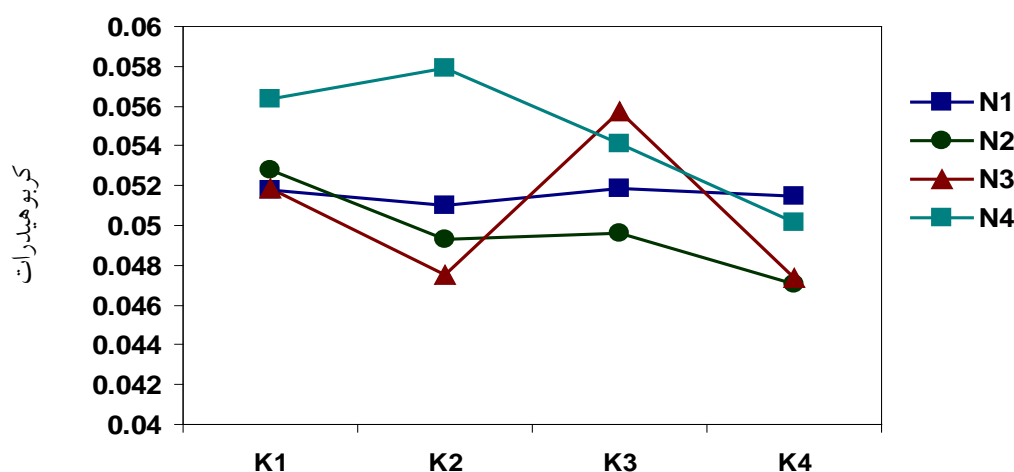
وزن خشک ریشه

اثر ساده سطوح مختلف نیتروژن بر وزن خشک ریشه از نظر آماری در سطح احتمال یک درصد معنی دار بود (جدول ۲).

با توجه به جدول مقایسه میانگین‌ها، تیمار N₃ (کاربرد کود نیتروژن ۶۰ کیلوگرم در هکتار) با میانگین ۲/۹ گرم بیشترین تاثیر را بر وزن خشک ریشه داشت که با تیمارهای N₂ (کاربرد کود نیتروژن ۴۰ کیلوگرم در هکتار) با میانگین ۲/۸ گرم و N₁ (کاربرد کود نیتروژن ۲۰ کیلوگرم در هکتار) با میانگین ۲/۲ گرم اختلاف معنی‌داری نداشت ولی با تیمار N₁ (عدم کاربرد نیتروژن) با میانگین ۱/۶ گرم دارای تفاوت معنی‌داری بود. کمترین تاثیر بر وزن خشک ریشه در تیمار N₁ (عدم کاربرد نیتروژن) مشاهده شد که با تیمار N₂ دارای تفاوت معنی‌داری نبود (جدول ۳).

میزان کربوهیدرات

بیشترین میزان کربوهیدرات در تیمار (N4K2) با کاربرد کود نیتروژن در سطح ۶۰ کیلوگرم در هکتار و کود پتاسیم در سطح ۲۰ کیلوگرم در هکتار به میزان ۰/۰۵۷ و کمترین میزان در تیمار (N2K4) با کاربرد کود نیتروژن در سطح ۲۰ کیلوگرم در هکتار و کود پتاسیم در سطح ۴۰ کیلوگرم در هکتار به میزان ۰/۰۴۷ مشاهده شد (شکل ۲).



شکل ۲- میزان کربوهیدرات

جدول ۳: اثر سطوح مختلف نیتروژن بر صفات اندازه گیری شده

تیمار	طول ساقه (سانتی‌متر)	طول میانگره (سانتی‌متر)	وزن تر ریشه (گرم)	وزن خشک ریشه (گرم)
N 1	۴۸/۸ b	۳/۳ b	۶/۴ c	۱/۶ b
N 2	۷۵/۲ b	۳/۷ ab	۱۱/۵۱ b	۲/۲ab
N 3	۸۵/۰۳ a	۴/۰۶ ab	۱۴/۵۴ ab	۲/۸ a
N 4	۹۰/۹۰ a	۴/۳۱ a	۱۵/۵a	۲/۹ a

اعدادی که در هر ستون حداقل دارای یک حرف مشترک هستند فاقد اختلاف معنی دار بر اساس آزمون توکی در سطح احتمال ۵٪ می باشند

منابع

- ۱- خواجه پور، م. ۱۳۸۲. اصول و مبانی زراعت، جهاد دانشگاهی دانشگاه صنعتی اصفهان
- ۲- سالاردینی، ع. ۱۳۶۲. حاصلخیزی خاک چاپ دوم، انتشارات دانشگاه تهران. ۴۴۲
- ۳- مظاهری، د. و مجنون حسینی، ن. ۱۳۸۱. مبانی زراعت عمومی. چاپ دوم. انتشارات دانشگاه تهران، ۳۲۰
- ۴- ملکوتی، م. ع. و ریاضی همدانی، س. ع. ۱۳۷۰. کودها و حاصلخیزی خاک، مرکز نشر دانشگاهی، ۸۰۰
- 5- Anbazhagan, M., Kalpana, M., Rajendran, R., Natarajan, V. and Dhanavel, D. 2010. In vitro production of *Stevia rebaudiana* Bertoni. Food Agric; 22 (3): 216-222.
- 6- Boana, A. and Goenadi, D. J. 1985. A study of growth patterns of stevia cutting. Menaraperkebunan, Horticulture Abstracts; 56 : 3732.
- 7- Bridel , M., Lavielle, R. and Le, B. 1931. principe sucré du Kaà-hê-é. (*Stevia rebaudiana* Bertoni). II. L'hydrolyse diastasique du stéviol. III. Le stéviol de l'hydrolyse diastasique et l'isostéviol de l'hydrolyse acide. Bull. Soc. Chim. Biol. 13: 781-796.
- 8- Chalapathi, M. V., Shivaraj, B. and Ramakrishna, P. 1997. Nutrient uptake and yield of (*Stevia rebaudiana* Bertoni) as influenced by methods of planting and fertilizer levels. Crop Res; 14: 205-208.
- 9- Chalapathi, M. V., Thimmegowda, S., Deva Kumar, N., Gangadhar, E., Rao, G. and Chandraprakash, J. 1999. Influence of fertilizer levels on growth, yield and nutrient uptake of ratoon crop of . Crop Res; 21: 947-949.
- 10- Geuns, J. 2003. Molecules of interest stevioside Phytochemistry; 6: 913 – 921.
- 11- Humphrey, T.V., Richman, A. S., Menassa, R. and Jim, E. 2006. Spatial organisation of four enzymes from *Stevia rebaudiana* Bertoni that are involved in steviol glycoside synthesis. Plant Molecular Biology; 61:47–62.
- 12- Hwang, S. J. 2006. Rapid in Vitro Propagation and Enhanced Stevioside Accumulation in *Stevia rebaudiana* Bertoni. Journal of Plant Biology; 49(4) : 267-270.
- 13- Ibrahim, A., Mahmoud, I., Nasr Berlanti, R. and Mohammed, M. 2008. Plant growth regulators affecting in vitro cultivation of *Stevia rebaudiana* Bertoni. Sugar Tech; 10(3) : 254-259
- 14- Kalpana, M., Anbazhagan, M., Natarajan, V. and Dhanavel, D. 2010. Improved micropropagation method for the enhancement of biomass in *Stevia rebaudiana* Bertoni. Science and Technology ;2(1):008–013.
- 15- Karuppusamy, S. 2009. A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by in vitro tissue, organ and cell cultures. Journal of Medicinal Plants; 3(13): 1222-1239.
- 16- Katayama, O., Sumida, T., Hayashi, H. and Mitsuhashi, H. 1976. The practical application of and research and development data (English translation). I.S.U. Company. Japan; pp 747.
- 17- Liu, J. and Li, S. F. Y. 1995. Separation and determination of stevia sweeteners by capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography. J. Liquid Chromatography; 18 (9): 1703-1719.
- 18- Narayanagowda, J. V. 1985. Investigations on horticultural practices in the production of china aster (*Callistephus chinensis* Nees.) cv. Vick's Branching. Ph. D. Thesis, University of Agricultural Sciences, Bangalore.
- 19- Ojha, A., Sharma, V. N. and Sharma, V. 2010. An efficient protocol for in vitro clonal propagation of natural sweetener plant (*Stevia rebaudiana* Bertoni). African Journal of Plant Science; 4(8):319-321
- 20- Pramanik, K. and Singh, R. K. 2003. Effect of levels and mode of phosphorus application with and without biofertilizer on yield and nutrient uptake by chickpea (*Cicer arietinum*). Ann. Agric. Res. New Sciences; 24(4):768.
- 21- Raghuraja, H. 1992. Studies on the effect of split nitrogen and phosphorus on growth and flower production of gaillardia (*Gaillardia pulchella*) cv. Kanaburgi local. M. Sc (Agri.) Thesis, University of Agricultural Sciences, Dharwad.
- 22- Robinson, B. L. 1930. Contributions from the Gray Herbarium of Harvard University. The Gray Herbarium of Harvard University, Cambridge.
- 23- Sairkar, P., Chandravanshi, M. K., Shukla, N. P. and Mehrotra, N. N. 2009. Mass production of an economically important medicinal plant *Stevia rebaudiana* using in vitro propagation techniques. Journal of Medicinal Plants; 3(4): 266-270.
- 24- Sheelavanta, M. N. 1973. Response of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) varieties to nitrogen levels under rainfed condition. M. Sc. (Agri.) Thesis, University of Agricultural Sciences Bangalore.
- 25- Shivaraj, B., Chalapathi, M. V. and parma, V. R. 1997. Nutrient uptake and yield of *Stevia rebaudiana* Bertoni as influenced by methods of planting and fertilizer levels. Crop Research Hisar; 14(2) : 205-208.

-
- 26- **Thompson , L. and Troeh, F. R. 1982.** Soil and soil fertility ,Mc Grow Hill publishing; pp516.
- 27- **Uddin, M. S., Chowdhury, M. Sh. H., MahfuzulHaque Khan , M. M., Uddin, M. B., Ahmed, R. and Azizul Baten, M. D. 2006.** In vitro propagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni in Bangladesh. African Journal of Biotechnology; 5 (13): 1238-1240.
- 28- **Venugopal, C. K. 1991.** Studies on the effect of plant density and nitrogen on growth and flower production in everlasting flower (*Helichrysum bracteatum* Andr.) cv. Fall double ixed. M. Sc. (Agri.) Thesis, University of Agricultural Sciences,Dharwad
- 29- **Watson. 1952.** The physiological basis of variation in yield. Advances Agronomy; 4 : 101-145.

