



The effect of salicylic acid on the yield of vegetative organs and active ingredients of stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) under drought stress

Mehrdad Maleki¹, Hamid Sobhanian^{2*}, Enaiatollah Yazdanpanah², Abbas Maleki³

¹ Department of Plant biology, Payamenoor University, Tehran, Iran, Email: mehrdadmaleki98@gmail.com

² Department of Plant biology, Payamenoor University, Tehran, Iran, Email: motif3000@yahoo.com

³ Department of Plant biology, Payamenoor University, Tehran, Iran, Email: enayatallahyazdanpanah@yahoo.com

⁴ Department of Agriculture, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Islami Azad University, Ilam Branch, Ilam, Iran, Email: maleki97@yahoo.com

Serial 66, 17th year, Number 2, Summer 2022 (89-107)

Article type:
Research Full Paper

Article history
Received: 2022/02/23
Revised: 2022/05/11
Accepted: 2022/05/13

Keywords
Extractable Sugar
Glycosides
Phenolic Compounds,
Stevia
Water Deficit

Abstract

This study was performed to investigate the effect of drought stress and salicylic acid on quantitative and qualitative yield and biochemical and physiological properties of stevia. An experiment was carried out based on a split plot design and randomized complete blocks with 3 replications in a research farm in Sarableh, Ilam during 2020-2021. Drought stress in 3 levels (control or 100% of field capacity, 75% of field capacity, and 50% of field capacity) and salicylic acid treatment in 2 levels (non-consumption and foliar application with a concentration of 1 mM) were applied. Plant height, number of periphery shoots, dry weight of stems and leaves, total dry matter yield, extractable sugars, and protein, proline, total chlorophyll, stevioside, glycoside, rebaudioside, and phenolic compound contents were assayed in the study. Findings showed that the highest total dry matter yield were obtained in irrigation control and salicylic acid consumption (77.2 g per plant), showing 34% increase compared to the lowest total dry matter yield obtained under 50% of field capacity irrigation and no salicylic acid consumption 34%. Also, in all drought stress treatments, applying salicylic acid improved total dry matter yield. In the treatment with no drought stress, the lowest sugar contents per plant were observed and in the treatment with salicylic acid the glucoside contents were more than the control. In general, drought stress reduced the amount of sugar and other growth traits of stevia plants. Applying salicylic acid in addition to improving the quantitative and qualitative traits of the stevia, improved the plant's yield under various levels of drought stress, which is very important.



تاثیر اسید سالیسیلیک بر عملکرد اندام‌های رویشی و مواد موثره استویا (*Stevia rebaudiana Bertoni*) تحت تنش خشکی

مهرداد ملکی^۱، حمید سبحانیان^{۲*}، عنایت‌اله یزدان‌پناه^۳، عباس ملکی^۴

^۱گروه زیست‌شناسی گیاهی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران، رایانامه: mehردادmaleki98@gmail.com

^۲گروه زیست‌شناسی گیاهی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران، رایانامه: motif3000@yahoo.com

^۳گروه زیست‌شناسی گیاهی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران، رایانامه: enayatallahyazdanpanah@yahoo.com

^۴گروه زراعت، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ایلام، ایلام، ایران، رایانامه: maleki97@yahoo.com

سال هفدهم، شماره ۶۶، تابستان ۱۴۰۱ / صفحات: ۸۹-۱۰۷

نوع مقاله:

مقاله کامل علمی-پژوهشی

چکیده

این بررسی به منظور بررسی تاثیر محلول پاشی اسید سالیسیلیک بر عملکرد و مواد موثره استویا تحت تنش خشکی انجام شد. آزمایش در قالب طرح اسپلیت پلات و در قالب بلوک‌های کامل تصادفی در ۳ تکرار در مزرعه تحقیقات شهرستان سرآبله واقع در استان ایلام در سال ۱۴۰۰-۱۳۹۹ اجرا شد. تنش خشکی در سه سطح ۱۰۰ (شاهد)، ۷۵ و ۵۰ درصد ظرفیت زراعی مزرعه و تیمار اسید سالیسیلیک در ۲ سطح عدم مصرف و محلول پاشی (با غلظت ۱ میلی‌مولار) بود. در این بررسی ارتفاع بوته، تعداد شاخه جانبی، وزن خشک ساقه، وزن خشک برگ، عملکرد ماده خشک کل، قند قابل برداشت، پروتئین، پرولین، کلروفیل کل، استویوزید، گلیکوزید، ریبودیوزید و ترکیبات فنلی اندازه‌گیری شد. یافته‌های این پژوهش نشان داد که بیشترین عملکرد ماده خشک کل در شاهد و مصرف اسید سالیسیلیک به مقدار ۷۷/۲ گرم در گیاه حاصل شد که نسبت به کمترین عملکرد ماده خشک کل یعنی تیمار ۵۰ درصد ظرفیت زراعی و عدم مصرف اسید سالیسیلیک ۳۴ درصد افزایش نشان داد. همچنین در تمام سطوح تنش خشکی مصرف اسید سالیسیلیک موجب افزایش عملکرد ماده خشک کل شد. در تیمار عدم اعمال تنش خشکی کمترین قند در بوته و در تیمار با اسید سالیسیلیک، میزان گلیکوزید بیشتر از شاهد بود. به‌طور کلی تنش خشکی موجب کاهش مقدار قند و سایر صفات رشدی گیاه استویا شد و در این بین مصرف اسید سالیسیلیک علاوه بر آنکه به تنهایی موجب بهبود خصوصیات کمی و کیفی گیاه استویا شد، در سطوح مختلف تنش خشکی نیز موجب بهبود عملکرد این گیاه شد که این نتیجه بسیار حائز اهمیت است.

واژه‌های کلیدی:

استویا
ترکیبات فنلی
کم‌آبی
گلیکوزید
قند قابل برداشت

مقدمه

افزایش بهره‌گیری از گیاهان دارویی و معطر در سطح دنیا، اهمیت و ضرورت کاشت گیاهان دارویی و معطر را آشکارتر می‌سازد (War et al., 2011; Fathi and Bahamin, 2018; Bahamin et al., 2013). استویا با نام علمی *Stevia rebaudiana* از خانواده‌ی مرکبان است که حداکثر دارای یک متر ارتفاع و پنج سال عمر با برگ‌هایی شیرین که بومی آمریکای جنوبی می‌باشد و توان مقابله با سرما را ندارد. این گیاه خاصیت شیرین کنندگی دارد و جایگزین بسیار مناسبی برای قند و شکر به حساب می‌آید (Garzi et al., 2019; Gerami et al., 2019). گیاه شیرین‌برگ بومی مناطق شمال قاره‌ی آمریکای جنوبی بوده و گونه‌های وحشی آن در سرزمین‌های بلند بین برزیل و پاراگوئه رشد می‌کند. به سبب خاصیت درمانی و شیرین کنندگی برگ استویا، این گیاه از لحاظ علمی و اقتصادی مورد توجه است (Bahari Saravi et al., 2021).

تولید محصولات زراعی توسط تنش، به‌خصوص تنش خشکی و شوری محدود می‌گردد، با توجه به تخمین پژوهشگران، تنها ده درصد از زمین‌های زراعی جهان عاری از تنش‌های محیطی می‌باشد. بیان شده است که عامل اصلی اختلاف بین عملکرد بالقوه و واقعی، تنش‌های محیطی می‌باشد (War et al., 2011). تنش خشکی بر متابولیسم گیاه اثر منفی می‌گذارد (Bahamin et al., 2021)، از جمله اینکه تولید پروتئین‌ها و آنزیم‌ها دچار اختلال می‌شود. در این شرایط در اثر افزایش تجزیه اسیدهای نوکلئیک، کربوهیدرات‌ها و پروتئین‌ها؛ تولید آکالوئیدها، اسانس‌ها و مواد معطر گیاهان افزایش می‌یابد (Sirousmehr et al., 2014; Rezaei et al., 2015; Zabet et al., 2015). به‌خاطر اینکه در شرایط تنش؛ تولید و انباشت متابولیت‌های ثانویه در گیاه افزایش

می‌یابد و این مواد از اکسیداسیون داخلی سلول‌های گیاهی جلوگیری به عمل می‌آورند، بنابراین در شرایط تنش خشکی، مقدار اسانس افزایش می‌یابد (Abbasi et al., 2022; Foladvand et al., 2017; Shamsibeiranvand et al., 2017). در پژوهشی که روی پونه (*Mentha pulegium* L.) انجام شد، مشخص شد که پروتئین محلول برگ و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در تنش خشکی شدید کاهش یافت (and Niknam, 2014; Dawoudian et al., 2021).

محلول پاشی یا کاربرد برگ مصرف عناصر غذایی یک انتخاب می‌باشد هنگامی که کمبود عنصر تغذیه‌ای توسط به کارگیری مواد تغذیه‌ای از طریق خاک در دسترسی مقدور نباشد (Moghaddam et al., 2022; Sarkar et al., 2007). برخی گزارشات حاکی از نقش سالیسیلیک اسید در تعدیل اثرات ناشی از تنش‌ها به‌ویژه تنش کم آبی موجود است (Saberi et al., 2021). برخی ترکیبات هم‌چون سالیسیلیک اسید با اثر بر خانواده آنزیم آنتی‌اکسیدان مانند کاتالاز، پراکسیدازها، دیسموتاز سوپر اکسید، پلی فنل اکسیداز و متابولیت‌هایی هم‌چون گلوکوتانیون و آسکوربیک اسید، اثرات ناشی از تنش خشکی و شوری و گرما را نقصان می‌دهند (Erfani et al., 2022; EL-Tayeb, 2005). سالیسیلیک اسید از گروه تنظیم کننده‌های رشد گیاهی می‌باشد که در تنظیم واکنش‌های فیزیولوژیکی گیاه نقش دارد. سنتز اتیلین، رشد و نمو، القای گلدهی، بسته و باز شدن روزنه‌ها و تنفس از وظایف اصلی سالیسیلیک اسید به حساب می‌آید (Dehestani, 2022). اسید سالیسیلیک موجب افزایش رشد از طریق طویل شدن و تقسیم سلول‌های گیاهی می‌گردد که این رهیافت با کمک بقیه‌ی تنظیم کننده‌ها مانند اکسین انجام می‌گردد (Sirousmehr et al., 2014). مقادیر قابل توجهی اسید سالیسیلیک در

اندام‌های رویشی و مواد موثره استویا تحت تنش خشکی بود.

مواد و روش‌ها

مکان و طرح آزمایشی: این آزمایش در قالب طرح اسپلیت پلات و در قالب بلوک‌های کامل تصادفی در ۳ تکرار در محدوده مزرعه پژوهشی شهرستان سرآبله واقع در استان ایلام در سال ۱۳۹۹-۱۴۰۰ اجرا شد. تنش خشکی در ۳ سطح شامل ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی مزرعه FC (شاهد یا آبیاری کامل)، تنش ۷۵ درصد ظرفیت زراعی مزرعه و تنش ۵۰ درصد ظرفیت زراعی مزرعه و تیمار اسید سالیسیلیک در ۲ سطح عدم مصرف و محلول پاشی (با غلظت ۱ میلی‌مولار در مرحله حدود ۵۰ درصد گلدهی مزرعه) (Figuroa-Pérez et al., 2015) بود.

اجرای تنش خشکی: با در نظر گرفتن ضریب گیاهی (Kc)، میزان تبخیر و تعرق بالقوه مشخص و بر اساس تخلیه رطوبتی و طبق تیمارهای مذکور تا رسیدن رطوبت خاک به حد ظرفیت زراعی مزرعه FC، میزان آب مورد نیاز محاسبه و حجم آب مورد نیاز هر کرت توسط کنتور حجمی اندازه گیری شد. عمق آب در هر آبیاری (I) بر حسب سانتی‌متر بر اساس معادله ۱ محاسبه شد (Jalili et al., 2021):

$$I = \frac{(\theta_f - \theta)(\rho_b / \rho_w) D}{100} \quad \text{معادله ۱}$$

θ = رطوبت وزنی خاک به هنگام آبیاری (گرم)

θ_f = رطوبت وزنی خاک در حالت ظرفیت زراعی (گرم)

ρ_b = چگالی ظاهری خاک (گرم بر سانتیمتر مکعب)

ρ_w = چگالی حقیقی خاک (گرم بر سانتیمتر مکعب)

D = عمق مؤثر ریشه (سانتی‌متر)

و به وسیله رابطه ۲-۳ حجم آب آبیاری مورد نیاز هر کرت برآورد شد:

$$V = I \times A \times 1000 \quad \text{معادله ۲}$$

V = حجم آب آبیاری استفاده شده در هر کرت (لیتر)

خاک حاوی ریزوسفر گزارش گردیده است (Karami-Chame et al., 2016; Kardoni et al., 2019). تاثیر مثبت سالیسیلیک اسید بر تنش خشکی به نقش این ماده در مهار اتیلن نسبت داده شده است. سالیسیلیک اسید با تاثیر بر آنزیم‌های خانواده آنتی اکسیدان مانند سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز پراکسیدازها، پلی فنل اکسیداز و متابولیت‌هایی مثل اسید گلوکاتایون و آسکوربیک، نتایج حاصل تنش‌های محیطی مثل شوری، خشکی و گرما را تعدیل می‌کند (Karami-Chame et al., 2016).

بیان شده است که سالیسیلیک اسید اثر مهارکنندگی به‌اسطه‌ی تنش خشکی و شوری را پایین می‌آورد (Karami-Chame et al., 2016). اثر سالیسیلیک اسید بر تنش محیطی مربوط به تاثیر آن در کاهش اتیلن می‌باشد. مطالعه‌ها نشان داده که احتمالاً سالیسیلیک اسید به خاطر اثر بر ساخت زیستی اتیلن موجب افزایش توان گیاه در مقابله با آثار تنش‌های محیطی می‌شود (Foladvand et al., 2016; Khoshkhabar et al., 2015, Maleki et al., 2020). گزارش‌های فراوانی در خصوص نقش سالیسیلیک اسید بر تعدیل اثر مضر تنش‌های محیطی، به خصوص تنش خشکی وجود دارد. سالیسیلیک اسید با تاثیر مثبت بر آنزیم‌های آنتی اکسیدان مثل سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، پراکسیدازها، پلی فنل اکسیداز و متابولیت‌هایی همچون اسید آسکوربیک و گلوکاتایون، اثر مضر تنش‌های گرم، خشکی و شوری را کم می‌کند (Karami-Chame et al., 2016). طبق تحقیقات صورت گرفته و موارد ذکر شده، با مصرف اسید سالیسیلیک می‌توان موجب افزایش مقاومت و یا بهبود رشد شد و با مصرف این مواد از کاهش عملکرد جلوگیری کرد. هدف از انجام این تحقیق بررسی تاثیر تاثیر اسید سالیسیلیک بر عملکرد

A= مساحت هر کرت (مترمربع)

I= ارتفاع آب آبیاری (متر)

عملیات زراعی

قبل از اجرای آزمایش، از عمق ۳۰ سانتی متری خاک محل اجرای آزمایش نمونه گیری به عمل آمد تا برخی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک و عناصر غذایی مانند نیتروژن، فسفر، پتاسیم، روی و آهن آن اندازه گیری شود و در نهایت مقدار کود لازم بر اساس نتایج به زمین داده شد. عملیات آماده سازی زمین شامل شخم، دیسک و تسطیح، قبل از کاشت صورت گرفت. پس از در آوردن شیارها نقشه آزمایش بر روی زمین پیاده گردید. فاصله بوته‌ها بین خطوط ۳۰ سانتی متر و بین ردیف‌های کاشت ۷۵ سانتی متر بود. طول هر خط کاشت ۶ متر و هر کرت دارای ۵ خط کاشت بود. فاصله بین دو تکرار ۲ متر در نظر گرفته شد. نشاءها از مرکز تحقیقات کشاورزی شهرستان کرخ تهیه شد. تاریخ کاشت نیز ۲۵ اسفند ۱۳۹۹ می‌باشد. نتایج تجزیه خاک در جدول ۱ نشان داده شده است.

قبل از کاشت از عمق مؤثر ریشه نمونه خاک تهیه و جهت تعیین درصد رطوبت وزنی به آزمایشگاه ارسال گردید که بر اساس آن آب مورد نیاز برای حالت تامین تمام نیاز آبی محاسبه و سپس از طریق تناسب به تیمارهای ۷۵ و ۵۰ درصد تخلیه رطوبتی اعمال شد. همچنین جهت تعیین زمان آبیاری از دستگاه رطوبت سنج خاک لوترون مدل LUTRON PMS-714 در طی فصل رشد استفاده شد. جهت تعیین دقیق آب ورودی به هر کرت آبیاری با روش کنترل شده (دارای کنتور اندازه‌گیری میزان آب خروجی) صورت گرفت. بدین ترتیب مقدار کل آب مصرفی در تیمار آبیاری کامل یا بدون تنش (۱۰۰٪ ظرفیت زراعی) معادل ۳۰۰۰ متر مکعب در هکتار، در تیمار تنش ۷۵٪ ظرفیت زراعی معادل ۲۲۵۰ متر مکعب در هکتار و در تیمار تنش ۵۰٪ ظرفیت زراعی معادل ۱۵۰۰ متر مکعب در هکتار محاسبه گردید.

جدول ۱: نتایج تجزیه خاک در آزمایشگاه

عمق نمونه برداری	پتاسیم (پی پی ام)	فسفر (پی پی ام)	ازت (درصد)	اسیدیته (دسی‌زیمنس بر متر)	هدایت الکتریکی (دسی‌زیمنس بر متر)	کربن آلی (درصد)	مواد خنثی شونده (درصد)
۳۰-۰	۲۸۰	۲۸	۳/۶۱	۷/۳۴	۰/۴۱	۲/۰۵	۱۸/۵

منبع: یافته‌های تحقیق قبل از اجرای تیمارهای آزمایش

صفات رویشی و عملکردی: به ترتیب در شروع ساقه رفتن، شروع گلدهی و شروع رسیدگی گیاه را کف بر کرده و وزن اندم هوایی آن با ترازوی دیجیتالی با دقت یک هزارم ارزیابی گردید. برای سنجش وزن خشک نمونه‌ها به مدت ۷۲ ساعت جلوی تابش مستقیم آفتاب قرار گرفتند و سپس وزن خشک در مراحل ساقه رفتن، گلدهی و رسیدگی تعیین گردید. ارتفاع بوته با خط‌کش از کف خاک تا آخرین مریستم

صفات مورد ارزیابی: در پایان این بررسی پس از حذف ۲ ردیف کناری به‌عنوان اثر حاشیه، نمونه‌گیری از ۲ خط وسط انجام شد. صفات مورد ارزیابی نیز شامل عملکرد ماده خشک کل، وزن خشک ساقه، وزن خشک برگ، درصد قند قابل برداشت، درصد پروتئین، میزان پرولین، کلروفیل کل، ارتفاع، تعداد شاخه جانبی، اوزیدها (شامل استویوزید، گلیکوزید و ریبودیوزید) و ترکیبات فنلی بود.

بر حسب سانتی‌متر اندازه‌گیری شد. در مرحله رسیدگی کامل، با استفاده از یک پلات یک متر مربعی بوته‌های وسط هر کرت از سطح خاک کف بر شدند و در سایه خشک شد. بعد از توزین عملکرد بیولوژیک به کیلوگرم در هکتار تعمیم داده شد.

اندازه‌گیری کلروفیل کل: برای این منظور ۰/۲ گرم وزن تر برگ به دقت توزین و در استون ۸۰ درصد در هاون خوب سائیده می‌گردد و حجم محلول با استون ۸۰٪ توسط بالن ژوژه به ۲۵ میلی لیتر رسید. محلول حاصل به مدت ۱۰ دقیقه در ۴۰۰۰ دور سانتیفریژ و سپس جذب نوری لایه فوقانی در طول موج‌های ۶۴۵، ۶۵۲ و ۶۶۳ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر مدل uv ۱۱۰۰ اندازه‌گیری شد. مقدار کلروفیل a و b طبق فرمول آرنون به دست آمد (Arnon., 1949). سپس از جمع کلروفیل آ و ب، کلروفیل کل (Arnon., 1949) حاصل شد. حرف v نشان دهنده‌ی حجم محلول صاف شده (محلول فوقانی حاصل از سانتیفریژ) و حرف m وزن تر نمونه بر حسب گرم است.

$$= [12/v (A_{663}) - 2/69 (A_{645})] \times v/m \times 1000$$

میلی گرم کلروفیل a در گرم برگ

$$= [22/9 (A_{645}) - 4/68 (A_{663})] \times v/m \times 1000$$

گرم کلروفیل b در گرم برگ

اندازه‌گیری پروتئین: برای محاسبه میزان پروتئین ابتدا ۱ گرم از برگ که به طور همگن آسیاب شده بودند داخل لوله آزمایش ریخته و ۱ گرم سولفات مس، ۸ گرم پتاسیم و ۱۵ سی سی اسید سولفوریک به آن اضافه شد. پس از انجام این مراحل لوله‌های آزمایش توسط یک ظرف حامل ۶ تایی به دستگاه مخصوص حرارت دهنده با درجه حرارت ۴۲۰ درجه سانتی‌گراد انتقال داده شد. پس از آنکه محلول داخل لوله آزمایش به رنگ سبز درآمد دستگاه خاموش و پس از سرد شدن لوله‌ها، به هر لوله ۷۵ سی سی آب مقطر اضافه شد. سپس به ازاء هر لوله آزمایش ۲۵ سی سی

اسید بوریک و چند قطره معرف کج‌لدال داخل یک ارلن ریخته تا هنگامی که رنگ آن قرمز شد، داخل هر لوله آزمایش ۶ سی سی محلول سود نیز اضافه شد. در مرحله بعد لوله آزمایش و ارلن در دستگاه کج‌لدال قرار گرفت. پس از پایان کار و تقطیر بخشی از مواد لوله آزمایش در ارلن، ارلن در دستگاه تیتراسیون قرار گرفت و اسید موجود در دستگاه (اسید کلریدریک) به ارلن اضافه شد. پس از آنکه رنگ محلول داخل ارلن به رنگ قرمز اولیه تبدیل شد، عدد نمایش داده شده دستگاه به عنوان عدد تیتراسیون یادداشت و با بهره برداری از رابطه درصد پروتئین به دست آمد (Jones et al., 1999).

$$\text{وزن نمونه} / 0.14 \times 6/25 \times \text{عدد تیتراسیون} = \text{درصد}$$

پروتئین

اندازه‌گیری قندهای محلول: در مرحله‌ی گلدهی محتوای قند محلول نمونه‌ها با بهره‌برداری از معرف آنترون (Thimmaiah, 2004) تعیین گردید. ۰/۱ گرم بافت تر برگ در ۲/۵ میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درصد در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ دقیقه قرار گرفت و کربوهیدرات‌های محلول استخراج شد. عصاره حاصل با بهره‌برداری از کاغذ صافی صاف گردید و سپس الکل آن تبخیر شد. رسوب حاصل در ۲/۵ میلی لیتر آب مقطر حل می‌گردد. ۲۰۰ میکرولیتر از هر نمونه در یک لوله آزمایش ریخته شد و ۵ میلی‌لیتر معرف آنترون به آن اضافه می‌گردد. پس از مخلوط شدن به مدت ۱۷ دقیقه در بن ماری ۹۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و پس از سرد شدن، جذب نمونه‌ها در ۶۲۵ نانومتر خوانده شد. برای محاسبه مقدار قند از منحنی استاندارد گلوکز بهره‌برداری شد و نتایج بر حسب میلی گرم بر گرم وزن خشک ارائه گردید.

اندازه‌گیری پرولین: در مرحله گلدهی سنجش پرولین انجام شد. در این روش ۰/۵ گرم از ماده تر گیاهی با

بر اساس مقایسه زمان بارداری پیک خروجی آن با پیک استاندارد مقایسه و سطح زیر منحنی آنها تعیین شد (Mamta et al., 2010).

ترکیبات فنلی: از روش رنگ سنجی کلرید آلومینیوم برای تعیین میزان ترکیبات فنلی بهره برداری شد (Chang et al., 2002). هر کدام از عصاره‌های متانولی گیاهی (۰/۵ میلی لیتر از ۱:۱۰ گرم در میلی لیتر) به صورت جداگانه با ۱/۵ میلی لیتر متانول، ۰/۱ میلی لیتر کلرید آلومینیوم (۱۰٪ متانولی)، ۰/۱ میلی لیتر استات پتاسیم (۱ مولار) و ۲۸ میلی لیتر آب مقطر ترکیب شدند. سپس محلول‌ها در دمای اتاق به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفتند و جذب هر ترکیب واکنشی در طول موج ۴۱۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه گیری شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

جهت مرتب کردن داده‌ها از Excel و برای تجزیه و تحلیل داده‌ها، از برنامه‌های آماری SAS و ماکرو استفاده شد. جهت مقایسه میانگین صفات مورد نظر نیز از آزمون چند دامنه‌ای دانکن استفاده شد.

نتایج

ارتفاع بوته‌ها: اثر اصلی تنش خشکی (آبیاری)، اثر اصلی اسید سالیسیلیک و اثر متقابل خشکی و اسید سالیسیلیک بر ارتفاع بوته معنی‌دار بود (جدول ۲). بیشترین ارتفاع بوته در شاهد و مصرف اسید سالیسیلیک به مقدار ۹۱/۱ سانتی‌متر حاصل شد که نسبت به کمترین مقدار یعنی تیمار ۵۰ درصد ظرفیت زراعی و عدم مصرف اسید سالیسیلیک ۳۸ درصد افزایش نشان داد. همچنین در تمام سطوح تنش خشکی مصرف اسید سالیسیلیک موجب افزایش ارتفاع بوته شد که این یک نتیجه مطلوب می‌باشد (شکل ۱).

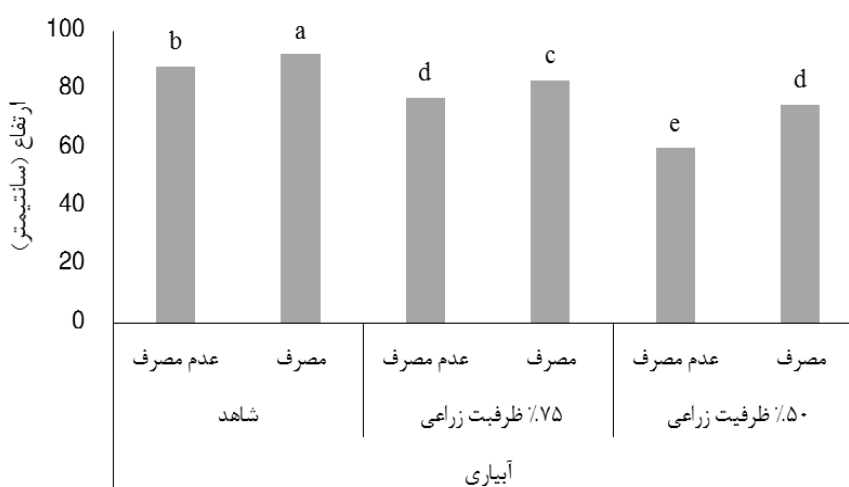
۱۰ میلی لیتر محلول ۳ درصد اسید سولفوسالیسیلیک ساییده گردید و از مخلوط همگن حاصل پس از صاف کردن، ۲ میلی لیتر برداشته شد و پس از افزودن ۲ میلی لیتر معرف اسید نین هیدرین و ۲ میلی لیتر اسید استیک خالص در بن ماری با دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت قرار داده شد. سپس آن‌ها را در حمام آب یخ گذاشته و پس از اضافه کردن ۴ میلی لیتر تولوئن، مقدار جذب در طول موج ۵۲۰ نانومتر خوانده شد و مقدار پرولین با بهره برداری از منحنی استاندارد آن به دست آمد (Bates et al., 1973).

عصاره‌گیری برای استویوزید، ریودیوزید و گلیکوزید: به جهت عصاره‌گیری برای استویوزید، ریودیوزید و گلیکوزید ابتدا ۱۰۰ میلی گرم برگ خشک در ۱۰ میلی لیتر متانول خالص به مدت ۱۵ دقیقه مخلوط گردید. در ادامه متانول در مبرد تحت دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد تبخیر شد. به جهت چربی زدایی، ۲۰ میلی لیتر آن‌گران اضافه شد و بعد از تبخیر حلال، مقدار ۵ میلی لیتر محلول (شامل استونیتریل و آب (۸۰:۲۰)) اضافه و فیلتر شد و به دستگاه HPLC تزریق گردد (Mamta et al., 2010).

ارزیابی استویوزید، ریودیوزید و گلیکوزید توسط HPLC: ۱۰ میکرولیتر عصاره استخراجی به ستون کروماتوگرافی با مشخصات Cosmosil 5 NH₂-MS به طول ۱۵ سانتی‌متر، قطر ۶/۴ میلی‌متر و قطر ذرات ۵ میکرومتر متصل به دستگاه HPLC مدل unicam-crystal-200 تزریق گردید. فاز متحرک شامل محلول آب مقطر و استونیتریل با شرایط ایزوکراتیک بود که با نسبت ۲۰ درصد از آب و ۸۰٪ استونیتریل با سرعت یک میلی لیتر بر دقیقه توسط پمپ از ستون عبور کرد. از شناساگر از نوع Diode Array و در طول موج ۲۱۰ نانومتر بهره برداری شد. فشار پمپ در ۸۰۰ psi تنظیم گردید و مقدار هر ماده

جدول ۲: تجزیه واریانس اثر تنش خشکی و اسید سالیسیلیک بر صفات رویشی و عملکردی استویا

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات				
		ارتفاع	تعداد شاخه جانبی	وزن خشک ساقه	وزن خشک برگ	عملکرد ماده خشک کل
تکرار	۲	۱۸/۱۶*	۹/۰۵۶ ns	۰/۱۷۱ ns	۳/۱۳۹ ns	۴/۷۵۸ ns
آبیاری	۲	۷۷۵/۱**	۶۳/۳۸ **	۳۳۹/۲ **	۱۴۳/۱ **	۹۱۷/۲ **
خطای آ	۴	۱/۳۳۳	۲/۳۸۹	۰/۳۳۹	۲/۹۳۳	۴/۹۵۷
سالیسیلیک اسید	۱	۳۲۰/۸**	۲۲/۲۲ ns	۲۱۸/۴ **	۱۵۸/۲ **	۷۴۸/۴ **
آبیاری X سالیسیلیک اسید	۲	۴۹/۳**	۰/۳۸۹ ns	۱۸/۴۸ *	۲/۳۰ ns	۳۱/۹ *
خطای آزمایش	۶	۴/۳۸۹	۷/۵۰	۲/۴۶۹	۰/۸۸۶	۵/۲۴۸
ضریب تغییرات	-	۲/۶۴	۱۲/۷	۴/۴	۳/۲۹	۳/۵۹



شکل ۱: اثر متقابل تنش خشکی و اسید سالیسیلیک بر ارتفاع بوته

حروف غیر مشترک بیانگر تفاوت معنی دار با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵ درصد است.

شاخه جانبی به مقدار ۲۴,۶۷ عدد در بوته حاصل شد که نسبت به سایر سطوح تنش خشکی اختلاف آماری معناداری داشت (جدول ۳).

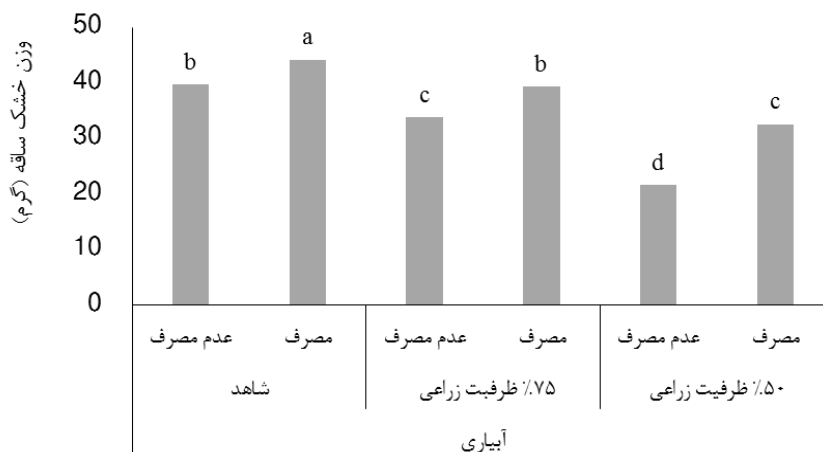
تعداد شاخه جانبی: اثر اصلی تنش خشکی (آبیاری) بر تعداد شاخه جانبی در بوته معنا دار بود (جدول ۲). در تیمار عدم اعمال تنش خشکی بیشترین تعداد

جدول ۳: اثر اصلی تنش خشکی بر برخی صفات مورفولوژیک

آبیاری	تعداد شاخه جانبی	وزن خشک برگ (گرم)	
		تعداد شاخه جانبی	وزن خشک برگ (گرم)
۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی (شاهد)	۲۴/۶۷	a	۳۳/۴۹
۷۵ درصد ظرفیت زراعی	۲۱/۵۰	b	۲۸/۵۶
۵۰ درصد ظرفیت زراعی	۱۸/۱۷	c	۲۳/۷۲
اسید سالیسیلیک	عدم مصرف	۲۰/۳۳	-
	مصرف	۲۲/۵۶	-

ستون های دارای حروف مشترک در هر گروه تیماری اختلاف آماری معناداری با هم ندارند

درصد افزایش نشان داد. همچنین در تمام سطوح تنش خشکی مصرف اسید سالیسیلیک موجب افزایش وزن خشک ساقه شد که این یک نتیجه مطلوب می‌باشد. همچنین اختلاف بین تمام تیمارها معنی دار بود (شکل ۲).



شکل ۲: اثر متقابل تنش خشکی و اسید سالیسیلیک بر وزن خشک ساقه

حروف غیر مشترک بیانگر تفاوت معنی دار با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵ درصد است.

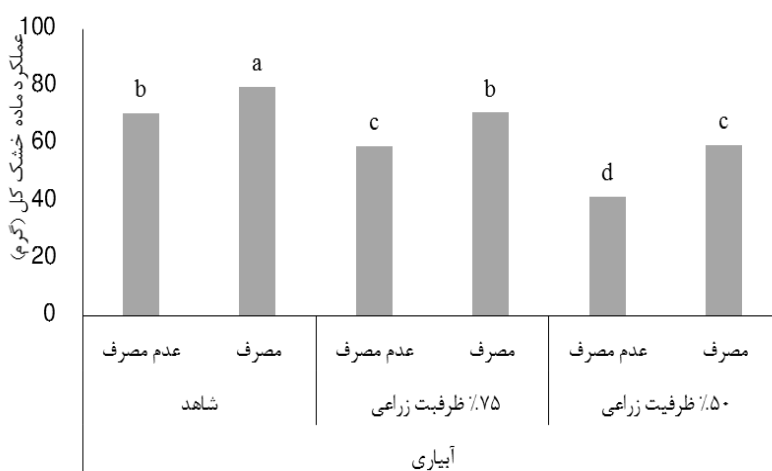
ظرفیت زراعی و عدم مصرف اسید سالیسیلیک ۳۴ درصد افزایش نشان داد. همچنین در تمام سطوح تنش خشکی مصرف اسید سالیسیلیک موجب افزایش عملکرد ماده خشک کل شد که این یک نتیجه مطلوب می‌باشد. همچنین اختلاف بین تمام تیمارها معنی دار بود (شکل ۳).

قند قابل برداشت: نتایج این بررسی نشان داد که اثر اصلی تنش خشکی (آبیاری) و اثر اصلی اسید سالیسیلیک بر قند قابل برداشت معنا دار بود (جدول ۴). در تیمار ۵۰ درصد ظرفیت زراعی کمترین قند قابل برداشت به مقدار ۲۳/۶ گرم در بوته حاصل شد که نسبت به سایر سطوح تنش خشکی اختلاف آماری معناداری داشت. بیشترین قند قابل برداشت در تیمار عدم اعمال تنش به مقدار ۳۰/۱۸ درصد حاصل شد (جدول ۵). در تیمار مصرف اسید سالیسیلیک قند قابل برداشت به مقدار ۲۸/۱۵ گرم در بوته به دست

وزن خشک برگ: اثر اصلی تنش خشکی (آبیاری) و اثر اصلی اسید سالیسیلیک بر وزن خشک برگ معنا دار بود (جدول ۲). در تیمار عدم اعمال تنش خشکی بیشترین وزن خشک برگ به مقدار ۳۳،۴۹ گرم در بوته حاصل شد که نسبت به سایر سطوح تنش خشکی اختلاف آماری معناداری داشت (جدول ۳). در تیمار مصرف اسید سالیسیلیک وزن خشک برگ به مقدار ۳۱،۵۶ گرم در بوته به دست آمد که بیشتر از تیمار عدم مصرف اسید سالیسیلیک بود (جدول ۳).

عملکرد ماده خشک کل: اثر اصلی تنش خشکی (آبیاری)، اثر اصلی اسید سالیسیلیک و اثر متقابل خشکی و اسید سالیسیلیک بر عملکرد ماده خشک کل معنا دار بود (جدول ۲). بیشترین عملکرد ماده خشک کل در تیمار شاهد و مصرف اسید سالیسیلیک به مقدار ۷۷/۲ گرم در گیاه حاصل شد که نسبت به کمترین عملکرد ماده خشک کل یعنی تیمار ۵۰ درصد

آمد که بیشتر از تیمار عدم مصرف اسید سالیسیلیک بود (جدول ۵).



شکل ۳: اثر متقابل تنش خشکی و اسید سالیسیلیک بر عملکرد ماده خشک کل حروف غیر مشترک بیانگر تفاوت معنی دار با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵ درصد است.

جدول ۴: تجزیه واریانس اثر تنش خشکی و اسید سالیسیلیک بر صفات کیفی استویا

منابع تغییرات	درجه آزادی	قند قابل برداشت	پروتئین	پرولین	کلروفیل کل
تکرار	۲	۱/۳۶۱ ns	۰/۶۱۴ ns	۰/۰۰۳ ns	۰/۰۱۰ ns
آبیاری	۲	۷۰/۷۴ **	۱۲/۵۲ **	۰/۵۰۹ **	۱/۰۴۴ **
خطای آ	۴	۲/۵۴۷	۰/۳۸۲	۰/۰۳۱	۰/۰۱۸
سالیسیلیک اسید	۱	۱۳/۲۱ **	۱۱/۶۵ **	۰/۱۵۳ **	۰/۳۵۳ **
آبیاری X سالیسیلیک اسید	۲	۱/۶۵۸ ns	۰/۰۷۲ ns	۰/۰۱۲ ns	۰/۰۴۹ **
خطای آزمایش	۶	۰/۳۴۷	۰/۰۹۲	۰/۰۰۳	۰/۰۰۳
ضریب تغییرات	-	۲/۱۵	۲/۹۶	۲/۴۱	۱/۹۹

ns و * و ** بترتیب بیانگر تفاوت آماری معنی دار در سطح ۱ درصد، ۵ درصد و عدم تفاوت معنی دار

جدول ۵: اثر اصلی تنش خشکی و اسید سالیسیلیک بر برخی صفات کیفی و مواد موثره

	قند قابل برداشت (گرم)	پروتئین (درصد)	پرولین (میکرومول بر گرم)	استویوزید (میلی گرم بر گرم وزن خشک)	گلایکوزید (میلی گرم بر گرم وزن خشک)
۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی (شاهد)	۳۰/۳۸	c	۸/۸۴	b	۲/۰۳
۷۵ درصد ظرفیت زراعی	۲۷/۸۹	b	۱۰/۱۶	ab	۲/۳۷
۵۰ درصد ظرفیت زراعی	۲۳/۶۰	a	۱۱/۷۲	a	۲/۶۱
عدم مصرف اسید سالیسیلیک	۲۶/۴۳	b	۹/۴۴	b	۲/۲۴
مصرف اسید سالیسیلیک	۲۸/۱۵	a	۱۱/۰۴	a	۲/۴۳

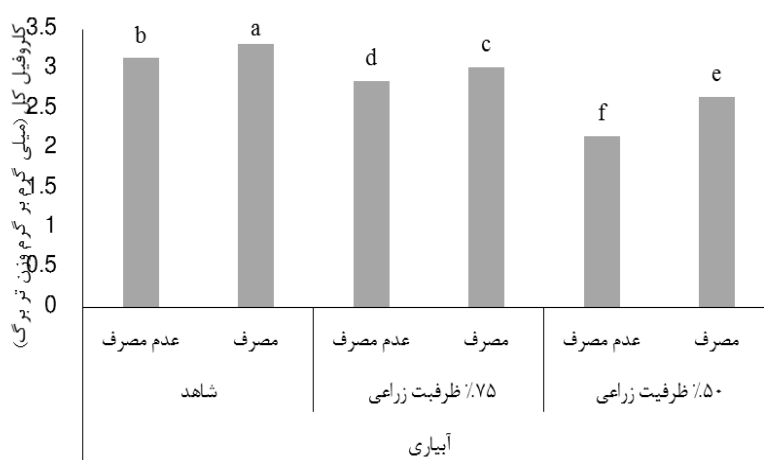
ستون های دارای حروف مشترک در هر گروه تیماری اختلاف آماری معناداری با هم ندارند

داشت (جدول ۶). در تیمار مصرف اسید سالیسیلیک پرولین به مقدار ۲,۴۳ میکرومول برگرم به دست آمد که بیشتر از تیمار عدم مصرف اسید سالیسیلیک بود (جدول ۵).

کلروفیل کل: نتایج این بررسی نشان داد که اثر اصلی تنش خشکی (آبیاری)، اثر اصلی اسید سالیسیلیک و اثر متقابل این دو عامل بر کلروفیل کل معنا دار بود (جدول ۴). یافته های این پژوهش نشان داد که بیشترین کلروفیل کل در تیمار شاهد و مصرف اسید سالیسیلیک به مقدار ۳,۱۴ میلی گرم برگرم در گیاه حاصل شد که نسبت به کمترین کلروفیل کل یعنی تیمار ۵۰ درصد ظرفیت زراعی و عدم مصرف اسید سالیسیلیک ۲۳ درصد افزایش نشان داد. همچنین در تمام سطوح تنش خشکی مصرف اسید سالیسیلیک موجب افزایش مقدار کلروفیل کل شد (شکل ۴).

پروتئین: نتایج این بررسی نشان داد که اثر اصلی تنش خشکی (آبیاری) و اثر اصلی اسید سالیسیلیک بر پروتئین معنا دار بود (جدول ۴). در تیمار اعمال تنش خشکی ۵۰ درصد ظرفیت زراعی بیشترین پروتئین به مقدار ۱۱,۷۲ درصد حاصل شد که نسبت به سایر سطوح تنش خشکی اختلاف آماری معناداری داشت (جدول ۵). در تیمار مصرف اسید سالیسیلیک پروتئین به مقدار ۱۱,۰۴ درصد به دست آمد که بیشتر از تیمار عدم مصرف اسید سالیسیلیک بود (جدول ۵).

پرولین: نتایج این بررسی نشان داد که اثر اصلی تنش خشکی (آبیاری) و اثر اصلی اسید سالیسیلیک بر پرولین معنا دار بود (جدول ۴). در تیمار اعمال تنش خشکی ۵۰ درصد ظرفیت زراعی بیشترین پرولین به مقدار ۲,۶۱ میکرومول برگرم حاصل شد که نسبت به سایر سطوح تنش خشکی اختلاف آماری معناداری



شکل ۴: اثر متقابل تنش خشکی و اسید سالیسیلیک بر کلروفیل کل

حروف غیر مشترک بیانگر تفاوت معنی دار با استفاده از آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح ۵ درصد است.

معناداری داشت (جدول ۵). در تیمار مصرف اسید سالیسیلیک استویوزید به مقدار ۲۹,۳ میلی گرم برگرم بافت خشک به دست آمد که بیشتر از تیمار عدم مصرف اسید سالیسیلیک بود (جدول ۵).

گلیکوزید: نتایج این بررسی نشان داد که اثر اصلی تنش خشکی (آبیاری) و اثر اصلی اسید سالیسیلیک بر

استویوزید: نتایج این بررسی نشان داد که اثر اصلی تنش خشکی (آبیاری) و اثر اصلی اسید سالیسیلیک بر استویوزید معنا دار بود (جدول ۶). در تیمار اعمال تنش خشکی ۵۰ درصد بیشترین استویوزید به مقدار ۳۱,۰۶ میلی گرم برگرم بافت خشک حاصل شد که نسبت به سایر سطوح تنش خشکی اختلاف آماری

معناداری داشت (جدول ۵). در تیمار مصرف اسید سالیسیلیک گلیکوزید به مقدار ۷٫۸۲ میلی گرم بر گرم بافت خشک به دست آمد که بیشتر از تیمار عدم مصرف اسید سالیسیلیک بود (جدول ۵).

گلیکوزید معنا دار بود (جدول ۶). در تیمار اعمال تنش خشکی ۵۰ درصد بیشترین گلیکوزید به مقدار ۸٫۳۵ میلی گرم بر گرم بافت خشک حاصل شد که نسبت به سایر سطوح تنش خشکی اختلاف آماری

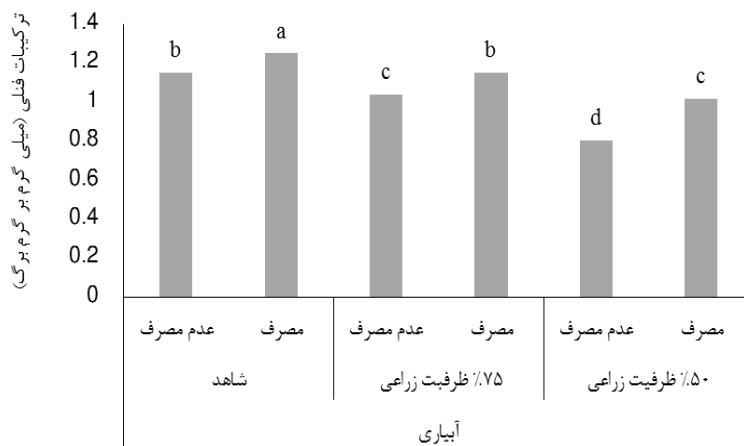
جدول ۶: تجزیه واریانس اثر تنش خشکی و اسید سالیسیلیک بر مواد موثره استویا

منابع تغییرات	درجه آزادی	استویوزید	گلیکوزید	ریبودیوزید	ترکیبات فنلی
تکرار	۲	۰/۱۴۱ ns	۰/۲۱۰ ns	۰/۱۶۶ ns	۰/۰۰۳ ns
آبیاری	۲	۸۹/۵ **	۷/۹۰۷ **	۶/۳۳۹ **	۰/۱۲۹ **
خطای آ	۴	۲/۲۴۰	۰/۳۶۴	۰/۳۱۶	۰/۰۰۵
سالیسیلیک اسید	۱	۶۲/۱ **	۴/۸۸۵ **	۴/۲۰۰ **	۰/۰۹۱ **
آبیاری X سالیسیلیک اسید	۲	۰/۲۵۸ ns	۰/۴۰۰ ns	۰/۳۲۸ ns	۰/۰۰۶ *
خطای آزمایش	۶	۰/۵۶۴	۰/۱۴۳	۰/۰۸۶	۰/۰۰۱
ضریب تغییرات	-	۲/۸۳	۵/۱۷	۴/۵۸	۲/۲۴

**، * و ns: بترتیب بیانگر تفاوت آماری معنی دار در سطح ۱ درصد، ۵ درصد و عدم تفاوت معنی دار

ترکیبات فنلی: اثر اصلی تنش خشکی (آبیاری)، اثر اصلی اسید سالیسیلیک و اثر متقابل این دو عامل بر ترکیبات فنلی معنادار بود (جدول ۶). یافته‌های این پژوهش نشان داد که بیشترین ترکیبات فنلی در تیمار تنش ۵۰ درصد و مصرف اسید سالیسیلیک به مقدار ۱/۲۴ میلی گرم بر گرم برگ در گیاه حاصل شد که نسبت به کمترین ترکیبات فنلی یعنی تیمار عدم تنش و عدم مصرف اسید سالیسیلیک ۲۸ درصد افزایش نشان داد (شکل ۵).

ریبودیوزید: اثر اصلی تنش خشکی (آبیاری) و اثر اصلی اسید سالیسیلیک بر ریبودیوزید معنا دار بود (جدول ۶). در تیمار اعمال تنش خشکی ۵۰ درصد بیشترین ریبودیوزید به مقدار ۷/۲۹ میلی گرم بر گرم بافت خشک حاصل شد که نسبت به سایر سطوح تنش خشکی اختلاف آماری معناداری داشت (جدول ۵). در تیمار مصرف اسید سالیسیلیک ریبودیوزید به مقدار ۶/۸۸ میلی گرم بر گرم بافت خشک به دست آمد که بیشتر از تیمار عدم مصرف اسید سالیسیلیک بود (جدول ۵).



شکل ۵: اثر متقابل تنش خشکی و اسید سالیسیلیک بر ترکیبات فنلی

بحث

طول یا ارتفاع گیاه یک صفت ارثی می‌باشد که تا حدود زیادی تحت تأثیر علل بیرونی همانند خاک، رطوبت و مواد غذایی می‌باشد. غالب اوقات گیاهانی که تحت تنش خشکی هستند نسبت به گیاهانی با شرایط مناسب از نظر آبدهی کوتاه تر هستند. بلندای بوته ی گیاه در شرایط طبیعی که از نظر رطوبتی تنش بر گیاه وارد نمی شود تناسب یا ارتباطی با عملکرد دانه ندارد. ولی هنگام بروز تنش رطوبتی این فاکتور با عملکرد دانه رابطه ای عکس برقرار است (Popova et al., 2009). افزایش ارتفاع بوته را می‌توان اینگونه توجیه کرد که بوته در اثر مصرف با سالیسیلیک اسید در برابر تنش خشکی مقاوم گشته است و این ماده موجب کاهش اثر مضر تنش خشکی شده است. این گونه گیاهان تیمار شده با سالیسیلیک اسید سطح برگ بیشتری نسبت به گیاهان شاهد دارند. افزایش سطح برگ در اینگونه گیاهان موجب افزایش فتوسنتز و به دنبال آن می‌تواند افزایش ارتفاع را دنبال داشته باشد (Modi et al., 2012).

سالیسیلیک اسید از ترکیباتی می‌باشد که به‌عنوان تنظیم کننده ی رشد گیاهی در بعضی از گیاهان ایفای نقش می‌کند. اینگونه مواد در مواقع تنش خشکی و شوری می‌توانند گیاهان را در برابر تنش محافظت نمایند. سالیسیلیک اسید موجب بالا بردن مقاومت گیاهان به تنش‌های غیر زیستی و زیستی همچون خشکی می‌شود (Modi et al., 2012).

تنش خشکی با کاهش جذب آب و عناصر غذایی بر رشد و نمو گیاه تأثیر نموده، ارتفاع بوته ها کاهش، برگ‌ها کوچک، و عملکرد گیاه زراعی کاهش می‌یابد (Bahamin et al., 2019). محققان (Modi et al., 2012) علت کاهش وزن خشک اندام‌های رویشی در حالت تنش را کاهش سطح برگ ذکر کرده اند که موجب کاهش دریافت نور و مقدار فتوسنتز می‌گردد.

محققان (Modi et al., 2012) کاهش فتوسنتز را به دلیل بسته شدن روزنه ها تحت شرایط تنش خشکی را به‌عنوان یکی از عوامل مهم کاهش میزان تولید ماده خشک در گیاهان مطرح کرده اند. تنش آبی موجب کاهش عملکرد تر، عملکرد خشک و عملکرد اسانس شده است زیرا وقتی گیاه با خشکی رو به رو شود روزنه هایش بسته یا نیمه بسته می‌شوند و این موجب کاهش جذب دی اکسید کربن می‌شود. گیاه مقدار زیادی انرژی برای جذب آب هزینه می‌کند و از سوی دیگر برای کاهش تبخیر و تعرق سطح برگ را هم کاهش می‌دهد و این خود منجر به کاهش تولید مواد فتوسنتزی می‌شود (Sirousmehr et al., 2014). در این بررسی تحت تنش خشکی کاهش تعداد شاخه در گیاه گزارش شده است که با نظر محققان (Figueroa-Pérez et al., 2015) همخوانی دارد.

قندهای محلول از جمله آسیمیلات‌های سازگار هستند که در شرایط تنش بر مقدار آنها افزوده می‌شود و تجمع آنها سبب تنظیم اسمزی و تورژسانس سلول‌ها شده و از طرف دیگر، سبب حفاظت و پایداری غشا و پروتئین در شرایط تنش می‌گردد، زیرا که افزایش قندهای محلولی یکی از ساز و کارهای افزایش فشار اسمزی داخل سلول است که گیاه سعی دارد در شرایط کم‌آبی فشار اسمزی محیط را خنثی نموده و آب بیشتری را از خاک جذب نماید (Karami-Chame et al., 2016). تجمع قندهای محلول داخل سلول‌ها در تنظیم اسمزی نقش مهم ایفاء نموده و کمک می‌کند تا پتانسیل آب سلول کاهش یافته و آب بیشتری برای حفظ تورژسانس تحت تنش کم‌آبی داخل سلول باقی بماند. این مکانسیم موجب پایداری غشای زیستی، پروتئین‌ها، افزایش فتوسنتز و مقاومت به خشکی می‌شود (Murtaza et al., 2010).

علت کاهش درصد پروتئین خام را می‌توان به تجزیه پروتئین‌ها در شرایط تنش کم‌آبی و عدم سنتز مجدد آنها در این شرایط نسبت داد. یکی از اثرات سوء تنش بر روی گیاهان بر هم زدن تعادل عناصر غذایی آنها و تغییر کیفی پروتئین‌ها می‌باشد (Bahamin et al., 2014).

رنگیزه‌های فتوسنتزی مانند کلروفیل و کاروتنوئید در مجموعه فتوسنتزی نقش دارند و شاخصی مهم برای رشد گیاه معرفی شده‌اند (Modi et al., 2012). در پژوهش حاضر محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی در غلظت‌های کم اسید سالیسیلیک افزایش یافت؛ ولی در ادامه در غلظت‌های تنش‌زای این تیمار، محتوای این رنگدانه‌ها کاهش معنی‌داری نشان داد. اسید سالیسیلیک در غلظت‌های کم با مهار تجزیه کلروفیل با آنزیم کلروفیل‌از افزایش این رنگدانه را در گیاه موجب می‌شود (Belkhadi et al., 2010). به نظر می‌رسد افزایش کلروفیل در غلظت کم اسید سالیسیلیک می‌تواند به همین دلیل باشد. برخی از پژوهشگران نیز نتایج مشابهی در تیمار اسید سالیسیلیک به دست آورده‌اند (Modi et al., 2012). در غلظت‌های زیاد اسید سالیسیلیک با تجمع بیش از حد گونه‌های فعال اکسیژن که نقش مولکول‌های پیام‌رسان را دارند، رشد گیاه متوقف می‌شود. این تنش، تجزیه کلروفیل و کاهش سنتز این رنگدانه‌ها را موجب می‌شود. مطالعات Rao و همکاران (1997) در گیاه گندم نشان داده که در غلظت‌های سمی اسید سالیسیلیک، کلروفیل کاهش می‌یابد؛ بنابراین شاید بتوان کاهش کلروفیل را در پژوهش حاضر با نتایج گزارش‌شده سایر پژوهش‌ها تفسیر و نتایج مشابه با آنها را تأیید کرد. کاروتنوئیدها نقش محافظتی در مجموعه فتوسنتزی و آثار مهاری بر پراکسیداسیون لیپیدها دارند و تنش اکسیداتیو را در گیاه کاهش می‌دهند (Modi et al., 2012).

تنش خشکی از طرفی موجب افزایش درصد اسانس بوته و درصد اسانس برگ شده است زیرا شرایط تنش تولید و نگهداری مواد ثانویه در گیاه را افزایش می‌دهد، این مواد چون از اکسید اسپون درونی سلول‌ها جلوگیری می‌کنند، در شرایط تنش افزایش می‌یابند (Karami-Chame et al., 2016). تنش آب بر متابولیسم گیاه اثر می‌گذارد، از جمله اینکه تولید پروتئین‌ها و آنزیم‌ها دچار اختلال می‌شود. در این شرایط در اثر افزایش تجزیه کربو هیدرات‌ها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک، تولید آکالوئیدها، اسانس‌ها و مواد معطر گیاهان افزایش می‌یابد (Sirousmehr et al., 2014).

برگ‌های استویا مقدار زیادی استویول گلیکوزید را در خود انباشته می‌کنند، که غلظت آن‌ها می‌تواند بسیار وابسته به ژنوتیپ، شرایط رشدی و مرحله نموی باشد. نتایج به‌دست آمده می‌تواند به دلیل نقش مؤثر سالیسیلیک اسید به عنوان یک فعال کننده مسیرهای درگیر در سنتز متابولیت ثانویه و آنزیم‌های درگیر در تولید کائورنوئیک اسید که پیش ساز سنتز ریودیوزید است باشد. معمولاً افزایش سطوح رونویسی یک ژن به افزایش در میزان متابولیت‌های ثانویه سنتز شده از طریق آن مسیر بیوسنتزی خاص منجر می‌شود (Modi et al., 2012).

ریودیوزید A مهمترین قند برگ استویا است. افزایش نسبت ریودیوزید A به استویوزید با مصرف اسید سالیسیلیک گزارش شده است. این نسبت به تدریج افزایش یافته تا این که در ۷۵ میکرومولار بالاترین نسبت ریودیوزید A به استویوزید را داشته و بعد از آن در غلظت ۱۰۰ میکرومولار تقریباً هیچ ریودیوزیدی تولید نشده است. به نظر می‌رسد در غلظت‌های بالا، اسید سالیسیلیک اثر ممانعت‌کنندگی بر روی تولید ریودیوزید A دارد. با این حال به نظر می‌رسد اسید سالیسیلیک بیش از آن که باعث افزایش

(Wang et al., 2015). در پژوهش حاضر میزان فعالیت ویژه‌ی این دو آنزیم و ترکیبات فنلی با افزایش غلظت اسید سالیسیلیک افزایش یافت. گزارش‌های قبلی نشان داده‌اند فعالیت ویژه‌ی آنزیم‌های فنیل آلانین آمونیا لیا ز و تیروزین آمونیا لیا ز در میوه‌جات و سبزی‌ها افزایش می‌یابد (Wang et al., 2015). در گزارش‌های دیگر، همبستگی مثبت بین فعالیت این آنزیم‌ها و ترکیبات فنلی اثبات شده است (Koushesh et al., 2012). ارتباط بین فعالیت این آنزیم‌ها (Wang et al., 2015; Wang et al., 2010)، اسید سالیسیلیک و فنل بیان‌کننده نقش تنظیمی اسید سالیسیلیک در سنتز فنل‌ها است (Wang et al., 2015).

نتیجه‌گیری نهایی

نتایج این بررسی نشان داد که اثر اصلی تنش خشکی و اثر اصلی اسید سالیسیلیک بر تعداد شاخه جانبی، وزن خشک برگ، پروتئین، پرولین، استویوزید، گلیکوزید و ریبودیوزید معنادار بود. اثر متقابل خشکی و اسید سالیسیلیک بر ارتفاع بوته، وزن خشک ساقه، وزن خشک برگ، عملکرد ماده خشک کل، کلروفیل کل و ترکیبات فنلی معنی‌دار بود. به‌طور کلی تنش خشکی موجب کاهش مقدار قند و سایر صفات رشدی گیاه استویا شد اما در مقابل مقدار مواد موثره گیاه افزایش یافت. در این بین مصرف اسید سالیسیلیک علاوه بر آنکه به تنهایی موجب بهبود خصوصیات کمی و کیفی گیاه استویا شد. اسید سالیسیلیک در سطوح مختلف تنش خشکی نیز موجب بهبود عملکرد این گیاه شد که این نتیجه بسیار حائز اهمیت است و می‌تواند راهکاری برای مقابله با تنش باشد.

میزان استویوزید کل شود نسبت بین این استویول گلیکوزیدها را تغییر می‌دهد. تقاضای روز افزون برای منابع شیرین‌کننده طبیعی با کالری پایین، همراه با اختلاف نظر درباره استفاده از برخی شیرین‌کننده‌های مصنوعی مانند سیکلامات، آسپارتام و... توسعه استراتژی‌هایی برای افزایش تولید SG در گیاه استویا را افزایش می‌دهد. برای برداشتن اولین گام در بهینه‌سازی تولید SG ها آنالیز نسخه برداری ژن‌های مهم مسیر بیوسنتزی SG ها دارای اهمیت اساسی است. احتمال دارد تیمارهایی مانند اسید سالیسیلیک باعث بیان گلیکوزیل ترانسفرازهایی شود که سبب ساخت گلیکوزیدها به یک اندازه می‌شود. با توجه به این نتایج اسید سالیسیلیک می‌تواند در که قند A تحقیقات بعدی در جهت افزایش میزان ریبودیوزید مطلوب‌تری می‌باشد مورد بررسی قرار بگیرد (Mehravaran et al., 2019).

مطالعات گذشته افزایش ترکیبات فنلی را در گیاهان تیمار شده با اسید سالیسیلیک گزارش کردند (Modi et al., 2012). گیاهان برای مقابله با تنش‌ها از ساز و کارهای مختلفی مانند افزایش متابولیت‌های ثانویه شامل فلاونوئید و آنتوسیانین استفاده می‌کنند. این ترکیبات نقش آنتی‌اکسیدانی دارند و جاروب‌کننده‌ی گونه‌های فعال اکسیژن هستند (Modi et al., 2012). افزایش ترکیبات فنلی با القای فعالیت ویژه آنزیم‌های فنیل آلانین آمونیا لیا ز و تیروزین آمونیا لیا ز که آنزیم‌های کلیدی در تولید این ترکیبات هستند با تیمار اسید سالیسیلیک رخ می‌دهد (Wang et al., 2015). سنتز ترکیبات فنلی با دامیناسیون فنیل آلانین و تیروزین در مسیر فنیل پروپانوئید انجام می‌شود و ترانس سینامیک اسید از فنیل آلانین و کوماریک اسید از تیروزین تولید می‌شود (Koushesh et al., 2012). این آنزیم‌ها با ROS حاصل از تنش‌ها القا می‌شوند

References

1. **Abbasi, A., Maleki, A., babaei, F., safari, H., rangin, A. (2022).** The effect of zinc sulfate and gibberellic acid on gas exchange and white bean (*Phaseolus vulgaris*) performance under drought stress. Journal of Iranian Plant Ecophysiological Research, 17(65), 1-18. (In Persian).
2. **Ali, F., Bano, A. and Fazal, A., (2017).** Recent methods of drought stress tolerance in plants. Plant Growth Regulation, 82(3), pp.363-375.
3. **Arnon DI. (1949).** Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiology. 24: 1-15.
4. **Bahamin, S., Koocheki, A., Nassiri Mahallati, M., Behashti, S. (2021).** Effect of nitrogen and phosphorus fertilizers on yield and nutrient efficiency indices in maize under drought stress. Environmental Stresses in Crop Sciences, 14(3), 675-690. (In Persian).
5. **Bahamin, S., Koocheki, A., Nassiri Mahallati, M., Beheshti, S. (2019).** Effect of biological and chemical fertilizers of nitrogen and phosphorus on quantitative and qualitative productivity of maize under drought stress conditions. Environmental Stresses in Crop Sciences, 12(1), 123-139. (In Persian).
6. **Bahamin, S., Parsa, S., Ghoreishi, S. (2013).** The Examination of Effects of Growth Stimulating and Salinity Bacteria on the Characteristics of *Mentha spicata* leaves. International Journal of Agronomy and Plant Production, 4 (9), 2119-2125.
7. **Bahamin, S., Sohrab, M., Mohammad, A. B., Behroz, K. T., & Qorbanali, A. (2014).** Effect of bio-fertilizer, manure and chemical fertilizer on yield and reproductive characteristics of sunflower (*Helianthus annuus* L.). International Journal Research Agriculture Environmental Science, 3(1), 36-43.
8. **Bahari Sarvai, S.H. Gholami, A., Pirdashti, H., Baradaran Firoozabadi, M., Asghari, H.R. (2021).** Growth and physiological response of *Stevia rebaudiana Bertoni* to the coexistence of endophytic fungi and polyamine spermidine foliar application under saline conditions. Environmental stresses in agricultural sciences, 14 (1): 241-263. (In Persian).
9. **Bates, L. S., Waldren, R. P., & Teare, I. D. (1973).** Rapid determination of free proline for water-stress studies. Plant and soil, 39(1), 205-207.
10. **Belkhadi, A., Hediji, H., Abbes, Z., Nouairi, Z., Barhoumi, M., Zarrouk, W., Chaibi, W. and Djebali, W. (2010).** Effects of exogenous salicylic acid pre-treatment on cadmium toxicity and leaf lipid content in *Linum usitatissimum* L.. Ecotoxicology and Environmental Safety 73: 1003011.
11. **Chang, C., M. Yang, H. Wen and J. Chern. (2002).** Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. Journal Food Drug Analysis, 10: 178-182.
12. **Dawoudian, J., Bahamin, S., & Tantoh, H. B. (2021).** Environmental impact assessment of cement industries using mathematical matrix method: case of Ghayen cement, South Khorasan, Iran. Environmental Science and Pollution Research, 28(18), 22348-22358.
13. **Dehestani-Ardakani, M., Ghatei, P., Momenpour, A., Gholamnezhad, J., Fakhripour, Z. (2022).** Effect of salicylic acid foliar application on flowering and growth characteristics of lantana (*Lantana camara* Linn.) under salinity stress. Journal of Iranian Plant Ecophysiological Research, 16(64), 1-23. (In Persian).
14. **EL-Tayeb, M.A. (2005).** Response of barley gains to the interactive effect of salinity and salicylic acid. Plant Growth Regular. 45: 215- 225.
15. **Erfani, S., rezaei, M., Farahvash, F., Mahmoudjanlo, M. (2022).** The effect of nano potassium fertilizer, potassium sulfate and salicylic acid on physiological characteristics of *Calendula officinalis* L. under water stress. Journal of Iranian Plant Ecophysiological Research, 17(65), 66-85. (In Persian).
16. **Farooq, M., Wahid, A., Kobayashi, N., Fujita, D., & Basra, S. M. A. (2009).** Plant drought stress: effects, mechanisms

- and management. *Agronomy for sustainable development*, 29(1), 185-212.
17. **Fathi, A., Bahamin, S. (2018).** The effect of irrigation levels and foliar application (zinc, humic acid and salicylic acid) on growth characteristics, yield and yield components of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). *Environmental Stresses in Crop Sciences*, 11(3), 661-674. (In Persian).
 18. **Figuroa-Pérez, M. G., Gallegos-Corona, M. A., Ramos-Gomez, M., & Reynoso-Camacho, R. (2015).** Salicylic acid elicitation during cultivation of the peppermint plant improves anti-diabetic effects of its infusions. *Food & function*, 6(6), 1865-1874.
 19. **Foladvand, F., Khoshkhabar, H., Naghdi, N., Hosseinabadi, M., Bahamin, S., Fathi, A. (2017).** The effect of sowing date and nitrogen on yield, and essential oil of German chamomile. *Scientia Agriculturae*, 19 (3): 85-92.
 20. **Garzi, A., Omid, H., Bostan, A. (2019).** Effect of *Stevia rebaudiana* seed priming treatments with salicylic acid, iron and zinc on some germination traits and photosynthetic pigments under drought stress. *Iranian Seed Research*, 6 (2): 125-135. (In Persian).
 21. **Gerami, M., Hamdian, A., Akbarpour, V. (2019).** Investigation of the effect of putrescine and salicylic acid on some physiological and antioxidant properties of *Stevia rebaudiana* B. in salinity conditions. *Journal of Crop Breeding*, 11 (29): 40-54. (In Persian).
 22. **Hassanpour, H., & Niknam, V. (2014).** Investigation of drought stress effect on growth and antioxidant enzymes activity in *Mentha pulegium* L. *Journal of plant process and function*. Vol. 3(8), 25-34. (In Persian).
 23. **Jalili, Kh., and Moradi, H., Jalili, J. (2021).** Evaluation of the effects of climate change on water needs of agricultural products using the Lars-WG model, Fifth International Congress on Agricultural Development, Natural Resources, Environment and Tourism of Iran, Tabriz. (In Persian).
 24. **Jones JB, Wolf B and Mills HA. (1999).** *Plant analysis Handbook*, Micro-Macro publishing, Inc, Athens, GA. pp: 110.
 25. **Karami-Chame, S., Khalil-Tahmasbi, B., ShahMahmoodi, P., Abdollahi, A., Fathi, A., Seyed-Mousavi, S.J., Bahamin, S. (2016).** Effects of salinity stress, salicylic acid and *Pseudomonas* on the physiological characteristics and yield of seed beans (*Phaseolus vulgaris*). *Scientia*, 14(2): 23438.
 26. **Kardoni, F., Bahamin, S., Khalil Tahmasebi, B., Ghavim-Sadati, S., Vahdani, S. (2019).** Yield Comparisons of Mung-bean as Affected by Its Different Nutritions (Chemical, Biological and Integration) under Tillage Systems. *Journal of Crop Ecophysiology*, 13(49(1)), 87-102. (In Persian).
 27. **Khorasaninejad, S., Mousavi, A., Soltanloo, H., Hemmati, K., & Khalighi, A. (2011).** The effect of drought stress on growth parameters, essential oil yield and constituent of Peppermint (*Mentha piperita* L.). *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(22), 5360-5365.
 28. **Khoshkhabar, H., Jafari, M., Feilinezhad, A., Bahamin, S. (2015).** Effect of Sodium Silicate on the Yield and Yield Components of Pea under Salinity Stress. *Biological Forum – An International Journal*, 7(1): 1045-1049.
 29. **Koushesh, M., Arzani, K. and Barzegar, M. (2012).** Postharvest polyamine application alleviates chilling injury and affects apricot storage ability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60: 8947-8953.
 30. **Maleki, A., Fathi, A., Bahamin, S. (2020).** The effect of gibberellin hormone on yield, growth indices, and biochemical traits of corn (*Zea Mays* L.) under drought stress. *Journal of Iranian Plant Ecophysiological Research*, 15(59), 1-16. (In Persian).
 31. **Mamta, P.R., P. Vijaylata, G. Arvind, S. Bikram, K.B. Ravinder and T. Rupinder. (2010).** Stimulatory effect of phosphate-solubilizing bacteria on plant growth, stevioside and rebaudioside-A contents of *stevia rebaudiana* Bertoni. *Applied Soil Ecology*, 46: 222-229.

32. **Mehravaran, L., Omid, M., Naghavi, M.R., Fakheri, B. (2019).** Effect of different concentrations of salicylic acid on the expression of 13-hydroxylase kaurnic acid gene involved in the biosynthetic pathway of steviol glycosides in stevia. *Journal of Modern Genetics*, 14 (2): 89-99. (In Persian).
33. **Modi AR, Patil G, Kumar N, Singh AS, Subhash N. (2012).** A simple and efficient in vitro mass multiplication procedure for *Stevia rebaudiana* Bertoni and analysis of genetic fidelity of in vitro raised plants through RAPD. *Suger Technology*. 3(5), 17-33.
34. **Moghaddam, M., Mehdizade, L., Farsari, S. (2022).** Effect of salicylic acid application on some physiological characteristics and essential oil production of lemon verbena (*Lippia citrodora* L.) under salinity stress. *Journal of Iranian Plant Ecophysiological Research*, 17(65), 54-65. (In Persian).
35. **Murtaza G., Asghar R. and Abdul Majid S. (2010).** Changes in specific activity of ascorbate peroxidase during seed development of pea (*Pisum sativum* L.) treated with salicylic acid. *African Journal of Biotechnology*, 9: 5333-5337.
36. **Popova, L.P., Maslenkova, L.T., Yordanova R.Y., Ivanova, A.P., Krantev, A.P., Szalai, G., and Janda, T. (2009).** Exogenous treatment with salicylic acid attenuates cadmium toxicity in pea seedlings. *Plant Physiology Biochemical*, 47:22431.
37. **Rahimi, Y., Taleei, A., & Ranjbar, M. (2017).** Changes in the expression of key genes involved in the biosynthesis of menthol and menthofuran in *Mentha piperita* L. under drought stress. *Acta Physiologicae Plantarum*, 39(9), 203.
38. **Rasouli, D., Solouki, M., Fakheri, B., & Esmaelzadeh, B. s. (2016).** Evaluation of antioxidant enzymes activities, proline, soluble sugars, photosynthetic pigments and essential oils of *Mentha piperita* L. in response to foliar application of salicylic acid and manganese stress. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 32(1), 71-82. (In Farsi).
39. **Rezaei, A., Lotfi, B., Jafari, M., & Bahamin, S. (2015).** Survey of effects of PGPR and salinity on the characteristics of *Nigella* leaves. In *Biological Forum-An International Journal*, 7:1058-1092.
40. **Saberi, M., karimian, V., Aran, M. (2021).** Effect of gibberellic and salicylic acid on germination improvement and seedling resistance of *Cassia angustifolia* vahl. under allelopathic stress of *eucalyptus camaldulensis* compounds. *Journal of Iranian Plant Ecophysiological Research*, 16(63), 49-60. (In Persian).
41. **Sarkar, A. K., Luijten, M., Miyashima, S., Lenhard, M., Hashimoto, T., Nakajima, K., & Laux, T. (2007).** Conserved factors regulate signalling in *Arabidopsis thaliana* shoot and root stem cell organizers. *Nature*, 446(7137), 811-814.
42. **Shamsibeiranvand, Z., Sadeghi, Z., Khoshkhabar, H., Hosseinabadi, M., Bahamin, S. (2017).** Survey some physiological characteristics of medicinal plant *Scrophularia striata* Boiss in Ilam province. *Scientia Agriculturae*, 19 (3): 62-68.
43. **Sirousmehr, A., Arbabi, J., & Asgharipour, M. R. (2014).** Effect of drought stress levels and organic manures on yield, essential oil content and some morphological characteristics of sweet basil (*Ocimum basilicum*). *Advance Environmental Biology*, 8(4), 880-885.
44. **Thimmaiah, S.R. (2004).** *Standard Methods for Biochemical Analysis* Kalyani Publishers, New Delhi, 545.
45. **Wang, L. J., Fan, L., Loescher, W., Duan, W., Lie, G. J., Cheng, J. S., Lou, H. B. and Li, S. H. (2010).** Salicylic acid alleviates decreases in photosynthesis under heat stress and accelerates recovery in grapevine leaves. *Plant Biology*, 10: 1-15.
46. **Wang, Z., Ma, L., Zhang, X., Xu, L., Cao, J. and Jiang, W. (2015).** The effect of exogenous salicylic acid on antioxidant activity, bioactive compounds and antioxidant system in apricot fruit. *Scientia Horticulturae* 181: 113-120.
47. **War, A. R., Paulraj, M. G., War, M. Y. and Ignacimuthu, S. (2011).** Jasmonic acid-mediated-induced resistance in groundnut (*Arachis hypogaea* L.)

- against *Helicoverpa armigera*. Journal of Plant Growth Regulation, 30: 512-523.
48. **Zabet, M., Bahamin, S., Ghoreishi, S., Sadeghi, H., Moosavi, S. (2015)**. Effect of deficit irrigation and nitrogen fertilizer on quantitative yield of aboveground part of forage pear millet (*Pennisetum glaucum*) in Birjand. Environmental Stresses in Crop Sciences, 7(2), 187-194. (In Persian).