بررسی اثر تیمارهای پاکلوبوترازول و جیبرلین بر تعدیل تنش خشکی در بافت کالوس گیاه *Stevia rebaudiana*

شکوفه حاجی‌هاشمی[1*] و شکیبا رجب‌پور[2]

[1]گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه صنعتی خاتم الانبیاء بهبهان، خوزستان، [2] گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران

(تاریخ دریافت: ١٣٩٥/٠٤/٢٥، تاریخ پذیرش نهایی: ١٣٩٥/٠٧/٢٨)

چکیده:

تنش خشکی یکی از عوامل محدود کننده رشد و تولید گیاهان در سراسر جهان است. گیاه *Stevia rebaudiana* بومی منطقه نیمه مرطوب پاراگوئه و دارای ترکیبات شیرین کننده استویول گلیکوزیدها با خاصیت دارویی می‌باشد. در این مطالعه کالوس‌های حاصل از گیاه *Stevia rebaudiana* در محیط‌های کشت MS تحت تیمارهای مختلف پلی‌اتیلن گلیکول، پاکلوبوترازول و جیبرلین کشت داده شدند و سپس برخی از خصوصیات رشد و فیزیولوژیک مورد مطالعه قرار گرفتند. نتایج نشان داد که پلی‌اتیلن گلیکول سبب کاهش میزان وزن‌تر، وزن خشک، رشد نسبی و محتوای آب کالوس‌ها شد درحالیکه تیمارهای پاکلوبوترازول و جیبرلین سبب کاهش اثرات منفی تنش خشکی بر رشد کالوس‌ها شدند. تنش خشکی بر روی لیپیدهای غشاء اثر منفی داشت و باعث پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء و افزایش معنی‌دار مالون دی‌آلدئید شد. تیمارهای پاکلوبوترازول و جیبرلین سبب کاهش پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء ناشی از تیمار پلی‌اتیلن گلیکول شدند. میزان کربوهیدرات‌های احیاء و محلول در پاسخ به تنش خشکی کاهش معنی‌داری نشان دادند درحالیکه تیمارهای جیبرلین و پاکلوبوترازول از اثرات منفی تنش خشکی و افت میزان کربوهیدرات‌ها پیشگیری نمودند. کربوهیدرات‌ها در تطابق اسمزی و حفظ ساختارهای سلولی نقش مهمی را ایفا می‌کنند. کالوس‌های استویا در پاسخ به تیمارهای پلی‌اتیلن گلیکول، جیبرلین و پاکلوبوترازول میزان آنتی‌اکسیدان‌های فنل و آلفاتوکوفرول را افزایش دادند که در کاهش اثرات منفی تنش اکسیداتیو ناشی از تنش خشکی نقش دارند. بر اساس بررسی نتایج، کالوس حاصل از گیاه *Stevia* حساس به تنش خشکی است و تیمارهای پاکلوبوترازول و جیبرلین سبب تعدیل اثرات سوء تنش خشکی بر روی کالوس‌های این گیاه می‌شوند.

کلمات کلیدی: *Stevia rebaudiana*، پاکلوبوترازول، تنش خشکی، جیبرلین، کالوس

مقدمه:

استویا (*Stevia rebaudiana* Bertoni)، گیاه دارویی از تیره آستراسه و بومی منطقه نیمه مرطوب پاراگوئه است. ارزش دارویی گیاه استویا به دلیل سنتز شیرین کننده طبیعی استویول گلیکوزیدها می‌باشد. استویول گلیکوزیدهای دارای اسکلت تتراسیکلیک ترپنی هستند و تقریباً ١٥٠ تا ٣٠٠ مرتبه شیرین‌تر از شکر هستند. استویول گلیکوزیدها به مدت بیش از یک قرن است که به عنوان یک شیرین کننده طبیعی فاقد کالری توسط

*نویسنده مسؤل، نشانی پست الکترونیکی: hajihashemi@bkatu.ac.ir

مردم بومی منطقه پاراگوئه استفاده می‌شوند (Brandle and Telmer, 2007; Geuns, 2003). استویا گیاهی خودناسازگار است و به دلیل عدم تلقیح موفق، بذرهای این گیاه دارای قدرت کم جوانه‌زنی هستند. لذا یکی از راهکارهای مناسب تکثیر این گیاه تکنیک کشت بافت و شرایط کشت درون شیشه (*in vitro*) می‌باشد (Hajihashemi and Ehsanpour, 2013; Sivaram and Mukundan, 2003).

خشکی یکی از مهمترین تنش‌های محیطی است و از بین عوامل محیطی تنش‌زا، خشکی دومین عامل اصلی کاهش عملکرد گیاهان بعد از عوامل بیماری‌زا می‌باشد. این کاهش در نتیجه تأخیر 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*., 2016; Krasensky and Jonak, 2012). پاسخ گیاهان به تنش خشکی متفاوت است و خصوصیات مورفولوژیک و فیزیولوژیک زیادی در مقاومت به خشکی مؤثر هستند. تنش خشکی با کاهش محتوی آب گیاه سبب بسته شدن روزنه‌ها وبه دنبال آن 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 تنظیم کننده اسمزی با این تنش‌ها مقابله می‌کنند. مواد تنظیم کننده اسمزی بیشتر شامل اسیدهای آمینه، قندها برخی یون‌های معدنی، هورمون‌ها و پروتئین‌ها هستند (Liu *et al*., 2000). تنش اسمزی ناشی از تنش خشکی سبب تولید رادیکالهای آزاد اکسیژن (ROS) و تنش ثانویه اکسیداتیو می‌شوند. تجمع ROS به‌دلیل این‌که سبب آسیب اکسیداتیو به لیپیدهای غشاء، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک می‌شوند برای سلول‌ها بسیار مضر می‌باشند (Sairam and Tyagi, 2004). راه‌های مختلفی برای کنترل ROSدر گیاهان وجود دارد و به عنوان مثال می‌توان به سنتز آنتی‌اکسیدانت‌های غیر آنزیمی فنل‌ها و آلفاتوکوفرول اشاره نمود (Liu *et al*., 2000). 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. یکی از ویژگیهای مهم ترکیبات فنلی خاصیت آنتی‌اکسیدانتی است که با گروه‌های هیدروکسیلی در ساختار مولکولی آنها در ارتباط است (Hatano *et al*., 1990; Halliwell and Gutteridge, 2015). آلفاتوکوفرول نیز در جذب و خنثی کردن رادیکالهای آزاد نقش مهمی در گیاهان ایفا می‌کنند (Wang and Quinn, 2000).

امروزه بازدارنده‌های سنتز هورمون جیبرلین به طور وسیعی جهت مبارزه با تنش‌های محیطی کاربرد دارند (Jaleel *et al*., 2007; Sankar *et al*., 2007). پاکلوبوترازول با دخالت در مسیر بیوسنتز اسید جیبرلیک در مرحله اکسیداسیونانت-کائورن به انت-کائورونیک اسید از تولید این هورمون گیاهی ممانعت می‌کنند. پاکلوبوترازول یک نمونه بسیار فعال و پرکاربرد 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)، *Triticum aestivum* (Aly and Latif, 2011)، *Phillyrea angustifolia* (Fernandez *et al*., 2006)، *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 (Hajihashemi and Ehsanpour, 2014; Jaleel *et al*., 2007). همچنین گزارشاتی مبنی بر افزایش مقاومت گیاهان به تنش در اثر تیمار جیبرلین در گیاهان *Brassica juncea* (Siddiqui *et al*., 2008)، *Sorghum bicolor* (Sheykhbaglou *et al*., 2014)، *Zea mays* (Kaya *et al*., 2006) و *Hordeum vulgare* (Vettakkorumakankav *et al*., 1999) وجود دارد. 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 (ناصری و همکاران ۱۳۹۰).

کشت بافت و سلول گیاهی یک ابزار مفید برای مطالعه مکانیسم‌های تحمل تنش تحت شرایط درون شیشه‌ای است (Satyavathi *et al*., 2004). کشت کالوس برای بررسی تحمل

تنش در یک محیط مشخص با شرایط کنترل شده، در یک دوره زمانی کوتاه مؤثر 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. در این راستا وزن‌تر، وزن خشک، محتوی آب گیاه، میزان رشد نسبی گیاه، کربوهیدرات‌های احیا و محلول، پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء، آلفاتوکوفرول و فنل کالوس اندازه گیری شدند.

مواد و روش‌ها:

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 D–۲,٤ و ۲ میلی گرم بر لیتر کینتین قرار گرفتند. پس از ٤ 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 پلی‌اتیلن گلیکول (صفر و ٤٪ 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 بوده بودند مجدداً توزین شدند و با کم کردن وزن اولیه، تغییرات وزن‌تر 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 شده‌اند 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.*, 2010):

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

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 (Sun and Hong, 2010):

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

RWC= محتوی آب نسبی

FW: وزن‌تر کالوس

DW: وزن خشک کالوس

قند 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. به‌این‌صورت 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 میلی‌لیتر اسید سولفوریک غلیظ به آن اضافه شد. این مخلوط به‌مدت ۱۰ دقیقه در محیط نگهداری شده و پس از آن به‌مدت

٢٠-١٠ دقیقه در حمام آب گرم ٣٠-٢٥ درجه سانتیگراد قرار داده شد و سپس جذب محلول در ٤٩٠ خوانده شد و با کمک منحنی استاندارد مربوطه میزان کربوهیدرات‌های محلول محاسبه شد (Dubois *et al.*, 1956).

قند احیا: برای این اندازه‌گیری، ابتدا محلولی از ترکیب دی نیترو سالیسیلیک اسید ١٪، سود ١/٦٪ و تارتارات سدیم-پتاسیم ٢٥٪ مخلوط شدند. سپس ٢ میلی‌لیتر از عصاره گیاهی استخراج شده با ١ میلی‌لیتر از رنگ ساخته شده مخلوط و به مدت ١٠ دقیقه در حمام آب جوش ١٠٠ درجه سانتیگراد قرار داده شد، سپس محلول به‌دست آمده با ١٠ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط شد و جذب نمونه‌ها در ٥٤٦ 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 غشا، غلظت مالون دی‌الدئید (MDA) که محصول پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیر اشباع می‌باشد، اندازه گیری شد. اندازه گیری مالون دی‌الدئید به روش Heath و Packer (١٩٨٦) انجام شد. طبق این روش ٠/٢ گرم از بافت تر با ٥ میلی‌لیتر ٠/٠١ درصد TCA سائیده شد. به یک میلی‌لیتر از عصاره حاصل از سانتریفوژ، ٤ میلی‌لیتر محلول‌تری کلرو استیک اسید ٢٠ درصد که حاوی ٠/٥ درصد تیوباربیوتوریک اسید (TBA) بود، اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت ٣٠ دقیقه در دمای ٩٥ درجه سانتیگراد در حمام آبگرم حرارت داده شد سپس بلافاصله بر روی یخ سرد شد و دوباره مخلوط به مدت ١٠ دقیقه در دور 10000 rpm سانتریفوژ شد. سپس شدت جذب این محلول در طول موج ٥٣٢ نانومتر خوانده شد. جذب بقیه رنگیزه های غیر اختصاصی در ٦٠٠ نانومتر تعیین و از این مقدار کسر شد. برای محاسبه غلظت مالون دالدئید از ضریب خاموشی معادل $155\ mM^{-1}\ Cm^{-1}$ استفاده شد.

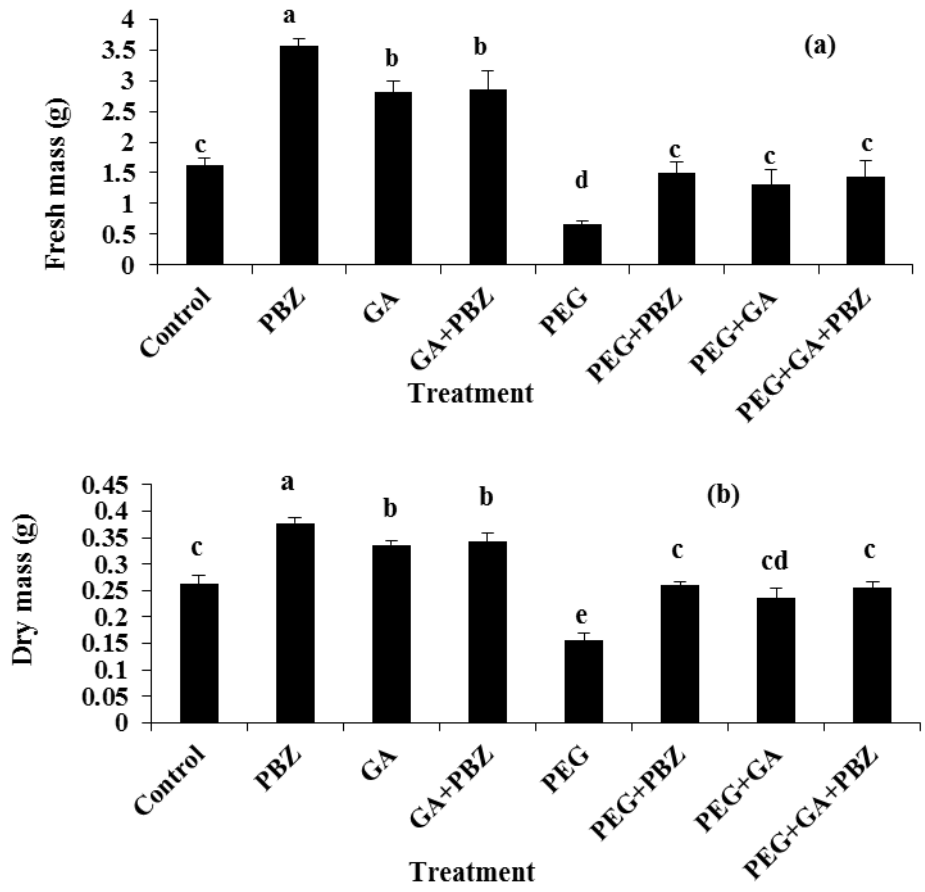
آلفاتوکوفرول: برای اندازه‌گیری آلفاتوکوفرول ٠/٥ گرم از نمونه با استفاده از ١٠ میلی‌لیتر متانول اسیدی ساییده شده و پس از ١٠ دقیقه سانتریفوژ شد (Baker *et al.*, 1980). سپس ٥ میلی‌لیتر عصاره را با ١ میلی‌لیتر TPTZ مخلوط می‌کنیم و پس از ١٠ دقیقه در تاریکی، ٢٠ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شده و جذب نمونه‌ها را در ٥٢٠ نانومتر می‌خوانیم. برای رسم منحنی استاندارد از آلفاتوکوفرول خالص با غلظت‌های ٠-٢٠٠ میکرومولار استفاده شد.

فنل: میزان فنل با استفاده از معرف فولین اندازه گیری شد (Singleton and Rossi, 1965). صد میلی گرم از نمونه توسط اتانول ٩٥ درصد ساییده شده و به مدت ٢٤ ساعت در تاریکی نگهداری گردید. سپس نمونه سانتریفوژ شده و سپس به یک میلی‌لیتر از عصاره، ١/٥ میلی‌لیتر اتانول ٩٥٪، ٥ میلی‌لیتر آب مقطر و ٠/٥ میلی‌لیتر معرف فولین ٥٠٪ افزوده شد. نمونه‌ها به مدت ١ ساعت در تاریکی نگهداری شدند و سپس جذب نمونه‌ها در طول موج ٧٢٥ نانومتر خوانده شد. میزان فنل بر اساس منحنی استاندارد حاصل از اسید گالیک محاسبه گردید.

نتایج:

بر اساس نتایج حاصل از بررسی شاخص‌های رشد، تیمارهای پاکلوبوترازول و جیبرلین میزان وزن‌تر، وزن خشک، محتوی آب و رشد نسبی کالوس‌های استویا را در حد معنی‌داری افزایش دادند و بیشترین میزان افزایش در تیمار پاکلوبوترازول مشاهده شد (شکل‌های ١ و ٢). تیمار پلی‌اتیلن گلیکول میزان رشد نسبی، وزن خشک، وزن‌تر و محتوی آب کالوس را در سطح معنی‌داری کاهش داد و میزان آنها به ترتیب معادل ٣٤٪، ٤٠٪، ٦٠٪ و ٦٣٪ کمتر از گیاهان شاهد بود. نتایج نشان داد که بیشترین و کمترین تأثیر منفی تنش خشکی بر شاخص‌های رشد به ترتیب در محتوی آب و میزان رشد نسبی کالوس ملاحظه شد. تیمارهای پاکلوبوترازول و جیبرلین سبب کاهش معنی‌دار اثرات مضر پلی‌اتیلن گلیکول بر شاخص‌های رشد مذکور شدند. میزان وزن‌تر، وزن خشک، محتوی آب و رشد نسبی کالوس در تیمار پلی‌اتیلن گلیکول توام با پاکلوبوترازول و جیبرلین تقریباً معادل گیاه شاهد (بدون تیمار) بودند و کاهش معنی‌داری نشان ندادند.

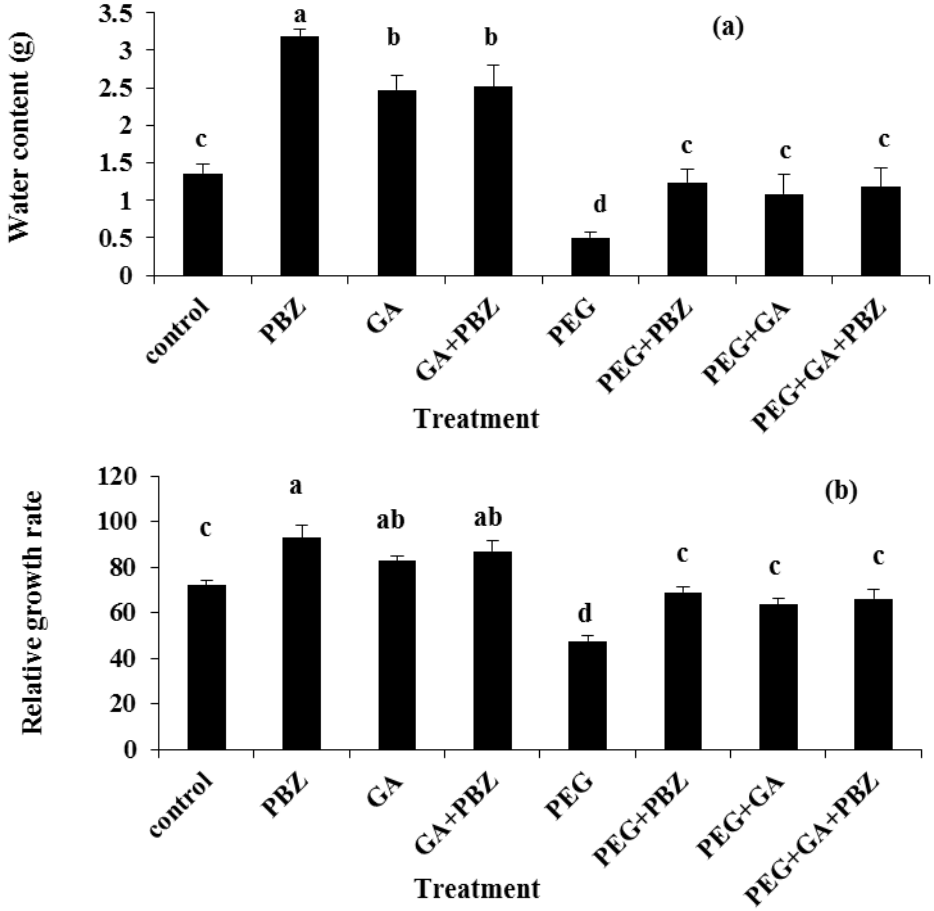
اثر تیمارهای مختلف بر میزان قندهای محلول کالوس گیاه



شکل ۱- تغییرات وزن‌تر (a ;Fresh mass) و وزن خشک (b ;Dry mass) کالوس *Stevia rebaudiana* در تیمارهای پاکلوبوترازول (PBZ)، جیبرلین (GA) و پلی‌اتیلن گلیکول (PEG). داده‌ها میانگین ۳ تکرار ±SD و حروف نامشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار ($P\leq 0.05$) بر اساس آزمون Duncan می‌باشد.

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 ٤٥٪، ٢٢٪ و ٢٨٪ بیشتر از گیاه شاهد بود. تیمار پلی‌اتیلن گلیکول میزان قندهای محلول کالوس را در مقایسه با گیاه شاهد ٥٤٪ 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 ٥٦٪ بیشتر از گیاهان شاهد شد و در تیمار جیبرلین توام با پاکلوبوترازول میزان افزایش بیشتر و حدود ٦٢٪ بود. بر اساس نتایج، در تیمار پلی‌اتیلن گلیکول میزان کربوهیدرات احیاء در سطح معنی‌داری (حدود ۷۰٪) نسبت به گیاه شاهد کاهش یافت (شکل ۳). میزان کربوهیدرات‌های احیاء تحت تیمارهای پلی‌اتیلن گلیکول توام با پاکلوبوترازول و جیبرلین در سطح معنی‌داری بیشتر از تیمار پلی‌اتیلن گلیکول و تقریباً معادل گیاه شاهد بود.

به منظور بررسی تأثیر تیمارهای مختلف بر میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء میزان مالون دی‌آلدئید (MDA) بررسی شد (شکل ٤). در تیمارهای پاکلوبوترازول و جیبرلین

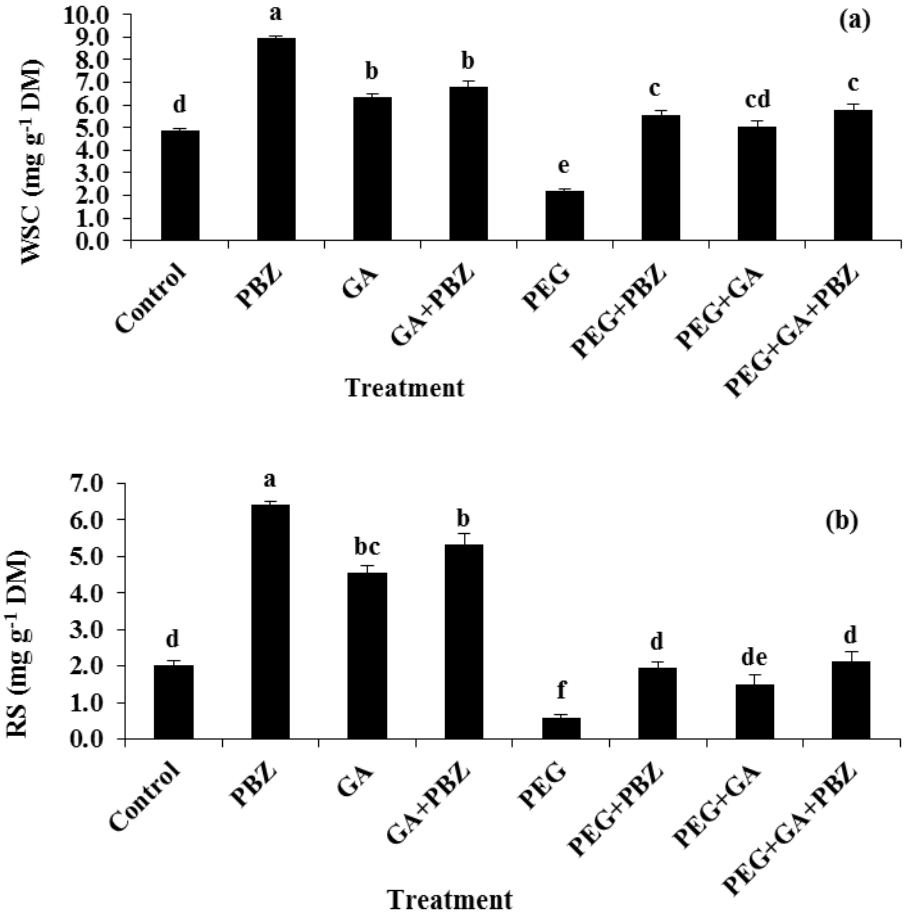


شکل ۲- تغییرات محتوی آب (Water content; a) و رشد نسبی (Relative growth rate; b) کالوس *Stevia rebaudiana* در تیمارهای پاکلوبوترازول (PBZ)، جیبرلین (GA) و پلی‌اتیلن گلیکول (PEG). داده‌ها میانگین ۳ تکرار ±SD و حروف نامشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار ($P\leq 0.05$) بر اساس آزمون Duncan می‌باشد.

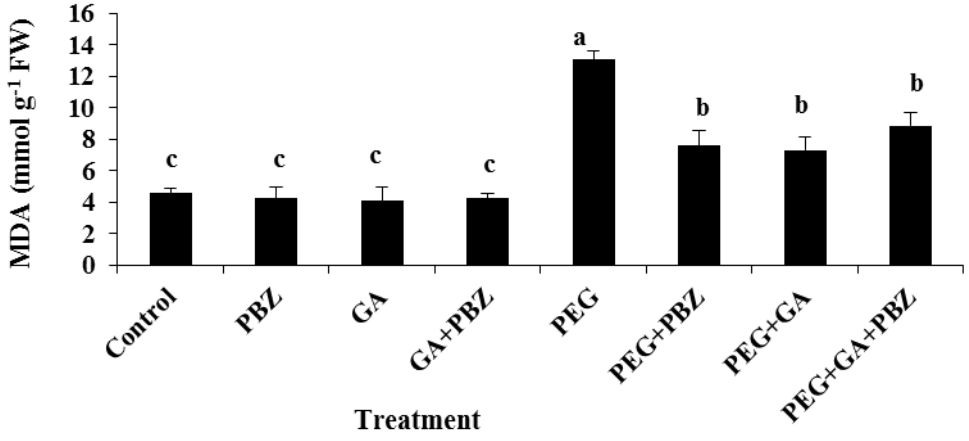
میزان MDA تقریباً معادل گیاه شاهد بود و تغییر معنی‌داری ملاحظه نشد. میزان MDA کالوس تحت تیمار پلی‌اتیلن گلیکول افزایش معنی‌داری نشان داد و حدود سه برابر بیشتر از گیاهان شاهد بود. تیمارهای پاکلوبوترازول و جیبرلین سبب کاهش معنی‌دار اثرات منفی پلی‌اتیلن گلیکول بر روی لیپیدهای غشاء شدند. میزان MDA در گیاهان تیمار شده با پلی‌اتیلن گلیکول توام با پاکلوبوترازول و جیبرلین به ترتیب کاهش ٤١٪ و ٤٤٪ در مقایسه با گیاهان تیمار شده با پلی‌اتیلن گلیکول تنها نشان دادند (شکل ۳-۱۱).

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 ٥). تیمار پاکلوبوترازول میزان آلفاتوکوفرول را در مقایسه با گیاه شاهد ۸٥٪ افزایش داد. میزان آلفاتوکوفرول در تیمار جیبرلین حدود ٧٤٪ افزایش یافت درحالیکه تیمار توام جیبرلین و پاکلوبوترازول میزان آلفاتوکوفرول را ۸۳٪ افزایش داد. تنش خشکی ناشی از پلی‌اتیلن گلیکول منجر به افزایش معنی‌دار میزان آلفاتوکوفرول (تقریباً ۸۰٪) شد. در پاسخ به تیمارهای پاکلوبوترازول و جیبرلین توام با پلی‌اتیلن گلیکول میزان آلفاتوکوفرول کالوس‌ها تقریباً یکسان بود و تفاوت معنی‌داری بین آنها ملاحظه نشد.

نتایج بررسی میزان فنل نشان داد که میزان تجمع فنل در کالوس استویا در تیمارهای مختلف در سطح معنی‌داری افزایش یافت (شکل ٦). میزان فنل کالوس استویا در تیمارهای

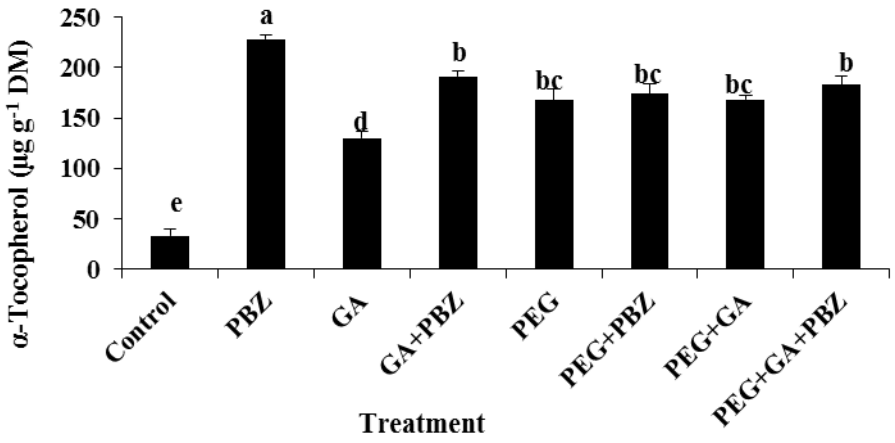


شکل ۳- تغییرات میزان قند محلول (WSC; a) و قند احیاء (RS; b) کالوس *Stevia rebaudiana* در تیمارهای پاکلوبوترازول (PBZ)، جیبرلین (GA) و پلی‌اتیلن گلیکول (PEG). DM: وزن خشک. داده‌ها میانگین ۳ تکرار ±SD و حروف نامشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار ($P\leq 0.05$) بر اساس آزمون Duncan می‌باشد.

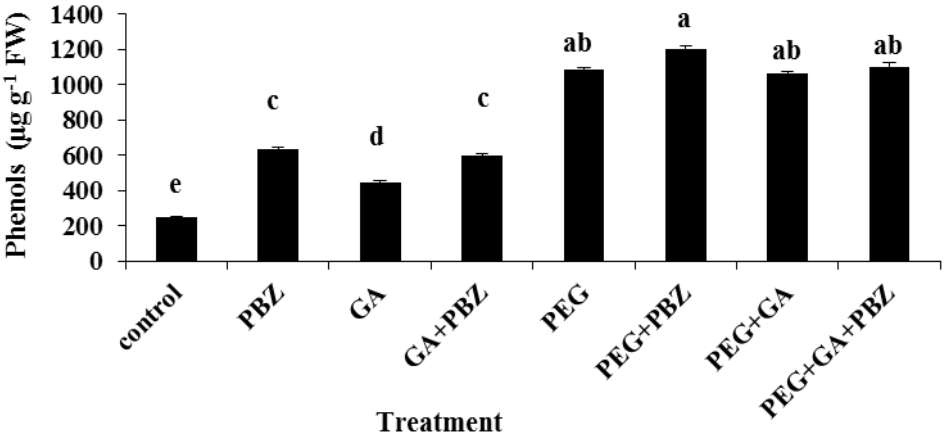


شکل ٤- تغییرات میزان مالون دی‌آلدئید (MDA) کالوس *Stevia rebaudiana* در تیمارهای پاکلوبوترازول (PBZ)، جیبرلین (GA) و پلی‌اتیلن گلیکول (PEG). داده‌ها میانگین ۳ تکرار ±SD و حروف نامشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار ($P\leq 0.05$) بر اساس آزمون Duncan می‌باشد.

پاکلوبوترازول، جیبرلین و تیمار توام جیبرلین با پاکلوبوترازول به ترتیب ٦٠٪، ٤٤٪ و ٥٨٪ بیشتر از شاهد بود. در پاسخ به



شکل ۵- تغییرات میزان آلفاتوکوفرول کالوس *Stevia rebaudiana* در تیمارهای پاکلوبوترازول (PBZ)، جیبرلین (GA) و پلی‌اتیلن گلیکول (PEG). DM: وزن خشک. داده‌ها میانگین ۳ تکرار ±SD و حروف نامشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار ($P\leq 0.05$) بر اساس آزمون Duncan می‌باشد.



شکل ٦-تغییرات میزان فنل کالوس *Stevia rebaudiana* در تیمارهای پاکلوبوترازول (PBZ)، جیبرلین (GA) و پلی‌اتیلن گلیکول (PEG). داده‌ها میانگین ۳ تکرار ±SD و حروف نامشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار ($P\leq 0.05$) بر اساس آزمون Duncan می‌باشد.

تیمار پلی‌اتیلن گلیکول میزان فنل افزایش معنی‌داری نشان داد و ۷۷٪ بیشتر از گیاه شاهد بود. تیمارهای مختلف پلی‌اتیلن گلیکول با جیبرلین و پاکلوبوترازول باعث افزایش معنی‌دار فنل شد درحالی‌که تفاوت معنی‌داری بین آنها مشاهده نشد.

بحث:

خشکی یکی از مهمترین تنش‌های محیطی است که تولید محصول را در قسمت‌های مختلف جهان به خصوص ایران که به عنوان کشور خشک و نیمه‌خشک شناسایی شده است، کاهش می‌دهد (کوچکی و همکاران ۱۳۷٤). گیاه دارویی *Stevia rebaudiana* Bertoni بومی منطقه نیمه‌مرطوب آمامبی می‌باشد و تنش خشکی یک عامل محدود کننده برای رشد و تولید شیرین کننده استویول گلیکوزیدها در این گیاه است (Hajihashemi and Ehsanpour, 2013; Hajihashemi *et al.*, 2013; Hajihashemi and Geuns 2016). در این تحقیق تأثیر تیمارهای مختلف پلی‌اتیلن گلیکول، پاکلوبوترازول و جیبرلین بر بافت کالوس در محیط‌های کشت مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که تنش خشکی ناشی از تیمار پلی‌اتیلن گلیکول باعث کاهش معنی‌دار وزن‌تر، وزن خشک، محتوی آب و میزان رشد نسبی بافت کالوس استویا شد. تنش خشکی با جلوگیری از بزرگ شدن سلول‌ها و کاهش تقسیم سلولی سبب کاهش رشد می‌شود (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; Zhang *et al.*, 2004) ، مرکبات (Wu *et al.*, 2008)، *Abelmoschus esculentus* (Sankar *et al.*, 2007) آفتابگردان (Hussain *et al.*, 2008; Kiani *et al.*, 2008) و پنبه (Massacci *et al.*, 2008) موجود می‌باشد. در واقع کاهش وزن‌تر 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 معنی‌دار وزن‌تر، 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 می‌شود (Fletcher *et al.*, 2010; Jungklang *et al.*, 2015). براساس گزارشات Hajihashemi وEhsanpour (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 هورمون‌ها مانند جیبرلین و فعالیت بعضی از آنزیم‌ها کمتر شده و در نتیجه رشد گیاهی دچار کاهش می‌شود (Anjum *et al.*, 2012). تیمار جیبرلین سبب افزایش تولید بیوماس *Thymus vulgaris* در شرایط تنش خشکی و افزایش مقاومت گیاه به کم آبی شد (پازکی و همکاران ۱۳۹۱). بدین ترتیب نتایج این آزمایشات با گزارشات سایر محققین همخوانی داشت (Akter *et al.*, 2014) و اعمال همزمان تیمارهای پاکلوبوترازول و جیبرلین با پلی‌اتیلن گلیکول سبب کاهش اثرات مضر تنش خشکی بر روی رشد کالوس استویا شد. براساس گزارش Chen و همکاران (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 *et al.*, 2009).

تنش خشکی با تأثیر بر عوامل مختلف مانند جذب و انتقال یونها، کربوهیدرات‌ها و غیره باعث کاهش رشد گیاه می‌شود (Sankar *et al.*, 2007). کربوهیدارت‌ها از قبیل گلوکز، فروکتوز، سوکروز و نشاسته نقش مهمی در حفظ پتانسیل اسمزی به‌عهده دارند (Parvaiz and Satyawati, 2008). کربوهیدرات‌ها علاوه بر تطابق و حفاظت اسمزی، در ذخیره کربن و تصفیه رادیکال‌های آزاد نیز نقش مهمی به‌عهده 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 پلی‌اتیلن گلیکول، جیبرلین و پاکلوبوترازول پرداختیم. گیاه *Stevia rebaudiana* قادر به تولید استویول گلیکوزیدها می‌باشد که این مولکول‌های شیرین دارای تعداد متغیری از گلوکز می‌باشند که ممکن است تحت تأثیر تیمارهای مختلف میزان آنها تغییر نمایند (Geuns, 2010). در تحقیق حاضر مقادیر کربوهیدرات محلول و احیاء کالوس استویا در تیمار پلی‌اتیلن گلیکول کاهش معنی‌داری نشان داد. اعمال تیمارهای توام پاکلوبوترازول و جیبرلین با پلی‌اتیلن 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 (Akter *et al.*, 2014; 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 (Djilianov *et al.*, 2005; Rajam *et al.*, 1998) آزمایشات ما نیز در تأیید نتایج مطالعات گذشته نشان داد که تیمارهای پاکلوبوترازول (Akter *et al.*, 2014; Fletcher *et al.*, 2010) و جیبرلین

(ناصری و همکاران ۱۳۹۰) از کاهش مقادیر کربوهیدرات‌ها در تنش خشکی جلوگیری نمود و میزان قندها تقریباً معادل گیاه شاهد (بدون تیمار) بود.

لیپیدها یکی از فراوان‌ترین جزء غشاء می‌باشند و نقش مهمی در مقاومت سلول‌های گیاهان به تنش‌های محیطی ایفا می‌کنند(Yordanov *et al*., 2000). کمبود آب سبب ایجاد اختلال در ارتباط بین چربی‌ها و پروتئین‌های غشاء و فرآیندهای غشایی و همچنین انتقال مواد از خلال غشاء می‌شود (Rahdari and Hoseini, 2012). رادیکال‌های 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 می‌شود زیرا هرچه تنش خشکی شدیدتر باشد میزان پراکسیداسیون لیپیدها افزایش می‌یابد (Jemai *et al*., 2008). تنش خشکی سبب افزایش معنی‌دار میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء در بافت کالوس استویا شد درحالیکه تیمارهای پاکلوبوترازول و جیبرلین در سطح معنی‌داری سبب تعدیل اثرات مخرب تنش خشکی بر لیپیدهای غشاء کالوس استویا شد که می‌تواند منجر به حفظ ساختار طبیعی سلول‌ها در کالوس و کاهش نکروزه شدن کالوس در تیمار پلی‌اتیلن گلیکول شود. گزارشات مشابهی با نتایج این تحقیق در گیاه فلفل (Anjum *et al*., 2012)، گندم (Aly and Latif, 2011)، یونجه (Boldaji *et al*., 2012)، *Phaseolus vulgaris* (Türkan *et al*., 2005)، جو (ناصری و همکاران ۱۳۹۰)، آویشن (پازکی و همکاران ۱۳۹۱)، وجود دارد. نتایج این تحقیق نشان داد که تیمارهای پاکلوبوترازول و جیبرلین در کاهش میزان پراکسیداسیون در کالوس‌های تیمار شده با پلی‌اتیلن گلیکول مؤثر بودند.

افزایش غلظت فنل‌ها در جاروب کردن رادیکالهای آزاد و مهار پراکسیداسیون لیپیدها مؤثر است (Blasco *et al*., 2013). براساس بررسی‌های تحقیق حاضر، کمترین میزان فنل در کالوس شاهد (بدون تیمار) در مقایسه با سایر تیمارهای پلی‌اتیلن گلیکول، پاکلوبوترازول و جیبرلین مشاهده شد. Shulka و همکاران (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 تأیید می‌نماید. آلفاتوکوفرول از ترکیبات محلول در چربی است و به همراه سایر آنتی‌اکسیدانها در نگهداری یکپارچگی غشاء در شرایط تنش نقش مهمی ایفا می‌کند (Munne-Bosch and Penuelas, 2003). توکوفرول‌ها مولکول‌های آمفی‌پاتیک شامل یک حلقه قطبی کرومانول و یک دم چربی دوست ایزوپرنیلی هستند. این مولکولها به عنوان آنتی اکسیدان‌های مهمی مطرح هستند که قادر به حذف گونه‌های فعال اکسیژن و رادیکال‌های لیپید پیروکسیل در محیط‌های چربی دوست هستند. گیاهان در پاسخ به تنش‌هایی از جمله نور شدید، دمای پائین، خشکی و شوری، سطوح توکوفرول خود را تغییر می‌دهند (Seo *et al*., 2011). کاهش میزان آلفاتوکوفرول در گیاه ترانس ژن تنباکو سبب کاهش مقاومت گیاه به تنش‌های غیر زیستی گردید (Abbasi *et al*., 2007). با توجه به نقش آنتی اکسیدانی آلفاتوکوفرول می‌توان نتیجه گیری نمود که کالوس استویا با آلفاتوکوفرول سبب کاهش اثرات مضر تنش خشکی می‌شود.

به طور کلی بررسی شاخص‌های رشد، میزان کربوهیدرات‌های احیا و محلول و پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء کالوس‌های *Stevia rebaudiana* در پاسخ به تنش خشکی ناشی از تیمار پلی‌اتیلن گلیکول نشان داد که کالوس این گیاه به تنش خشکی حساس است که این مسئله نتایج سایر تحقیقات بر روی گیاه استویا را تأیید می‌نماید (Hajihashemi and Ehsanpour, 2013). تیمارهای پاکلوبوترازول و جیبرلین با افزایش رشد، بیوماس و محتوی آب کالوس، میزان کربوهیدرات‌ها، فنل‌ها و آلفاتوکوفرول، و کاهش میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء در گیاهان تیمار شده با پلی‌اتیلن 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.

منابع:

پازکی، ع.، رضایی، ح.، حبیبی، د. و پاک‌نژاد، ف. (۱۳۹۱) اثر تنش خشکی، محلول پاشی آسکوربات و جیبرلین بر روی برخی صفات مورفولوژیکی، محتوی نسبی آب برگ و پایداری غشای سیتوپلاسمی گیاه آویشن (*Thymus vulgaris* L.). مجله زراعت و اصلاح نبات ۸ (۱): ۱-۱۳

کوچکی، ع.، حسینی، م. و نصیری محلاتی، م. (۱۳۷٤) رابطه آب و خاک در گیاهان زراعی. انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد، مشهد..

ناصری، ز.، عباسی، ف. و محمودزاده، ه. (۱۳۹۰) اثر سطوح مختلف خشکی و جیبرلین بر تجمع پرولین، قندهای محلول و غیرمحلول در برگ جو خوراکی (*Hordeum vulgar* L.). فیزیولوژی محیطی گیاهی (پژوهش‌های اکوفیزیولوژی گیاهی ایران) ٦ (۲): ۱-۱۰

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

Achard, P., Gusti, A., Cheminant, S., Alioua, M., Dhondt, S., Coppens, F., Beemster, G.T. and Genschik, P. (2009) Gibberellin signaling controls cell proliferation rate in Arabidopsis. Current biology 19: 1188-1193.

Akter, N., Islam, M. R., Karim, M. A. and Hossain, T. (2014) Alleviation of drought stress in maize by exogenous application of gibberellic acid and cytokinin. Journal of Crop Science and Biotechnology 17**:** 41-48.

Aly, A. A. and Latif, H. H. (2011) Differential effects of paclobutrazol on water stress alleviation through electrolyte leakage, phytohormones, reduced glutathione and lipid peroxidation in some wheat genotypes (*Triticum aestivum* L.) grown in-vitro. Romainian Biotechnological Letters 6**:** 6710-6721.

Anjum, S. A., Xie, X. Y., Wang, L.-C., Saleem, M. F., Man, C. and Lei ,W. (2011) Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress. African Journal of Agricultural Research 6**:** 2026-2032.

Baker, H., Frank, O., Deangelis, B. and Feingold, S. (1980) Plasma tocopherol in man at various times after ingesting free or acetylated tocopherol. Nutrition Reports International 21**:** 531-536.

Blasco, B. A., Leyva, R., Romero, L. and Ruiz, J. M. (2013) Iodine effects on phenolic metabolism in lettuce plants under salt stress. Journal of agricultural and food chemistry 61**:** 2591-2596.

Boldaji, S. H., Khavari-Nejad, R., Sajedi, R. H., Fahimi, H. and Saadatmand, S. (2012) Water availability effects on antioxidant enzyme activities, lipid peroxidation, and reducing sugar contents of alfalfa (*Medicago sativa* L.) Acta Physiologiae Plantarum 34**:** 1177-1186.

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

Chai, Q., Gan, Y., Zhao, C., Xu, H.-L., Waskom, R. M., Niu, Y. and Siddique, K. H. (2016) Regulated deficit irrigation for crop production under drought stress. A review. Agronomy for Sustainable Development 36**:** 1-21.

Chen, J., Hall, D.E. and 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: 58-62.

Djilianov, D., Georgieva, T., Moyankova, D., Atanassov, A., Shinozaki, K., Smeeken, S., Verma, D. and Murata, N. (2005) Improved abiotic stress tolerance in plants by accumulation of osmoprotectants—gene transfer approach. Biotechnology and Biotechnological Equipment 19**:** 63-71.

Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. and Smith, F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry 28**:** 350-356.

Fernandez, J., Balenzategui, L., Banon, S. and Franco, J. (2006) Induction of drought tolerance by paclobutrazol and irrigation deficit in *Phillyrea angustifolia* during the nursery period. Scientia Horticulturae 107**:** 277-283.

Fletcher, R. A., Gilley, A., Sankhla, N. and Davis, T. D. (2010) Triazoles as plant growth regulators and stress protectants. Horticultural Reviews 24**:** 55-138.

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

Geuns, J. M. (2010) Stevia and steviol glycosides. Euprint, Heverlee.

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

Hajihashemi, S. and 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**:** 414-420.

Hajihashemi, S., Geuns, J. C. and Ehsanpour, 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**:** 2009-2014.

Halliwell, B. and Gutteridge, J.M. (2015) Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press, USA.

Hatano, T., Yasuhara, T., Yoshihara, R., Agata, I., Noro, T. and Okuda, T. (1990) Effects of interaction of tannins with co-existing substances. VII. Inhibitory effects of tannins and related polyphenols on xanthine oxidase. Chemical and Pharmaceutical Bulletin 38**:** 1224-1229.

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.

Hussain, M., Malik, M., Farooq, M., Ashraf, M. and Cheema, M. (2008) Improving drought tolerance by exogenous application of glycinebetaine and salicylic acid in sunflower. Journal of Agronomy and Crop Science 194**:** 193-199.

Jaleel, C. A., Gopi, R., Manivannan, P. and Panneerselvam, R. (2007) Responses of antioxidant defense system of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. to paclobutrazol treatment under salinity. Acta Physiologiae Plantarum 29**:** 205-209.

Jeffries, T. W., Yang, V. W. and Davis, M. W. (1998) Comparative study of xylanase kinetics using dinitrosalicylic, arsenomolybdate, and ion chromatographic assays. Applied Biochemistry and Biotechnology 70**:** 257-265.

Jemai, H., Fki, I., Bouaziz, M., Bouallagui, Z., El Feki, A., Isoda, H. and 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**:** 2630-2636.

Jungklang, J., Saengnil, K. and Uthaibutra, J. (2015) Effects of water-deficit stress and paclobutrazol on growth, relative water content, electrolyte leakage, proline content and some antioxidant changes in *Curcuma alismatifolia* Gagnep. cv. Chiang Mai Pink. Saudi Journal of Biological Sciences.

Kaya, C., Tuna, A. L. and Alfredo, A. A. (2006) Gibberellic acid improves water deficit tolerance in maize plants. Acta Physiologiae Plantarum 28**:** 331-337.

Kiani, S. P., Maury, P., Sarrafi, A. and Grieu, P. (2008) QTL analysis of chlorophyll fluorescence parameters in sunflower (*Helianthus annuus* L.) under well-watered and water-stressed conditions. Plant science 175**:** 565-573.

Kim, I.-S., Yang, M., Lee, O.-H. and Kang, S.-N. (2011) The antioxidant activity and the bioactive compound content of *Stevia rebaudiana* water extracts. LWT-Food Science and Technology 44**:** 1328.۱۳۳۲-

Krasensky, J. and Jonak, C. (2012) Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. Journal of Experimental Botany 63**:** 1593-1608.

Kumar, H., Kaul, K., Bajpai-Gupta, S., Kaul, V. K. and Kumar, S. (2012) A comprehensive analysis of fifteen genes of steviol glycosides biosynthesis pathway in Stevia rebaudiana (Bertoni). Gene 492**:** 276-284.

Liu, Q., Zhang, Y. and Chen, S. (2000) Plant protein kinase genes induced by drought, high salt and cold stresses. Chinese Science Bulletin 45**:** 1153-1157.

Lokhande, V. H., Nikam, T. D. and Penna, S. (2010) Biochemical, physiological and growth changes in response to salinity in callus cultures of *Sesuvium portulacastrum* L. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC) 102:17-25.

Massacci, A., Nabiev, S., Pietrosanti, L., Nematov, S., Chernikova, T., Thor, K. and Leipner, J. (2008) Response of the photosynthetic apparatus of cotton (*Gossypium hirsutum*) to the onset of drought stress under field conditions studied by gas-exchange analysis and chlorophyll fluorescence imaging. Plant Physiology and Biochemistry 46**:** 189-195.

Munne-Bosch, S. and 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**:** 758-766.

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

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

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

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

Rajam, M., Dagar, S., Waie, B., Yadav, J., Kumar, P., Shoeb, F. and Kumria, R. (1998) Genetic engineering of polyamine and carbohydrate metabolism for osmotic stress tolerance in higher plants. Journal of Biosciences 23**:** 473-482.

Sairam, R. and Tyagi, A. (2004) Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. Curent Science-Bangalore 86**:** 407-421.

Sakthivelu, G., Akitha Devi, M., Giridhar, P., Rajasekaran, T., Ravishankar, G., Nikolova, M., Angelov, G., Todorova, R. and Kosturkova, G. (2008) Isoflavone composition, phenol content, and antioxidant activity of soybean seeds from india and bulgaria. Journal of Agricultural and Food Chemistry 56**:** 2090-2095.

Sankar, B., Jaleel, C. A., Manivannan, P., Kishorekumar, A., Somasundaram, R. and 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**:** 229-235.

Satyavathi, V., Jauhar, P., Elias, E. and Rao, M. (2004) Effects of growth regulators on in vitro plant regeneration in durum wheat. Crop Science 44**:** 1839-1846.

Seo, Y. S., Kim, S. J., Harn, C. H. and Kim, W. T. (2011) Ectopic expression of apple fruit homogentisate phytyltransferase gene (MdHPT1) increases tocopherol in transgenic tomato (*Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom) leaves and fruits. Phytochemistry 72**:** 321-329.

Sheykhbaglou, R., Rahimzadeh, S., Ansari, O. and Sedghi, M. (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 and Biochemistry 10.

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

Siddiqui, M., Khan, M., Mohammad, F. and Khan, M. (2008) Role of nitrogen and gibberellin (GA_3) in the regulation of enzyme activities and in osmoprotectant accumulation in Brassica juncea L. under salt stress. Journal of Agronomy and Crop Science 194**:** 214-224.

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

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

Specht, J., Chase, K., Macrander, M., Graef, G., Chung, J., Markwell, J., Germann, M., Orf, J. and Lark, K. (2001) Soybean response to water. Crop Science 41**:** 493-50.۹

Sun, Y.-L. and Hong, S.-K. (2010) Effects of plant growth regulators and L-glutamic acid on shoot organogenesis in the halophyte *Leymus chinensis* (Trin.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC) 100**:** 317-328.

Türkan, I., Bor, M., Özdemir, F. and 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**:** 223-231.

Vettakkorumakankav, N. N., Falk, D., Saxena, P. and Fletcher, R. A. (1999) A crucial role for gibberellins in stress protection of plants. Plant and cell physiology 40**:** 542-548.

Wang, X. and Quinn, P. J. (2000) The location and function of vitamin E in membranes (Review). Molecular Membrane Biology 17**:** 143-156.

Wu, Q.-S., Xia, R.-X. and Zou, Y.-N. (2008) Improved soil structure and citrus growth after inoculation with three arbuscular mycorrhizal fungi under drought stress. European Journal of Soil Biology 4: 122-128.

Yordanov, I., Velikova, V. and Tsonev, T. (2000) Plant responses to drought, acclimation, and stress tolerance. Photosynthetica 38**:** 171-186.

Zhang, J. and Kirkham, M. (1996) Antioxidant responses to drought in sunflower and sorghum seedlings .New Phytologist 132**:** 361-373.

Zhang, M., Duan, L., Zhai, Z., Li, J., Tian, X., Wang, B., He, Z. and Li, Z. (2004) Effects of plant growth regulators on water deficit-induced yield loss in soybean. Proceedings of the 4th International Crop Science Congress, Brisbane, Australia 10: 252-256.