

Study of the effect of glutamic acid on some physiological properties of stevia (*Stevia rebaudiana*) under salinity stress using *in vitro* culture

Masoumeh Salmeh¹, Mahyar Gerami², Masoud Azadbakht³ ,
Parastoo Majidian^{4*} 

¹ Biology Department, Sana Institute of Higher Education, Sari, Iran, Email: m.salemi.0808@gmail.com

² Biology Department, Sana Institute of Higher Education, Sari, Iran, Email: mahyar.gerami@yahoo.com

³ Biology Department, Sana Institute of Higher Education, Sari, Iran, Email: masoudazadbakht@gmail.com

⁴ Crop and Horticultural Science Research Department, Mazandaran Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Sari, Iran, Email: p.majidian@areeo.ac.ir

Article type:

Research article

Abstract

This study aimed to evaluate the effect of salt stress and glutamic acid on some physiological traits in stevia *in vitro* culture conditions. This study was conducted using a completely randomized factorial design with three replications at the tissue culture laboratory of Pardis University in Tehran. The physiological parameters, including photosynthetic pigment content, proline content, MDA content, and antioxidant enzyme activities, were assessed according to the interaction effects of glutamic acid and salinity. Finally, the obtained data were analyzed using Minitab 16 and SAS 9.4 software. The results indicated that stevia was sensitive to salinity concentrations of 100 and 200 mM. However, glutamic treatments positively affected physiological parameters under salinity stress. The results showed that 0.5 mg of glutamic acid could effectively neutralize the impact of 200 mM salinity. Additionally, the data indicated that stevia could help mitigate the adverse effects of salinity by enhancing the activity of impaired systems, such as the antioxidant enzyme guaiacol peroxidase and increasing proline content.

Article history

Received:12.08.2024

Revised:08.12.2024

Accepted:17.12.2024

Published:22.06.2025

Keywords

Glutamic Acid
Plant Tissue Culture
Salinity
Stevia

Introduction: Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) is a perennial medicinal plant from the Asteraceae family and a valuable natural source of steviol glycosides used as non-caloric sweeteners. Increasing demand for healthier sugar alternatives has intensified interest in stevia cultivation. However, salinity stress is a major abiotic constraint that negatively affects plant growth, photosynthesis, and metabolic balance. Salinity induces oxidative stress through excessive production of reactive oxygen species, leading to membrane damage and pigment degradation. Plants activate antioxidant enzymes and osmoprotective compounds to mitigate these effects. Glutamic acid, as a key amino acid involved in nitrogen metabolism, chlorophyll biosynthesis, and stress signaling, has been proposed as an effective elicitor to enhance stress tolerance. This study aimed to evaluate the physiological and biochemical responses of stevia plantlets to salinity stress and glutamic acid application under *in vitro* conditions.

Materials and Methods: The experiment was conducted as a factorial arrangement in a completely randomized design with six replications. Stevia plantlets were cultured on Murashige and Skoog medium supplemented with benzylaminopurine. Salinity stress was applied using four sodium chloride concentrations (0, 50, 100, and 200 mM), combined with four glutamic acid levels (0, 0.05, 0.2, and 0.5 mg L⁻¹). After 50 days of treatment, plant samples were collected for analysis. Chlorophyll, carotenoids, proline, total protein, malondialdehyde content, and the

activities of catalase and guaiacol peroxidase were measured using standard biochemical assays. Data were statistically analyzed using analysis of variance and mean comparisons at the 5% probability level.

Results and Discussion: Salinity stress significantly reduced photosynthetic pigments and increased oxidative damage, as indicated by elevated malondialdehyde levels and enhanced antioxidant enzyme activities. Accumulation of proline and total protein increased with increasing salinity, reflecting stress-induced metabolic adjustments. Application of glutamic acid significantly alleviated the adverse effects of salinity by improving pigment content, enhancing antioxidant enzyme activity, and reducing lipid peroxidation. The interaction between salinity and glutamic acid was significant for most traits, indicating that glutamic acid effectively modulated plant responses under stress conditions. The highest glutamic acid concentration showed the strongest protective effect, particularly under moderate salinity levels.

Conclusion: Stevia is sensitive to high salinity stress; however, exogenous application of glutamic acid markedly improved physiological performance and stress tolerance under *in vitro* conditions. Glutamic acid enhanced antioxidant defense, stabilized cellular membranes, and supported metabolic balance under salinity stress. The results suggest that glutamic acid can be considered an effective elicitor for mitigating salinity-induced damage in stevia and may provide a practical strategy for improving stevia propagation and cultivation in saline environments.

Cite this article as: Salmei, M., Gerami, M/, Azadbakht, M., Majidian, P. (2025). Study of the effect of glutamic acid on some physiological properties of stevia (*Stevia rebaudiana*) under salinity stress using *in vitro* culture. *Journal of Plant Environmental Physiology*, 78: 106-118.



©The author(s)

Publisher: Islamic Azad University, Gorgan branch

DOI: <https://doi.org/10.71890/IPER.2025.984417>

مطالعه اثر گلوتامیک اسید بر برخی از خصوصیات فیزیولوژیکی گیاه استویا (*Stevia rebaudiana* L.) در شرایط تنش شوری به صورت درون شیشه‌ای

معصومه سالمی^۱، مهیار گرامی^۲، مسعود آزادبخت^۳، پرستو مجیدیان^{۴*} 

^۱ بخش زیست شناسی، موسسه آموزش عالی غیرانتفاعی سنا، ساری، ایران، رایانامه: m.salemi.0808@gmail.com

^۲ بخش زیست شناسی، موسسه آموزش عالی غیرانتفاعی سنا، ساری، ایران، رایانامه: mayhar.gerami@yahoo.com

^۳ بخش زیست شناسی، موسسه آموزش عالی غیرانتفاعی سنا، ساری، ایران، رایانامه: masoudazadbakht@gmail.com

^۴ بخش تحقیقات علوم زراعی و باغی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی مازندران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ساری،

ایران، رایانامه: p.majdian@areeo.ac.ir

نوع مقاله:	چکیده
مقاله پژوهشی	هدف از این مطالعه، بررسی اثر تنش شوری و گلوتامیک اسید بر برخی از ویژگی های فیزیولوژیکی گیاه استویا در شرایط درون شیشه ای بود. این آزمایش به صورت فاکتوریل بر مبنای طرح کاملاً تصادفی با شش تکرار در آزمایشگاه کشت بافت دانشگاه پردیس تهران انجام شد. صفات مختلف فیزیولوژیکی نظیر رنگیزه های فتوسنتزی، محتوای پرولین، محتوای مالون دی آلدئید، فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی تحت اثر متقابل دو تیمار تنش شوری و گلوتامیک اسید بررسی شد. در نهایت، داده های بدست آمده با استفاده از نرم افزار SAS 9.4 و Minitab 16 مورد ارزیابی قرار گرفتند. بررسی نتایج حاصل از تنش شوری نشان داد که گیاه استویا نسبت به تنش ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی مولار کاملاً حساس بوده و نابود می شود. اما اعمال تیمار گلوتامیک اسید تاثیر بسزایی بر صفات مختلف فیزیولوژیکی گیاه در برابر تنش شوری به همراه دارد. بررسی دقیق تر نتایج نشان داد که تیمار ۰/۵ میلی گرم بر لیتر گلوتامیک اسید توانست به طور کامل اثر ۲۰۰ میلی مولار تنش شوری را خنثی کند. به علاوه، بررسی صفات اندازه گیری شده نشان داد که گیاه با استفاده از مکانیسم های دفاعی نظیر آنزیم آنتی اکسیدانی گایاکول پراکسیداز و همچنین پرولین توانست با اثرات تنش شوری به مقابله بپردازد.
واژه های کلیدی:	
استویا	
کشت بافت	
تنش شوری	
گلوتامیک اسید	

استناد: سالمی، معصومه؛ گرامی، مهیار؛ آزادبخت، مسعود؛ مجیدیان، پرستو (۱۴۰۴). مطالعه اثر گلوتامیک اسید بر برخی از خصوصیات فیزیولوژیکی گیاه استویا (*Stevia rebaudiana* L.) در شرایط تنش شوری به صورت درون شیشه ای. فیزیولوژی محیطی گیاهی، ۱۱۸:۷۸-۱۰۶.

DOI: <https://doi.org/10.71890/IPER.2025.984417>

ناشر: دانشگاه آزاد اسلامی گرگان

© نویسندگان.



مقدمه

استویا گیاهی است چند ساله و علفی از خانواده (Asteracea) و بومی شمال شرقی کشور پاراگوئه است. در برگ گیاه استویا انواع گلیکوزید های استوویول تولید می شود که بسیار شیرین تر از قند معمولی است. به دلیل مصرف بالای قند و شکر در جهان، ضرورت تولید محصولاتی که به حفظ سلامت بدن میپردازند مورد توجه قرار گرفته است (Singh et al., 2005).

متاسفانه، در حال حاضر تنش شوری به عنوان یک تنش مهم محسوب می شود و آثار زیانبار آن بر تولید و کیفیت محصولات مبرهن است. طبق مطالعات خاک شور براساس میزان سمیت ناشی از نمک ها، هدایت الکتریکی عصاره اشباع خاک شور، تقریباً معادل ۴۰ میلی مولار کلرید کلسیم است (Yan et al., 2015).

از مهمترین اتفاقاتی که تحت تنش شوری رخ می دهد، تولید اکسیژن های فعال می باشد. آنزیم های آنتی اکسیدانی مهمترین ترکیبات در جهت حذف این رادیکال های آزاد اکسیژن (ROS) هستند. آنزیم های آنتی اکسیدانی کاتالاز، گایاکول پراکسیداز و آنزیم های مسیر گلوکوتایون-آسکوربات جز این دسته از آنزیم ها هستند. این سیستم ها و مکانیسم ها میتوانند رادیکال های اکسیژن فعال در شرایط تنش را از بین ببرند. آنزیم های آنتی اکسیدانی از DNA و پروتئین ها و غشا سلولی در مقابل اثرات مخرب این رادیکال ها که در برابر تنش غیر زنده تولید میشوند، محافظت کند. (Hasegawa et al., 2000).

یکی از اثرات عمده تنش شوری، کاهش میزان فتوسنتز می باشد که ناشی از عدم رشد مناسب گیاه است. همچنین تخریب کلروفیل ها توسط کلروفیلاز منجر به پیری زودرس برگ می گردد. از آنجا که کلروفیل از مهمترین مکانیسم فتوسنتز می باشد، روش

های متعددی برای اندازه گیری صفات مرتبط با فتوسنتز از قبیل محتوای کلروفیل، کمپلکس پروتئین-کلروفیل و فلورسانس کلروفیل وجود دارد (Liu et al., 2021). مطالعات نشان داده است که در زمان بروز تنش، انتقال الکترون از فتوسیستم دو به فتوسیستم یک مختل شده که در این حالت، بالا بودن میزان کلروفیل باعث افزایش تولید رادیکال های آزاد اکسیژن می شود که اثرات مخرب فراوانی دارد. یکی از مکانیسم های گیاه برای کاهش تولید ROS، افزایش فعالیت آنزیمی به نام کلروفیلاز است که در نهایت منجر به تجزیه کلروفیل می شود (Ashraf and Harris, 2004).

گیاهان برای سازگاری از مکانیسم های متفاوت آناتومیک، مورفولوژیک و فیزیولوژیک استفاده می کنند. تنش شوری یا سدیم کلرید تنها بر یک مرحله رشدی گیاه تاثیر منفی نمیگذارد بلکه با توجه به شدت تنش شوری، میزان مقاومت و حساسیت گیاه به تنش، مراحل مختلف رشد، نوع بافت گیاهی متفاوت و متغیر است. تعداد زیادی از پژوهش ها در زمینه تحمل تنش شوری بر این نکته تاکید دارد که میزان مقاومت به تنش کلرید سدیم یا حتی دیگر تنش ها نظیر تنش خشکی یک ویژگی چند ژنی است که تعداد زیادی از مکانیسم های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی را در بر گرفته و به کمک آنها به مقابله با تنش میپردازد. یکی از مهمترین زمینه های مقاومت تنش شوری، محدود سازی جذب سدیم از ریشه، تنظیم جریان آن در داخل سلول و کنترل انتقال طولانی مسیر آن و همچنین کده بندی آن در سلول ها است (Corwin et al., 2021). بر اساس مطالعات انجام شده، یکی از راه های موثر جهت مقابله با تنش شوری و بالابردن تحمل گیاه استفاده از الیستورها می باشد. گلوتامیک اسید یکی از اسید آمینه های کلیدی است که در سنتز و تولید پروتئین ها نقش دارد.

مطالعات نشان داده است که گلوتامیک اسید در سنتز دیگر اسید های آمینه، جذب بهتر ترکیبات غذایی از خاک، انتقال بین سلولی ترکیبات، کمک به رشد گیاه در مقابله با تنش های زیستی و غیر زیستی و پیش ماده اصلی سنتز کلروفیل می باشد (Sun et al., 2010). از این رو، حضور گلوتامیک اسید در گیاه می تواند منجر به سنتز کلروفیل و در نهایت فتوسنتز بیشتر و در نهایت به رشد و توسعه گیاه بیانجامد.

مطالعات مختلفی در زمینه استفاده از الیسیتورها در کاهش اثرات مخرب تنش شوری در گیاه استویا انجام شده است. برای مثال، در مطالعه ای، Gerami و همکاران (۲۰۱۹) تاثیر پوترسین و اسید سالیسیلیک را بر برخی از خصوصیات فیزیولوژیک و آنتی اکسیدانی گیاه استویا در شرایط تنش شوری مورد مطالعه قرار دادند. نتایج نشان داد که شوری سبب کاهش کلروفیل و افزایش فعالیت های آنزیم های آنتی اکسیدانی شد. در حالی که، اعمال تیمار ۰/۵ میلی مولار اسید سالیسیلیک منجر به افزایش فعالیت آنزیم های کاتالاز و پراکسیداز شد. به علاوه، اثر محلول پاشی سلنیوم، بور و آهن بر عملکرد برگ و میزان کلروفیل آن، فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی و میزان گلیکوزیدهای استویول گیاه استویا تحت تنش شوری توسط Aghighi Shahvershi و همکاران (۲۰۱۷) بررسی شد. نتایج نشان داد که اثر تنش شوری و محلول پاشی بر عملکرد برگ، میزان کلروفیل، کاروتنوئید، محتوای پروتئین، آنزیم های کاتالاز (CAT) و سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و ترکیب های تشکیل دهنده گلیکوزیدهای استویول معنی دار بودند.

در ارتباط با استفاده از گلوتامیک اسید نیز پژوهش های متعددی انجام شده است. برای مثال، در مطالعه ای نشان داده شد که استفاده از گلوتامیک اسید میتواند به کشت گیاه خیار در شرایط تنش شوری در

غلظت های ۱۰۰ میلی مول در لیتر کلرید سدیم کمک بسزایی کند (Iqbal et al., 2021). در پژوهش Habib Khodai و همکاران (۲۰۱۴) نشان داده شد که استفاده همزمان از گلوتامیک اسید و اعمال تنش شوری بر وارپته خوش ناو انگور تاثیر معنی داری داشته و گیاهان رشد یافته در محیط کشت MS حاوی صد میلی گرم گلوتامیک اسید قادر به تحمل تنش شوری تا ۲۰۰ میلی مولار بوده اند در حالی که تیمار شاهد فاقد گلوتامیک اسید نتوانست تیمار شوری ۱۰۰ میلی مولار را تحمل کند.

در این راستا، با توجه به اهمیت گیاه دارویی استویا و لزوم ارائه راهکارهای مناسب جهت مقابله با تنش شوری، هدف از این پژوهش بررسی اثرات القاگر گلوتامیک اسید و تنش شوری بر برخی صفات و فیزیولوژیکی گیاه استویا تحت شرایط درون شیشه ای بود.

مواد و روش ها

نوع آزمایش و محل انجام آن: این پژوهش به صورت طرح آزمایش فاکتوریل بر مبنای طرح کاملاً تصادفی با شش تکرار انجام شد. گیاهچه های گیاه استویا در شرایط درون شیشه ای، از آزمایشگاه کشت بافت جهاد دانشگاهی تهران واقع در پردیس کشاورزی دانشگاه تهران، استان البرز تهیه شدند.

نحوه تهیه مواد آزمایش و اعمال تیمارها: گیاهچه های تهیه شده به قطعات دو الی سه سانتی متری برش خورده و به منظور تکثیر و پرآوری، در محیط کشت پرآوری موراشیگ و اسکوگ (Murashige and Skoog medium) یا MS حاوی مقدار ۰/۵ میلی گرم هورمون بنزیل آمینو پورین (6-Benzylaminopurine) یا BAP قرار گرفتند. در نهایت به منظور رشد، گیاهان به اتاقک رشد آزمایشگاه کشت بافت جهاد دانشگاهی تهران، در شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت

تاریکی و در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و رطوبت ۲۵ درصد انتقال یافتند. پس از رشد اولیه گیاهان به مدت ۱۴ روز، اعمال تنش بر گیاهچه های دو الی سه سانتی متری انجام شد. در این مرحله نیز گیاهچه ها در محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی گرم در لیتر هورمون BAP، غلظت های صفر، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی مولار در لیتر سدیم کلراید (NaCl) و غلظت های مختلف گلوتامیک اسید (صفر، ۰/۰۵، ۰/۲ و ۰/۵ میلی گرم بر لیتر) کشت داده و انتقال یافتند. پس از گذشت ۵۰ روز، نمونه های گیاهی را در ازت مایع پودر ساییده و به منظور بررسی صفات فیزیولوژیک در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد ذخیره و نگه داری شد.

صفات مورد بررسی

سنجش میزان کلروفیل و کاروتنوئیدها: اندازه گیری میزان رنگیزه های فتوسنتزی از طریق روش Arnon (۱۹۴۹) انجام شد. پس از تهیه نمونه ها، جذب محلول با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج های ۶۴۵، ۶۶۳ و ۴۸۰ نانومتر اندازه گیری و برای شاهد نیز از استون ۸۰٪ استفاده گردید. مقدار کاروتنوئید از روش Lichthentaler (۱۹۷۸) استفاده شد.

سنجش پرولین: مقدار پرولین براساس روش Bates و همکاران (۱۹۷۳) در طول موج ۵۲۰ نانومتر اندازه گیری شد.

هیدرین مخلوط شد. بعد از ۱۰ دقیقه قرار گرفتن مایع در آب گرم در دمای ۷۰ درجه سانتیگراد، جذب نمونه در ۵۷۰ نانومتر محاسبه شد.

سنجش مالون دی آلدئید: محتوای مالون دی آلدئید (Malondialdehyde) یا پراکسیداسیون لیپیدی غشا اندازه گیری این شاخص بر اساس روش Heath و Packer (۱۹۶۸) با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موجهای ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر قرائت شد.

سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز: برای سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز از روش Luck (۱۹۶۵) استفاده شد. ۲۰ میکرولیتر عصاره آنزیم با ۹۸۰ میکرولیتر از بافر فسفات حاوی آب اکسیژنه دو میلی مولار مخلوط شدند و تغییرات جذب آنها در طول موج ۲۴۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر خوانده شد.

سنجش فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز: سنجش فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز با استفاده از روش Gaspar و همکاران (۱۹۷۷) انجام شد. کمپلکس واکنشی (۲ میلی لیتر) شامل ۱ میلی لیتر بافر فسفات ۱۰۰ میلی مولار (PH=7)، ۲۵۰ میکرولیتر از EDTA ۰/۱ میلی مولار، ۱ میلی لیتر گایاکول ۵ میلی مولار، ۱ میلی لیتر پراکسید ۱۵ میلی مولار و ۵۰ میکرولیتر از محلول آنزیمی استخراج شد. واکنش با اضافه کردن محلول آنزیمی شروع شده و افزایش جذب در طول موج ۴۷۰ نانومتر به مدت یک دقیقه ثبت شد.

تجزیه و تحلیل داده ها

پس از اندازه گیری و محاسبه صفات ذکر شده نتایج بدست آمده آنالیز تجزیه واریانس و مقایسه میانگین ها به روش دانکن در سطح احتمال ۵ درصد به کمک نرم افزار SAS 9.4 انجام گرفت. برای ترسیم نمودار ها از نرم افزار Excel و برای نرمال سازی داده ها از Minitab 16 استفاده شد.

سنجش پروتئین کل

میزان پروتئین کل بر اساس روش Bradford (۱۹۷۶) با استفاده از سرم بوین آلبومین به عنوان پروتئین استاندارد اندازه گیری شد. حدود ۱ گرم از نمونه در ۵ میلی لیتر از بافر ۵۰ میلی مولار فسفات در pH برابر با ۶/۸ مخلوط شد و به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۴۴۴۷۲ سانتریفیوژ گردید. مایع رویی با ۱ میلی لیتر از نین

نتایج

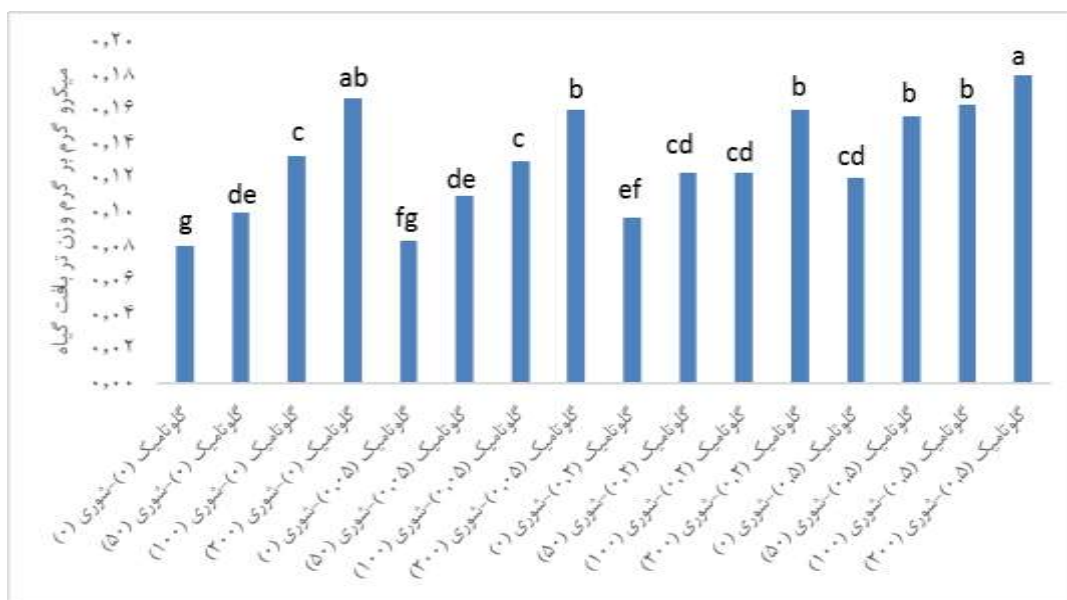
پروتئین کل در سطح ۱ درصد معنی دار شدند. در حالی که، اثرات متقابل این دو تیمار برای تمامی صفات به جز کلروفیل کل و آنزیم کاتالاز در سطح احتمال ۱ درصد اختلاف معنی دار را نشان دادند (جدول ۱).

نتایج تجزیه واریانس مربوط به صفات مورد مطالعه نشان داد که اثرات ساده شوری و گلوتامیک اسید بر تمامی صفات شامل کلروفیل کل، کاروتنوئید، گایاکول پر اکسیداز، مالون دی آلدئید، پرولین، کاتالاز و

جدول ۱: تجزیه واریانس مربوط اثرات تیمارهای شوری و گلوتامیک اسید بر صفات فیزیولوژیک گیاه استویا

میانگین مربعات							
منابع	درجه آزادی	کاروتنوئید (میکروگرم بر وزن تر گیاه)	کلروفیل کل (میکروگرم بر وزن تر گیاه)	پرولین (میکرومول بر میلی گرم وزن تر گیاه)	مالون دی آلدئید (میکرومول بر میلی گرم وزن تر گیاه)	گایاکول پر اکسیداز (میکرومول بر دقیقه بر میلی گرم وزن تر گیاه)	کاتالاز (میکرومول بر دقیقه بر میلی گرم وزن تر گیاه)
تنش شوری	۳	۰/۰۱۰۷**	۲/۱۷۷**	۶۱۳/۴۶**	۲۶/۳۴**	۰/۰۲۵**	۲۳۳۱۵/۹۷**
گلوتامیک اسید	۳	۰/۰۰۳**	۰/۳۴۴**	۲۰۰/۱۵**	۶/۴۷**	۰/۰۰۴**	۶۴۷/۳۰**
گلوتامیک اسید × تنش شوری	۹	۰/۰۰۰۲**	۰/۰۰۰۱ ^{ns}	۵/۶۴**	۲/۱۵**	۰/۰۰۰۶**	۲۸۷/۵۱ ^{ns}
خطای آزمایش	۳۲	۰/۰۰۰۰۹	۰/۰۰۰۰۴	۱/۳۷	۰/۰۳	۰/۰۰۰۰۱۷	۲۰۰/۶۴
ضریب تغییرات		۷/۵۸	۱/۶۷	۶/۲۹	۴/۴۹	۱۲/۱۵	۲۲/۰۴
۲/۷۱							

*, ** و ^{ns} به ترتیب معنی داری در سطح یک، پنج و عدم معنی داری را نشان می دهد

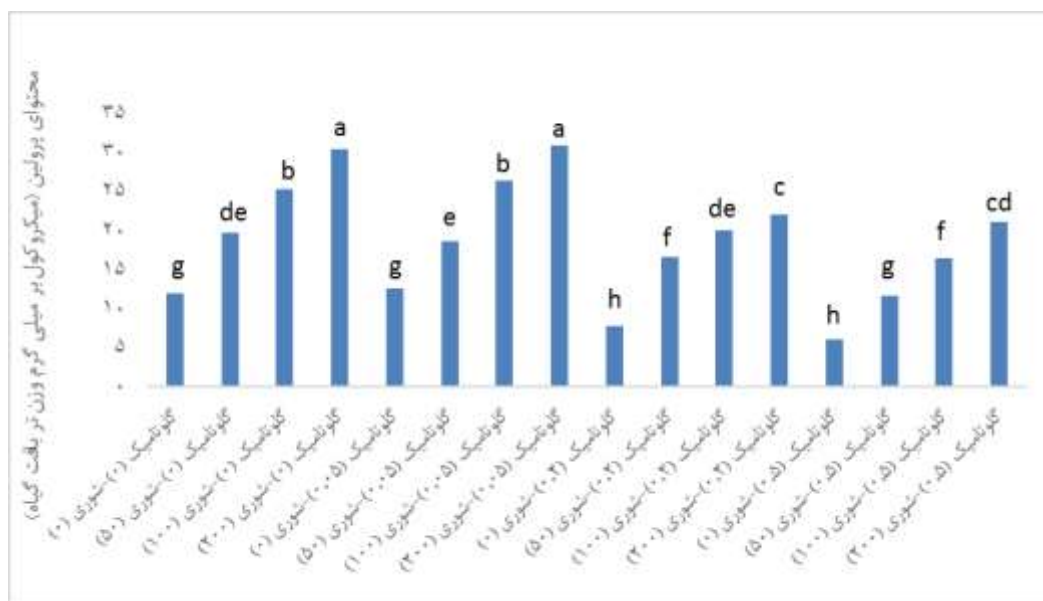


شکل ۱: مقایسه میانگین اثر تیمارهای شوری و گلوتامیک اسید بر محتوای میزان کاروتنوئیدها

با این حال با توجه به مصرف گلوتامیک اسید میزان پرولین روند کاهشی داشته و این بدان معناست که اضافه کردن گلوتامیک اسید به محیط کشت منجر به رشد بهتر گیاه شد و در نتیجه نسبت به تنش شوری بسیار مقاومتر شده است (شکل ۲). بررسی سطح گلوتامیک اسید و تجزیه و تحلیل داده ها مربوط به آن نشان داد که بیشترین میزان پرولین در سطوح ۰/۰۵ میلی گرم بر لیتر گلوتامیک اسید و ۲۰۰ میلی مولار در لیتر شوری نسبت به شاهد مشاهده شد (شکل ۲).

بررسی مقایسه میانگین تیمارهای شوری نشان داد که بیشترین میزان کاروتنوئید (۰/۱۸ میکروگرم/گرم وزن تر بافت گیاه) مربوط به تیمار ۰/۵ میلی گرم بر لیتر گلوتامیک اسید و تنش شوری ۲۰۰ میلی مولار در لیتر و کمترین میزان (۰/۰۸ میکروگرم/گرم وزن تر بافت گیاه) مربوط به تیمار شاهد بود (شکل ۱).

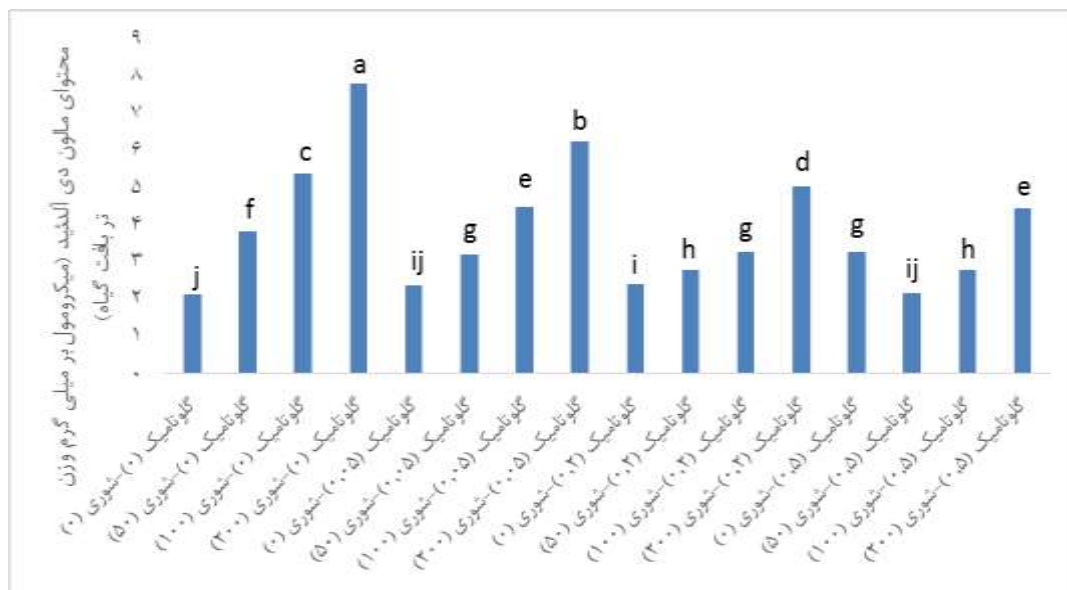
در ارتباط با پرولین، نتایج نشان داد که با افزایش سطح شوری میزان پرولین در گیاهان افزایش می یابد.



شکل ۲: مقایسه میانگین اثر تیمارهای شوری و گلوتامیک اسید بر میزان پرولین

بافت گیاه شد. به علاوه، اثر متقابل تیمارها بیانگر اثر افزایشی مالون دی آلدئید بود، به طوریکه سطح ۰/۰۵ میلی گرم گلوتامیک اسید و ۲۰۰ میلی مولار در لیتر شوری منجر به افزایش MDA به میزان ۶/۲۴ میکرومول/میلی گرم وزن تر بافت گیاه شد (شکل ۳).

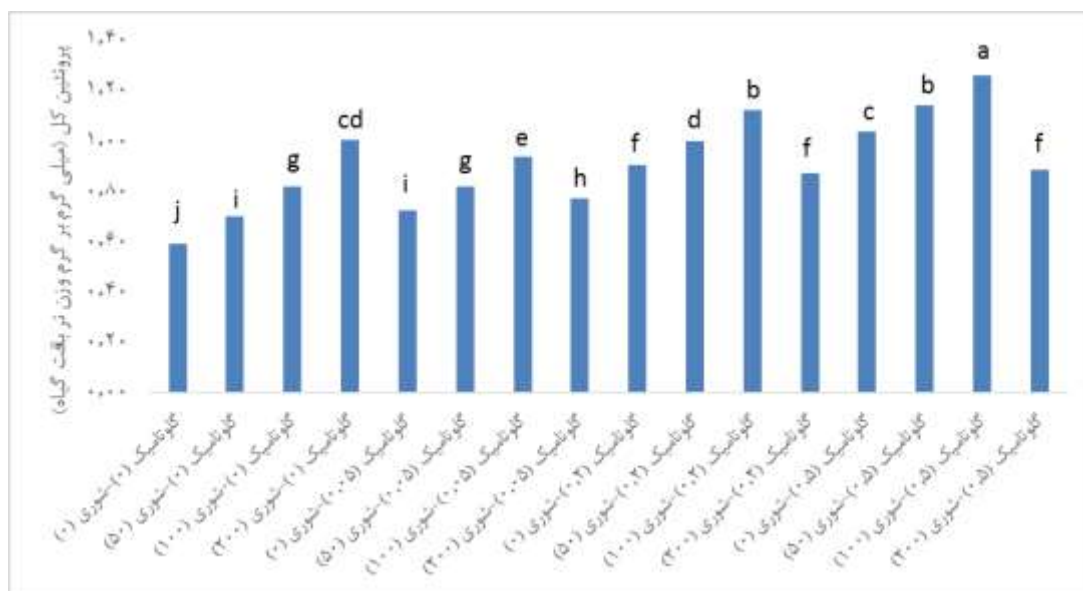
بررسی سطح MDA در هر یک از سطوح تنش شوری نشان داد که میزان این ترکیب در مواجهه با تنش شوری افزایش یافت. به طوریکه، سطح ۲۰۰ میلی مولار در لیتر شوری منجر به افزایش مالون دی آلدئید به میزان ۷/۸۱ میکرومول/میلی گرم وزن تر



شکل ۳: مقایسه میانگین اثر تیمارهای شوری و گلوتامیک اسید بر میزان مالون دی آلدئید

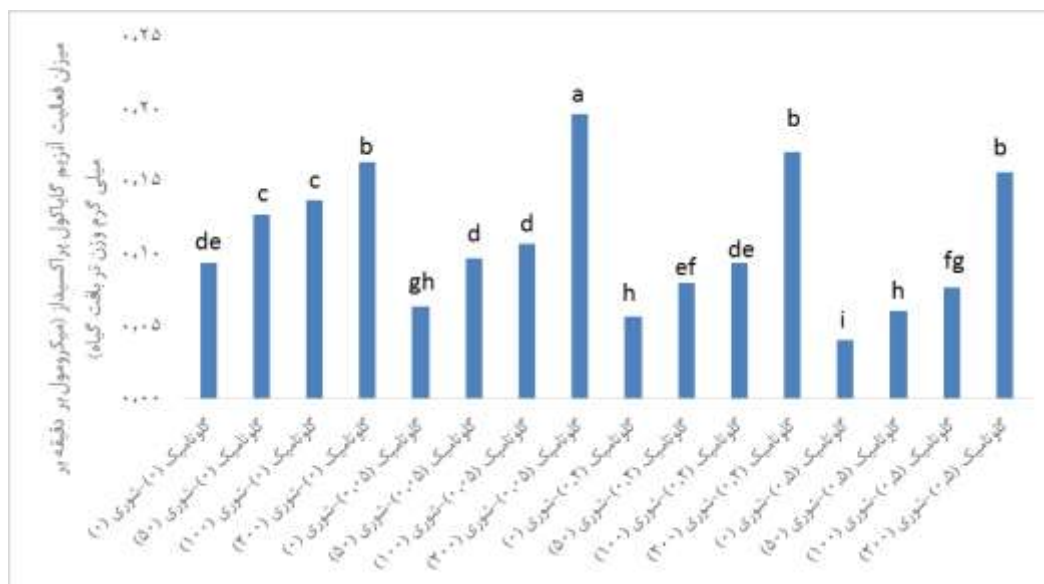
شاهد، نشان از افزایش تقریباً دو برابری میزان پروتئین های کل بود. ترکیب تیماری ۰/۵ میلی گرم بر لیتر گلوتامیک اسید و ۱۰۰ میلی مولار شوری منجر به دستیابی به بالاترین میزان پروتئین کل برابر با ۱/۲۵ میلی گرم/گرم وزن تر بافت گیاه گردید (شکل ۴).

بر اساس نتایج بدست آمده از این پژوهش، افزایش سطح تنش شوری منجر به افزایش سطح پروتئین کل شد و از سوی دیگر استفاده از گلوتامیک اسید نیز توانست افزایش سطح پروتئین های کل را دوچندان کند. به عنوان مثال افزایش سطح گلوتامیک اسید از صفر به ۰/۵ میلی گرم در شرایط گیاهان



شکل ۴: مقایسه میانگین اثر تیمارهای شوری و گلوتامیک اسید بر میزان پروتئین کل

در ارتباط با آنزیم گایاکول پراکسیداز می توان اشاره کرد که افزایش سطح فعالیت این آنزیم همسو در جهت افزایش سطح تنش شوری بود. این مورد نشان دهنده آن است که گیاه در مقابله با تنش شوری از این آنزیم استفاده کرده است. به علاوه، در سطح ۲۰۰ میلی مولار شوری و غلظت ۰/۰۵ میلی گرم از گلوتامیک اسید بیشترین میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز به میزان ۰/۱۹۶ میکروکول/دقیقه/میلی گرم وزن تر بافت گیاه در مقایسه با شاهد دیده شد (شکل ۵).



شکل ۵: مقایسه میانگین اثر تیمارهای شوری و گلوتامیک اسید بر میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز

بحث

مهمترین نقاط در متابولیت های ثانویه در مسیر سنتز کارتنوئیدها، دو آنزیم ۱-دئوکسی دی زایلوز ۵ فسفات سنتتاز (DXS) و ۱ دئوکسی دی زایلوز ۵ فسفات (DXR) در مسیر سنتز ۲-سی متیل دی اریتریول ۴ فسفات (MEP) می باشد. با برهم خوردن تعادل متابولیت های ثانویه میزان کارتنوئیدها نیز کاهش می یابد (You et al., 2020). در مطالعه Karimi و همکاران (۲۰۱۵) نشان داده شد که با افزایش سطح تنش شوری از ۲۵ به ۱۰۰، میزان کلروفیل کل و کارتنوئید ها کاهش می یابد و این موضوع در ارقام قزل اوزوم و دیزماری انگور به مراتب نسبت به دیگر ارقام بیشتر بوده است. کریمی کاهش میزان کلروفیل را ناشی از تغییر متابولسیم نیتروژن در رابطه با ساخت اسید آمینه پرولین که در تنظیم فشار اسمزی موثر است میداند.

گیاهان معمولاً در مقابله با تنش شوری دچار تنش کم آبی نیز می شوند. از این رو گیاه برای مقابله با تنش کم آبی روزنه خود را میبندد. از آنجا که بستن روزنه مساوی با عدم فتوسنتز است گیاه دچار تنش شده و برای بهبود عملکرد خود به ناچار از ذخایر ترکیبات خود استفاده میکند که یکی از این موارد کلروفیل ها هستند. گیاه با استفاده از آنزیم کلروفیلاز، کلروفیل خود را تخریب کرده و از این طریق به مقابله با تنش میپردازد. از سوی دیگر، کارتنوئید ها نیز جزء مهمی از ترکیباتی هستند که گیاه با استفاده از تخریب آنها به مقابله با تنش ها میپردازد. از آنجا که انباشت سدیم در سطح سلول منجر به نابودی متابولیت های ثانویه میشود، برهم خوردن تعادل متابولیت های ثانویه، از

نتایج پروژه حاضر با نتایج حاصل از پژوهش Neshat و همکاران (۲۰۲۲) بر روی گیاه کلزا مطابقت داشت به طوریکه افزایش سطح شوری باعث کاهش میزان کارتنوئیدها همراه بود. به علاوه، در مطالعه دیگر، کاهش سطح کارتنوئیدها در گیاه گندم تحت تنش شوری مشاهده شد (Shah et al., 2017). بررسی مطالعه Abdi (۲۰۲۲) نیز نشان داد که به موازات افزایش سطح گلوتامیک اسید میزان کلروفیل ها و کارتنوئید در گیاه قاصدک روسی تحت تنش خشکی افزایش چشمگیر و معنی داری داشت.

آنزیم گایکول پراکسیداز یکی از آنزیم های آنتی اکسیدانی کلیدی در مقابله با تنش های اکسیداتیو می باشند. بررسی ها نشان داده است که معمولا گیاه با افزایش سطح آنزیم های آنتی اکسیدانی به مقابله با این تنش میپردازد (نامنی و همکاران، ۱۴۰۰). مطالعات Rasouli (۲۰۱۵) بر روی گیاه استویا نشان داد که افزایش سطح تنش شوری از ۵۰ به ۳۰۰ میلی مولار سبب افزایش آنزیم کاتالاز در این گیاه شد که این نتایج با نتایج مطالعه حاضر همسو بود. مطالعه Zeng و همکاران (۲۰۱۳) بر روی گیاه استویا نشان داد که اعمال تنش شوری بر گیاه استویا منجر به افزایش سطح آنزیم کاتالاز شد. در بررسی اثر گلوتامیک اسید و تنش سرما بر گیاه پسته نشان داده شد که با افزایش سطح گلوتامیک اسید بر گیاهان سرما دیده، میزان آنزیم گایکول پراکسیداز در مقایسه با تیمار شاهد به طور معنی داری افزایش یافته که این مهم نشان دهنده افزایش سطح این آنزیم به واسطه گلوتامیک اسید میباشد و به دنبال آن افزایش سطح اسید های آمینه کل گیاه عنوان شده است (Goharizi et al., 2021).

معمولا گیاهان در مواجهه با تنش های زیستی و غیرزیستی با استفاده از روش های گوناگون و موثر نظیر افزایش سطح ترکیبات آنتی اکسیدانی به مقابله با

تنش های میپردازند. یکی از مهمترین گروه ترکیبات آنتی اکسیدانی، آنزیم های آنتی اکسیدانی هستند که همگی ساختار پروتئینی دارند. از این رو مطالعات نشان داده است که گیاه با افزایش سطح پروتئین کل میتواند به مقابله با اثرات مخرب تنش ها بپردازد. در تحقیقی انجام شده توسط (Iqbal et al., 2021) نشان داده شد که اعمال تیمار پاششی گلوتامیک اسید بر گیاه خیار تحت تنش شوری منجر به کاهش سطح پروتئین کل شد که نتایج این تحقیق کاملا همسو با نتایج مربوط به داده های پروژه حاضر بود. همچنین در مطالعه Helali (۲۰۲۲) نشان داده شد که اعمال تنش شوری و گلوتامیک اسید منجر به افزایش رشد پروتئین کل در گیاه رزماری شد، به طوری که با اعمال گلوتامیک اسید به میزان یک میلی گرم بر لیتر اثر تنش شوری کاهش یافت.

امروزه پرولین به عنوان یک ترکیب پایدار کننده ساختار سلولی و محافظت کننده اسمزی شناخته شده است که قادر می باشد تا حدودی به مقابله با گونه های اکسیژن فعال (Reactive oxygen species) یا ROS ها بپردازد. از سوی دیگر به عنوان یک ترکیب و منبع قوی از کربن و نیتروژن شناخته شده و با توجه به موارد ذکر شده به عنوان یکی از مکانیسم های دفاعی گیاه در مقابله با خسارات ناشی از تنش از آن یاد می شود. در مطالعه (Iqbal et al., 2021) نشان داده شد که اعمال تیمار پاششی گلوتامیک اسید بر گیاه خیار تحت تنش شوری منجر به کاهش سطح پرولین شده است که نتایج این تحقیق کاملا همسو با نتایج مربوط به داده های پروژه حاضر بود. در آن مطالعه علت این امر را ناشی از کمتر شدن اثر میزان استرس وارد شده بر گیاه میدانند. همچنین در تحقیق دیگر توسط (Franzoni et al., 2022) نشان داده شد که با اعمال تنش شوری و گلوتامیک اسید بر گیاه کاهو میزان پرولین با افزایش سطح تنش شوری

افزایش و با افزایش سطح گلوتامیک اسید کاهش یافت که با نتایج حاصل از این پژوهش حاضر همسو بود. علاوه کاربرد تیمار گلوتامیک اسید نشان از تاثیر بسیار زیاد آن بر صفات مختلف فیزیولوژیکی به صورت افزایش پرولین، افزایش فعالیت گایاکول پراکسیداز در مقابله با تنش شوری داشت.

نتیجه گیری نهایی

بررسی داده ها نشان داد که استویا نسبت به تنش شوری نسبتاً حساس بوده و تحت تیمارهای تنش شوری ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی مولار از بین می رود. همراه با اعمال تیمار تنش شوری، اعمال تیمار گلوتامیک اسید بخصوص در غلظت ۰/۵ میلی گرم بر لیتر، توانست به طور کامل اثر تنش شوری را خنثی کند. به

تشکر و قدردانی

از همکاری صمیمانه و حمایت ارزشمند معاونت پژوهش و فناوری موسسه آموزش عالی غیرانتفاعی سنا ساری در اجرا و اتمام این پژوهش تشکر و قدردانی می گردد.

References

- Abdi, A. (2022). Assessment of drought stress on morphologic traits and latex of Russian dandelion. Master thesis, Tehran University.
- Aghighi Shahverdi, M., Omid, H. and Tabatabai, G. (2017). The effect of foliar Fe, Br and Selenium on morphologic traits of root and photosynthetic pigments of stevia under salt stress. *Journal of Plant Environmental Physiology*. 12(3): 1-18.
- Arnon, D. I. (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology*. 24(1): 1-15.
- Ashraf, M. P. J. C. and Harris, P. J. C. (2004). Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. *Plant Science*. 166(1): 3-16.
- Bates, L.S., Waldren, R.A. and Teare, I. D. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*. 39: 205-207.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248-254
- Corwin, D. L. (2021). Climate change impacts on soil salinity in agricultural areas. *European Journal of Soil Science*. 72(2): 842-862.
- Franzoni, G., Cocetta, G., Trivellini, A., Garabello, C., Contartese, V. and Ferrante, A. (2022). Effect of exogenous application of salt stress and glutamic acid on lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Scientia Horticulturae*. 299: 111027.
- Gaspar, T., Wyndaele, R., Bouchet, M., and Ceulemans, E. (1977). Peroxidase and α - amylase activities in relation to germination of dormant and nondormant wheat. *Physiologia plantarum*. 40(1): 11-14.
- Gerami, M., Mohammadian, A. and Akbarpour, V. (2019). The effect of putrescine and salicylic acid on physiological characteristics and antioxidant in *Stevia Rebaudiana* B. under salinity stress. *Journal of Crop Breeding*. 11 (29): 40-54
- Goharrizi, K. J., Meru, G., Kermani, S. G., Heidarinezhad, A. and Salehi, F. (2021). Short-term cold stress affects physiological and biochemical traits of pistachio rootstocks. *South African Journal of Botany*. 141: 90-98.
- Habib Khodai, R. (2014). The effect of salt stress and glutamic acid on Khoshnav grape cultivar and evaluation the gene expression involved in resistant to salt stress. Master thesis, Tehran University.
- Hasegawa, P. M., Bressan, R. A., Zhu, J. K. and Bohnert, H. J. (2000). Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual Review of Plant Biology*. 51(1): 463-499.

- Heath, R. L., and Packer, L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 125: 189-198.
- Helali, S. (2022). Assessment of glutamic acid on some morphological and biochemical properties of *Rosmarinus officinalis* under salt stress. Master thesis. Tehran University
- Iqbal, P., Ghani, M.A., Ali, B., Shahid, M., Iqbal, Q., Ziaf, K. and Ahmad, J. (2021). Exogenous application of glutamic acid promotes cucumber (*Cucumis sativus* L.) growth under salt stress conditions. *Emirates Journal of Food and Agriculture*. 407-416.
- Karimi, M., Ahmadi, A., Hashemi, J., Abbasi, A., Tavarini, S., Guglielminetti, L., and Angelini, L. G. (2015). The effect of soil moisture depletion on stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) grown in greenhouse conditions: Growth, steviol glycosides content, soluble sugars and total antioxidant capacity. *Scientia Horticulturae*. 183: 93-99.
- Liu, J., Fu, C., Li, G., Khan, M. N. and Wu, H. (2021). ROS homeostasis and plant salt tolerance: plant nanobiotechnology updates. *Sustainability*. 13(6): 3552.
- Lück, H. (1965). Catalase. In *Methods of enzymatic analysis* (pp. 885-894). Academic press.
- Neshat, M., Chavan, D. D., Shirmohammadi, E., Pourbabaee, A. A., Zamani, F., and Torkaman, Z. (2023). Canola inoculation with *Pseudomonas baetica* R27N3 under salt stress condition improved antioxidant defense and increased expression of salt resistance elements. *Industrial Crops and Products*. 206: 117648.
- Rasouli Alamouti, M. (2015). The evaluation of salt stress on phytochemical yield and growth parameters of stevia under hydroponic condition. Master thesis, Payam Nor University.
- Shah, S.H., Houborg, R. and McCabe, M.F. (2017). Response of chlorophyll, carotenoid and SPAD-502 measurement to salinity and nutrient stress in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Agronomy*. 7(3): 61-72.
- Singh, S. D. and Rao, G. P. (2005). Stevia: The herbal sugar of 21st century. *Sugar Tech*. 7(1): 17-24.
- Sun, Y., Zhou, Q., Xie, X. and Liu, R. (2010). Spatial, sources and risk assessment of heavy metal contamination of urban soils in typical regions of Shenyang, China. *Journal of Hazardous Materials*. 174(1-3): 455-462.
- Yan, N., Marschner, P., Cao, W., Zuo, C. and Qin, W. (2015). Influence of salinity and water content on soil microorganisms. *International Soil and Water Conservation Research*. 3(4): 316-323.
- You, M. K., Lee, Y. J., Kim, J. K., Baek, S. A., Jeon, Y. A., Lim, S. H., and Ha, S. H. (2020). The organ-specific differential roles of rice DXS and DXR, the first two enzymes of the MEP pathway, in carotenoid metabolism in *Oryza sativa* leaves and seeds. *BMC plant Biology*. 20: 1-16.
- Zeng, J., Chen, A., Li, D., Yi, B., and Wu, W. (2013). Effects of salt stress on the growth, physiological responses, and glycoside contents of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(24):5720-5726.