

بررسی اثر تیمارهای پاکلوبوترازول و جیبرلین بر تعدیل تنش خشکی در

بافت کالوس گیاه *Stevia rebaudiana*

شکوفه حاجی‌هاشمی^{۱*} و شکبیا رجب‌پور^۲

^۱گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه صنعتی خاتم‌الانبیاء بهبهان، خوزستان، ^۲گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام‌نور، تهران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۴/۲۵، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۵/۰۷/۲۸)

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 وزن تر، 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:

گلیکوزیدها می‌باشد. استویول گلیکوزیدهای دارای اسکلت تتراسیکلیک ترپنی هستند و تقریباً ۱۵۰ تا ۳۰۰ مرتبه شیرین‌تر از شکر هستند. استویول گلیکوزیدها به مدت بیش از یک قرن است که به عنوان یک شیرین کننده طبیعی فاقد کالری توسط

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

*نویسنده مسؤول، نشانی پست الکترونیکی: hajhashemi@bkatu.ac.ir

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 می‌کند (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). پاكلوبوترازول با دخالت در مسیر بیوسنتز اسید جیبرلیک در مرحله اکسیداسیونانت-کائورن به انت-کائورونیک اسید از تولید این هورمون گیاهی ممانعت می‌کند. پاكلوبوترازول 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 پاكلوبوترازول سبب افزایش مقاومت گیاهان *Arachis hypogaea* (Sankar et al., 2007)، *Triticum aestivum* (Aly and Latif, 2011)، *Phillyrea angustifolia* (Fernandez et al., 2006) و *Stevia rebaudiana* (Hajihashemi and Ehsanpour, 2014) و غیره در برابر تنش خشکی شده است. پاكلوبوترازول با افزایش آنتی‌اکسیدانت‌های 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) و *Zea mays* (Kaya et al., 2006) و *Hordeum vulgare* (Vettakkorumakankav et al., 1999) وجود دارد. تیمار جیبرلین با افزایش میزان رشد، آنتی‌اکسیدان‌ها 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

مردم بومی منطقه پاراگوئه استفاده می‌شوند (Brandle and Telmer, 2007; Geuns, 2003). استویا گیاهی خودناسازگار است و به دلیل عدم تلقیح موفق، بذره‌های 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 و به 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 به دلیل 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 ROS در 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

(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 وزن‌تر کالوس‌ها در اثر تیمار اندازه گیری گردید. به منظور بررسی تغییرات وزن خشک، تعداد شش کالوس قبل از تیمار برداشت شده و در آن با دمای ۷۰ درجه سانتیگراد به مدت ۷۲ ساعت خشک شدند. سپس از آن 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):

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

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):

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

RWC = محتوی آب نسبی

FW: وزن تر 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. 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 میلی‌لیتر اسید سولفوریک غلیظ به آن اضافه شد. این مخلوط به مدت ۱۰ دقیقه در محیط نگهداری شده و پس از آن به مدت

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 (Murashige and Skoog, 1962) MS 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 پلی‌اتیلن گلیکول (صفر و ۰/۴٪ وزنی)، پاکلوبوترازول

میلی لیتر عصاره را با ۱ میلی لیتر TPTZ مخلوط می‌کنیم و پس از ۱۰ دقیقه در تاریکی، ۲۰ میلی لیتر 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 میلی لیتر از عصاره، ۱/۵ میلی لیتر اتانول ۹۵٪، ۵ میلی لیتر آب مقطر و ۰/۵ میلی لیتر 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.

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 ۱ و ۲). 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 ۳۴٪، ۴۰٪، ۶۰٪ و ۶۳٪ 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.

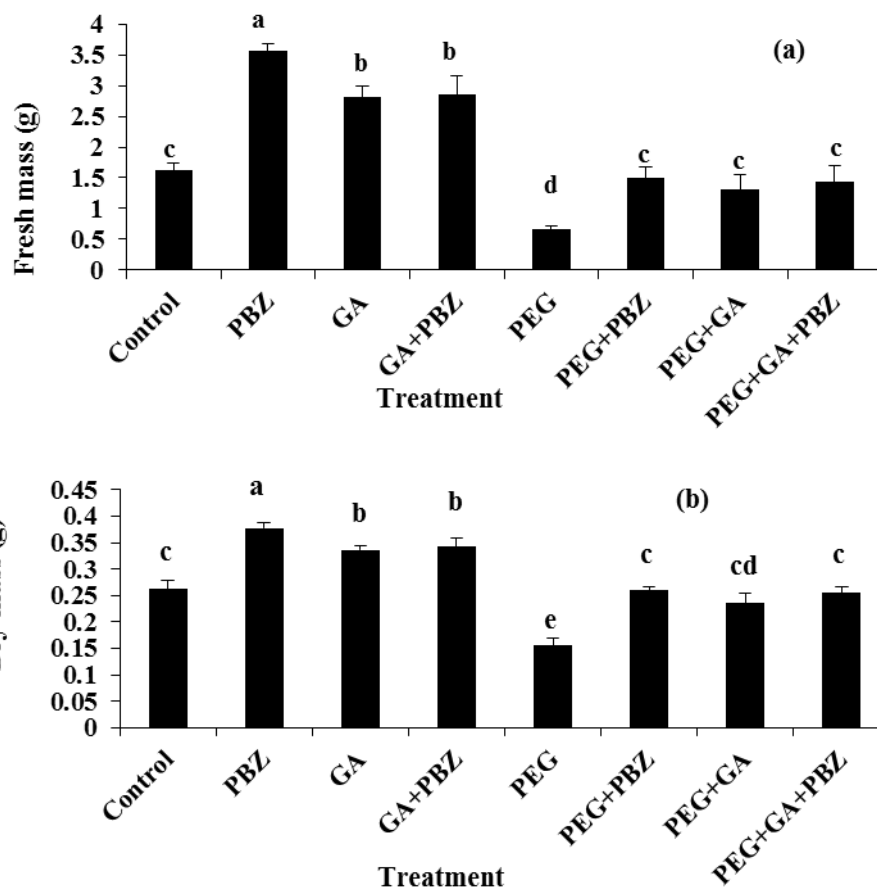
اثر تیمارهای مختلف بر میزان قندهای محلول کالوس گیاه

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 کربوهیدرات‌های محلول محاسبه شد (Dubois et al., 1956)

قند احیا: برای این اندازه‌گیری، 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 به‌دست آمده با ۱۰ میلی لیتر آب مقطر مخلوط شد و جذب نمونه‌ها 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 غشا، غلظت مالون دی‌الدئید (MDA) که محصول پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیر اشباع می‌باشد، اندازه‌گیری شد. اندازه‌گیری مالون دی‌الدئید به روش Heath و Packer (۱۹۸۶) انجام شد. طبق این روش ۰/۲ گرم از بافت تر با ۵ میلی لیتر ۰/۱ 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 تیوباریتوریک 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 رنگیزه‌های 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 میلی لیتر متانول اسیدی ساییده شده و پس از ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد (Baker et al., 1980). سپس ۵

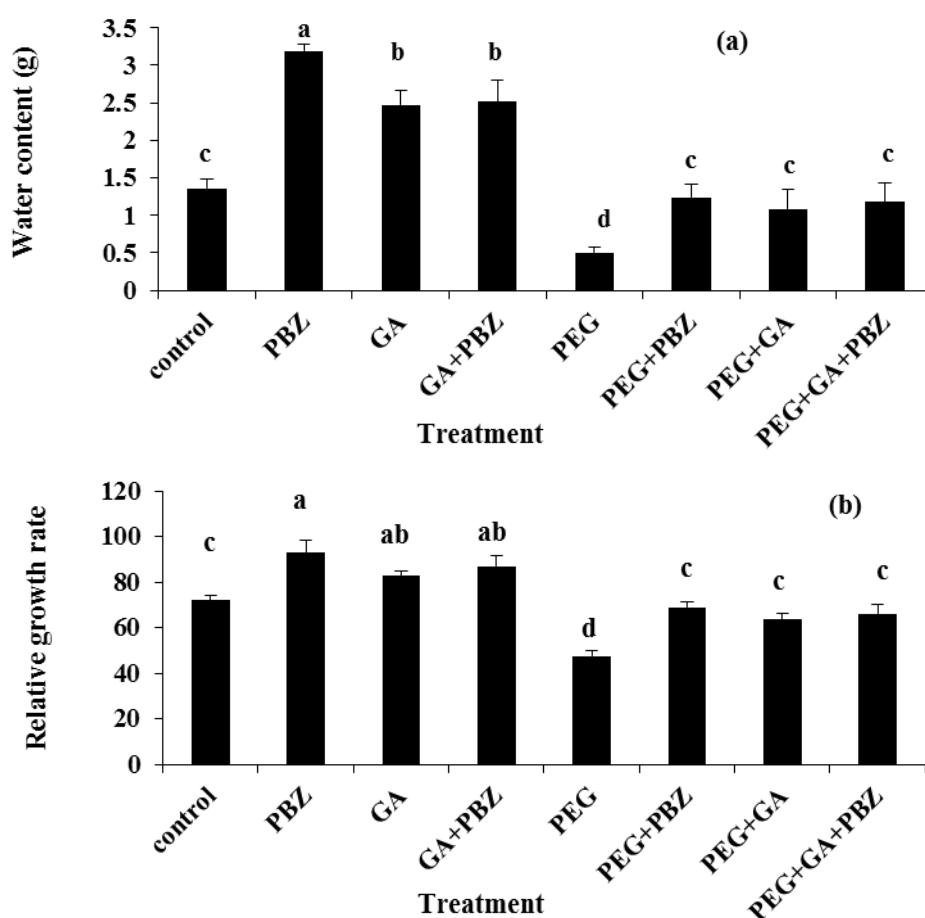


شکل ۱- تغییرات وزن تر (a; Fresh mass) و وزن خشک (b; Dry mass) کالوس *Stevia rebaudiana* در تیمارهای پاکلوبوترازول (PBZ)، جیبرلین (GA) و پلی اتیلن گلیکول (PEG). داده‌ها میانگین ۳ تکرار \pm SD و حروف نامشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار ($P \leq 0.05$) بر اساس آزمون Duncan می‌باشد.

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 پلی اتیلن گلیکول میزان کربوهیدرات احیاء در سطح معنی‌داری (حدود ۷۰٪) نسبت به گیاه شاهد کاهش یافت (شکل ۳). میزان کربوهیدرات‌های احیاء تحت تیمارهای پلی اتیلن گلیکول توام با پاکلوبوترازول و جیبرلین در سطح معنی‌داری بیشتر از تیمار پلی اتیلن 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 ۴). در تیمارهای پاکلوبوترازول و جیبرلین

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 پلی اتیلن گلیکول میزان قندهای محلول کالوس را در مقایسه با گیاه شاهد ۵۴٪ کاهش داد. میزان قند محلول در گیاهان تیمار شده با پلی اتیلن گلیکول توام با پاکلوبوترازول در سطح معنی‌داری بیشتر از گیاه شاهد است. تیمار پلی اتیلن 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



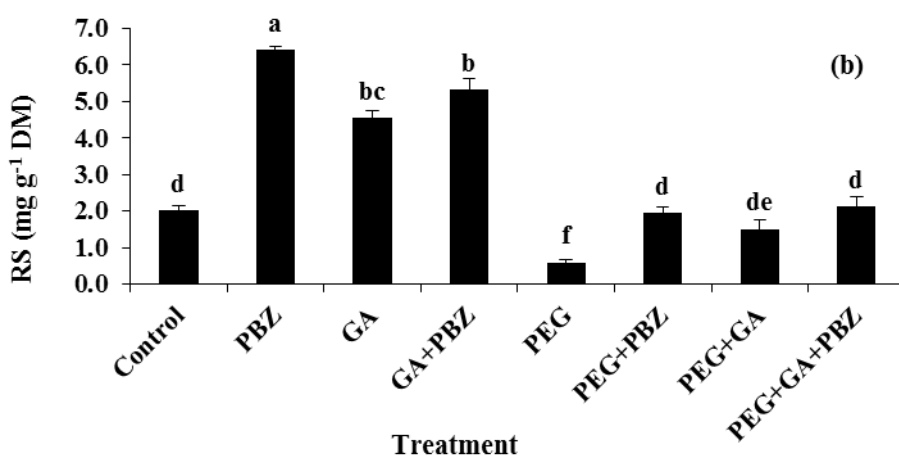
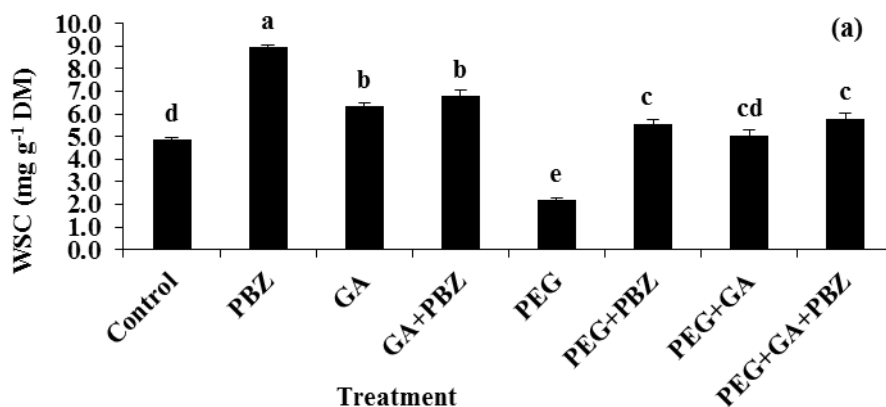
شکل ۲- تغییرات محتوی آب (a; Water content) و رشد نسبی (b; Relative growth rate) کالوس *Stevia rebaudiana* در تیمارهای پاکلوبوترازول (PBZ)، جیبرلین (GA) و پلی اتیلن گلیکول (PEG). داده‌ها میانگین ۳ تکرار \pm SD و حروف نامشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار ($P \leq 0.05$) بر اساس آزمون Duncan می‌باشد.

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.

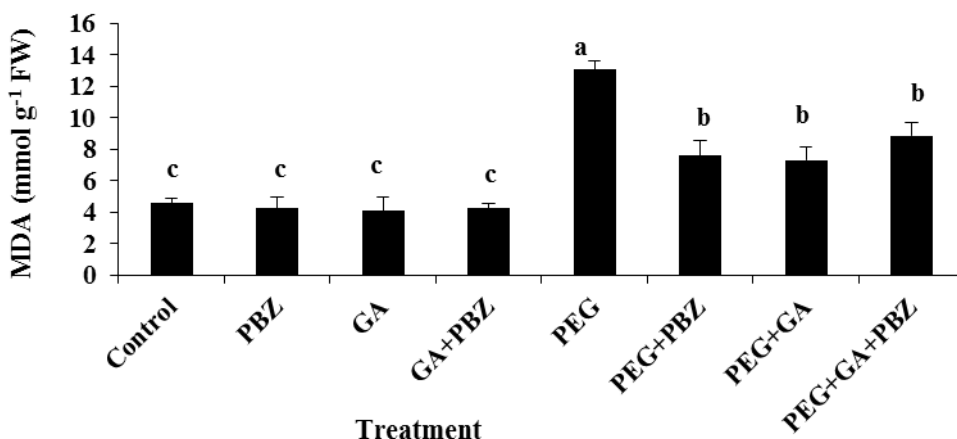
نتایج بررسی میزان فنل نشان داد که میزان تجمع فنل در کالوس استویا در تیمارهای مختلف در سطح معنی‌داری افزایش یافت (شکل ۶). میزان فنل کالوس استویا در تیمارهای

میزان MDA تقریباً معادل گیاه شاهد بود و تغییر معنی‌داری 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 پلی اتیلن گلیکول بر روی لیپیدهای غشاء شدند. میزان MDA در گیاهان تیمار شده با پلی اتیلن گلیکول توام 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).

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).

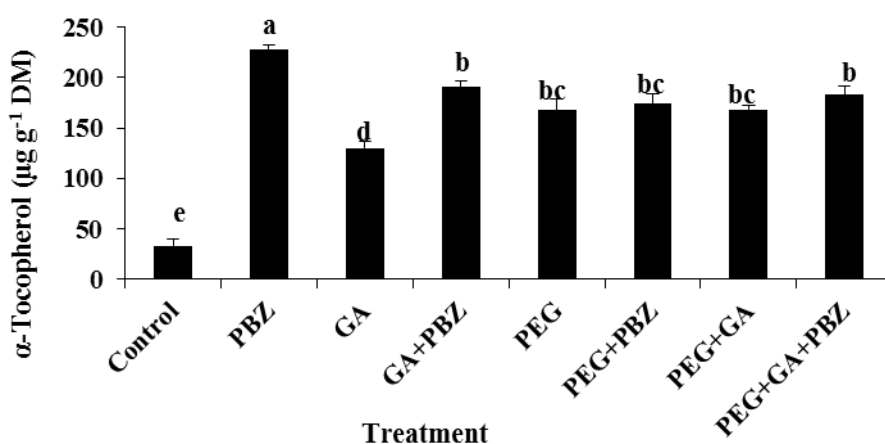


شکل ۳- تغییرات میزان قند محلول (WSC; a) و قند احیاء (RS; b) کالوس *Stevia rebaudiana* در تیمارهای پاکلوبوترازول (PBZ)، جیبرلین (GA) و پلی اتیلن گلیکول (PEG). DM: وزن خشک. داده‌ها میانگین ۳ تکرار \pm SD و حروف نامشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار ($P \leq 0.05$) بر اساس آزمون Duncan می‌باشد.

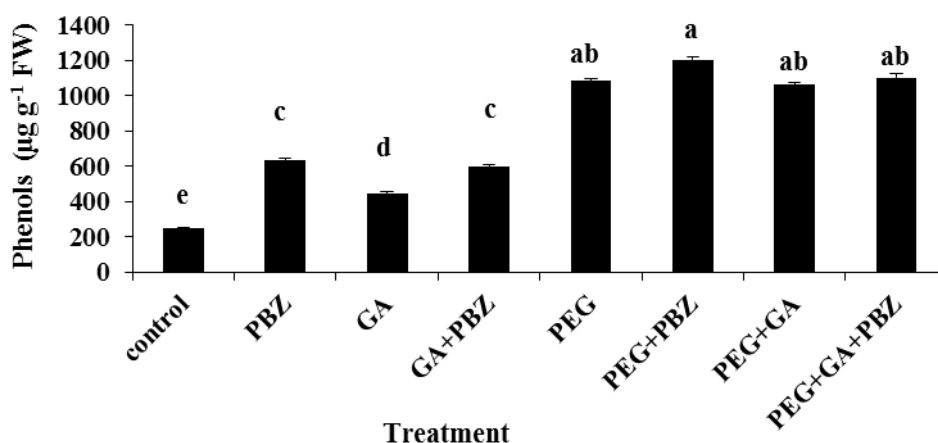


شکل ۴- تغییرات میزان مالون دی‌آلدئید (MDA) کالوس *Stevia rebaudiana* در تیمارهای پاکلوبوترازول (PBZ)، جیبرلین (GA) و پلی اتیلن گلیکول (PEG). داده‌ها میانگین ۳ تکرار \pm SD و حروف نامشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار ($P \leq 0.05$) بر اساس آزمون Duncan می‌باشد.

پاکلوبوترازول، جیبرلین و تیمار توام جیبرلین با پاکلوبوترازول به ترتیب ۶۰٪، ۴۴٪ و ۵۸٪ بیشتر از شاهد بود. در پاسخ به



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



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.

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 پلی اتیلن گلیکول، پاکلوبوترازول و جیبرلین بر بافت کالوس در محیط‌های کشت مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که تنش خشکی ناشی از تیمار پلی اتیلن گلیکول باعث کاهش معنی‌دار وزن تر، 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

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 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 ۱۳۷۴). گیاه دارویی *Stevia rebaudiana* Bertoni بومی منطقه نیمه‌مرطوب آمازی

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). کربوهیدرات‌ها 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 باشند. 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). مطالعات گذشته نشان داد که تیمارهای پاکلوبوترازول و جیبرلین (Akter et al., 2014; Fletcher et al., 2010)

مشابهی مبنی بر اثر منفی تنش خشکی بر رشد گیاهان استویا (Hajihashemi and Ehsanpour, 2013)، سویا (Specht et al., 2004; Zhang et al., 2001; Wu et al., 2008)، مرکبات (Sankar et al., 2007) *Abelmoschus esculentus*، آفتابگردان (Hussain et al., 2008; Kiani et al., 2008) و پنبه (Massacci et al., 2008) موجود می‌باشد. 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 معنی‌دار 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 می‌شود (Fletcher et al., 2015; Jungklang et al., 2010). براساس گزارشات Hajihashemi و Ehsanpour (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.

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 پروکسیل 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 نتیجه‌گیری 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.

(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

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. (۱۳۷۴) 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 vulgare L.*). فیزیولوژی محیطی گیاهی (پژوهش‌های اکوفیزیولوژی گیاهی ایران) ۶ (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. *Romanian 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 (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: 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. ⁹
- 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.