

مقدمه

۱-۱ گیاه استویا

گیاه استویا با نام علمی *Stevia rebaudiana* Bertoni به گیاه شیرین معروف می‌باشد. این گیاه چند ساله علفی حساس به سرما است که پیدایش آن بین ۲۲ تا ۲۴ درجه جنوبی و ۵۳ تا ۵۶ درجه غربی در پاراگوئه و برزیل است (Kinghorn and Soejarto 2002). این گیاه به طور طبیعی در منطقه آمازبای (یک منطقه باریک بین برزیل و پاراگوئه) رشد می‌کند و محصولات آن به طور فزاینده ای برای حدود یک ربع قرن در بسیاری از غذاها و نوشیدنی های در بسیاری از کشورها در دسترس است. گیاه *Stevia rebaudiana* Bertoni به مدت بیش از یک قرن به عنوان یک شیرین کننده طبیعی مصرف می شود و هیچ مدرکی دال بر اثرات جانبی سوء بر سلامت انسان به دلیل مصرف عصاره این گیاه ارائه نشده است (Geuns 2003). رشد این گیاه به دمای متوسط بین ۱۵ تا ۳۸ درجه سانتیگراد و رطوبت نسبی ۸۰٪ نیاز دارد (Ibrahim et al. 2008). گیاه استویا متعلق به خانواده Asteraceae و طایفه Eupatorieae می‌باشد. این طایفه دارای پنج جنس می‌باشد که شامل Ageratin، *Stevia*، *Mickania*، *Koanophyllon*، *Chromolaena* است. جنس استویا متشکل از ۱۵۰ تا ۳۰۰ گونه از گیاهان بوته‌ای و درختچه‌ای می‌باشد. ارتفاع گیاه استویا بسته به شرایط اقلیمی ۸۰-۶۰ سانتیمتر متغیر بوده و طول عمرش ۵-۳ سال می‌باشد (Uddin et al. 2006).

گیاه دارویی *Stevia rebaudiana* Bertonی دارای شیرین کننده طبیعی استویول گلیکوزیدها می باشد. خشکی یکی از مهمترین تنش های محیطی است که تولید محصول را در قسمت های مختلف جهان کاهش می دهد. در طول قرن بیستم، *Stevia rebaudiana* Bertonی و ترکیبات شیرین کننده آن ثبت اختراع شدند. استویوزید (فراوان ترین جزء شیرین کننده برگ) و ent-kaurene diterpene diglycoside برای اولین بار در دهه اول قرن بیستم به طور ناخالص جداسازی شدند. در دهه ۱۹۷۰ گروه تحقیقاتی پروفیسور Osamu Tanaka در دانشگاه هیروشیما در ژاپن دومین شیرین کننده اصلی تحت عنوان ریبودیوزید A را استخراج نمودند (Kohda et al. 1976). پس از آن، شش گلیکوزید شیرین با غلظت های کمتر با عناوین استویول بیوزید، ریبودیوزید B-E و دولوکوزید A را استخراج کردند (Yamasaki et al. 1976).

۱-۱-۱ مشخصات گیاه شناسی

استویا یک گیاه خود ناسازگار، روز کوتاه، علفی و چند ساله با سیستم ریشه ای گسترده، ساقه ترد و شکننده کوچک به طول ۳۰-۵۰ سانتیمتر که سالیانه شاخه های ثانویه تولید می کنند (Shock 1982). دارای برگ های بیضوی، دندانه ای، نوک تیز و متقابل به ندرت متناوب به طول ۲-۳ سانتیمتر می باشند. کرک ها در واحد سطح برگ دارای دو اندازه متفاوتند، یکی بزرگ ۴-۵ میکرون و دیگری کوچک به اندازه ۲/۵ میکرون است. گل های این گیاه پنج تایی، کوچک و سفید رنگ بوده و دارای دهانه بنفش کم رنگ هستند. گل ها کامل، کوچک و سفید رنگ هستند. در گل آذین های کوچک تعداد ۲ تا ۶ گل به وجود می آید. گل آذین ها در خوشه های باز آرایش یافته اند و هر گیاه بیشتر از یک ماه گل هایش را حفظ می کند و گرده های این گل ها می توانند کاملاً آلرژی زا باشند. ریشه استویا فیبری، رشته مانند و چند ساله است. ریشه ها عمیق نیستند و در سطح زمین پخش می شوند و تنها بخشی است که دارای مواد شیرین کننده نیست. ریشه های نرم اطراف خاک سطحی و ریشه های ضخیم تر در مناطق عمیق تر جمع شده اند. استویا به خوبی در طیف گسترده ای از خاک با توجه به تامین رطوبت و زهکشی کافی رشد می کند. ارتفاع گیاه حدود ۱ متر است و عمر آن حداکثر ۵ سال می باشد. کشت این گیاه در مناطق نیمه گرمسیری از جمله آمریکای جنوبی است. در پاییز و زمستان قسمت های هوایی گیاه از بین می رود و بخش زیر زمینی زیر خاک باقی می ماند و در بهار سال آینده رشد کرده و محصول

می‌دهد. هم اکنون این گیاه در پاراگوئه، برزیل، مالزی، چین، تایوان، کره جنوبی، کشت داده می‌شود (Shock 1982, Sivaram and Mukundan 2003).

بیوسنتز استویول گلیکوزیدها

مولکول‌های استویول گلیکوزیدها دارای اسکلت تتراسیکلیک ترپنی هستند دارای مسیر بیوسنتزی مشترکی با جیبرلین هستند (Brandle and Telmer 2007). گیاهان دارای دو مسیر مجزا برای بیوسنتز ایزوپنتیل پیروفسفات^۱ (IPP) (پیش ساز ترکیبات ایزوپرنوئیدی) می‌باشند که در سیتوپلاسم از طریق مسیر موالونات^۲ (MVA) و در کلروپلاست از طریق مسیر غیر موالونات^۳ (MEP) سنتز می‌شوند. در نقطه پایان مسیر IPP تولید می‌شود که سپس به دی متیل آلیل پیروفسفات^۴ (DMAPP) و متوالیا به ژرانیل ژرانیل پیروفسفات^۵ (GGPP) تبدیل می‌شود و سایر دی ترپن‌ها از GGPP مشتق می‌شوند (Bohlmann et al. 1998). در مسیر بیوسنتزی DMAPP، MEP توسط ژرانیل ژرانیل پیروفسفات سنتتاز^۶ (GGPPS) در کلروپلاست به ژرانیل ژرانیل پیروفسفات تبدیل می‌شود. ژرانیل ژرانیل پیروفسفات توسط آنزیم کوپالیل پیروفسفات سنتتاز^۷ (*ent-CPS*) به انت-کوپالیل پیروفسفات^۸ (*ent-CPP*) تبدیل شده و سپس توسط انت-کائورن سنتتاز^۹ (*ent-KS*) به انت-کائورن^{۱۰} تبدیل شده و سپس انت-کائورن به شبکه آندوپلاسمی منتقل می‌شود. انت-کائورن توسط انت-کائورن اکسیداز^{۱۱} (*ent-KO*) در سه مرحله متوالی به ترتیب به انت-کائورنول^{۱۲}، انت-کائورنال^{۱۳} و نهایتاً به انت-کائورنوئیک اسید^{۱۴} (*ent-KA*) اکسید می‌شود. کائورن‌ها جزء گروه دی ترپن‌ها

¹ Isopentenyl pyrophosphate

² Mevalonate

³ Non-mevalonate pathway

⁴ Dimethylallyl pyrophosphate

⁵ Geranylgeranyl pyrophosphate

⁶ Geranyl geranyl pyrophosphate synthase

⁷ Ent-copalyl pyrophosphate synthase

⁸ Ent-copalyl pyrophosphate

⁹ Ent-kaurene

¹⁰ Ent-kaurene oxidase 0

¹¹ Ent-kaurenol 1

¹² Ent-kaurenal 2

¹³ Ent-kaurenoic acid 3

محسوب می‌شوند که دارای اسکلت تتراسیکلیک بوده و دارای خواص ضد سرطانی، ضد ایدز و فعالیت های ضد میکروبی می‌باشند (Ghisalberti 1997).

مسیر تولید جیبرلیک اسید و استویول تا مرحله تولید انت-کائورنوئیک اسید مشترک است و از آن پس مسیر منشعب شده و آنزیم‌های متفاوتی از انت-کائورنوئیک اسید به عنوان سوسترا استفاده نموده و جیبرلیک اسید و استویول تولید می‌نمایند. در مسیر بیوسنتزی استویول گلیکوزیدها، انت-کائورنوئیک اسید توسط انت-کائورنوئیک اسید هیدروکسیلاز^۴ (*ent-KAH*) به استویول^۵ (SV) تبدیل می‌شود و استویول به سیتوپلاسم منتقل می‌گردد (Kim et al., 1996). آنزیم‌های UDP-گلیکوزیل ترانسفراز^۶ (UGTs) در بیوسنتز استویول گلیکوزیدها دخیل می‌باشند. Richman و همکاران (۲۰۰۵) ژن‌های *UGT76G1*, *UGT74G1* و *UGT85C2* را کلون نمودند. استویول توسط *UGT85C2* به استویول مونوزاید^۷ و متوالیا توسط یک UGT ناشناخته به استویول بیوزید^۸ گلیکوزیده می‌شود. استویول بیوزید توسط *UGT74G1* به استویوزید تبدیل شده و نهایتاً توسط *UGT76G1* به ریبودیوزید A گلیکوزیده می‌شود (Humphrey et al. 2006). در مسیر بیوسنتز جیبرلیک اسید، انت-کائورنوئیک اسید توسط آنزیم انت-کائورنوئیک اسید اکسیداز به طور متوالی به انت-هیدروکسی کائورنوئیک اسید، *GA12-aldehyde* و *GA12* تبدیل می‌شود. سپس انواع مختلف جیبرلین‌ها از *GA12* در سیتوپلاسم حاصل می‌شوند (Humphrey et al. 2006).

1-2 تنش خشکی

خشکی یکی از مهمترین تنش های محیطی است و از بین عوامل محیطی تنش زا، خشکی دومین عامل اصلی کاهش عملکرد گیاهان بعد از عوامل بیماری‌زا می باشد. این کاهش در نتیجه تاخیر یا عدم استقرار گیاه، تضعیف یا از بین رفتن گیاهان استقرار یافته و تغییرات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی در سوخت و ساز گیاهان به وجود می‌آید (Chai et al. 2017). پاسخ گیاهان به تنش خشکی متفاوت است و خصوصیات مورفولوژیک و فیزیولوژیک زیادی در مقاومت به خشکی مؤثر هستند. خشکی موجب

¹ Ent-kaurenoic acid hydroxylase

¹ Steviol 5

¹ UDP-dependent glycosyltransferases

¹ Steviolmonoside 7

¹ Steviolbioside 8

کاهش انعطاف‌پذیری دیواره سلولهای در حال رشد برگ و ساقه و در نتیجه کاهش رشد اندام می‌شود. یکی از اثرات تنش خشکی کاهش میزان سطح برگ است. علاوه بر اینکه سطح برگ در رابطه با فتوسنتز اهمیت دارد، بر آب قابل دسترس گیاه اثر می‌گذارد. کاهش سطح برگ یک واکنش ابتدایی به کمبود آب است که موجب کاهش شدت تعرق و در نتیجه حفظ آب گیاه می‌شود و با کاهش سطح برگ میزان وزن گیاه کاهش می‌یابد (Anjum et al. 2011).

تنش خشکی با کاهش محتوی آب گیاه سبب بسته شدن روزنه‌ها و متعاقباً کاهش میزان فتوسنتز و کاهش میزان رشد گیاه می‌گردد (Anjum et al. 2011). گیاهان در تنش‌های محیطی از قبیل خشکی، شوری، دما و غیره با ذخیره مواد تنظیم‌کننده اسمزی با این تنش‌ها مقابله می‌کنند. مواد تنظیم‌کننده اسمزی بیشتر شامل اسیدهای آمینه، قندها برخی یون‌های معدنی، هورمون‌ها و پروتئین‌ها هستند (Liu et al. 2018). گیاهان در شرایط محیطی نامساعد از قبیل افزایش دما، شدت بالای نور، تنش شوری و خشکی و آلودگی هوا، تولید ROS از قبیل اکسیژن یکتایی (O° ، سوپراکسید) ($O_2^{\circ-}$ ، هیدروژن پراکسید (H_2O_2) و رادیکال‌های هیدروکسیل (OH°) را افزایش می‌دهند. مکانیسم تولید ROS در اثر تنش‌های غیرزیستی کاملاً مشخص نیست. تشکیل ROS با احیاء یونی والنت O_2 آغاز می‌شود. انتقال الکترون‌ها (یک، دو یا سه الکترون) به‌ترتیب منجر به تولید رادیکال‌های $O_2^{\circ-}$ ، H_2O_2 و OH° می‌شود. به‌طور خلاصه خشکی سبب کاهش آب و بسته شدن روزنه‌ها توسط ABA در برگ‌ها، دست‌یابی محدود به CO_2 ، احیاء زیاد زنجیره انتقال الکترون و در نهایت تولید ROS می‌شود. این شرایط تنش فتواکسیداتیو نامیده می‌شود که در پاسخ‌های گیاه به سایر تنش‌ها مانند پاسخ به تنش خشکی، دما و تنش نوری نیز مشاهده می‌شود.

تجمع ROS به‌دلیل این‌که سبب آسیب اکسیداتیو به لیپیدهای غشاء، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک می‌شوند برای سلول‌ها بسیار مضر می‌باشند (Sairam and Tyagi 2004). رادیکال سوپراکسید معمولاً در کلروپلاست‌ها و میتوکندری‌ها و مقداری هم در میکروبادی‌ها تولید می‌شود. تصفیه $O_2^{\circ-}$ با سوپراکسید دیسموتاز (SOD) سبب تولید H_2O_2 شده که توسط آسکوربات پراکسیداز (APX) و کاتالاز (CAT) تجزیه می‌شوند (Asada 1992). تولید رادیکال OH° می‌تواند کلروفیل، پروتئین، DNA، لیپید و ماکرومولکول‌های مهم دیگر را تخریب کند بنابراین به‌طور جدی بر متابولیسم سلولی و در نهایت رشد و محصول گیاه تأثیر می‌گذارد (Imlay and Linn 1988).

راه‌های مختلفی برای کنترل ROS در گیاهان وجود دارد و به عنوان مثال می‌توان به سنتز آنتی اکسیدانت‌های غیر آنزیمی فنل‌ها و آلفاتوکوفرول اشاره نمود. Kim و همکاران (۲۰۱۱) گزارش نمودند که بخشی از خاصیت آنتی‌اکسیدانی در عصاره گیاه *Stevia rebaudiana* مربوط به تجمع ترکیبات فنلی در این گیاه است (Kim et al. 2011). یکی از ویژگی‌های مهم ترکیبات فنلی خاصیت آنتی‌اکسیدانی است که با گروه‌های هیدروکسیلی در ساختار مولکولی آنها در ارتباط است. آلفاتوکوفرول نیز در جذب و خنثی کردن رادیکال‌های آزاد نقش مهمی در گیاهان ایفا می‌کند (Wang and Quinn 2000).

۱-۲-۱ تنظیم کننده رشد پاکلوبوترازول

امروزه بازدارنده‌های سنتز هورمون جیبرلین به طور وسیعی جهت مبارزه با تنش‌های محیطی کاربرد دارند (Fletcher et al. 2000). پاکلوبوترازول با دخالت در مسیر بیوسنتز اسید جیبرلیک در مرحله اکسیداسیون انت-کائورن به انت-کائورونیک اسید از تولید این هورمون گیاهی ممانعت می‌کنند. پاکلوبوترازول یک نمونه بسیار فعال و پرباربرد از تریازول‌ها است که به عنوان مقاوم کننده گیاه در برابر تنش‌های محیطی نیز شناخته شده است (Sankar et al. 2007). بر اساس گزارشات تیمار پاکلوبوترازول سبب افزایش مقاومت گیاهان *Arachis hypogaea* (Sankar et al. 2007) و *Stevia rebaudiana* (Hajihashemi and Ehsanpour 2014) و غیره در برابر تنش خشکی شده است. پاکلوبوترازول با افزایش آنتی اکسیدانت‌های آنزیمی و غیر آنزیمی و تجمع مواد تنظیم کننده اسمزی سبب افزایش مقاومت گیاهان به شرایط تنش می‌شود (Sankar et al. 2007). همچنین گزارشاتی مبنی بر افزایش مقاومت گیاهان به تنش در اثر تیمار جیبرلین در گیاهان وجود دارد (Roghayyeh et al. 2014, Siddiqui et al. 2008). تیمار جیبرلین با افزایش میزان رشد، آنتی اکسیدان‌ها و کاهش اثرات مضر تنش خشکی بر روی لیپیدهای غشاء سبب افزایش مقاومت گیاهان به تنش می‌شود (Siddiqui et al. 2008).

پاکلوبوترازول طول ساقه را کاهش می‌دهد که در نتیجه ی کاهش طول میانگره‌ها می‌باشد و منجر به کاهش وزن ساقه می‌شود. سطح برگ و وزن خشک برگ نیز توسط پاکلوبوترازول کاهش می‌یابد درحالی‌که باعث افزایش ضخامت برگ می‌شود. این ترکیب می‌تواند طول دمبرگ در گیاه را کاهش دهد. با توجه به کاهش سطح برگ گیاهان تحت تیمار پاکلوبوترازول، پتانسیل

آب گیاهان تحت تیمار به طور کلی بالاتر از گیاهان شاهد است. پیشنهاد شده است که گیاهان تحت تیمار مقاومت بالاتری در برابر شرایط خشکسالی داشته باشند (FLETCHER ET AL. 2000)

اثر تنش خشکی بر کالوس استویا

کشت بافت و سلول گیاهی یک ابزار مفید برای مطالعه مکانیسم‌های تحمل تنش تحت شرایط درون شیشه ای است. کشت کالوس برای بررسی تحمل تنش در یک محیط مشخص با شرایط کنترل شده، در یک دوره زمانی کوتاه موثر هستند. تاکنون مطالعات زیادی بر روی تنظیم کننده‌های رشد جهت رفع مشکل تنش‌های محیطی صورت گرفته است. تنظیم کننده‌های رشد سبب القای مکانیسم‌هایی می‌شوند که گیاهان حساس بتوانند الگوهای رفتاری گیاهان مقاوم را جهت رفع تنش‌های محیطی در پیش گیرند. امروزه بازدارنده‌های سنتز هورمون جیبرلین مانند پاکلوبوترازول به‌طور وسیعی در مقابله با تنش‌های غیر زیستی کاربرد دارند (Jaleel et al. 2007). همچنین از آنجاییکه یکی از پاسخ‌های گیاه در مواجه شدن با تنش خشکی کاهش رشد و تولید بیوماس است (Anjum et al. 2011). در این تحقیق به بررسی اثر هورمون رشد جیبرلین بر کاهش اثرات منفی تنش خشکی بر تولید بافت کالوس گیاه استویا پرداخته شد. با توجه به اثر آنتاگونیستی پاکلوبوترازول و جیبرلین، بررسی پاسخ‌های گیاه استویا به تنش خشکی در حضور پاکلوبوترازول و یا جیبرلین امکان شناسایی صفات مطلوب و زمینه انتقال ژن‌های مفید به گیاه جهت افزایش مقاومت به تنش خشکی فراهم می‌شود. لذا در این مطالعه به بررسی پاسخ‌های کالوس‌های حاصل از برگ گیاه استویا به تنش خشکی و برهم کنش آن با تیمارهای پاکلوبوترازول و جیبرلیک اسید پرداخته شد.

۱-۴ اهدافی که در این تحقیق دنبال می‌شوند عبارتند از:

استویا به دلیل دارا بودن ویژگی‌های مطلوب بسیار زیاد به عنوان یک گیاه با پتانسیل‌های ارزشمند اقتصادی و درمانی شناخته شده است. کشت گسترده این گونه دارویی مهم در سراسر جهان در حال افزایش است، با این حال تنها در چند پژوهش به بررسی رفتار کالوس این گونه دارویی با ارزش در شرایط سخت و تنش‌زایی محیطی پرداخته شده است. پژوهش‌های انجام شده در این زمینه به مطالعه‌ی آسیب و تغییر در رفتار فیزیولوژیک کالوس استویا ناشی از تنش خشکی پرداخته و مورد ارزیابی قرار

گرفته شده است. تنظیم کننده های رشد سبب القای مکانیسم هایی می شوند که گیاهان حساس بتوانند الگوهای رفتاری گیاهان مقاوم را جهت رفع تنش های محیطی در پیش گیرند. تنش خشکی معرف یکی از جدی ترین عوامل محدود کننده رشد گیاه است. اهدافی که در این مطالعه مد نظر می باشد عبارتند از:

- ۱- بررسی دامنه تحمل به خشکی کالوس گیاه *Stevia*
- ۲- تعیین بهترین غلظت پاکلوبوترازول بر روی تحمل به خشکی گیاه *Stevia*
- ۳- بررسی اثر برهم کنش جیبرلین، پاکلوبوترازول و پلی اتیلن گلیکول بر برخی از پارامترهای

فیزیولوژیکی گیاه *Stevia*

با بررسی پاسخ های گیاه *Stevia* به تنش خشکی در حضور جیبرلین و پاکلوبوترازول امکان شناسایی صفات مطلوب و زمینه انتقال ژنهای مفید به گیاه جهت افزایش مقاومت به تنش خشکی فراهم می شود.

مواد و روش ها

تولید کالوس و تیمار خشکی

به منظور تولید کالوس، جداکشت‌هایی از برگ گیاه استویا بدست آمده از United States, Prairie Oak Publishing, 221 South Saunders Street, Marville MO 64468 تهیه شدند و در محیط کشت MS (Murashige and Skoog 1962) حاوی ۲ میلی گرم بر لیتر ۲،۴-D و ۲ میلی گرم بر لیتر کینتین قرار گرفتند. پس از ۴ هفته کالوس ایجاد شد. کالوسهای حاصل هر دو هفته یکبار در محیط تولید کالوس واکشت شدند. پس از سه مرحله واکشت، کالوس‌هایی با وزن یک گرم تهیه شدند و تحت تیمارهای مختلف پلی اتیلن گلیکول (صفر و ۴٪ وزنی)، پاکلوبوترازول (صفر و ۲ میلی گرم بر لیتر) و جیبرلین (صفر و ۲ میلی گرم بر لیتر) قرار گرفتند و در اتاق کشت نگهداری شدند.

اندازه گیری شاخص‌های رشد

پس از گذشت یک ماه، کالوس‌هایی که در ابتدا وزن شده بودند مجدداً توزین شدند و با کم کردن وزن اولیه، تغییرات وزن تر کالوس‌ها در اثر تیمار اندازه گیری گردید. به منظور بررسی تغییرات وزن خشک، تعداد شش کالوس قبل از تیمار برداشت شده و در آون با دمای ۷۰ درجه سانتیگراد به مدت ۷۲ ساعت خشک شدند. سپس از آون خارج شده و توزین شده اند و

وزن خشک اولیه کالوس‌ها حاصل گردید. پس از تیمار نیز وزن خشک کالوس‌ها اندازه گیری گردید و تغییرات وزن خشک آنها با تفاضل وزن خشک ثانویه از وزن خشک اولیه حاصل گردید.

میزان رشد نسبی کالوس (RGR) طبق فرمول زیر محاسبه گردید (Lokhande et al. 2011):

$$\text{RGR}\% = (W2 - W1) / W1 * 100 \quad (\text{فرمول ۱})$$

$\text{RGR} =$ میزان رشد نسبی کالوس

$W1$: وزن اولیه کالوس قبل از تیمار

$W2$: وزن ثانویه کالوس پس از تیمار

میزان محتوی آب نسبی (RWC) کالوس طبق فرمول شماره ۲ محاسبه گردید:

$$\text{RWC}\% = (FW - DW) / FW * 100 \quad (\text{فرمول ۲})$$

$\text{RWC} =$ محتوی آب نسبی

FW : وزن تر کالوس

DW : وزن خشک کالوس

کربوهیدرات محلول

در ابتدا به منظور استخراج کربوهیدرات‌ها، ۰/۰۱ گرم از بافت خشک توزین شد و با ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر گرم در هاون

سائیده شد و با کمک کاغذ واتمن شماره ۱ صاف شد. برای اندازه‌گیری هیدرات‌های کربن محلول، از روش فنل-اسید سولفوریک

استفاده شد. به این صورت که ۲ میلی‌لیتر از عصاره گیاهی استخراج شده را با ۵۰ میکرولیتر فنل ۸۰٪ وزنی (حل شده در آب مقطر)

مخلوط کرده و سپس ۵ میلی لیتر اسید سولفوریک غلیظ به آن اضافه شد. این مخلوط به مدت ۱۰ دقیقه در محیط نگهداری شده و پس از آن به مدت ۲۰-۱۰ دقیقه در حمام آب گرم ۳۰-۲۵ درجه سانتیگراد قرار داده شد و سپس جذب محلول در ۴۹۰ خوانده شد و با کمک منحنی استاندارد مربوطه میزان کربوهیدرات های محلول محاسبه شد (DuBois et al. 1956).

کربوهیدرات احیا

برای این اندازه گیری، ابتدا محلولی از ترکیب دی نیترو سالیسیلیک اسید ۱٪، سود ۱/۶٪ و تارتارات سدیم-پتاسیم ۲۵٪ مخلوط شدند. سپس ۲ میلی لیتر از عصاره گیاهی استخراج شده با ۱ میلی لیتر از رنگ ساخته شده مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب جوش ۱۰۰ درجه سانتیگراد قرار داده شد، سپس محلول به دست آمده با ۱۰ میلی لیتر آب مقطر مخلوط شد و جذب نمونه ها در ۵۴۶ نانومتر خوانده شد و با کمک منحنی استاندارد مربوطه میزان قند احیا محاسبه شد (Jeffries et al. 1998).

پراکسیداسیون لیپید غشاء

برای سنجش مقدار پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء، غلظت مالون دیالدئید (MDA) که محصول پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیر اشباع می باشد، اندازه گیری شد. اندازه گیری مالون دیالدئید به روش Heath and Packer (۱۹۶۸) انجام شد. طبق این روش ۰/۲ گرم از بافت تر با ۵ میلی لیتر ۰/۰۱ درصد TCA سائیده شد. به یک میلی لیتر از عصاره حاصل از سانتریفوژ، ۴ میلی لیتر محلول تری کلرو استیک اسید ۲۰ درصد که حاوی ۰/۵ درصد تیوباربیوتوریک اسید (TBA) بود، اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد در حمام آبگرم حرارت داده شد سپس بلافاصله بر روی یخ سرد شد و دوباره مخلوط به مدت ۱۰ دقیقه در دور rpm 10000 سانتریفوژ شد. سپس شدت جذب این محلول در طول موج ۵۳۲ نانومتر خوانده شد. جذب بقیه رنگیزه های غیر اختصاصی در ۶۰۰ نانومتر تعیین و از این مقدار کسر شد. برای محاسبه غلظت مالون دالدئید از ضریب خاموشی معادل $155 \text{ mM}^{-1} \text{ Cm}^{-1}$ استفاده شد.

آلفاتوکوفرول

برای اندازه‌گیری آلفاتوکوفرول ۰/۵ گرم از نمونه با استفاده از ۱۰ میلی‌لیتر متانول اسیدی ساییده شده و پس از ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد (Baker et al. 1980). سپس ۵ میلی‌لیتر عصاره را با ۱ میلی‌لیتر TPTZ مخلوط می‌کنیم و پس از ۱۰ دقیقه در تاریکی، ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شده و جذب نمونه‌ها را در ۵۲۰ نانومتر می‌خوانیم. برای رسم منحنی استاندارد از آلفاتوکوفرول خالص با غلظت‌های ۰-۲۰۰ میکرومولار استفاده شد.

فنل

میزان فنل با استفاده از معرف فولین اندازه‌گیری شد (Singleton and Rossi 1965). صد میلی گرم از نمونه توسط اتانول ۹۵ درصد ساییده شده و به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی نگهداری گردید. سپس نمونه سانتریفوژ شده و سپس به یک میلی‌لیتر از عصاره، ۱/۵ میلی‌لیتر اتانول ۹۵٪، ۵ میلی‌لیتر آب مقطر و ۰/۵ میلی‌لیتر معرف فولین ۵۰٪ افزوده شد. نمونه‌ها به مدت ۱ ساعت در تاریکی نگهداری شدند و سپس جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۲۵ نانومتر خوانده شد. میزان فنل بر اساس منحنی استاندارد حاصل از اسید گالیک محاسبه گردید.

اندازه‌گیری میزان پراکسید هیدروژن

سنجش پراکسید هیدروژن (H_2O_2) با استفاده از روش Velikova et al. (2000) انجام شد. ۰/۵ گرم بافت برگ توزین شد و با تری کلرو استیک اسید (TCA) ۰/۱٪ کاملاً ساییده شدند. به ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول روئی حاصل از سانتریفوژ، ۰/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۰ میلی‌مولار (pH 7) و ۱ میلی‌لیتر یدید پتاسیم ۱ مولار اضافه شد و جذب نمونه‌ها در طول موج ۳۹۰ نانومتر خوانده شد. مقدار پراکسید هیدروژن در هر نمونه با استفاده از ضریب خاموشی $2.8 \times 10^{-4} \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ محاسبه شد.

اندازه گیری ظرفیت کل آنتی اکسیدان

اندازه گیری ظرفیت کل آنتی اکسیدانی به روش FRAP^۱ انجام شد (Benzie and Strain 1996). محلول واکنش شامل ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی و ۱/۵ میلی لیتر محلول FRAP که حاوی بافر استات ۳۰۰ میلی مولار (pH 7)، تری پریدیدل تریازن ۱۲۰ میلی مولار و کلرید آهن ۲۰ میلی مولار می باشد. شدت جذب این محلول در طول موج ۵۹۳ نانومتر خوانده شد. برای رسم منحنی استاندارد از اسید آسکوربیک خالص استفاده شد.

اندازه گیری پروتئین های محلول

استخراج پروتئین از قطعات برگ گیاهان با نسبت ۱:۳ بافت به بافر انجام گرفت. عصاره های حاصل به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۱۳۰۰۰ rpm در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفوژ شدند. از محلول روشنای جهت اندازه گیری فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان، میزان آنتی اکسیدان کل، میزان پروتئین های محلول و بررسی الگوی بیان پروتئینی استفاده شد. اندازه گیری پروتئین کل طبق روش برادفورد انجام شد (Bradford 1976). برای رسم منحنی استاندارد پروتئین از پروتئین استاندارد BSA^۲ (سرم آلبومین گاوی) با وزن مولکول ۶۶/۲ KDa استفاده شد.

اندازه گیری فعالیت آنزیم کاتالاز

به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره آنزیمی، ۹۰۰ میکرولیتر از محلول واکنش حاوی ۱۰ میلی مولار پراکسید هیدروژن در بافر فسفات افزوده و منحنی کاهش جذب در طول موج ۲۴۰ نانومتر در مدت ۶۰ ثانیه رسم شد (Aebi 1984).

¹ Ferric Reducing Antioxidant Power

² 2,4,6-tripyridyl-s-triazine⁰

² Bovine serum albumin

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آسکورات پراکسیداز

فعالیت APX بر اساس روش Nakano and Asada (۱۹۸۷) اندازه‌گیری شد. محلول واکنش آنزیم APX از ۶۲۵ میکرولیتر بافر فسفات حاوی ۰/۲ میلی‌مولار EDTA، ۱۷۵ میکرولیتر آسکوربیک اسید و ۵۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن ۱ میلی‌مولار تشکیل شده بود.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز

سنجش فعالیت SOD با استفاده از سنجش مهار احیای نوری نیتروبلوتترازولیوم^۲ (NBT) در ۵۶۰ نانومتر انجام گرفت (Beauchamp and Fridovich 1971). مخلوط واکنش نمونه‌ها شامل بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار pH = ۷، ۰/۰۷۵ میکرومولار NBT، ۰/۱ میلی‌مولار EDTA، ۷۵ میکرومولار ریوفلاوین^۳، ۱۳^۴ میلی‌مولار متیونین^۴ و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی می‌باشد.

اندازه‌گیری آمینو اسیدها، پرولین و آنزیم‌های بیوسنتز پرولین

برای اندازه‌گیری آمینو اسیدها از روش Yemm et al (۱۹۵۵) استفاده شد. برای اندازه‌گیری پرولین از روش Bates et al (۱۹۷۳) استفاده شد. در این روش ۵۰ میلی‌گرم از بافت‌های برگ گیاهان به تعداد ۳ تکرار با ۱/۷ میلی‌لیتر سولفوسالسیلیک اسید ۳٪ (w/v) به‌خوبی ساییده شدند تا به‌طورکامل هموژنایز شوند. عصاره‌های حاصل به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۴۰۰۰ rpm سانتریفوژ شدند. در مرحله‌ی بعد ۱ میلی‌لیتر محلول روشن‌آور برداشته و داخل لوله‌های آزمایشی ۱۰ میلی‌لیتر منتقل شد. سپس ۱ میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال و ۱ میلی‌لیتر معرف نین‌هیدرین به هر لوله اضافه شد و به مدت ۱ ساعت در دمای ۱۰۵-۱۰۰ درجه سانتیگراد داخل بن ماری حرارت داده شدند. سپس به هر لوله ۲ میلی‌لیتر تولوئن اضافه شد و به شدت مخلوط شد. اندازه‌گیری با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۲۰ نانومتر صورت گرفت. برای رسم منحنی استاندارد از پرولین خالص استفاده شد.

² Nitro blue tetrazolium

2

² Riboflavin

3

² Methionine

4

به منظور بررسی میزان فعالیت آنزیم پیرولین ۵- کربوکسیلات سنتتاز (P5CS) از مخلوط واکنشی حاوی گلوتامیک اسید ۷۵ میلی مولار، Tris-Hcl ۷۵ میلی مولار (pH 7.3)، کلرید منیزیم ۱۸/۷۵ میلی مولار، NADPH ۰/۴ میلی مولار استفاده شد (Stines et al. 1999). میزان فعالیت آنزیم پیرولین دهیدروژناز با بررسی افزایش جذب در طول موج ۳۴۰ نانومتر در مخلوط واکنش حاوی بافر استات ۱۰۰ میلی مولار (pH 10.3)، پیرولین ۲۰ میلی مولار، NAD^+ ۱۰ میلی مولار و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی انجام گرفت (Rena and Splittstoesser 1975).

طرح آماری مورد استفاده و آنالیز داده‌ها

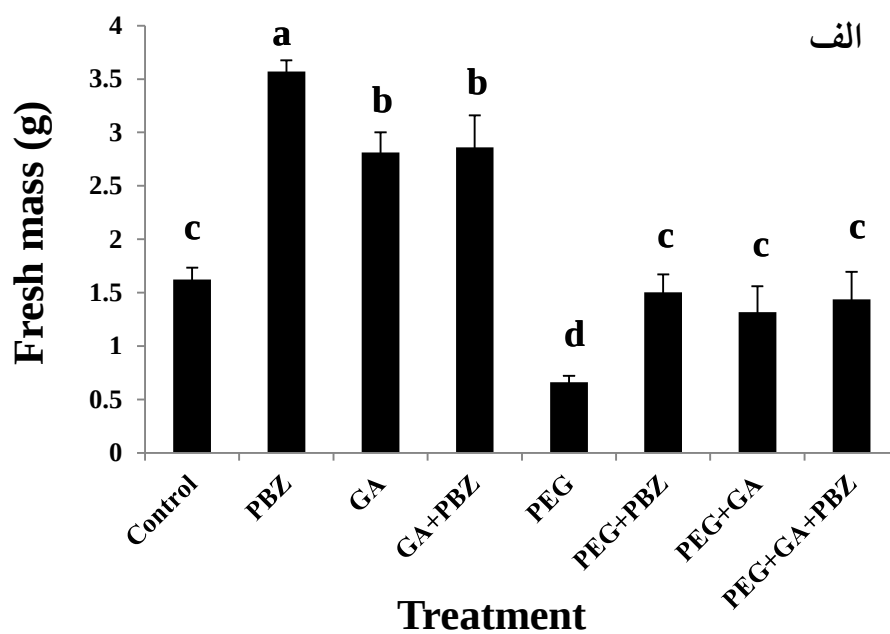
تمام آزمایشات طبق طرح کامل تصادفی انجام شد و برای هر تیمار حداقل سه تکرار در نظر گرفته شد. پردازش داده‌ها با استفاده از نرم افزارهای رایانه ای Excel و SPSS صورت گرفت. داده های جمع آوری شده مربوط به صفات اندازه گیری شده برای تجزیه و تحلیل واریانس و مقایسه میانگین داده ها توسط آزمون Duncan، با ضریب اطمینان ۹۵ درصد ($p \leq 0.05$) انجام شد.

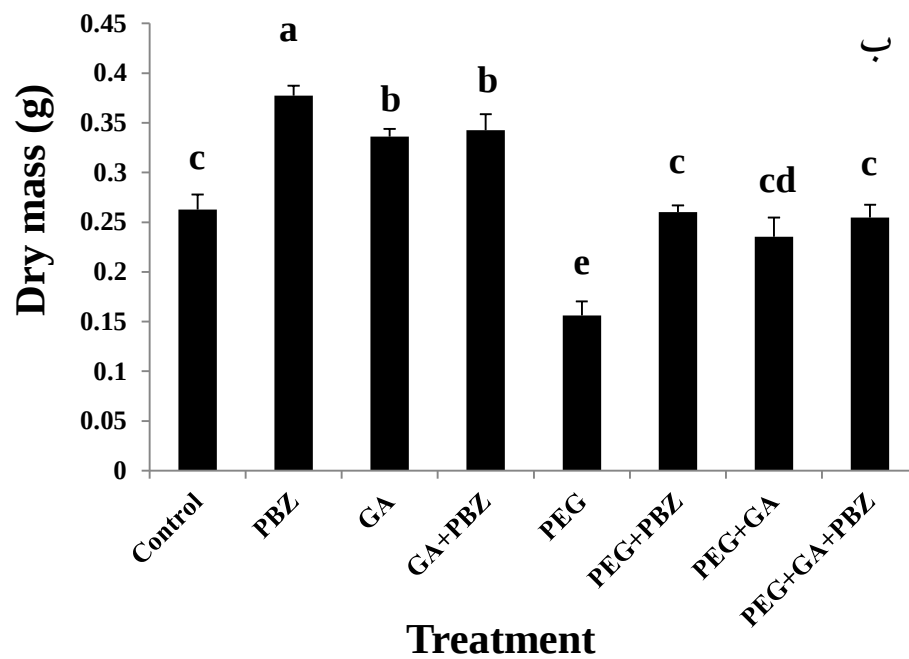
نتایج

بر اساس نتایج حاصل از بررسی شاخص های رشد، تیمارهای پاکلوبوترازول و جیبرلین میزان وزن تر، وزن خشک، محتوی آب و رشد نسبی کالوس های استویا را در حد معنی داری افزایش دادند و بیشترین میزان افزایش در تیمار پاکلوبوترازول مشاهده شد (شکل های ۱ و ۲). تیمار پلی اتیلن گلیکول میزان رشد نسبی، وزن خشک، وزن تر و محتوی آب کالوس را در سطح معنی داری کاهش داد و میزان آنها به ترتیب معادل ۳۴٪، ۴۰٪، ۶۰٪ و ۶۳٪ کمتر از گیاهان شاهد بود. نتایج نشان داد که بیشترین و کمترین تاثیر منفی تنش خشکی بر شاخص های رشد به ترتیب در محتوی آب و میزان رشد نسبی کالوس ملاحظه شد. تیمارهای پاکلوبوترازول و جیبرلین سبب کاهش معنی دار اثرات مضر پلی اتیلن گلیکول بر شاخص های رشد مذکور شدند. میزان وزن تر، وزن

خشک، محتوی آب و رشد نسبی کالوس در تیمار پلی اتیلن گلیکول توام با پاکلوبوترازول و جیبرلین تقریباً معادل گیاه شاهد (بدون

تیمار) بودند و کاهش معنی داری نشان ندادند.

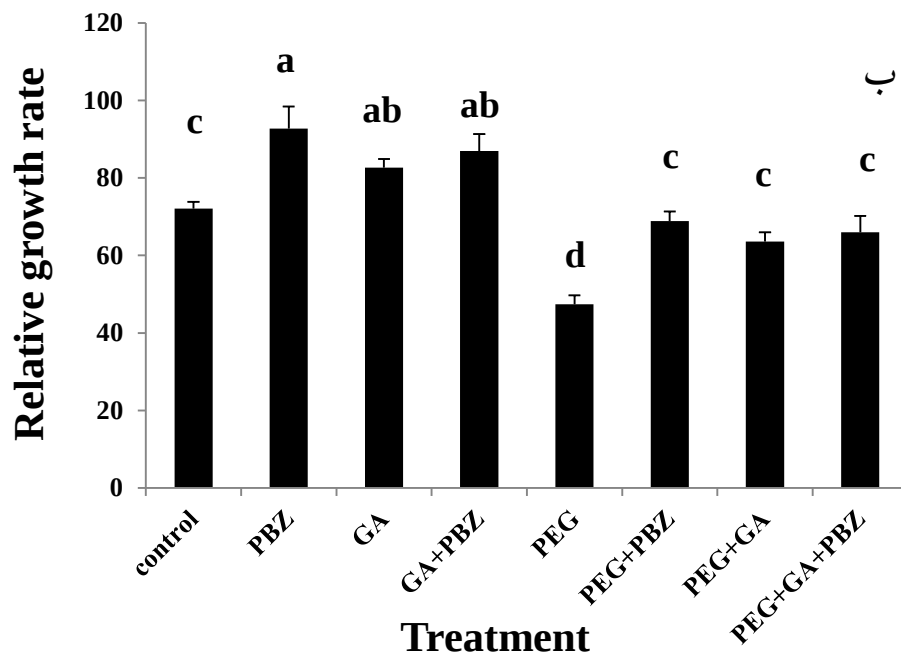
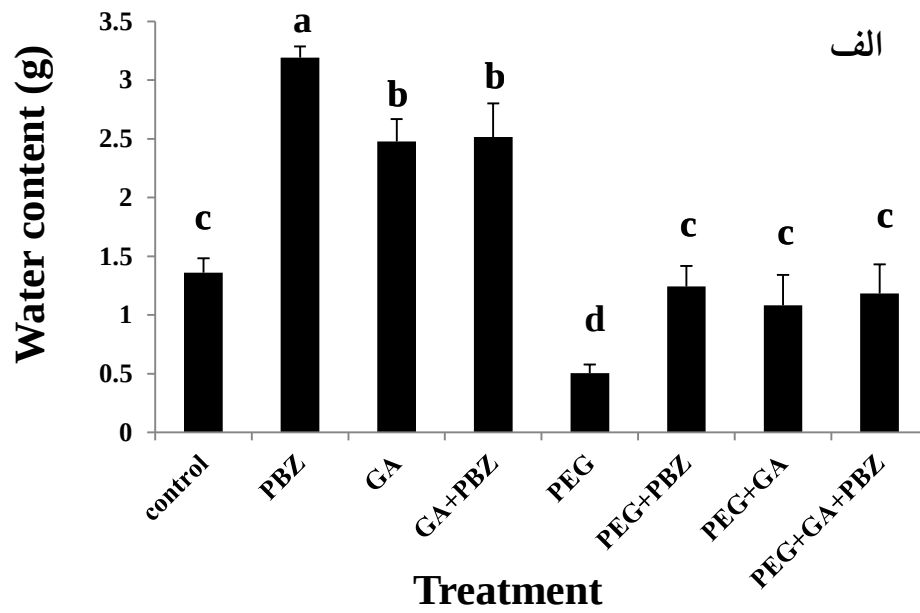




شکل ۱: تغییرات وزن تر (Fresh mass; الف) و وزن خشک (Dry mass; ب) کالوس *Stevia rebaudiana* در

تیمارهای پاکلوبوترازول (PBZ)، جیبرلین (GA) و پلی اتیلن گلیکول (PEG). داده‌ها میانگین ۳ تکرار $\pm SD$ و حروف نامشابه

نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار ($P \leq 0.05$) بر اساس آزمون Duncan می‌باشد.

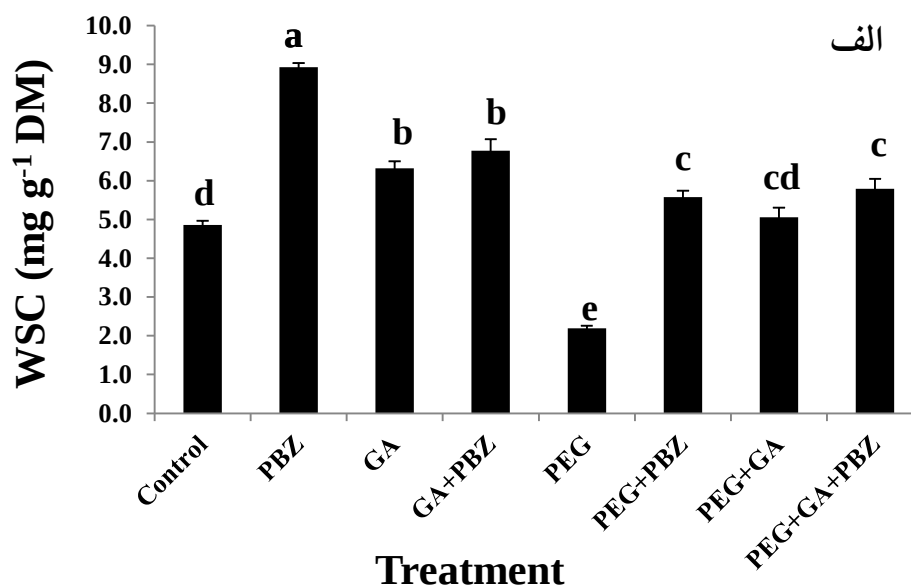


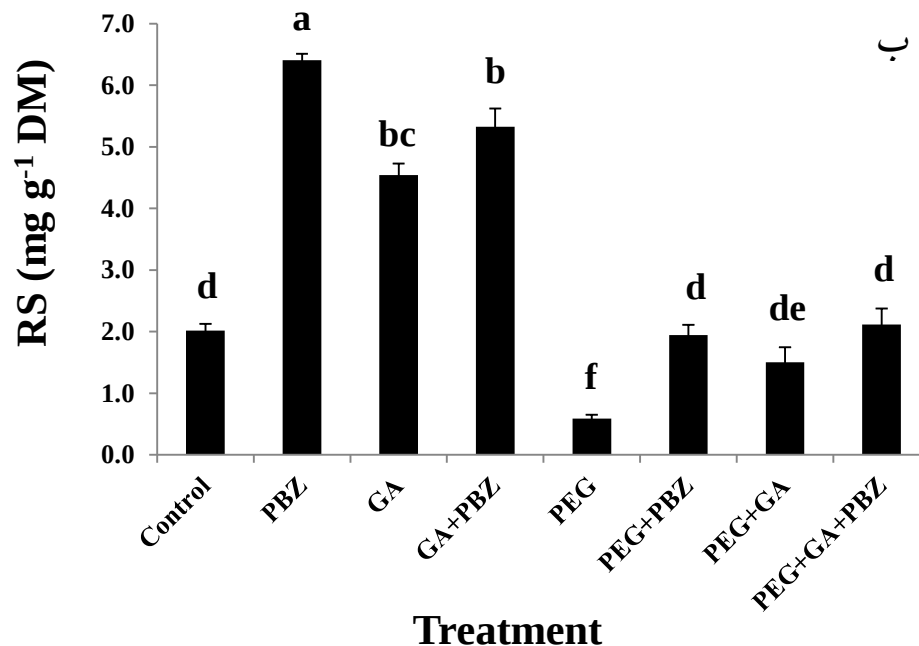
شکل ۲: تغییرات محتوی آب (Water content; الف) و رشد نسبی (Relative growth rate; ب) کالوس *Stevia*

rebaudiana در تیمارهای پاکلوبوترازول (PBZ)، جیبرلین (GA) و پلی اتیلن گلیکول (PEG). داده‌ها میانگین ۳ تکرار $\pm$ SD

و حروف نامشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار ($P \leq 0.05$) بر اساس آزمون Duncan می‌باشد.

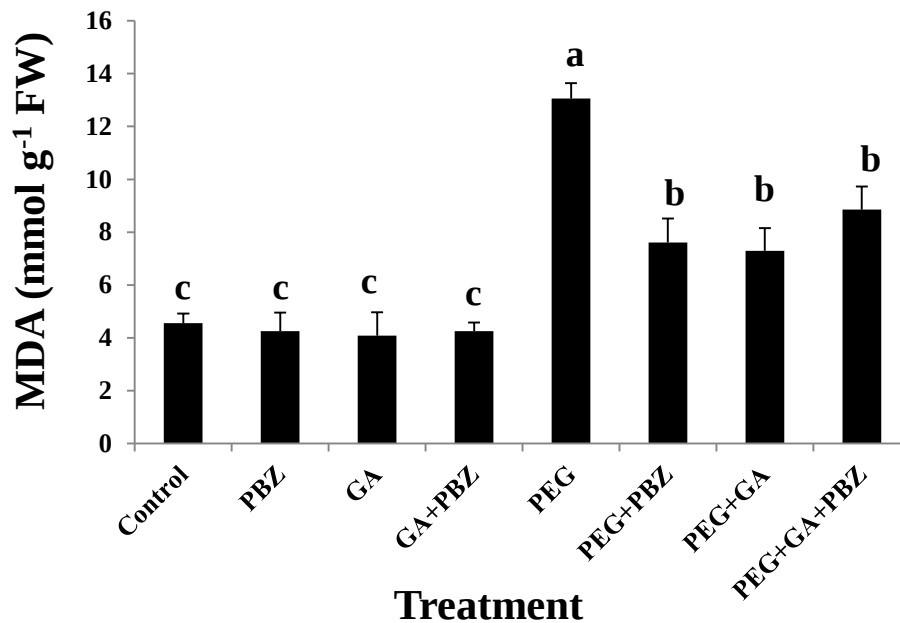
اثر تیمارهای مختلف بر میزان قندهای محلول کالوس گیاه استویا مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به شکل ۳، میزان قندهای محلول در تیمارهای پاکلوبوترازول و جیبرلین در سطح معنی‌داری بیشتر از گیاه شاهد بود و بیشترین میزان قند در تیمار پاکلوبوترازول ملاحظه گردید. میزان قندهای محلول در تیمارهای پاکلوبوترازول، جیبرلین و تیمار توام جیبرلین و پاکلوبوترازول تقریباً ۴۵٪، ۲۲٪ و ۲۸٪ بیشتر از گیاه شاهد بود. تیمار پلی‌اتیلن گلیکول میزان قندهای محلول کالوس را در مقایسه با گیاه شاهد ۵۴٪ کاهش داد. میزان قند محلول در گیاهان تیمار شده با پلی‌اتیلن گلیکول توام با پاکلوبوترازول در سطح معنی‌داری بیشتر از گیاه شاهد است. تیمار پلی‌اتیلن گلیکول توام با جیبرلین اثر معنی‌داری بر میزان قند محلول در مقایسه با گیاه شاهد نشان نداد (شکل ۳). بررسی کربوهیدرات‌ها نشان داد که بیشترین میزان قندهای احیا در تیمار پاکلوبوترازول و حدود سه برابر بیشتر از گیاه شاهد بود (شکل ۳). تیمار جیبرلین سبب افزایش قندهای احیا حدود ۵۶٪ بیشتر از گیاهان شاهد شد و در تیمار جیبرلین توام با پاکلوبوترازول میزان افزایش بیشتر و حدود ۶۲٪ بود. بر اساس نتایج، در تیمار پلی‌اتیلن گلیکول میزان کربوهیدرات‌های احیا در سطح معنی‌داری (حدود ۷۰٪) نسبت به گیاه شاهد کاهش یافت (شکل ۳). میزان کربوهیدرات‌های احیا تحت تیمارهای پلی‌اتیلن گلیکول توام با پاکلوبوترازول و جیبرلین در سطح معنی‌داری بیشتر از تیمار پلی‌اتیلن گلیکول و تقریباً معادل گیاه شاهد بود.





شکل 3: تغییرات میزان قند محلول (WSC; الف) و قند احیاء (RS; ب) کالوس *Stevia rebaudiana* در تیمارهای پاکلوبوترازول (PBZ)، جیبرلین (GA) و پلی اتیلن گلیکول (PEG). داده‌ها میانگین ۳ تکرار $\pm$ SD و حروف نامشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار ($P \leq 0.05$) بر اساس آزمون Duncan می‌باشد.

به منظور بررسی تاثیر تیمارهای مختلف بر میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء میزان مالون دی‌آلدئید (MDA) بررسی شد (شکل ۴). در تیمارهای پاکلوبوترازول و جیبرلین میزان MDA تقریباً معادل گیاه شاهد بود و تغییر معنی داری ملاحظه نشد. میزان MDA کالوس تحت تیمار پلی اتیلن گلیکول افزایش معنی‌داری نشان داد و حدود سه برابر بیشتر از گیاهان شاهد بود. تیمارهای پاکلوبوترازول و جیبرلین سبب کاهش معنی‌دار اثرات منفی پلی‌اتیلن گلیکول بر روی لیپیدهای غشاء شدند. میزان MDA در گیاهان تیمار شده با پلی اتیلن گلیکول توأم با پاکلوبوترازول و جیبرلین به ترتیب کاهش ۴۱٪ و ۴۴٪ در مقایسه با گیاهان تیمار شده با پلی اتیلن گلیکول تنها نشان دادند (شکل ۳-۱۱).



شکل ۴: تغییرات میزان مالون دی آلدئید (MDA) کالوس *Stevia rebaudiana* در تیمارهای پاکلوبوترازول (PBZ)،

جیبرلین (GA) و پلی اتیلن گلیکول (PEG). داده‌ها میانگین ۳ تکرار $\pm$ SD و حروف نامشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار ($P \leq 0.05$) بر اساس آزمون Duncan می‌باشد.

بررسی تیمارهای مختلف بر روی کالوس استویا نشان داد که کمترین میزان آلفاتوکوفرول در گیاه شاهد و بیشترین میزان

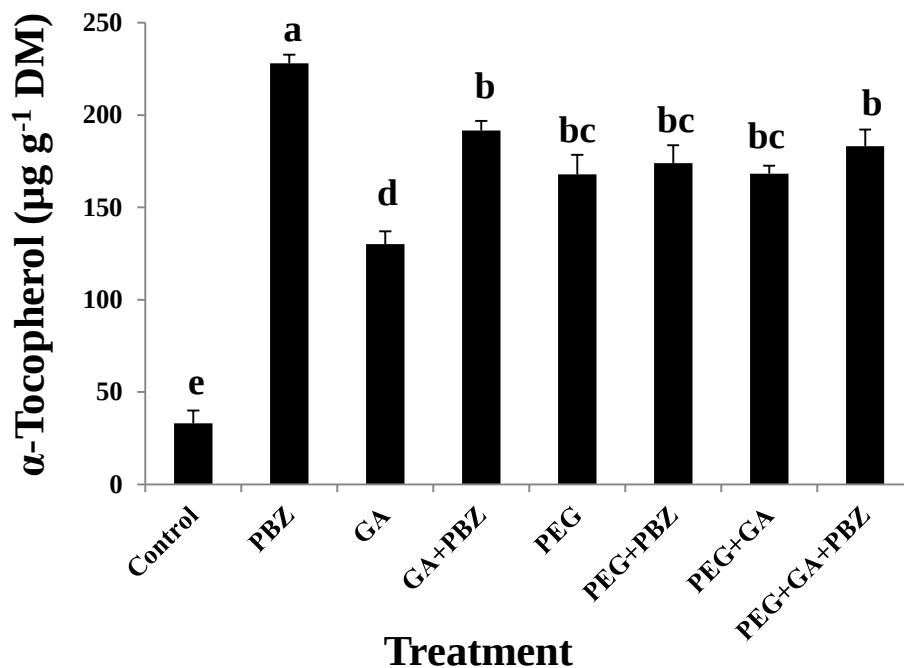
در گیاه تیمار شده با پاکلوبوترازول مشاهده شد (شکل ۵). تیمار پاکلوبوترازول میزان آلفاتوکوفرول را در مقایسه با گیاه شاهد ۸۵٪

افزایش داد. میزان آلفاتوکوفرول در تیمار جیبرلین حدود ۷۴٪ افزایش یافت درحالیکه تیمار توام جیبرلین و پاکلوبوترازول میزان

آلفاتوکوفرول را ۸۳٪ افزایش داد. تنش خشکی ناشی از پلی اتیلن گلیکول منجر به افزایش معنی‌دار میزان آلفاتوکوفرول (تقریباً

۸۰٪) شد. در پاسخ به تیمارهای پاکلوبوترازول و جیبرلین توام با پلی اتیلن گلیکول میزان آلفاتوکوفرول کالوس‌ها تقریباً یکسان بود

و تفاوت معنی‌داری بین آنها ملاحظه نشد.



شکل ۵: تغییرات میزان آلفاتوکوفرول کالوس *Stevia rebaudiana* در تیمارهای پاکلوبوترازول (PBZ)، جیبرلین

(GA) و پلی اتیلن گلیکول (PEG). داده‌ها میانگین ۳ تکرار $\pm$ SD و حروف نامشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار ($P \leq 0.05$) بر

اساس آزمون Duncan می‌باشد.

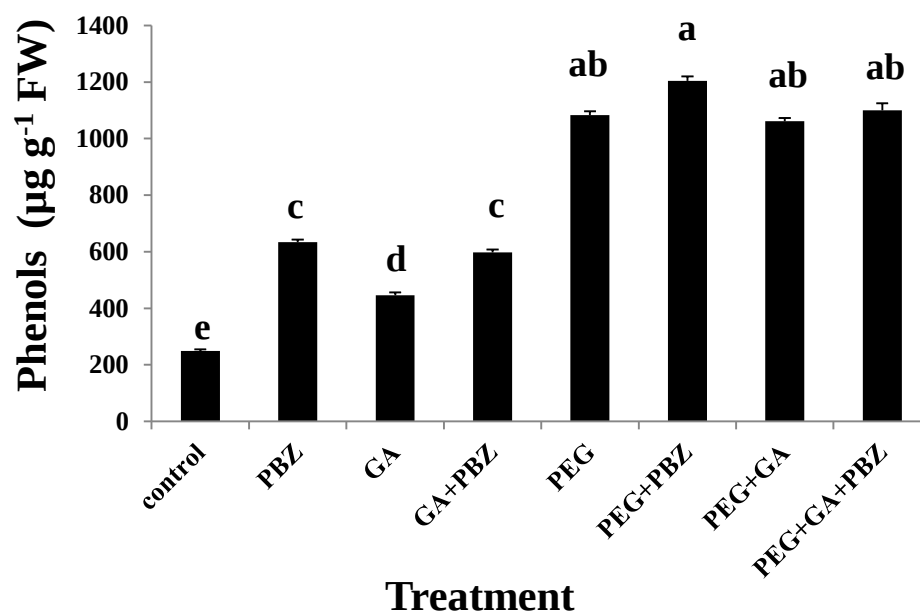
نتایج بررسی میزان فنل نشان داد که میزان تجمع فنل در کالوس استویا در تیمارهای مختلف در سطح معنی‌داری افزایش

یافت (شکل ۶). میزان فنل کالوس استویا در تیمارهای پاکلوبوترازول، جیبرلین و تیمار توام جیبرلین با پاکلوبوترازول به ترتیب

۶۰٪، ۴۴٪ و ۵۸٪ بیشتر از شاهد بود. در پاسخ به تیمار پلی اتیلن گلیکول میزان فنل افزایش معنی‌داری نشان داد و ۷۷٪ بیشتر از گیاه

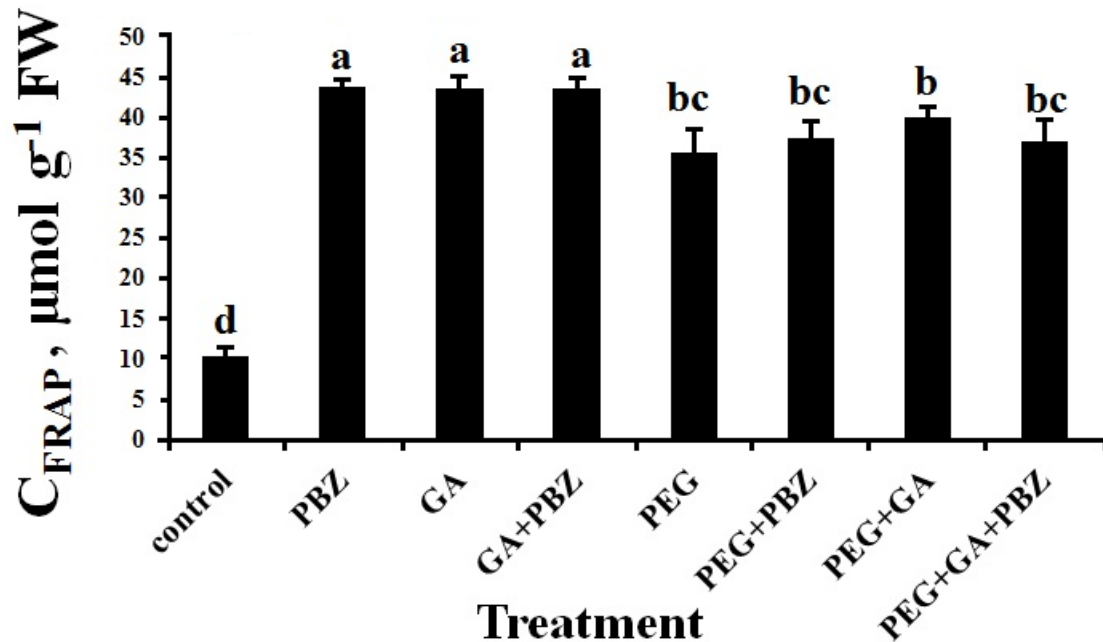
شاهد بود. تیمارهای مختلف پلی اتیلن گلیکول با جیبرلین و پاکلوبوترازول باعث افزایش معنی‌دار فنل شد درحالی‌که تفاوت معنی

داری بین آنها مشاهده نشد.



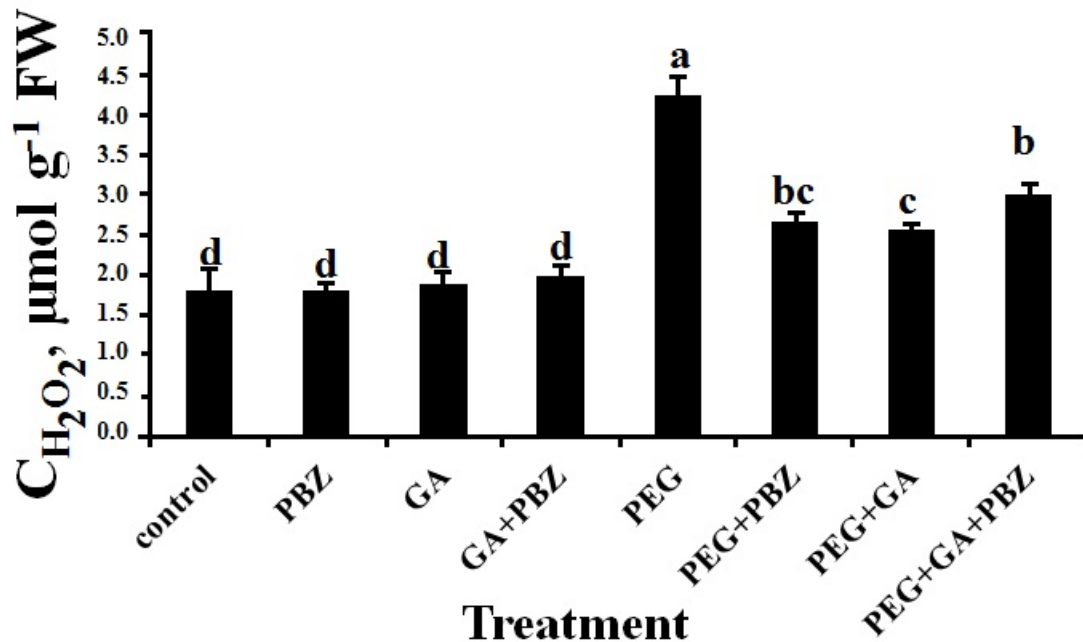
شکل ۶: تغییرات میزان فنل کالوس *Stevia rebaudiana* در تیمارهای پاکلوبوترازول (PBZ)، جیبرلین (GA) و پلی اتیلن گلیکول (PEG). داده‌ها میانگین ۳ تکرار $\pm$ SD و حروف نامشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار ($P \leq 0.05$) بر اساس آزمون Duncan می‌باشد.

نتایج آنالیز آنتی اکسیدانت کل (FRAP) نشان داد که میزان تجمع آنتی اکسیدانت‌ها در کالوس استویا در تیمارهای مختلف در سطح معنی‌داری افزایش یافت (شکل ۷). میزان آنتی اکسیدانت کل کالوس استویا در تیمارهای پاکلوبوترازول، جیبرلین و تیمار توام جیبرلین با پاکلوبوترازول بیشتر از تیمارهای مختلف پلی اتیلن گلیکول با جیبرلین و پاکلوبوترازول بود درحالی‌که تفاوت معنی‌داری بین آنها مشاهده نشد.



شکل ۷: تغییرات میزان آنتی اکسیدانت کل (FRAP) کالوس *Stevia rebaudiana* در تیمارهای پاکلوبوترازول (PBZ)، جیبرلین (GA) و پلی اتیلن گلیکول (PEG). داده‌ها میانگین ۳ تکرار $\pm SD$ و حروف نامشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار ($P \leq 0.05$) بر اساس آزمون Duncan می‌باشد.

بررسی تیمارهای مختلف بر روی کالوس استویا نشان داد که کمترین میزان هیدروژن پراکسید در گیاه شاهد و تیمارهای پاکلوبوترازول، جیبرلین و تیمار توام جیبرلین با پاکلوبوترازول مشاهده شد (شکل ۸). تنش خشکی ناشی از پلی اتیلن گلیکول منجر به افزایش معنی‌دار میزان هیدروژن پراکسید شد. در پاسخ به تیمارهای پاکلوبوترازول و جیبرلین توام با پلی اتیلن گلیکول میزان هیدروژن پراکسید کالوس‌ها بیشتر از گیاه شاهد و کمتر از تیمار پلی اتیلن گلیکول بود.



شکل ۸: تغییرات میزان پراکسید هیدروژن کالوس *Stevia rebaudiana* در تیمارهای پاکلوبوترازول (PBZ)، جیبرلین

(GA) و پلی اتیلن گلیکول (PEG). داده‌ها میانگین ۳ تکرار $\pm$ SD و حروف نامشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار ($P \leq 0.05$) بر

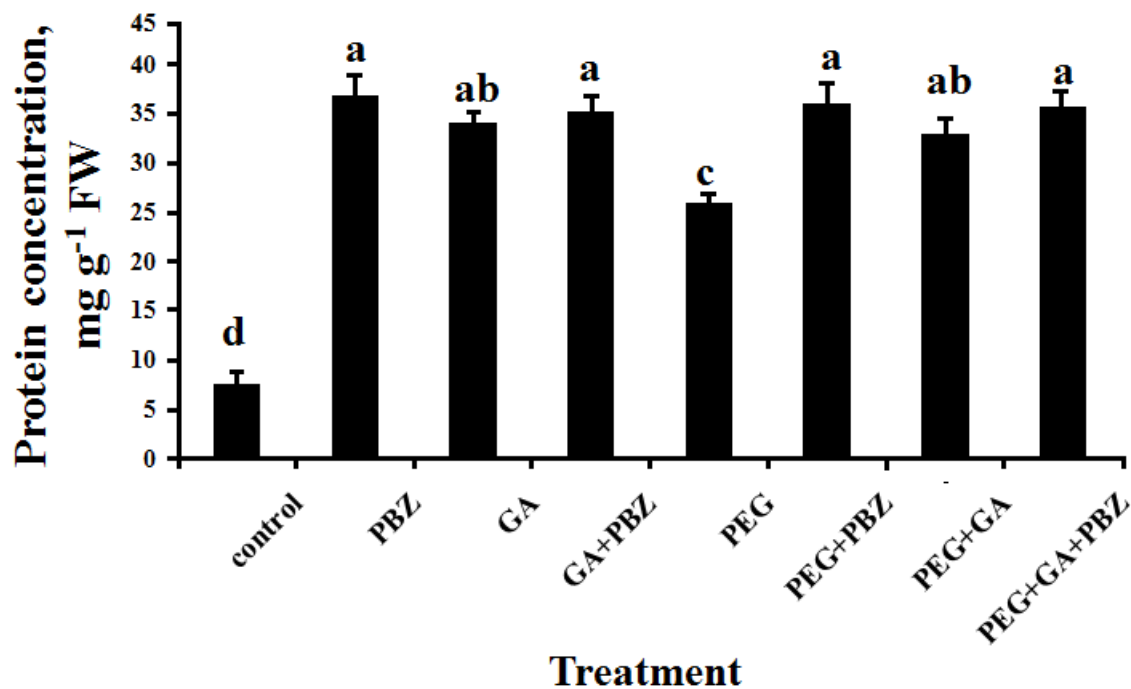
اساس آزمون Duncan می‌باشد.

بررسی تاثیر تیمارهای مختلف بر میزان پروتئین کل نشان داد که در تیمارهای پاکلوبوترازول و جیبرلین میزان پروتئین

کل در سطح معنی‌داری بیشتر از گیاه شاهد بود و تغییر معنی‌داری ملاحظه شد (شکل ۹). میزان پروتئین کالوس تحت تیمار پلی

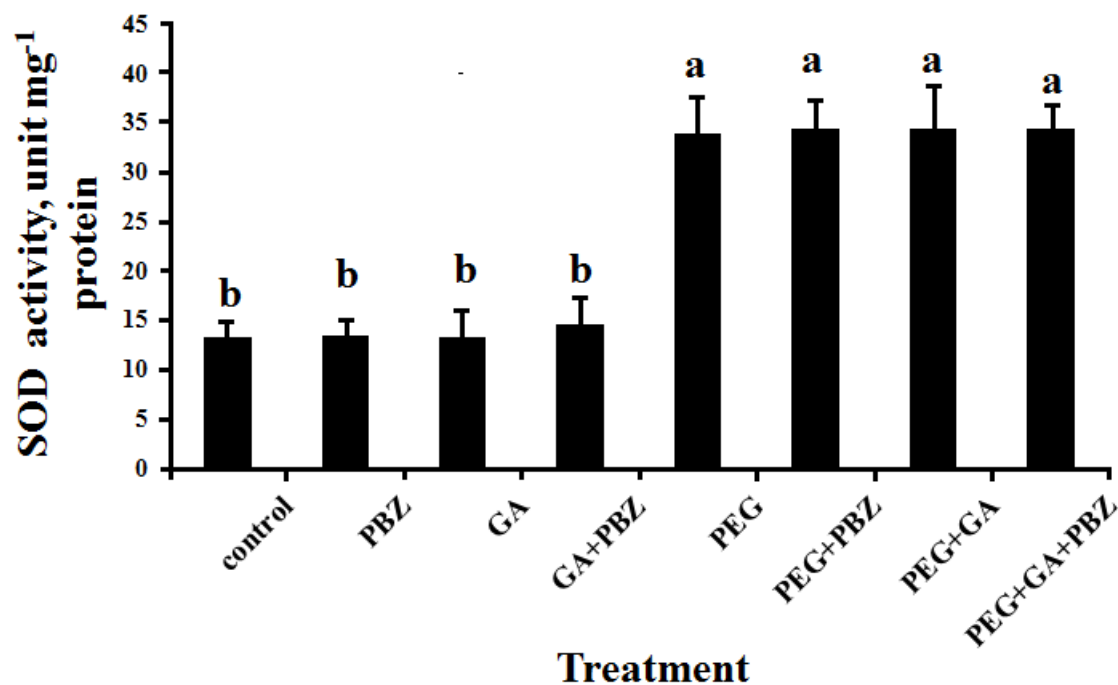
اتیلن گلیکول افزایش معنی‌داری نشان داد و حدود سه برابر بیشتر از گیاهان شاهد بود. تیمارهای پاکلوبوترازول و جیبرلین سبب

افزایش معنی‌دار میزان پروتئین‌ها در مقایسه با پلی اتیلن گلیکول تنها شدند.



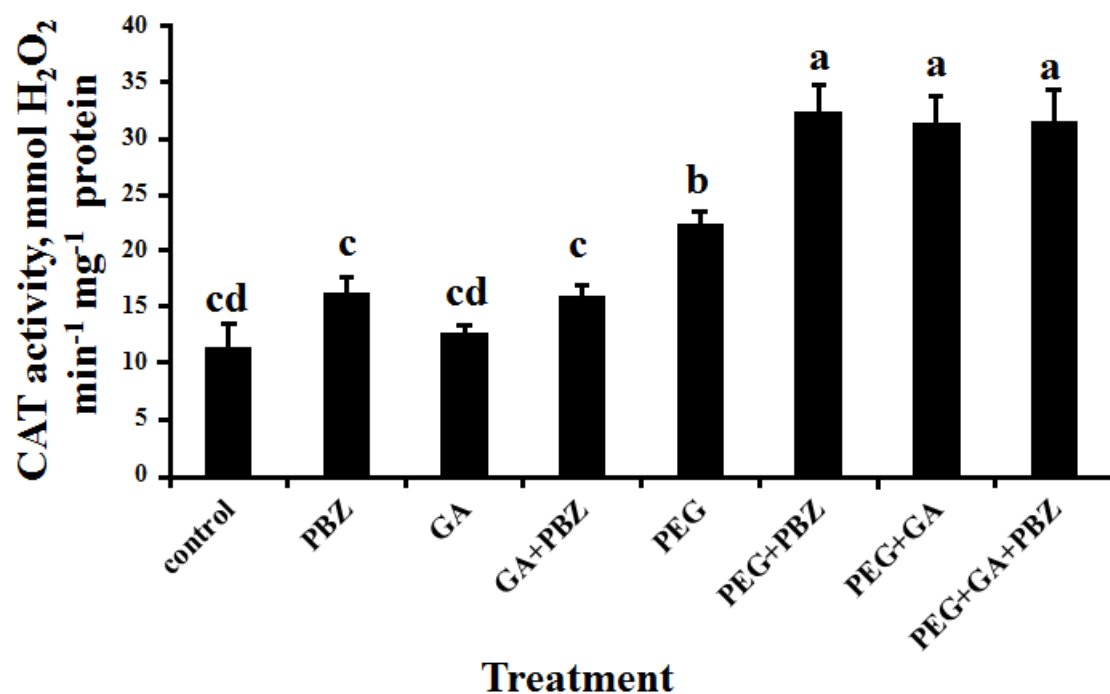
شکل ۹: تغییرات میزان پروتئین کالوس *Stevia rebaudiana* در تیمارهای پاکلوبوترازول (PBZ)، جیبرلین (GA) و پلی اتیلن گلیکول (PEG). داده‌ها میانگین ۳ تکرار $\pm$ SD و حروف نامشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار ($P \leq 0.05$) بر اساس آزمون Duncan می‌باشد.

میزان فعالیت آنزیم SOD آنالیز شده در تیمارهای پاکلوبوترازول، جیبرلین و تیمار توام جیبرلین با پاکلوبوترازول اختلاف معنی‌داری با گیاهان شاهد نشان نداد (شکل ۱۰). تیمار پلی اتیلن گلیکول باعث افزایش معنی‌دار فعالیت SOD شد. همانطوریکه نتایج نشان داد فعالیت SOD در تیمار پاکلوبوترازول و جیبرلین توام با پلی اتیلن گلیکول افزایش معنی‌داری نشان داد درحالی‌که تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای مختلف مشاهده نشد.



شکل ۱۰: تغییرات میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز کالوس *Stevia rebaudiana* در تیمارهای پاکلوبوترازول (PBZ)، جیبرلین (GA) و پلی اتیلن گلیکول (PEG). داده‌ها میانگین ۳ تکرار $\pm$ SD و حروف نامشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار ($P \leq 0.05$) بر اساس آزمون Duncan می‌باشد.

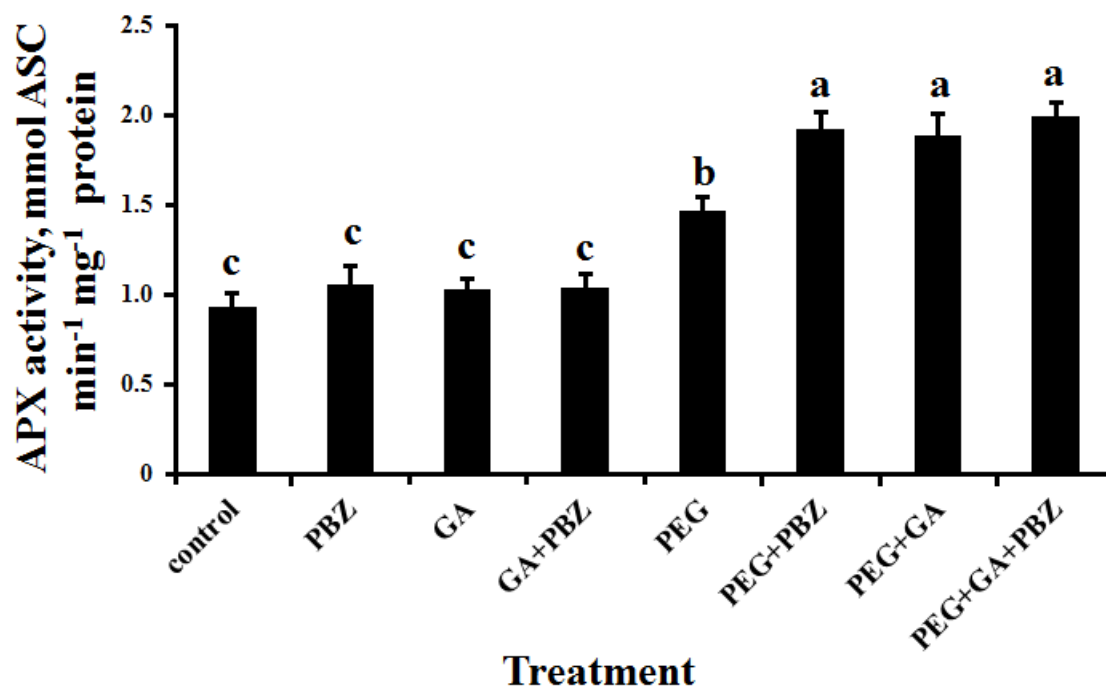
نتایج اندازه‌گیری فعالیت آنزیم CAT نشان داد که تیمارهای پاکلوبوترازول، جیبرلین و تیمار توام جیبرلین با پاکلوبوترازول اختلاف معنی‌داری با گیاهان شاهد نشان نداد (شکل ۱۱). تیمار پلی اتیلن گلیکول باعث افزایش معنی‌دار فعالیت CAT شد. همان‌طوریکه نتایج نشان داد فعالیت CAT در تیمار پاکلوبوترازول و جیبرلین توام با پلی اتیلن گلیکول افزایش معنی‌داری نشان داد بیشتر از تیمار پلی اتیلن گلیکول تنها شد.



شکل ۱۱: تغییرات میزان فعالیت آنزیم کاتالاز کالوس *Stevia rebaudiana* در تیمارهای پاکلوبوترازول (PBZ).

جیبرلین (GA) و پلی اتیلن گلیکول (PEG). داده‌ها میانگین ۳ تکرار $\pm$ SD و حروف نامشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار ($P \leq 0.05$) بر اساس آزمون Duncan می‌باشد.

نتایج حاصل از اندازه‌گیری فعالیت آنزیم APX حاکی از عدم تغییر معنی‌دار فعالیت APX در تیمارهای پاکلوبوترازول، جیبرلین و تیمار توام جیبرلین با پاکلوبوترازول بود (شکل ۱۲). فعالیت APX در گیاهان تیمار شده با پلی اتیلن گلیکول افزایش معنی‌داری در مقایسه با گیاهان شاهد نشان داد. در تیمار پاکلوبوترازول و جیبرلین توام با پلی اتیلن گلیکول افزایش معنی‌داری در فعالیت APX مشاهده شد. میزان فعالیت APX در تیمارهای پاکلوبوترازول و جیبرلین توام با پلی اتیلن گلیکول بیشتر از پلی اتیلن گلیکول تنها بود.



شکل ۱۲: تغییرات میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز کالوس *Stevia rebaudiana* در تیمارهای پاکلوبوترازول

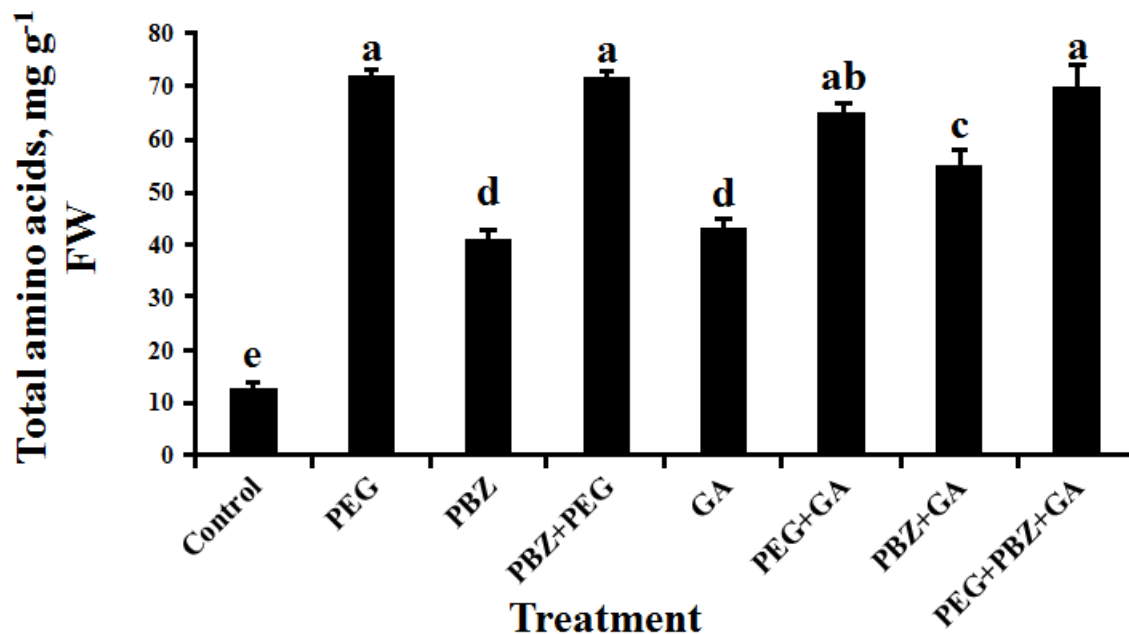
(PBZ)، جیبرلین (GA) و پلی اتیلن گلیکول (PEG). داده‌ها میانگین ۳ تکرار $\pm SD$ و حروف نامشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار

($P \leq 0.05$) بر اساس آزمون Duncan می‌باشد.

نتایج آنالیز آمینو اسیدکل نشان داد که میزان آمینو اسیدها در کالوس استویا در تیمارهای مختلف در سطح معنی‌داری

افزایش یافت (شکل ۱۳). میزان آمینواسید کل کالوس استویا در تیمارهای پلی اتیلن گلیکول با پاکلوبوترازول، جیبرلین بیشتر از

تیمارهای مختلف جیبرلین و پاکلوبوترازول بدون پلی اتیلن گلیکول بود درحالی‌که تفاوت معنی‌داری بین آنها مشاهده نشد.



شکل ۱۳: تغییرات میزان آمینو اسید کل کالوس *Stevia rebaudiana* در تیمارهای پاکلوبوترازول (PBZ)، جیبرلین

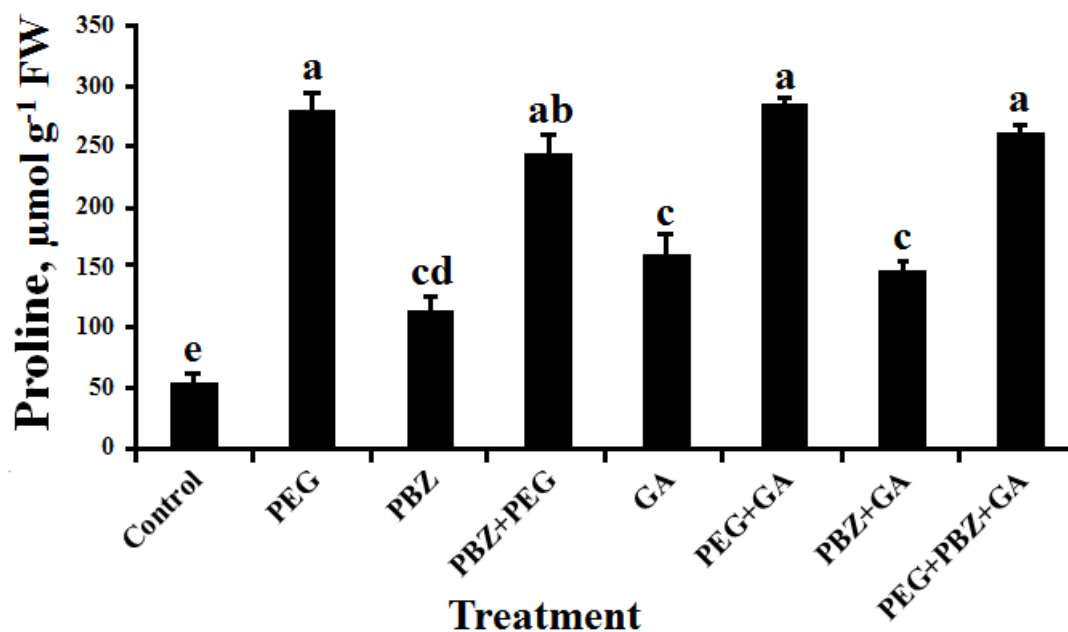
(GA) و پلی اتیلن گلیکول (PEG). داده‌ها میانگین ۳ تکرار $\pm SD$ و حروف نامشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار ($P \leq 0.05$) بر

اساس آزمون Duncan می‌باشد.

نتایج آنالیز پرولین مشابه آمینو اسید کل بود و میزان پرولین در کالوس استویا در تیمارهای مختلف در سطح معنی‌داری

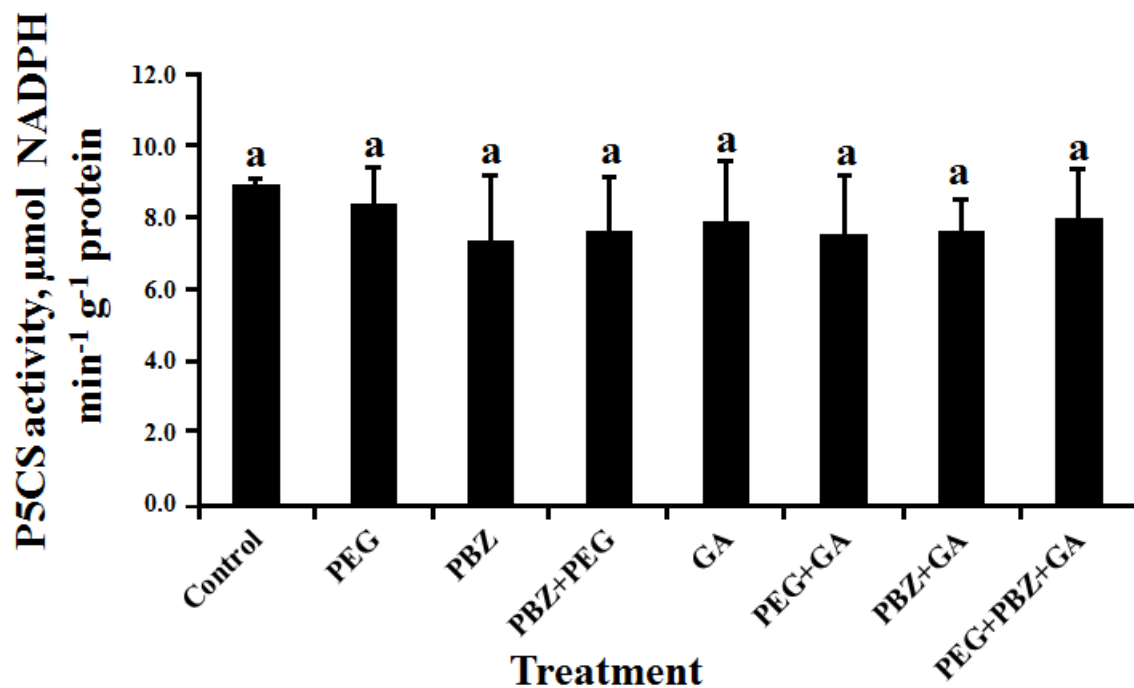
افزایش یافت (شکل ۱۴). میزان پرولین کالوس استویا در تیمارهای پلی اتیلن گلیکول با پاکلوبوترازول، جیبرلین بیشتر از تیمارهای

مختلف جیبرلین و پاکلوبوترازول بدون پلی اتیلن گلیکول بود درحالی‌که تفاوت معنی‌داری بین آنها مشاهده نشد.



شکل ۱۴: تغییرات میزان پرولین کالوس *Stevia rebaudiana* در تیمارهای پاکلوبوترازول (PBZ)، جیبرلین (GA) و پلی اتیلن گلیکول (PEG). داده‌ها میانگین ۳ تکرار $\pm \text{SD}$ و حروف نامشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار ($P \leq 0.05$) بر اساس آزمون Duncan می‌باشد.

نتایج حاصل از اندازه‌گیری فعالیت آنزیم C5PS حاکی از عدم تغییر معنی‌دار فعالیت آن در تیمارهای پاکلوبوترازول، جیبرلین و تیمار توام جیبرلین با پاکلوبوترازول با یا بدون پلی اتیلن گلیکول بود (شکل ۱۵).



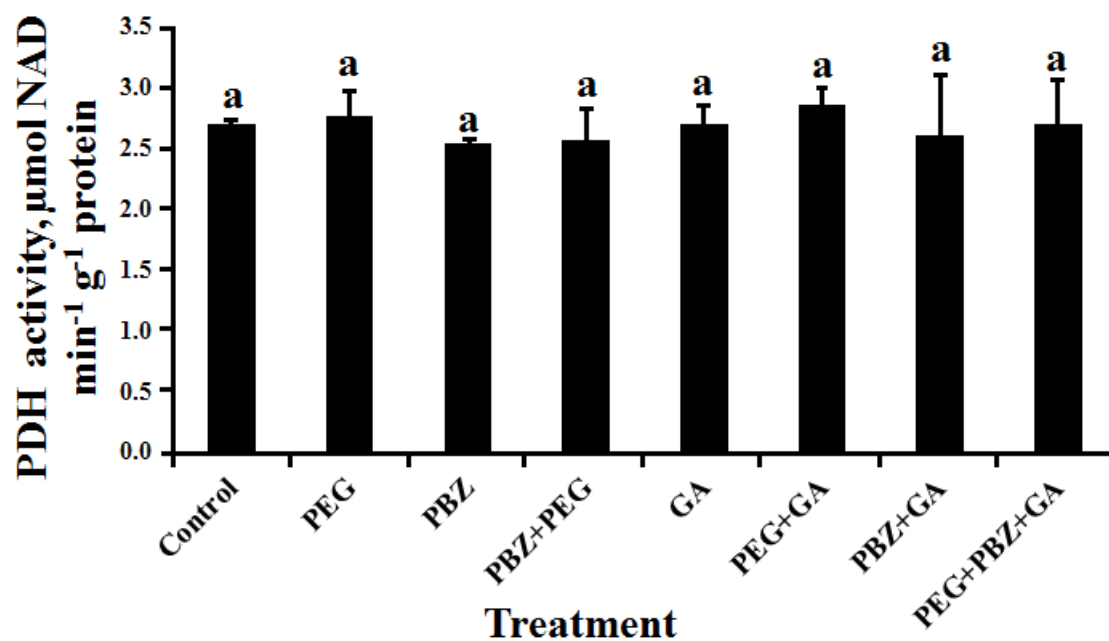
شکل ۱۵: تغییرات میزان فعالیت آنزیم پیروولین ۵- کربوکسیلات سنتتاز (P5CS) کالوس *Stevia rebaudiana* در

تیمارهای پاکلوبوترازول (PBZ)، جیبرلین (GA) و پلی اتیلن گلیکول (PEG). داده‌ها میانگین ۳ تکرار $\pm$ SD و حروف نامشابه

نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار ($P \leq 0.05$) بر اساس آزمون Duncan می‌باشد.

نتایج حاصل از اندازه گیری فعالیت آنزیم PDH همانند آنزیم C5PS حاکی از عدم تغییر معنی دار فعالیت آن در

تیمارهای پاکلوبوترازول، جیبرلین و تیمار توام جیبرلین با پاکلوبوترازول با یا بدون پلی اتیلن گلیکول بود (شکل ۱۶).



شکل ۱۶: تغییرات میزان فعالیت آنزیم پرولین دهیدروژناز (PDH) کالوس *Stevia rebaudiana* در تیمارهای پاکلوپوترازول (PBZ)، جیبرلین (GA) و پلی اتیلن گلیکول (PEG). داده‌ها میانگین ۳ تکرار $\pm \text{SD}$ و حروف نامشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار ($P \leq 0.05$) بر اساس آزمون Duncan می‌باشد.

بحث

خشکی یکی از مهمترین تنش های محیطی است که تولید محصول را در قسمت های مختلف جهان به خصوص ایران که به عنوان کشور خشک و نیمه خشک شناسایی شده است، کاهش می دهد. گیاه دارویی *Stevia rebaudiana* Bertoni بومی منطقه نیمه مرطوب آمازی می باشد و تنش خشکی یک عامل محدود کننده برای رشد و تولید شیرین کننده استویول گلیکوزیدها در این گیاه است (Hajihashemi and Ehsanpour 2013, 2014, Hajihashemi and Geuns 2016). در این تحقیق تاثیر تیمارهای مختلف پلی اتیلن گلیکول، پاکلوبوترازول و جیبرلین بر بافت کالوس در محیط های کشت مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که تنش خشکی ناشی از تیمار پلی اتیلن گلیکول باعث کاهش معنی دار وزن تر، وزن خشک، محتوی آب و میزان رشد نسبی بافت کالوس استویا شد. تنش خشکی با جلوگیری از بزرگ شدن سلول ها و کاهش تقسیم سلولی سبب کاهش رشد می شود (Anjum et al. 2011). گزارشات مشابهی مبنی بر اثر منفی تنش خشکی بر رشد گیاهان استویا (Hajihashemi and Ehsanpour 2013)، سویا (Specht et al. 2001) و *Abelmoschus esculentus* (Sankar et al. 2007) موجود می باشد. در واقع کاهش وزن تر کالوس نه تنها به دلیل کاهش بیوماس گیاه بود بلکه بخشی از آن مربوط کاهش محتوی آب بافت کالوس بود. کاهش در مقدار نسبی آب در پاسخ به تنش خشکی در انواع مختلفی از گیاهان مانند *Phaseolus vulgaris* (Türkan et al. 2005)، سویا (Sakthivelu et al. 2008)، فلفل (Anjum et al. 2012) سورگوم (Zhang and Kirkham 1996) گزارش شده است.

در تحقیق حاضر، تیمارهای پاکلوبوترازول و جیبرلین سبب افزایش معنی دار وزن تر، وزن خشک، محتوی آب و میزان رشد نسبی بافت کالوس شدند و همچنین اثرات منفی تنش خشکی را بر روی گیاه استویا کاهش داد. پاکلوبوترازول سبب کاهش اثرات مخرب تنش خشکی بر رشد گیاه می شود (Fletcher et al. 2000). براساس گزارشات Hajihashemi et al (۲۰۱۳)، تیمار پاکلوبوترازول سبب کاهش اثرات مضر تنش خشکی بر روی بیوماس و محتوی آب گیاه *Stevia rebaudiana* شد. با کاهش محتوی آب گیاه در تنش خشکی، ترشح هورمون ها مانند جیبرلین و فعالیت بعضی از آنزیم ها کمتر شده و در نتیجه رشد گیاهی دچار کاهش می شود (Anjum et al. 2012). تیمار جیبرلین سبب افزایش تولید بیوماس *Thymus vulgaris* در شرایط

تنش خشکی و افزایش مقاومت گیاه به کم آبی شد (PAZOKI et al. 2012). بدین ترتیب نتایج این آزمایشات با گزارشات سایر محققین همخوانی داشت و اعمال همزمان تیمارهای پاکلوبوترازول و جیبرلین با پلی اتیلن گلیکول سبب کاهش اثرات مضر تنش خشکی بر روی رشد کالوس استویا شد. براساس گزارش Chen et al (۲۰۰۵)، تیمار پاکلوبوترازول در محیط کشت باعث افزایش میزان نشاسته به عنوان منبع انرژی در بافت کالوس گیاه *Hemerocallis* spp. گردید که متعاقباً میزان رشد و وزن بافت کالوس افزایش یافت. هورمون رشد جیبرلین با تخریب پروتئین‌های Della سبب تحریک ژن‌های محرک رشد و افزایش رشد سلول‌ها و وزن بافت گیاهی می‌شود (Achard and Genschik 2009).

تنش خشکی با تاثیر بر عوامل مختلف مانند جذب و انتقال یونها، کربوهیدرات‌ها و غیره باعث کاهش رشد گیاه می‌شود (Sankar et al. 2007). کربوهیدرات‌ها از قبیل گلوکز، فروکتوز، سوکروز و نشاسته نقش مهمی در حفظ پتانسیل اسمزی به‌عنده دارند (Parvaiz and Satyawati 2008). کربوهیدرات‌ها علاوه بر تطابق و حفاظت اسمزی، در ذخیره کربن و تصفیه رادیکال‌های آزاد نیز نقش مهمی به‌عنده دارند (Anjum et al. 2012). با توجه به نقش حفاظتی قندها در برابر تنش اسمزی در این تحقیق به بررسی تغییرات میزان کربوهیدرات‌ها در کالوس استویا تیمار شده با پلی اتیلن گلیکول، جیبرلین و پاکلوبوترازول پرداختیم. گیاه *Stevia rebaudiana* قادر به تولید استیویول گلیکوزیدها می‌باشد که این مولکول‌های شیرین دارای تعداد متغیری از گلوکز می‌باشند که ممکن است تحت تاثیر تیمارهای مختلف میزان آنها تغییر نمایند (Geuns and Struyf 2010). در تحقیق حاضر مقادیر کربوهیدرات محلول و احیاء کالوس استویا در تیمار پلی اتیلن گلیکول کاهش معنی داری نشان داد. اعمال تیمارهای توام پاکلوبوترازول و جیبرلین با پلی اتیلن گلیکول از اثرات منفی تنش خشکی بر میزان کربوهیدرات‌ها جلوگیری نمودند که می‌توانند در مقاومت بیشتر کالوس استویا در برابر تنش نقش داشته باشد. گیاهان با تجمع قندهای مختلف در پاسخ به پاکلوبوترازول و جیبرلین در شرایط تنش و ایفای نقش‌های مختلف حفاظتی از جمله تنظیم اسمولاریته سلولی و حفاظت ساختارهای سلولی مقاومت گیاهان را افزایش می‌دهند (Sankar et al. 2007). در گیاهان تراریخته مقاوم به تنش شوری، قندهای محلول نقش مهمی را در حفاظت از غشاء و یا ساختارهای درون سلولی در برابر آسیب ناشی از تنش شوری ایفا نمودند (Rajam et al. 1998).

لیپیدها یکی از فراوان ترین جزء غشاء می باشند و نقش مهمی در مقاومت سلول های گیاهان به تنش های محیطی ایفا می کنند (Yardanov et al. 2003). کمبود آب سبب ایجاد اختلال در ارتباط بین چربی ها و پروتئین های غشاء و فرآیندهای غشایی و همچنین انتقال مواد از خلال غشاء می شود (Rahdari and Hoseini 2012). رادیکال های آزاد ناشی از تنش خشکی عامل پراکسیداسیون لیپیدها و تخریب غشاء در گیاهان هستند (Nair et al. 2008). مقدار پراکسیداسیون لیپیدها نشان دهنده شدت تنش خشکی در نظر گرفته می شود زیرا هرچه تنش خشکی شدیدتر باشد میزان پراکسیداسیون لیپیدها افزایش می یابد (Jemai et al. 2008). تنش خشکی سبب افزایش معنی دار میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء در بافت کالوس استویا شد درحالیکه تیمارهای پاکلوبوترازول و جیبرلین در سطح معنی داری سبب تعدیل اثرات مخرب تنش خشکی بر لیپیدهای غشاء کالوس استویا شد که می تواند منجر به حفظ ساختار طبیعی سلول ها در کالوس و کاهش نکروزه شدن کالوس در تیمار پلی اتیلن گلیکول شود. گزارشات مشابهی با نتایج این تحقیق در گیاه لفل، *Phaseolus vulgaris* و آویشن وجود دارد (Anjum et al. 2005, PAZOKI et al. 2012, Türkan et al. 2012). نتایج این تحقیق نشان داد که تیمارهای پاکلوبوترازول و جیبرلین در کاهش میزان پراکسیداسیون در کالوس های تیمار شده با پلی اتیلن گلیکول موثر بودند.

افزایش غلظت فنل ها در جاروب کردن رادیکالهای آزاد و مهار پراکسیداسیون لیپیدها موثر است. براساس بررسی های تحقیق حاضر، کمترین میزان فنل در کالوس شاهد (بدون تیمار) در مقایسه با سایر تیمارهای پلی اتیلن گلیکول، پاکلوبوترازول و جیبرلین مشاهده شد. Shukla et al. (۲۰۰۹) بیان نمودند که رابطه مستقیمی بین میزان فنل و خاصیت آنتی اکسیدانی در گیاه *Stevia rebaudiana* وجود دارد که نتایج حاصل از این مطالعه را تایید می نماید. آلفاتوکوفرول از ترکیبات محلول در چربی است و به همراه سایر آنتی اکسیدانها در نگهداری یکپارچگی غشاء در شرایط تنش نقش مهمی ایفا می کند (Munne-Bosch and Penuelas 2003). توکوفرول ها مولکولهای آمفی پاتیک شامل یک حلقه قطبی کرومانول و یک دم چربی دوست ایزوپرنیلی هستند. این مولکولها به عنوان آنتی اکسیدان های مهمی مطرح هستند که قادر به حذف گونه های فعال اکسیژن و رادیکالهای لیپید پیروکسیل در محیط های چربی دوست هستند. گیاهان در پاسخ به تنش هایی از جمله نور شدید، دمای پائین، خشکی و شوری، سطوح توکوفرول خود را تغییر می دهند. کاهش میزان آلفاتوکوفرول در گیاه ترانس ژن تنباکو سبب کاهش مقاومت گیاه به تنش های

غیر زیستی گردید (Abbasi et al. 2007). با توجه به نقش آنتی اکسیدانی آلفاتوکوفرول می توان نتیجه گیری نمود که کالوس استویا با آلفاتوکوفرول سبب کاهش اثرات مضر تنش خشکی می شود.

به طور کلی بررسی شاخص های رشد، میزان کربوهیدرات های احیا و محلول و پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء کالوس های *Stevia rebaudiana* در پاسخ به تنش خشکی ناشی از تیمار پلی اتیلن گلیکول نشان داد که کالوس این گیاه به تنش خشکی حساس است که این مسئله نتایج سایر تحقیقات بر روی گیاه استویا را تایید می نماید (Hajihashemi and Ehsanpour 2013). تیمارهای پاکلوبوترازول و جیبرلین با افزایش رشد، بیوماس و محتوی آب کالوس، میزان کربوهیدرات ها، فنل ها و آلفاتوکوفرول، و کاهش میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء در گیاهان تیمار شده با پلی اتیلن گلیکول سبب کاهش اثرات مضر تنش خشکی شدند. نتایج این تحقیق با اثبات کارآمدی تیمارهای پاکلوبوترازول و جیبرلین در کاهش اثرات منفی تنش خشکی زمینه را برای مطالعات بیشتر در زمینه افزایش مقاومت *Stevia rebaudiana* در سطح سلولی در بافت کالوس و دستکاریهای ژنتیکی فراهم نمود.

نتایج نشان می دهد که کالوس *S. rebaudiana* مقدار زیادی H_2O_2 در پاسخ به PEG تجمع می دهد که با یافته های قبلی ما در گیاه استویا مطابقت دارد (Hajihashemi and Ehsanpour 2013). تنش خشکی با تنش اکسیداتیو ناشی از افزایش تجمع ROS، به ویژه H_2O_2 در کلروپلاست، میتوکندری و پراکسیزوم ها توأم است. در نتیجه، القا فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان یک استراتژی برای غلبه گیاهان بر تنش های اکسیداتیو است (Foyer and Noctor 2003). نتایج این تحقیق یک همبستگی مثبت بین تجمع H_2O_2 و فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در کالوس های تحت تیمار PEG نشان داد. پراکسید هیدروژن به سرعت توسط آنزیم های آنتی اکسیدانت به آب و اکسیژن تجزیه می شود (Guo et al. 2006). القا فعالیت کاتالاز تحت تنش آبی و ارتباط مثبت بین افزایش بیان آن و تحمل به تنش، به خوبی اثبات شده است (Anjum et al. 2012). آنزیمهای کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز با افزایش پراکسید هیدروژن در کالوس های تیمار شده با پلی اتیلن گلیکول افزایش معنی داری نشان دادند که نقش مهمی در سم زدایی H_2O_2 داشتند.

همان‌طور که بیان شد گیاهان علاوه بر آنزیم‌های آنتی‌اکسیداتیو، آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی را نیز برای تصفیه رادیکال‌های آزاد تحت تنش خشکی به‌کار می‌برند. آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی از قبیل کاتالاز، پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز و سوپر اکسید دیسموتاز و آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی شامل مولکول‌هایی مانند اسید آسکوربیک، گلوتاتیون، توکوفرول و کاروتنوئیدها می‌باشند که می‌توانند ROS را تصفیه کنند. اسیدآسکوربیک و توکوفرول‌ها توانایی کمی برای انتقال الکترون دارند و به‌وسیله انتقال اتم‌های هیدروژن به رادیکال‌های ROS آنها را احیاء کرده و همین امر آنها را به آنتی‌اکسیدان‌های مؤثری تبدیل کرده است (Arora et al. 2002). میزان آنتی‌اکسیدانت کل در پاسخ به تیمارهای مختلف در کالوس استویا به طور قابل توجهی افزایش یافت.

یکی از عوارض جانبی ناشی از تنش خشکی تولید ROS است که با پروتئین واکنش نشان می‌دهد و منجر به تجزیه پروتئین‌ها می‌شود (Torres-Franklin et al. 2008). تجمع پروتئین‌ها در پاسخ به تنش خشکی نه تنها به حفظ آب بافت کمک می‌کند بلکه از آسیب‌های ناشی از تجمع رادیکال‌های آزاد اکسیژن در پاسخ به تنش خشکی جلوگیری می‌کند (Anjum et al. 2012). تجمع پروتئین‌ها در کالوس‌های تحت تیمار پاکلوبوترازول و جیبرلین توام با تنش خشکی سبب افزایش مقاومت کالوس استویا به تنش خشکی می‌شود. تنظیم اسمزی در تنش خشکسالی می‌تواند با تجمع اسیدهای آمینه، پرولین، پروتئین و متابولیت‌های دیگر همراه باشد که در نگهداری آب سلول نقش مهمی دارد (Anjum et al. 2012).

نتیجه‌گیری

گیاه *Stevia rebaudiana* بومی یک منطقه نیمه مرطوب می‌باشد و نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که کالوس این گیاه همانند گیاه استویا به تنش خشکی حساس می‌باشد. تنش خشکی در کالوس استویا سبب تحریک آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز شد. موثرترین آنزیم در جاروب کردن H_2O_2 در گیاهان استویا آنزیم کاتالاز بود. تیمارهای پاکلوبوترازول و جیبرلین در کالوس‌های تحت تنش خشکی میزان آنتی‌اکسیدانت‌های آنزیم و غیر آنزیمی را افزایش داد و به این ترتیب حفاظت آنتی‌اکسیدانی کالوس استویا را در برابر تنش خشکی افزایش داد که می‌توان به کاهش ملاحظه شده در میزان H_2O_2 اشاره نمود.

Abbasi, A.-R., Hajirezaei, M., Hofius, D., Sonnewald, U.&Voll, L. M. (2007) Specific roles of α -and γ -tocopherol in abiotic stress responses of transgenic tobacco. *Plant physiology*, 143(4), 1720-1738.

Achard, P.&Genschik, P. (2009) Releasing the brakes of plant growth: how GAs shutdown DELLA proteins. *Journal of Experimental Botany*, 60(4), 1085-1092.

Aebi, H. (1984) [13] Catalase in vitro. *Methods in enzymology*, 105, 121-126.

Anjum, S. A., Farooq, M., Xie, X.-y., Liu, X.-j. & Ijaz, M. F. (2012) Antioxidant defense system and proline accumulation enables hot pepper to perform better under drought. *Scientia Horticulturae*, 140, 66-73.

Anjum, S. A., Xie, X., Wang, L., Saleem, M. F., Man, C. & Lei, W. (2011) Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress. *African journal of agriculture science*, 6, 2016-2032.

Arora, A., Sairam, R. & Srivastava, G. (2002) Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Current Science*, 1227-1238.

Asada, K. (1992) Ascorbate peroxidase—a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiologia plantarum*, 85(2), 235-241.

Baker, H., Frank, O., DeAngelis, B. & Feingold, S. (1980) Plasma tocopherol in man at various times after ingesting free or acetylated tocopherol. *Nutrition Reports International*, 1(4), 536-539.

Bates, L., Waldren, R. & Teare, I. (1973) Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and soil*, 39(1), 205-207.

Beauchamp, C. & Fridovich, I. (1971) Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical biochemistry*, 44(1), 276-287.

Benzie, I. F. & Strain, J. J. (1996) The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical biochemistry*, 239(1), 70-76.

Bohlmann, J., Meyer-Gauen, G. & Croteau, R. (1998) Plant terpenoid synthases: molecular biology and phylogenetic analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(8), 4126-4133.

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(1-2), 248-254.

Brandle, J. & Telmer, P. (2007) Steviol glycoside biosynthesis. *Phytochemistry*, 68(14), 1855-1863.

Chai, L.-y., Yong, W., Yang, Z.-h., Mubarak, H. & Mirza, N. (2017) Physiological characteristics of *Ficus tikoua* under antimony stress. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China*, 27(4), 939-945.

Chen, J., Hall, D. E. & De Luca, V. (2005) Effects of the growth retardant paclobutrazol on large-scale micropropagation of daylily (*Hemerocallis* spp.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 41(1), 58-62.

DuBois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. t. & Smith, F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry*, 28(3), 350-356.

Fletcher, R. A., Gilley, A., Davis, T. D., Sankhla, N. & 2000. . *Horticu. Rev.* 24 (2000) Triazoles as plant growth regulators and stress protectants. *Horticultural reviews*, 24, 55-138.

Foyer, C. H. & Noctor, G. (2003) Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiologia plantarum*, 119(3), 355-364.

Geuns, G. M. C. & Struyf, T. (2010) Radical scavenging activity of steviol glycosides and steviol glucuronide. Geuns, J.M.C. (ed), pp. 191-207, Kuleuven, Belgium.

Geuns, J. M. C. (2003) Stevioside. *Phytochemistry*, 64, 913-921.

Ghisalberti, E. (1997) The biological activity of naturally occurring kaurane diterpenes. *Fitoterapia*, 68, 303-325.

Guo, R., Sun, D., Tan, Z., Rong, D. & Li, C. (2006) Two recessive genes controlling thermophotoperiod-sensitive male sterility in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 112(7), 1271-1276.

Hajihashemi, S. & Ehsanpour, A. A. (2013) Influence of exogenously applied paclobutrazol on some physiological traits and growth of *Stevia rebaudiana* under in vitro drought stress. *Biologia*, 68(3), 414-420.

Hajihashemi, S. & Ehsanpour, A. A. (2014) Antioxidant response of *Stevia rebaudiana* B. to polyethylene glycol and paclobutrazol treatments under in vitro culture. *Applied biochemistry and biotechnology*, 172(8), 4038-4052.

Hajihashemi, S., Geuns, J. M. & Ehsanpour, A. A. (2013) Gene transcription of steviol glycoside biosynthesis in *Stevia rebaudiana* Bertoni under polyethylene glycol, paclobutrazol and gibberellic acid treatments in vitro. *Acta physiologiae plantarum*, 35(6), 2009-2014.

Hajihashemi, S. & Geuns, J. M. C. (2016) Gene transcription and steviol glycoside accumulation in *Stevia rebaudiana* under polyethylene glycol-induced drought stress in greenhouse cultivation. *FEBS Open Bio*, 6(9), 937-944.

Heath, R. L.&Packer, L. (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Archives of biochemistry and biophysics, 125(1), 189-198.

Humphrey ,T. V., Richman, A. S., Menassa, R.&Brandle, J. E. (2006) Spatial organisation of four enzymes from *Stevia rebaudiana* that are involved in steviol glycoside synthesis. Plant molecular biology, 61(1-2), 47-62.

Ibrahim, I., Nasr, M., Mohammedm, B.&El-Zefzafi ,M. (2008) Nutrient factors affecting in vitro cultivation of *Stevia rebaudiana*. Sugar Tech, 10(3), 248-253.

Imlay, J. A.&Linn, S. (1988) DNA damage and oxygen radical toxicity. Science, 240(4857), 1302-1309.

Jaleel, C. A., Manivannan, P., Sankar, B., Kishorekumar, A., Sankari, S.&Panneerselvam, R. (2007) Paclobutrazol enhances photosynthesis and ajmalicine production in *Catharanthus roseus*. Process Biochemistry, 42(11), 1566-1570.

Jeffries, T. W., Yang, V. W.&Davis, M. W. (1998) Comparative study of xylanase kinetics using dinitrosalicylic, arsenomolybdate, and ion chromatographic assays. Applied biochemistry and biotechnology, 70(1), 257-265.

Jemai, H., Fki, I., Bouaziz, M., Bouallagui, Z., El Feki, A., Isoda, H.&Sayadi, S. (2008) Lipid-lowering and antioxidant effects of hydroxytyrosol and its triacetylated derivative recovered from olive tree leaves in cholesterol-fed rats. Journal of agricultural and food chemistry, 56(8), 2630-2636.

Kim, I.-S., Yang, M., Lee, O.-H.&Kang, S.-N. (2011) The antioxidant activity and the bioactive compound content of *Stevia rebaudiana* water extracts. LWT-Food Science and Technology, 44(5), 1328-1332.

Kinghorn, A. D.&Soejarto, D. D. (2002) Discovery of terpenoid and phenolic sweeteners from plants. Pure and Applied Chemistry, 74(7), 1169-1179.

Kohda, H., Kasai, R., Yamasaki, K., Murakami, K.&Tanaka, O. (1976) New sweet diterpene glucosides from *Stevia rebaudiana*. Phytochemistry, 15(6), 981-983.

Liu, Y., Wu, Q., Ge, G., Han, G.&Jia, Y. (2018) Influence of drought stress on alfalfa yields and nutritional composition. BMC Plant Biology, 18(1), 13.

Lokhande, R. S., Singare, P. U.&Pimple, D. S. (2011) Toxicity study of heavy metals pollutants in waste water effluent samples collected from Taloja industrial estate of Mumbai, India. *Resources and Environment*, 1(1), 13-19.

Munne-Bosch, S.&Penuelas, J. (2003) Photo-and antioxidative protection, and a role for salicylic acid during drought and recovery in field-grown *Phillyrea angustifolia* plants. *Planta*, 217(5), 758-766.

Murashige, T.&Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3), 473-497.

Nair, A. S., Abraham, T.&Jaya, D. (2008) Studies on the changes in lipid peroxidation and antioxidants in drought stress induced cowpea (*Vigna unguiculata* L.) varieties. *J. Environ. Biol*, 29, 689-691.

Nakano, Y.&Asada, K. (1987) Purification of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts; its inactivation in ascorbate-depleted medium and reactivation by monodehydroascorbate radical. *Plant and cell physiology*, 28(1), 131-140.

Parvaiz, A.&Satyawati, S. (2008) Salt stress and phyto-biochemical responses of plants-a review. *Plant Soil and Environment*, 54(3), 89.

PAZOKI, A., Rezaei, H., Habibi, D.&Paknejad, F. (2012) EFFECT OF DROUGHT STRESS, ASSCORBATE AND GIBBERELLIN FOLIAR APPLICATION ON SOME MORPHOLOGICAL TRAITS, RWC AND CELL MEMBRANE STABILITY OF THYME (*THYMUS VULGARIS* L.).

Rahdari, P.&Hoseini, S. M. (2012) Drought stress: a review. *International Journal of Agronomy and Plant Production*, 3(10), 443-446.

Rajam, M., Dagar, S., Waie, B., Yadav, J., Kumar, P., Shoeb, F.&Kumria, R. (1998) Genetic engineering of polyamine and carbohydrate metabolism for osmotic stress tolerance in higher plants. *Journal of biosciences*, 23.473, (4)

Rena, A. B.&Splittstoesser, W. E. (1975) Proline dehydrogenase and pyrroline-5-carboxylate reductase from pumpkin cotyledons. *Phytochemistry*, 14(3), 657-661.

Roghayyeh, S., Saeede, R., Omid, A.&Mohammad, S. (2014) The effect of salicylic acid and gibberellin on seed reserve utilization, germination and enzyme activity of sorghum (*Sorghum bicolor* L.) seeds under drought stress. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*, 10.(1)

Sairam, R. K.&Tyagi, A. (2004) Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants Current Science, 86(3), 407-421.

Sakthivelu, G., Devi, M. A., Giridhar, P., Rajasekaran, T., Ravishankar, G., Nedev, T.&Kosturkova, G. (2008) Drought-induced alterations in growth, osmotic potential and in vitro regeneration of soybean cultivars. General and Applied Plant Physiology, 34(1-2), 103-112.

Sankar, B., Jaleel, C. A., Manivannan, P., Kishorekumar, A., Somasundaram, R.&Panneerselvam, R. (2007) Effect of paclobutrazol on water stress amelioration through antioxidants and free radical scavenging enzymes in *Arachis hypogaea* L. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 60(2), 229-235.

Shock, C. (1982) Experimental cultivation of *Rebaudiana Stevia* in California. Davis Agron. Progr. Rep., Univ. California.

Shukla, S., Mehta, A., Bajpai, V. K.&Shukla, S. (2009) In vitro antioxidant activity and total phenolic content of ethanolic leaf extract of *Stevia rebaudiana* Bert. Food and Chemical Toxicology, 47(9), 2338-2343.

Siddiqui, M., Khan, M., Mohammad, F.&Khan, M. (2008) Role of nitrogen and gibberellin (GA3) in the regulation of enzyme activities and in osmoprotectant accumulation in *Brassica juncea* L. under salt stress. Journal of Agronomy and Crop Science, 194(3), 214-224.

Singleton, V.&Rossi, J. A. (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. American journal of Enology and Viticulture, 16(3), 144-158.

Sivaram, L.&Mukundan, U. (2003) In vitro culture studies on *Stevia rebaudiana*. In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant, 39(5), 520-523.

Specht, J., Chase, K., Macrander, M., Graef, G., Chung, J., Markwell, J., Germann, M., Orf, J.&Lark, K. (2001) Soybean response to water. Crop science, 41(2), 493-509.

Stines, A. P., Naylor, D. J., Høj, P. B.&Van Heeswijck, R. (1999) Proline accumulation in developing grapevine fruit occurs independently of changes in the levels of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase mRNA or protein. Plant physiology, 120(3), 923-923.

Torres-Franklin, M. L., Contour-Ansel, D., Zuily-Fodil, Y.&Pham-Thi, A.-T. (2008) Molecular cloning of glutathione reductase cDNAs and analysis of GR gene expression in cowpea and common bean leaves during recovery from moderate drought stress. Journal of plant physiology, 165(5), 514-521.

Türkan, I., Bor, M., Özdemir, F. & Koca, H. (2005) Differential responses of lipid peroxidation and antioxidants in the leaves of drought-tolerant *P. acutifolius* Gray and drought-sensitive *P. vulgaris* L. subjected to polyethylene glycol mediated water stress. *Plant Science*, 168(1), 223-231.

Uddin, M. S., Chowdhury, M. S. H., Khan, M. M. M. H., Uddin, M. B., Ahmed, R. & Baten, M. (2006) In vitro propagation of *Stevia rebaudiana* Bert in Bangladesh. *African Journal of Biotechnology*, 5(13)

Velikova, V., Yordanov, I. & Edreva, A. (2000) Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: protective role of exogenous polyamines. *Plant Science*, 151(1), 59-66.

Wang, X. & Quinn, P. J. (2000) The location and function of vitamin E in membranes. *Molecular membrane biology*, 1, 156-163, (3)

Yamasaki, K., Kohda, H., Kobayashi, T., Kasai, R. & Tanaka, O. (1976) Structures of stevia diterpene-glucosides: Application of ¹³C NMR. *Tetrahedron Letters*, 17(13), 1005-1008.

Yordanov, I., Velikova, V. & Tsonev, T. (2003) Plant responses to drought and stress tolerance. *Bulg J Plant Physiol*, (Special Issue), 187-206.

Yemm, E., Cocking, E. & Ricketts, R. (1955) The determination of amino-acids with ninhydrin. *Analyst*, 80(948), 209-214.

Zhang, J. & Kirkham, M. (1996) Lipid peroxidation in sorghum and sunflower seedlings as affected by ascorbic acid, benzoic acid, and propyl gallate. *Journal of plant physiology*, 149(5), 489-493.