اثر اسید جیبرلیک و پرایمینگ بر جوانه‌زنی و برخی از ترکیبات استویا (*Stevia rebaudiana* Bertoni)

محمد صدقی، پریسا شیخ نواز جاهد و رئوف سید شریفی

گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۰/۱۱، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۵/۱۲/۲۵)

چکیده

با توجه به ضعیف بودن بذر استویا (*Stevia rebaudiana* Bertoni) و جوانه‌زنی دشوار آن، هدف از این تحقیق، بررسی اثر انواع پرایمینگ بر جوانه‌زنی و رشد گیاهچه و برخی از ترکیبات موجود در برگ استویا در محیط حاوی اسید جیبرلیک بود. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار در آزمایشگاه اجرا شد. تیمارها شامل غلظت‌های مختلف اسید جیبرلیک (صفر، ۲۵ و ۵۰ میلی-گرم در لیتر) و پرایمینگ بذر به صورت هیدرو، هورمون (اسید جیبرلیک ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر) و اسمو (نیترات پتاسیم سه درصد) به مدت ۱۸ ساعت بود. میزان ترکیبات مؤثره توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. فعالیت آنزیم‌های هیدرولیتیک و آنزیم‌های آنتی اکسیدانت گیاهچه‌ها نیز اندازه‌گیری شد. بیشترین سرعت جوانه‌زنی در پیش تیمار اسمو پرایمینگ به دست آمد. بیشترین میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسمیوتاز در هیدروپرایمینگ (۴۷٪ افزایش نسبت به شاهد) و مالون‌دی‌آلدهید (۵۰٪ افزایش) در هیدرو و اسموپرایمینگ و کاتالاز (۳۸٪ افزایش) و پراکسیداز در هیدرو پرایمینگ (۵۳٪ درصد افزایش) در غلظت صفر میلی‌لیتر اسید جیبرلیک اندازه‌گیری شد. بیشترین میزان آنزیم آلفا آمیلاز (۴۱٪ در افزایش) با پیش تیمار هورمون و در غلظت ۵۰ میلی‌گرم از اسید جیبرلیک به دست آمد. بیشترین میزان آلفاکادینول (۲۶٪ افزایش)، متیل سالیسیلات (۳۶٪ افزایش) و سافرانال (۴۰٪ افزایش)، همچنین کربوهیدرات (۲۳٪ افزایش) و پروتئین (۲۶٪ افزایش) در تیمار هورمون پرایمینگ و در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر اسید جیبرلیک مشاهده شد. در این پژوهش برای دست‌یابی به حداکثر میزان ترکیبات مؤثره، غلظت ۵۰ میلی‌لیتر اسید جیبریک در پیش‌تیمار با هورمون مناسب تشخیص داده شد.

کلمات کلیدی: آنزیم‌های آنتی اکسیدانت، پیش‌تیمار بذر، جیبرلین، جوانه‌زنی، آلفا آمیلاز.

مقدمه

گیاهان دارویی از ارزش و اهمیت خاصی در تامین بهداشت و سلامت جوامع هم به لحاظ درمان و هم پیشگیری از بیماری‌ها برخوردارند (حاجی صمدی اصل و همکاران، ۱۳۹۰). استویا با نام علمی *Stevia rebaudiana* Bertoni یکی از ۲۴۰ گونه‌ی تیره آفتاب‌گردان است. این گیاه به عنوان شیرین‌کننده طبیعی و فاقد گلوکز برای افراد دیابتی معرفی شده است (Ingle, 2008). قدرت شیرین کنندگی این گیاه حدود ۱۰۰-۴۰۰ برابر ساکارز است (Tawar *et al.*,2010). برگ‌های این گیاه فاقد ساخارین، آسپارتام و کاری است (Boana and Goenadi, 1985; Ojha *et al.*, 2010) علاوه بر استفاده استویا به عنوان یک عامل شیرین کننده، برخی از گزارش‌ها حاکی از وجود خاصیت ضد

*نویسنده مسؤل، نشانی پست الکترونیکی: m_sedghi@uma.ac.ir

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-20]

میکروبی در عصاره‌ی برگ این گیاه است و آن را در طبقه‌بندی با گیاهان دارویی قرار می‌دهد (Jayarman *et al.*، 2008). جدیدترین تحقیقات پزشکی تاثیر ضد ویروسی (Singh و Roa 2005)، جلوگیری از افزایش فشار و قند خون (Hossein *et al.*, 2008) کاهش وزن (Rita Elkins، 1997) و تقویت معده و روده (Rafiq *et al.*، 2007) را نشان داده‌اند. استویا اثر ناچیزی بر افزایش قند خون دارد وحتی موجب افزایش تحمل گلوکز می‌شود. بنابراین، بسیار مورد توجه افراد مبتلا به دیابت و افرادی که محدودیت مصرف مواد قندی دارند، قرار گرفته است (Millard LeCroy, 2014).

کشت و پرورش گیاهان دارویی و معطر از چند جنبه با مشکلاتی مواجه است. از جمله این که در بسیاری از گیاهان دارویی، جوانه‌زنی و استقرارگیاهچه به علت قوه نامیه کمی که این گیاهان دارند، اغلب با مشکل مواجه است و مشکل جوانه-زنی در بذر استویا نیز وجود دارد (چراغی و همکاران، ۱۳۹۰). پرایمینگ بذر از جمله روش‌هایی است که منجر به افزایش قابلیت جوانه‌زنی در طیف وسیعی از گیاهان می‌شود (چراغی و همکاران، ۱۳۹۰). هورمون‌های گیاهی که به‌طور معمول برای پرایمینگ استفاده می‌شود، اکسین (IAA, IBA, NAA)، جیبرلین (GA_3)، کینتین، اسید آبسیزیک (ABA)، پلی‌آمین‌ها، اتیلن، براسینولید و اسید سالیسیلیک است (Sparks, 2005). تحقیقات نشان می‌دهد که بسیاری از هورمون‌های گیاهی از جمله اکسین، جیبرلین، سایتوکینین، اتیلن و اسید آبسیزیک شاید از راه‌های مشخصی که منجر به کنترل عملکرد اسید نوکلئیک‌ها می‌شوند، در تحریک جوانه‌زنی و یا خواب بذر نقش دارند (Chiwocha *et al.*, 2005). برخی از محققان معتقد هستند که جیبرلین‌ها موجب افزایش در فعالیت آنزیم RNA پلی‌مراز می‌شوند و در نتیجه میزان رونویسی از بخش‌هایی از DNA را افزایش می‌دهند. بنابراین، جیبرلین‌ها ممکن است که به طور مستقیم یا غیر مستقیم میزان رونویسی بعضی ژن‌ها را افزایش دهند و در نتیجه موجب شوند تا بسیاری از آنزیم‌های پاسخ‌گو برای جوانه‌زنی در حد مطلوبی تولید شود. جیبرلین‌ها با القای تغییراتی در مراحل رونویسی و یا ترجمه برخی از ژن‌ها موجب تغییرات کمی و کیفی در سنتز برخی از پروتئین‌ها می‌شوند و در نهایت سنتز آنزیم‌های هیدرولیز کننده مولکول‌های ذخیره‌ای دانه، نظیر آلفا آمیلاز را تحریک می‌کنند که در نتیجه این آنزیم‌ها واکنش‌های ضروری جهت تولید انرژی و ترکیبات ساختمانی لازم برای رشد و ظهور جنین کاتالیز و به این ترتیب پدیده جوانه‌زنی القا می-گردد (Harbberd and Peng, 2002). چیوچا و همکاران (۲۰۰۵) گزارش کرده‌اند که GA_3 و اتیلن مسیرهای انتقال سیگنال ویژه‌ای را فعال می‌کنند که موجب می‌شود تا میزان اکسین‌ها و سایتوکینین‌های دانه‌های آرابیدوپسیس به حد مناسبی جهت القای شکست خواب ارتقا یابد. نتایج تحقیق صدقی و همکاران (۲۰۱۰)، نشان داد که پرایمینگ بذر با کلرید سدیم و جیبرلین شاخص‌های جوانه‌زنی و رشد گیاهچه رازیانه و همیشه بهار را بهبود بخشید. جوانه‌زنی بذرهای پرایمینگ شده سریع‌تر از تیمار شاهد اتفاق می‌افتد (Ghassemi-Golezani and Mazloomi-Oskooyi, 2008). کاربرد اسید جیبرلیک موجب افزایش معنی‌داری در درصد جوانه‌زنی کاکتوس شد (Arechiga and Baes، 2007). تسریع جوانه‌زنی در بذرهای پرایم شده می‌تواند ناشی از افزایش فعالیت آنزیم-های تجزیه کننده مثل آلفاآمیلاز، افزایش سطح انرژی زیستی در قالب افزایش مقدار ATP، افزایش سنتز DNA و RNA، افزایش تعداد و در عین حال ارتقای عملکرد میتوکندری‌ها باشد (Afzal *et al.*، 2002). جمیل و رها (۲۰۰۷) بیان داشتند که پرایمینگ بذرهای چغندرقند توسط هورمون اسید جیبرلیک موجب افزایش درصد نهایی جوانه‌زنی و سرعت آن می‌گردد و مقدار جذب آب توسط بذر به هنگام جوانه‌زنی نسبت به تیمار شاهد را افزایش می‌دهد و هم‌چنین پیش تیمار، رشد سریع‌تر گیاه را موجب می‌شود. در بذرهای پرایم شده، تغییرات متابولیک و بیوشیمیایی به نفع جوانه‌زنی تحقق می‌یابد. برای مثال، در این بذرها بخشی از پروتئین‌ها و کربوهیدرات‌ها بر اثر آنزیم‌ها و واکنش‌های هیدرولیزکننده شکسته شده و آماده شرکت در فرآیند جوانه‌زنی می‌شوند (Harris، 2001). این مساله می‌تواند توجیهی برای تسریع جوانه‌زنی و کاهش

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-20]

متوسط زمان جوانه‌زنی باشد (Campbell *et al.*،1999). به نظر می‌رسد که دلیل بالاتر بودن درصد و سرعت جوانه‌زنی در تیمار با اسید جیبرلیک نقش کلیدی این هورمون در جوانه‌زنی به ویژه آزادسازی آنزیم‌های تجزیه کننده کربوهیدرات و پروتئین در داخل بذر باشد. درصد جوانه‌زنی بذر استویا نیز با توجه به ریز بودن و خود ناسازگاری این گیاه پایین است (Yadav *et al.*,2011). بنابراین، هدف از این آزمایش بررسی اثر پرایمینگ بذر همراه با غلظت مناسب از اسید جیبرلیک جهت دست‌یابی به بالاترین درصد جوانه‌زنی در استویا بود. همچنین، بررسی تغییرات ترکیبات مختلف برگ استویا در واکنش به تیمارها از دیگر اهداف این تحقیق بودند.

مواد و روش‌ها

این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار در دانشگاه محقق اردبیلی اجرا شد. تیمارها شامل غلظت‌های مختلف اسید جیبرلیک (صفر، ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر) و پرایمینگ بذر به صورت هیدرو، هورمون و اسمو پرایمینگ بود. انتخاب روش‌های پرایمینگ این تحقیق با توجه به خصوصیات ریز بودن و ذخایر غذایی اندک بذور استویا انجام شد. اسمو و هیدرو پرایمینگ جزو رایج‌ترین روش‌های پرایمینگ بذر هستند و در گیاهانی با بذر ریز نتایج رضایت-بخشی نشان داده‌اند (شافع، ۱۳۸۹). به منظور اعمال تیمارهای پرایمینگ، بذرها درون آب مقطر، جیبرلین ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر و نیترات پتاسیم ۳٪ به ترتیب برای هیدرو، هورمون و اسمو پرایمینگ به مدت ۱۸ ساعت قرار داده شدند. پس از این مدت، بذرها از محلول خارج گردیدند و دو بار با آب مقطر شسته شدند و در دمای آزمایشگاه قرار گرفتند تا به طور کامل خشک شوند در ادامه، بذرهای پرایم شده در پتری‌دیش‌های هفت سانتی‌متری به تعداد ۵۰ بذر در هر ظرف پتری بر روی کاغذ صافی کشت شدند. مقدار دو میلی‌لیتر از محلول‌های اسید جیبرلیک با غلظت‌های صفر، ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر به محیط اضافه شد. برای شاهد نیز از آب مقطر استفاده گردید. سپس پتری‌دیش‌ها در ژرمیناتور (IKH-RI شرکت ایران خودساز) در دمای ^{o}c ۱±۲۳ با ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی و رطوبت نسبی ۷۵ ± ۵ ٪ قرار داده شد. شمارش بذرهای جوانه زده از روز دوم آغاز شد. در پایان دوره آزمایش (۱۴ روز) تعداد بذرهای جوانه‌زده بر حسب درصد گزارش شد. خروج حدود دو میلی‌متر ریشه‌چه به عنوان معیار جوانه‌زنی برای بذور در نظر گرفته شد (ISTA،2010). به منظور محاسبه سرعت جوانه‌زنی با شروع جوانه‌زنی بذرها، هر دو روز یکبار بذرهای جوانه زده شمارش شدند و این کار تا زمانی ادامه یافت که بذرها توانایی تولید گیاهچه را داشتند. این دوره زمانی برای گونه‌های مختلف متفاوت است (Powell *et al.*،1984). سرعت جوانه‌زنی در این پژوهش با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد (Magaire, 1962).

[n /(تعداد بذر جوانه‌زده در هر شمارش)]Σ = سرعت جوانه‌زنی

n: روز شمارش

پس از جوانه‌زنی و رشد گیاهچه‌ها تحت شرایط ذکر شده، از برگ‌های تولید شده در گیاهچه‌های ۲۰ روزه، نمونه‌برداری و میزان ترکیبات موثره شامل آلفاکادینول، متیل سالیسیلات و سافرانال توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. مواد موثره مذکور با حلال دی کلرومتان استخراج و پس از افزودن استاندارد داخلی به دستگاه GC با برنامه‌ریزی دمایی معین تزریق گردید، سپس با در نظر گرفتن منحنی کالیبراسیون و مقادیر فراکنش‌ها، مقدار ترکیبات موثره فوق تعیین شد. به‌منظور تعیین فعالیت آنزیم‌های هیدرولیتیک و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت از گیاهچه‌ها عصاره آنزیمی طبق روش سیرم و همکاران (۲۰۰۲) استخراج گردید. فعالیت آنزیم کاتالاز بر اساس روش ابی (۱۹۸٤) اندازه‌گیری شد. کمپلکس واکنش، شامل ۰/۵ میلی‌لیتر پراکسید هیدروژن ۷/۵ میلی‌مولار، ۱/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی‌مولار (pH=۷) و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود که حجم نمونه‌ها با اضافه کردن آب مقطر به سه میلی‌لیتر رسانده شد. با افزودن پراکسید هیدروژن واکنش آغاز گردید و کاهش در جذب نمونه‌ها در طول موج ۲٤۰ نانومتر در مدت یک دقیقه ثبت گردید. محلول جذب زمینه (blank) شامل تمام مواد استفاده شده به جز

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-20]

عصاره آنزیمی استخراج شده بود. میزان پراکسید هیدروژن تجزیه شده با استفاده از ضریب خاموشی (Ɛ=39.4 Mm-1cm-1) محاسبه شد. فعالیت ویژه آنزیم بر اساس میکرومول پراکسید هیدروژن تجزیه شده در دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین بیان گردید.

آنزیم پراکسیداز طبق روش کاتو و شیمیزو (۱۹۸۷) اندازه-گیری گردید. در این روش محیط آزمایش حاوی ۱۰۰ میلی‌مولار بافر سدیم فسفات (pH=۵/۸) و ۷/۲ میلی‌مولار گایاکول، ۱۱/۸ میلی‌مولار H_2O_2 و ۰/۱ میلی‌لیتر از عصاره آنزیمی بود. واکنش با اضافه کردن پراکسید هیدروژن و تغییر در چگالی نوری شروع شد. تغییرات جذب با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر و در طول موج ٤٧٠ نانومتر ثبت گردید.

برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسمیوتاز، مخلوط واکنش شامل دو میلی‌لیتر بافر ۵۰HEPES-KOH میلی‌مولار (pH=۷/۸)، حاوی اتیلن‌دی‌آمین‌تترا استیک اسید ۰/۱ میلی‌مولار، کربنات سدیم ۵۰ میلی‌مولار (pH=۱۰/۲)، ال-متیونین (L-methionine) ۱۲ میلی‌مولار، نیتروبلوتترازولیوم (NBT) ۷۵ میکرومولار، ریبوفلاوین یک میلی‌مولار و ۲۰۰ میکرولیتر از عصاره آنزیمی بود. نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در شدت نور حدود ۸۰۰۰ لوکس قرار گرفت و پس از این مدت جذب آن‌ها در طول موج ٥٦٠ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد (Giannopolitis and Ries, 1997).

غلظت مالون دی‌آلدئید طبق روش مک‌کوئی و شتی (۲۰۰۲) و با اندکی تغییر اندازه‌گیری شد. در لوله‌های آزمایش، ۲۰۰ میلی‌لیتر از بافت هموژن با ۸۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط شد. پانصد میلی‌لیتر از تری کلرو استیک اسید ۲۰٪ با ۱ ml از تیوبای‌بوتیریک اسید ۱۰ میلی‌مولار مخلوط شد. لوله های آزمایش به مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور ۱۰۰°C قرار گرفتند. سپس، به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۳۰۰۰g سانتریفیوژ شدند. از روشناور حاصل برای اندازه‌گیری غلظت MDA استفاده شد. مقدار جذب روشناور در طول موج ۵۳۲ و ٦٠٠ نانومتر قرائت و با استفاده از ضریب خاموشی (μM^{-1} cm^{-1} ۱۵۵) محاسبه شد و غلظت MDA بر اساس جذب مولی و بر حسب $mM\ g^{-1}$ بیان گردید.

فعالیت آنزیم آلفا امیلاز پنج روز پس از جوانه‌زنی و مطابق روش دومان و همکاران (۱۹۸۲) مشخص شد. بذرها در بافر ٦٠ میلی‌لیتر (pH=۸/٦) هموژنیزه شدند و سپس در ۱۲۰۰۰gو به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. فعالیت آنزیم در محیط واکنش که حاوی ٦٠ میلی‌مولار بافر فسفات (pH=۸/٦)، ٤٠٠ میکروگرم بر میلی‌لیتر کلسیم کلراید و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی-لیتر نشاسته بود، مشخص شد. عصاره‌ی آنزیم (۱ میلی‌لیتر) پس از ۲۰ دقیقه انکوباسیون در حمام آب گرم ۱۰۰ درجه به محیط آزمایش اضافه شد. فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز با استفاده از نشاسته و با طول موج ٦٢٠ نانومتر به صورت میکروگرم نشاسته بر گرم در دقیقه بافت تازه مشخص شد (Doman *et al.*, 1982).

آزمون نرمال بودن توزیع داده‌ها توسط نرم‌افزار SPSS.16 انجام گرفت. تجزیه آماری با استفاده از نرم افراز SAS و همبستگی و رگرسیون توسط SPSS انجام شد. برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪ استفاده گردید. رسم شکل‌ها و نمودارها با بهره‌گیری از نرم‌افزار Excel 2010 انجام پذیرفت.

نتایج و بحث

اثر غلظت‌های مختلف اسید جیبرلیک، انواع پرایمینگ و اثر متقابل آن‌ها بر ترکیبات موثره اندازه‌گیری شده در برگ استویا معنی‌دار بود (جدول ۱).

تاثیر پرایمینگ بر میزان متیل سالیسیلات، آلفا کادینول، پروتئین و کربوهیدرات در سطح احتمال یک درصد و بر میزان سافرانال در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بود. تاثیر اسید جیبرلیک بر تمام ترکیبات موثره استخراج شده در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بدست آمد. با استناد به جدول ۲ می‌توان چنین استنباط کرد که هورمون اسید جیبرلیک موجب افزایش ترکیبات موثره در استویا گردید، به‌طوری‌که بیشترین میزان آلفا کادینول و سافرانال از غلظت ۵۰ میلی‌لیتر اسید جیبرلیک و پیش تیمار با هورمون و نیترات پتاسیم به دست آمد.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-20]

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر پرایمینگ و اسید جیبرلیک بر ترکیبات موثره برگ استویا و میزان پروتئین و کربوهیدرات برگ

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات				
		آلفاکادینول	متیل سالیسیلات	سافرانال	پروتئین	کربوهیدرات
پرایمینگ(P)	۲	۰/٤٤**	۰/۰۹**	۰/۰۰۱*	۱٤/٦۷**	۸۹/٤۸**
جیبرلین(G)	۲	۰/۰۵**	۰/۰۲**	۰/۰۰۹**	٤/٦**	۱۷۲/۰**
G*A	٤	۰/۰۰۳*	۰/۰۰۰۹*	۰/۰۰۰۱*	۱/۹۲^{ns}	۵/۰۹^{ns}
خطا	۱۸	۰/۰۰۱٦	۰/۰۰۰٦	۰/۰۰۰۲	۰/۰۷	٤/۳
ضریب تغییر (٪)		۲/٤	۳/۵٦	۷/۹۸	۲/۱٦	۳/٤٤

* و ** به ترتیب معنی‌دار در سطح آماری ۵ و ۱٪

جدول۲- مقایسه میانگین اثر متقابل پرایمینگ و اسید جیبرلیک بر ترکیبات موثره، پروتئین و کربوهیدرات برگ استویا

پرایمینگ	اسید جیبرلیک (میلی‌گرم در لیتر)	آلفاکادینول	متیل سالیسیلات	سافرانال	پروتئین	کربوهیدرات
		درصد				
هیدروپرایمینگ	صفر	۰/۱۳^{d}	۰/۵۳^{e}	۰/۱۳^{d}	۱۰/٤^{e}	۵۳/۰^{d}
	۲۵	۰/۱٦^{bc}	۰/۵۷^{d}	۰/۱٦^{bc}	۱۰/۸^{e}	۵۹/۳^{c}
	۵۰	۰/۱۸^{b}	۰/٦^{d}	۰/۱۸^{b}	۱۱/٤^{e}	٦۰/۷^{bc}
هورمون پرایمینگ	صفر	۰/۱۵^{cd}	۰/۷۲^{b}	۰/۱۵^{cd}	۱۲/۵۳^{c}	۵۹/۷^{c}
	۲۵	۰/۱۸^{b}	۰/۷٦^{b}	۰/۱۸^{b}	۱۳/٤۳^{b}	٦۰/۰^{bc}
	۵۰	۰/۲۲^{a}	۰/۸۳^{a}	۰/۲۲^{a}	۱٤/۲^{a}	٦۹/۰^{a}
اسموپرایمینگ	صفر	۰/۱٤^{cd}	۰/٦۱^{d}	۰/۱٤^{cd}	۱۱/٤^{e}	۵٤/۷^{d}
	۲۵	۰/۱۸^{b}	۰/٦۵^{c}	۰/۱۸^{b}	۱۲/۵٦^{c}	٦۱/۳^{bc}
	۵۰	۰/۲۲^{a}	۰/۷٤^{b}	۰/۲۲^{a}	۱۳/۰^{cb}	٦۳/۷^{b}

در هر ستون، میانگین‌های دارای حروف مشترک از نظر آماری اختلاف معنی‌داری در سطح ۵٪ ندارند.

هورمون پرایمینگ به همراه کاربرد غلظت ۵۰ میلی‌لیتر اسید جیبرلیک موجب تولید بیشترین مقدار متیل سالیسیلات، همچنین کربوهیدرات و پروتئین در برگ استویا گردید (جدول ۲).

حاجی صمدی اصل و همکاران (۱۳۹۰) گزارش کردند که اسید جیبرلیک به عنوان یک ترکیب ترپنوئیدی ارتباط تنگاتنگ و مستقیمی با متابولیسم اولیه و ثانویه به ویژه در مسیر بیوسنتزی اسانس‌ها و ترکیبات معطر دارد. آنها با محلول‌پاشی اسید جیبرلیک روی گیاه اسطوخدوس (*Lavandula officinalis* Chaix.) به این نتیجه رسیدند که کاربرد جیبرلین موجب افزایش اسانس گیاه گردید. بررسی منابع نشان می‌دهد که از هورمون اسید جیبرلیک می‌توان برای افزایش ویژگی‌های رشدی گیاهان استفاده کرد (Mostafa *et al.*, 2005). جیبرلین ها تقسیم و طویل شدن سلولی را افزایش می‌دهند، بنابراین کاربرد خارجی اسید جیبرلیک می‌تواند رشد شاخه، فتوسنتز و تجمع ماده خشک را افزایش دهد (Abl EL-Aal *et al.*, 2008) و این افزایش منجر به بالارفتن محتوای کربوهیدراتی گیاه می شود. افزایش میزان پروتئین گیاهچه ماریتیغال (*Silybum marianum*) بر اثر اعمال پرایمینگ گزارش شده است (معصومی زواریان و همکاران، ۱۳۹۲).

اثر غلظت‌های مختلف اسید جیبرلیک، انواع پرایمینگ و اثر متقابل آنها بر درصد و سرعت جوانه‌زنی در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۳).

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-20]

جدول ۳- تجزیه واریانس اثر پرایمینگ و اسید جیبرلیک بر ویژگی‌های جوانه‌زنی و فعالیت آنزیمی در استویا

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات						
		درصد جوانه زنی	سرعت جوانه‌زنی	سوپراکسید دیسمیوتاز	کاتالاز	پراکسیداز	مالون دی آلدهید	آلفا آمیلاز
پرایمینگ (P)	۲	۷۹/۰٦ **	۸/۵۳**	۰/۵٤**	٤/۵**	۰/٤۷**	۰/۰۰۲*	۰/۰۹۳**
جیبرلین (G)	۲	۲۵۹۸/۸۸**	۳۷/۹**	۳۷/۹**	٤۱.۸**	۰/۹۲**	۰/۰۱**	۰/۱۹**
G*A	٤	٦۸/۹۵**	۰/٤۲*	۱/۰۰*	۰/۳۱*	۰/۰۵*	۰/۰۰۰۵*	۰/۰۰۱*
خطا	۱۸	۰/۵۹	۰/۱۰۲	۰/۰۱٤	۰/۰٤۸	۰/۰۱٦	۰/۰۰۰۲	۰/۰۰۱٦
ضریب تغییر (٪)		۲/۲٦	۳/۸٦	٦/۵۷	۳/۵۱	۱۰/٤۸	۷/۹۷	٤/۰۲

* و ** به ترتیب معنی‌دار در سطح آماری ۵ و ۱٪

اسید جیبرلیک موجب افزایش درصد جوانه‌زنی شد، به طوریکه بیشترین درصدجوانه‌زنی (٦۷/۲٦٪) در تیمار هورمون پرایمینگ و در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر اسید جیبرلیک مشاهده شد. کم‌ترین درصد جوانه‌زنی (۱۳/۷٪) مربوط به اسمو پرایمینگ و در غلظت صفر میلی‌لیتر اسید جیبرلیک بود (جدول ٤). تحقیقات نشان می‌دهد که کاربرد جیبرلین موجب رشد و توسعه‌ی گیاه از جمله در پدیده‌ی جوانه‌زنی و توسعه‌ی بذری می‌شود (Ritchi and Gilroy، 1998 ; Sun and 1971; Darra and Saxena، Gubler 2004). جیبرلین در اغلب تک لپه‌ای‌ها از جنین ترشح و موجبات آغاز فرایندهای جوانه‌زنی را فراهم می‌کند. این امر با تولید آنزیم‌های هیدرولیتیک و در نتیجه تجزیه ذخایر بذر همراه است. در مورد سایر گیاهان نیز جیبرلین موجب فراهم شدن شرایط رشد سلول از طریق تغییر در ویژگی‌های دیواره سلول می‌شود و در نتیجه طول سلول‌ها افزایش پیدا می‌کند (Davies, 2010).

اثر اسید جیبرلیک، انواع پرایمینگ و اثر متقابل آن‌ها بر فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت و آلفا آمیلاز معنی‌دار بود (جدول ۳). پرایمینگ با افزایش آنزیم‌های آنتی اکسیدانت موجب بهبود شاخص‌های جوانه‌زنی به ویژه درصد و سرعت جوانه‌زنی در استویا می‌شود (Hossein *et al.*، 2008). حداکثر میزان فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسمیوتاز و غلظت مالون‌دی آلدئید در غلظت صفر میلی‌لیتر اسید جیبرلیک و تیمار اسمو پرایمینگ به دست آمد. اثر سطوح اسید جیبرلیک بر غلظت مالون‌دی آلدهید روند معکوسی داشت، به طوری که با افزایش میزان اسید جیبرلیک، میزان این ماده کاهش یافت و بیشترین مقدار در تیمار اسمو پرایمینگ و غلظت صفر میلی‌لیتر اسید جیبرلیک مشاهده گردید. در پیش‌تیمار اسموپرایمینگ و هورمون پرایمینگ به ترتیب بیشترین و کم‌ترین غلظت مالون-دی‌آلدهید بدست آمد (جدول ٤). پاکلوبوترازول یکی از بازدارنده‌های سنتز اسید جیبرلیک است. حاجی هاشمی و احسان‌پور (۲۰۱٤ و ۲۰۱۳) اعلام کردند که کاربرد این ترکیب بر روی گیاه استویا موجب افزایش غلظت مالون‌دی‌آلدئید می-شود. بنابراین، می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که اعمال اسید جیبرلیک می‌تواند با تولید این ماده رابطه معکوسی داشته باشد. تولید مالون دی آلدئید بیانگر پراکسیداسیون لیپیدهای غشا است و به نوعی معیاری از تنش اکسیداتیو تلقی می‌شود. اسید جیبرلیک با کاهش تولید این ماده موجب کاهش تنش اکسیداتیو می‌گردد و در نتیجه از فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت در حضور این هورمون کاسته خواهد شد (Sedghi and Tolouie, 2013). بنابراین، کاهش فعالیت آنزیم های اشاره شده در تیمار هورمون پرایمینگ و غلظت بالای اسید جیبرلیک به این صورت قابل توجیه است.

بیشترین میزان فعالیت آلفاآمیلاز در بیشترین غلظت اسید جیبرلیک (۵۰ میلی‌لیتر) و در پیش‌تیمار با هورمون حاصل شد. هیدرو پرایمینگ بذر در غلظت صفر میلی‌لیتر اسید جیبرلیک موجب حداکثر فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز گردید

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-20]

جدول ٤- مقایسه میانگین شاخص‌های جوانه‌زنی و فعالیت‌های آنزیمی استویا در غلظت‌های مختلف اسید جیبرلیک و انواع پرایمینگ

پرایمینگ	اسید جیبرلیک (میلی‌گرم در لیتر)	درصد جوانه زنی	سرعت جوانه‌زنی (بذر در روز)	سوپراکسید دیسمیوتاز (واحد بر میلی گرم در دقیقه)	کاتالاز (واحد بر میلی‌گرم در دقیقه در پروتئین)	پراکسیداز (واحد بر میلی‌گرم در دقیقه)	مالون‌دی آلدئید (میلی‌مول بر گرم وزن تر)	آلفاآمیلاز (واحد بر میلی‌گرم وزن تر در دقیقه)
هیدروپرایمینگ	صفر	۱۷/۱۳^{g}	۱۰/۲۳^{b}	۲/۲۳^{a}	۷/۷^{a}	۱/٦٦^{a}	۰/۲۱^{b}	۰/۷٤^{e}
	۲۵	۲۷/۷^{e}	۸/۵^{d}	۲/۱^{a}	۷/۱۳^{b}	۱/٤٦^{ab}	۰/۱۸^{cd}	۰/۹۲^{dc}
	۵۰	۵۰/۸^{b}	٦/٦٦^{f}	۱/۷^{cb}	٤/٦^{c}	۱/۲۳^{cd}	۰/۱۷^{cb}	۱/۰٦^{b}
هورمون پرایمینگ	صفر	۲٤/٦^{f}	۸/۵^{c}	۱/۸٦^{b}	۷/۱٦^{b}	۱/٦۳^{a}	۰/۲۱^{b}	۰/۹۵^{c}
	۲۵	٤۱/٤^{c}	۷/۳^{e}	۱/۵^{cb}	٦/۰٦^{c}	۱/۰۸^{ef}	۰/۱٦^{d}	۱/۰۹^{b}
	۵۰	٦۷/۲٦^{a}	۵/۲^{g}	۱/۲^{e}	٤/۷۳^{e}	۰/۷۵^{f}	۰/۱۲^{e}	۱/۲۷^{a}
اسموپرایمینگ	صفر	۱۳/۷^{h}	۱۱/۷۳^{a}	۲/۲٦^{a}	٦/۸٦^{b}	۱/۳۵^{bc}	۰/۲٤^{a}	۰/۸۵^{d}
	۲۵	۲۵/۹۳^{f}	۸/۷۳^{cd}	۱/۷^{cb}	۵/۵۹^{d}	۰/۸۸^{ef}	۰/۱۹^{cb}	۰/۹۹^{c}
	۵۰	۳۸/۵۳^{d}	۷/۰۰^{ef}	۱/٤٦^{d}	٤/۷٦^{e}	۰/۷۷^{f}	۰/۱٦^{cd}	۱/۱^{b}

در هر ستون، میانگین‌های دارای حروف مشترک از نظر آماری اختلاف معنی‌داری در سطح ۵٪ ندارند.

(جدول ٤). بنابراین، می‌توان چنین نتیجه گرفت که با افزایش اسید جیبرلیک بر درصد جوانه‌زنی افزوده شده است، زیرا افـزایش سـنتز و آزادسـازی هورمون اسید جیبرلیک (GA_3) در بـذر موجـب شکسـته شدن نشاسته ذخیره‌ای و تبدیل آن بـه مـواد قابـل اسـتفاده برای جنین و آغاز فرآیند جوانه‌زنی می‌شـود (Nadjaf *et al.*, 2006) افزایش میزان این هورمون بر میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی تاثیر معکوس داشت (جدول ٤). افزایش میزان کاتالاز و سوپراکسید دیسمیوتاز طی اسموپرایمینگ و هیدروپرایمنگ اتفاق افتاد. اسید جیبرلیک به عنوان تنظیم کننده رشد گیاهی با بالا بردن تقسیم سلولی موجب افزایش جذب مواد غذایی می‌گردد و بیشتر کردن جذب مواد موجب افزایش ارتفاع، تعداد برگ، سطح برگ و غیره خواهد شد (Shah *et al.*, 2006). افزایش مولفه‌های رشدی گیاه مانند سطح برگ، تعداد برگ و فعالیت فتوسنتزی منجر به افزایش دسترسی مسیرهای بیوسنتزی تولید کننده آنزیم‌ها و سایر ترکیبات خواهد شد (Sifola and Barbieri، 2006). مصرف تنظیم کننده رشد اسید جیبرلیک (GA_3) باعث افزایش فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز در هنگام جوانه‌زنی جهت تجزیه نشاسته گردیده و این مساله موجب تقویت بنیه بذر می‌شود که نتیجه آن، درصد سبز یکنواخت‌تر و سطح برگ بیشتر خواهد بود (Ingle، 2008).

نتیجه‌گیری کلی

غلظت‌های مختلف اسید جیبرلیک، محتوا و عملکرد ماده موثره گیاهان دارویی و معطر را تحت تاثیر قرار می‌دهد. در این پژوهش برای دست‌یابی به حداکثر میزان ترکیبات موثره، غلظت ۵۰ میلی‌لیتر اسید جیبریک در پیش‌تیمار با هورمون مناسب تشخیص داده شد. حداکثر جوانه‌زنی در غلظت ۵۰ میلی‌لیتر اسید جیبرلیک در پیش‌تیمار با هورمون به دست آمد. کاربرد اسید جیبرلیک همراه با پرایمینگ بذر، موجب جوانه‌زنی یکنواخت و تولید گیاهچه قوی با استقرار مناسب می‌شود که از عوامل رسیدن به پوشش سبز کامل و همچنین عملکرد بالا در واحد سطح است. با توجه به این که بذر استویا از قدرت جوانه‌زنی و رویش کمی برخوردار است، می‌توان از این تیمار برای بهبود جوانه‌زنی استفاده کرد. به احتمال زیاد این امر می تواند ناشی از کاهش صرف انرژی بذر در جهت تولید سیستم

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-20]

آنتی‌اکسیدانت و تغییر الگوی مصرف انرژی در فعالیت‌های جوانه‌زنی باشد.

منابع:

حاجی صمدی اصل، ب.، حسن‌پور اقدم، م. و خلیقی، ا. (۱۳۹۰) اثر افشانه کردن جیبرلین بر ویژگی رشدی و عملکرد اسانس گیاه زینتی – دارویی اسطوخدوس (*Lavandula officinalis* Chaix.). نشریه‌ی دانش کشاورزی و تولید پایدار. ۲۱(۲) : ۲۳-۳۲.

چراغی، ف.، محمودی، س.، جامی الاحمدی، م. و پارسا، س. (۱۳۹۰) بهبود جوانه‌زنی و رشد گیاه دارویی گلپر ایرانی تحت تاثیر آماده سازی اسمزی بذر. داروهای گیاهی. ۲(٤):۲۲۹-۲۳۸.

شافع، م.(۱۳۸۹) بررسی تاثیر پرایمینگ بر خصوصیات جوانه‌زنی، بنیه بذر، استقرار و رشد گیاهان دارویی بنگ دانه *Hyocuamus niger* L.))پایان نامه کارشناسی ارشد علوم وتکنولوژی بذر، دانشگاه بیرجند، خراسان جنوبی، ایران.

معصومی‌زاوریان، ا.، یوسفی‌راد، م. و شریف‌مقدسی، م. (۱۳۹۲) اثرات پرایمینگ بذر به وسیله نیترات پتاسیم بر شاخص‌های جوانه-زنی، فعالیت آنزیم پراکسیداز بذور و پروتئین کل گیاهچه گیاه دارویی مارتیغال. اولین همایش مجازی سراسری کشاورزی و منابع طبیعی پایدار، موسسه آموزش عالی مهر اروند، تهران، ایران.

Abd El- Aal, F. S., Shaheen A. M. and Rizk, F. A. (2008) The effect of foliar application of GA3 and soil dressing of NPK at different levels on the plant productivity of potatoes (*Solanum tuberosum* L.). Research Journal of Agriculture and Biological Sciences 4 (5): 384-391.

Abi, H. (1984) Catalase in vitro, Method of enzymology. 105: 121-126.

Afzal, I., N. Ahmad, S. M. A. Basra, R. Ahmad and Iqbal, A. (2002) Effect of different seed vigor enhancement techniques on hybrid maize (*Zea mays* L.). Journal of Agricultural Science 39: 109-112.

Baes, P. O., and Arechiga, M. R. (2007) Seed germination of *Trichocereus terscheckii* (Cactaceae): light, temperature and gibberellic acid effects. Journal of Arid Environment 69: 169-176.

Boana, A. Goenadi, D.J. (1985) A study of growth patterns of stevia cutting. Horticulture Abstracts, 56: 3732.

Campbell, J. A., B. P. Naidu and J. R. Wilson. (1999) The effect of glycinebetaine application on germination and early growth of sugarcane. Seed Science and Technology 27: 747-752.

Chiwocha, S. D. S., Culter, A. J., Abrams, S. R., Ambrose, S. J., Yang, J., Ross, A. R. S. and Kermode, A. R. (2005) The ert1-2 mutation in *Arabidopsis thaliana* affects the abscisic acid, auxin, cytokinin and gibberellin metabolic pathways during maintenance of seed dormancy, moist chilling and germination . Plant Journal. 42:35-45.

Darra, BL. and Saxena, S. N., (1971) Effect of gibberellic acid pre-soaking seed treatment at different salinity regimes on germination, growth and yield attributes of hybrid maize (Ganga-3). Indian Journal of Agronomy 16: 46-49.

Davies, P. J. (2010). Plant hormones. Biosynthesis, signal transduction, action. Springer. USA.

Doman, D. C., Walker, J. C.,Trelease, R. N. and Moore, B. D. (1982) Metabolism of carbohydrate and lipidreserves in germinated cotton seeds. Planta, 155(6):502-510.

Ghassemi-Golezani, K. and Mazloomi-Oskooyi, R. (2008) Effect of water supply on seed quality development in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.), International Journal Plant Production, 2: 117-124.

Giannopolitis, C.N. and Ries, S.K. (1997) Superoxide dismutase. I. Occurence in higher plants, Journal of Plant Physiology, 59: 309-314.

Hajihashemi, S. and Ehsanpour, A. A. (2013) Influence of exogenously applied paclobutrazolon some physiological traits and growth of *Stevia rebaudiana* under in vitro drought stress. Journal of Botaniy 68(2): 1-4.

Hajihashemi, S. and 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: 4038–4052.

Harberd, N.P. and Peng, J. (2002) The role of GA-mediated signaling in the control of germination. Science. 5: 376-381.

Harris, D. (2001) Development and testing of on-farm seed priming. Advances in Agronomy 90: 129-178.

Hossein, M. A., Shamim Akabri, A. M., Jahan, T. A. and Hassan, M. N. (2008) Micropropagagation of *Stevia Rebaudiana*. International Journal of Sustainable crop production 3(4):1-90.

Ingle, M. R. (2008) Effect of growth regulators and environments on rooting of stevia cuttings (*Stevia rebaudiana* Bertoni), [Dissertation]. [Dharwad]: University of Agricultural Sciences, p 67.

ISTA (International seed testing association). (2010) International rules for seed testing. Switzerland.

Jamil, M. and Rha. E. S. (2007) Gibberllic acid (GA3) enhance seed water uptake, germination and early seedling growth in sugar beet under salt stress. Pakistan Journal of Biological Sciences 10: 654-658.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-20]

Jayaraman, S., Manoharan, M. S. and Illanchezian, S. (2008) In-vitroAntimicrobial and Antitumor Activities of *Stevia Rebaudiana* (Asteraceae) Leaf Extracts,Trop Journal of Pharmacutical Research, 7(4): 1143-1149.

Kato, M. and Shimizu, S. (1987) Cholorophyll metabolism in higher plant, VII. Chorolophyll degradation in senescing tobacco leaves: phenolic dependent peroxidative degradation, Canadian Journal of Botany, 65: 729-735.

Magaire, J. D. (1962) Seed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor, Crop Science, 2: 111-116.

Millard LeCroy, D. (2014) Factors affecting Stevia *Rebaudiana* B. germination and growth. Ph.D. thesis. University of Idaho. USA.

McCue, P. and Shetty. K. (2002) A biochemical analysis of mungbean (*Vigna radiata*) response to microbial polysaccharides and potential phenolicenhancing effect for nutraceutical applications. Food Biotechnology, 16: 57-79.

Mostafa H. A. M, El-Bassiouny H. M. S., Khattab H. K. I. and Sadak M. S., (2005) Improving the characteristics of roselle seeds as a new source of protein and lipid by gibberellins and benzyladenine application. Journal of Applied Sciences Research 1 (2): 161-167.

Nadjaf, F., Bannayan, M., Tabriz, L. and Rastgoo, M. (2006) Seed germination and dormancy breaking techniques for *Ferula gommosa* and *Teucrium polium*. Journal Arid Envirments., 54: 542-547.

Ojha, A., Sharma, V. N. and Sharma,V. (2010) An efficient protocol for in vitro clonal propagation of natural sweetener plant (*Stevia rebaudiana* Bertoni). African Journal of Plant Science; 4(8):319-321.

Powell, A., Matthews, A. S. and Olivera, M.(1984) Seed quality in grain legumes. Advances in Applied Biology, 10: 211-285.

Rafiq, M., Dahot, M. U., Mangrio, S. M., Naqavi, H. A. and Qashi, I. A. (2007) In vitro clonal propagation and biochemical analysis of field estabilihed st, Pakistan Journal of Botany, 39(7): 2467-2474.

Rita Elkins, M. H. (1997) Stevia natures sweetener.Woodland publishing, Inc, 160: 1-29.

Ritchie, S. and Gilroy, S. (1998) Gibberellins, regulating genes and germination. New Phytologist., 140: 363-383.

Sairam, R. K., Rao, K. V. and Srivastava, G. C. (2002) Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. Plant Science. 163:1037-1046.

Sedghi, M. and Toluie, S. (2013) Influence of salicylic acid on the antimicrobial potential of Stevia. Tropical Journal of Pharmacutical Research 12 (6): 1035-1038.

Sedghi, M., Nemati, A. and Esmaielpour, B. (2010) Effect of seed priming on germination and seedling growth of two medicinal plants under salinity, Emirates Journal of Food and Agriculture, 22(2): 130-139.

Shah, S. H., Ahmad, I. and Samiullah, (2006) Effect of gibberellic acid spray on growth, nutrient uptake and yield attributes during various growth stage of black cumin (*Nigella sativa* L.). Asian Journal of Plant Sciences 5 (5): 881-884.

Sifola M. I and Barbieri, G. (2006) Growth, yield and essential oil content of three cultivars of basil grown under different levels of nitrogen in the field. Scientia Horticulturae 108: 408-413.

Singh, S. D. and Rao, G. P. (2005) Stevia: the herbal sugar of 21 st century, Sugar Tech, 7(1): 17-24.

Sparks, D. L. (2005) Advance in Agronomy, Vol: 88, Published by academic press, 223-260.

Sun, T. P. and Gubler, F. (2004) Molecular mechanism of gibberellin signaling in plants. Annual Review in Plant Biology. 55: 197-223.

Taware, A. S. and Harke, S. N., Mukadam, D. S., Chavan, A. M., Taware, S. D. (2010) Effect of different extracts of callus and plantlets of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) onseed germination of some agricultural crops, African Journal Biotechnology 9(40): 6675-6683.

Yadav, A. K., Singh, S., Dayani, D. and Ahuja, P. S. (2011) A review on the improvement of stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni). Canadian Journal of Plant Science 91: 1-27.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-20]