

بررسی اثرات محلول پاشی سالیسیلیک اسید بر صفات مورفولوژیکی و بیوشیمیایی استویا (*Stevia rebaudiana*)

حسن جلیل‌وند شیرخانی تبار^۱، افشین توکلی*^۱، فواد مرادی^۲ و فرید شکاری^۱

^۱ دکتری گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران

^۲ پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، کرج، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۴/۲۶، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۹/۰۷/۱۵)

چکیده

به منظور ارزیابی اثر محلول پاشی سالیسیلیک اسید بر صفات مورفولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه استویا (*Stevia rebaudiana*) آزمایشی گلخانه‌ای در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در سال ۱۳۹۵ در قزوین اجرا شد. تیمارهای آزمایشی در چهار سطح محلول پاشی سالیسیلیک اسید شامل شاهد (عدم کاربرد)، غلظت ۱۰۰، ۳۰۰ و ۶۰۰ میکرو مولار سه ماه پس از انتقال نشاها به گلخانه بود. صفات مورد بررسی شامل ارتفاع بوته، تعداد شاخه‌های فرعی، وزن خشک بوته، وزن خشک برگ‌ها، وزن خشک شاخه‌ها، نسبت وزن خشک برگ‌ها به وزن خشک کل، درصد و عملکرد استویوزاید، ربودیوزاید-آ، ربودیوزاید-ب و ربودیوزاید-س بودند. نتایج نشان داد که محلول پاشی سالیسیلیک اسید اثرات افزایشی معنی‌داری بر کلیه صفات مورد ارزیابی بجز صفت شاخص سبزیگی (SPAD) داشت. به طوری که تیمار سطح ۱۰۰ میکرومولار باعث افزایش معنی‌دار ارتفاع بوته، درصد استویوزاید، درصد و عملکرد ربودیوزاید-س (به ترتیب ۱۸/۲، ۹۱/۷، ۱۶۰ و ۱۸۶ درصد) نسبت به تیمار شاهد شد. با افزایش غلظت سالیسیلیک اسید تا ۳۰۰ میکرومولار افزایش معنی‌داری در وزن خشک شاخه‌ها، وزن خشک برگ‌ها، وزن خشک بوته، عملکرد استویوزاید، درصد و عملکرد ربودیوزاید-آ (به ترتیب ۳/۹، ۱۰/۳، ۷/۰، ۸۴/۶، ۷۸/۳ و ۱۰۰/۰ درصد) نسبت به تیمار شاهد مشاهده شد و در نهایت با اعمال تیمار ۶۰۰ میکرومولار، تعداد شاخه‌های فرعی، نسبت وزن خشک برگ‌ها به وزن خشک شاخه‌ها، درصد و عملکرد ربودیوزاید-ب (به ترتیب ۳۶۵/۸، ۴۳/۰، ۳۸۳/۳ و ۳۴۴/۴ درصد) نسبت به تیمار شاهد افزایش یافت. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که محلول پاشی سالیسیلیک اسید در غلظت ۳۰۰ میکرو مولار می‌تواند در افزایش عملکرد کمی و کیفی استویا مؤثر باشد.

واژه‌های کلیدی: استویوزاید، ربودیوزاید، سبزیگی، وزن خشک

مقدمه

کشورهای چین، پاراگوئه، برزیل و کلمبیا، هند، ژاپن، کنیا، کره جنوبی، تایوان، ویتنام و ایالات متحده آمریکا زیرکشت گیاه استویا است. در حال حاضر کشورهای آمریکا، ژاپن، چین و اتحادیه اروپا سهم بالایی در بازار تجارت استویا در سطح

استویا با نام علمی *Stevia rebaudiana*، گیاهی بوته‌ای، چند ساله و پرشاخه از خانواده Asteraceae و بومی نواحی برزیل و پاراگوئه است. بیش از ۱۰۰ هزار هکتار از اراضی دنیا از جمله

* نویسنده مسئول، نشانی پست الکترونیکی: tavakoli@znu.ac.ir

که نقش مهمی در تنظیم برخی فرایندهای فیزیولوژیکی گیاهان دارد و کاربرد آن در بهبود فرایند رشد و نمو، تحمل به تنش‌ها و بیوستز فرآورده‌های بیوشیمیایی در برخی گیاهان از جمله گیاهان زراعی و دارویی گزارش شده است (Muthulakshmi and Lingakumar, 2017). در پژوهشی اثر محلول‌پاشی سالیسیلیک اسید بر برخی صفات مورفولوژیک و بیوشیمیایی (درصد استویزاید) گیاه استویا در چهار زمان برداشت بررسی و گزارش شد که سطوح مختلف این ماده فنولیک از صفر تا ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر اثر معنی‌دار و مؤثری روی صفات مورد مطالعه داشت (El-Housini et al., 2014). محققان گزارش کردند که کاربرد سالیسیلیک اسید در غلظت کم می‌تواند منجر به بهبود وزن تر و تجمع ماده خشک و در غلظت‌های بالا موجب کاهش این ویژگی‌های رشدی در گیاه آراییدوپسیس گردد. همچنین، ظهور علائم ناشی از تیمار این هورمون اعم از افزایش یا کاهش رشد به شرایط محیطی در زمان کاربرد بستگی دارد (Hayat et al., 2010). در یک بررسی روی گیاه استویا، کاربرد ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر سالیسیلیک اسید به‌روش محلول‌پاشی در مقایسه با غلظت صفر، ۵۰ و ۷۵ میلی‌گرم در لیتر، منجر به افزایش معنی‌دار تعداد شاخه‌ها، تعداد برگ، وزن تر و خشک برگ، سطح برگ و محتوای استویزاید گردید. به‌طوری‌که، اثر محلول‌پاشی سالیسیلیک اسید با غلظت ۷۵ میلی‌گرم در لیتر بر روی گیاه استویا در افزایش سطح برگ در چین سوم از فصل دوم برداشت در سطح یک درصد معنی‌دار بود (El-Housini et al., 2014). برگ‌های گیاه استویا با درصد ماده مؤثره بالا دارای اهمیت اقتصادی زیادی است. بنابراین، با توجه به تأیید مطالعات محققین در خصوص تأثیر مثبت محلول‌پاشی هورمون سالیسیلیک اسید روی رشد و افزایش مواد مؤثره گیاهی، مقرون به صرفه بودن کاربرد وسیع آن در افزایش وزن خشک برگ و محتوای ماده مؤثره برخی گیاهان و از سوی دیگر، عدم وجود گزارشی مبنی بر اثر منفی این هورمون بر سلامت انسان، این پژوهش با هدف بررسی اثر محلول‌پاشی غلظت‌های مختلف هورمون سالیسیلیک اسید جهت افزایش عملکرد کمی و کیفی گیاه استویا در شرایط

جهان دارند (Jahangir Chughtai et al., 2020). این گیاه به‌دلیل داشتن ترکیبات طبیعی شیرین و کم کالری در برگ‌ها، دارای اهمیت اقتصادی بالایی است و می‌تواند جایگزین مناسبی برای شیرین‌کننده‌های مصنوعی و طبیعی باشد (Libik-Konieczny et al., 2018; Lokesh et al., 2018; Yadav et al., 2011). متابولیت‌های ثانویه این گیاه با پایه موادی به نام استویول گلیکوزیدها (Steviol glycosides or SGs) متعلق به دی‌ترین‌های چهار حلقه‌ای (Tetracyclic diterpenes) هستند که موجب طعم شیرین گیاه می‌شوند و با این وجود، در هنگام مصرف، این مواد متابولیزه نمی‌شوند، انرژی از آنها آزاد نمی‌گردد و بنابراین، برای افراد دیابتی مفید می‌باشند (Gantait and Mandal, 2015; Mejia-espejel et al., 2018).

از میان هشت ماده دی‌ترین گلیکوزیدی شناسایی شده در برگ‌های این گیاه، چهار ماده استویزاید (Stevioside)، ربودیوزاید-آ (Rebaudioside-A)، ربودیوزاید-س (Rebaudioside-C) و دولکوزاید (Dulcoside) دارای اهمیت زیادی هستند (کریمی و همکاران، ۱۳۹۲؛ Brandle and Telmer, 2007). استویزاید و ربودیوزاید-آ ۲۰۰ تا ۳۰۰ برابر شیرین‌تر از شکر هستند و به ترتیب اولین و دومین شیرین‌کننده با فراوانی بالا در برگ را شامل می‌شوند که نسبت این دو جز، تعیین‌کننده کیفیت مزه در استویا است (Tansi et al., 2017; Tavakoli et al., 2019).

با توجه به ارزش تجاری استویول گلیکوزیدها، راهبردهای فنی برای افزایش این متابولیت‌های ثانویه در استویا ارائه شده و در این راستا، استفاده از محرک‌ها (به‌شیوه زیستی و غیرزیستی) به‌عنوان یک روش امیدبخش برای افزایش محتوای این ترکیبات در گیاهان مورد توجه قرار گرفته است (Tavakoli et al., 2019). مواد تنظیم‌کننده رشد گیاهی از مهم‌ترین عوامل کاربردی تأثیرگذار در الگوی رشد، جوانه‌زنی و سطوح مواد مؤثره گیاهان می‌باشند (Vakilzadeh Anaraki et al., 2014). سالیسیلیک اسید با نام اختصاری SA یا ارتو هیدروکسی بنزوئیک اسید (Ortho-hydroxybenzoic acid)، به‌عنوان یک تنظیم‌کننده رشد و همچنین یک آنتی‌اکسیدان غیرآنزیمی بالقوه، یکی از چندین ترکیب فنلی در گیاهان است

گلخانه به اجرا درآمد.

مواد و روش‌ها

این پژوهش با هدف بررسی اثر محلول پاشی غلظت‌های مختلف هورمون سالیسیلیک اسید بر عملکرد کمی و کیفی گیاه استویا در گلخانه ایستگاه تحقیقات کشاورزی اسماعیل آباد واقع در ده کیلومتری جنوب غربی شهر قزوین (۳۶ درجه ۱۵ دقیقه ۲۲ ثانیه شمالی و ۴۹ درجه ۵۴ دقیقه ۳۲ ثانیه شرقی با ارتفاع ۱۲۸۵ متر از سطح دریا) در سال ۱۳۹۵ اجرا شد. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار و چهار تیمار محلول پاشی (شاهد، ۱۰۰، ۳۰۰ و ۶۰۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید) صورت گرفت و هر تیمار شامل شش گلدان با قطر ۱۸ و ارتفاع ۲۰ سانتی‌متر بود.

با توجه به پایین بودن قوه نامیه بذر استویا و به منظور داشتن جمعیتی همسان در کشت، از نشاءهای تجاری با میانگین ارتفاع ۲۰-۱۵ سانتی‌متر استفاده شد. خاک مورد استفاده در گلدان‌ها، خاک مزرعه با بافت لوم (۴۸٪ شن، ۳۵٪ سیلت و ۱۷٪ رس) بود. دمای گلخانه در روز و شب به ترتیب ۳۲ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد و طول روز ۱۵ ساعت تنظیم گردید. سه‌ماه پس از انتقال نشاء و استقرار کامل بوته، تیمار محلول پاشی با استفاده از سالیسیلیک اسید (SA) آزمایشگاهی (Merck Salicylic acid, 100631-Germany) در غلظت‌های مختلف همراه با مویان دی اکتیل تجاری با غلظت ۰/۳ در هزار طی ساعات پایانی روز به وسیله سمپاش دستی، اعمال شد. ۴۰ روز پس از اعمال تیمار محلول پاشی سالیسیلیک اسید شاخص سبزیگی برگ توسط دستگاه SPAD 502 (Konica Minolta, Japan) بر روی آخرین برگ توسعه یافته اندازه‌گیری شد. همچنین، صفات مورفولوژیکی شامل ارتفاع بوته و تعداد شاخه‌های فرعی تعیین شدند. سپس، از هر واحد آزمایشی نمونه‌برداری به صورت تخریبی انجام گرفت و دو بوته از ارتفاع ۱۰ سانتی‌متر بالای سطح خاک برداشت و در آون با دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت خشک شد و جهت ارزیابی صفات وزن خشک بوته، وزن خشک برگ‌ها در هر بوته، وزن خشک شاخه‌ها در هر بوته، نسبت وزن خشک

برگ‌ها به وزن خشک کل هر بوته استفاده شد. به منظور استخراج استویوزاید، ربودیوزاید-آ، ربودیوزاید-ب و ربودیوزاید-س، میزان ۱۰۰ میلی‌گرم از نمونه برگ تازه پودر شده توسط نیتروژن مایع در یک میلی‌لیتر متانول ۷۰ درصد حل شده و سپس به مدت ده دقیقه در دستگاه اولتراسونیک (دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد) قرار داده شد (Zeng et al., 2013). پس از سانتریفیوژ نمونه‌ها (۷۰۰۰ دور در دقیقه) و گذر از فیلتر (۰/۲ میکرومتر)، غلظت مواد مؤثره با استفاده از دستگاه HPLC (Agilent, 1260 infinity II HPLC system, C18, length, 250 mm; inner diameter, Eclipse Analytical, USA) موجود در پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران (ABRII) توسط سیستم فاز متحرک حلال دوگانه ایزوکراتیک شامل مخلوط متانول: بافر فسفات سدیم (۶۸:۳۲)، شدت جریان عبور ثابت یک میلی‌لیتر در دقیقه و حجم تزریق نمونه ۲۰ میکرولیتر؛ مورد بررسی قرار گرفت. محلول استاندارد شاهد استویول‌های مورد ارزیابی در هشت غلظت ۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰ و ۵۰۰ پی‌پی‌ام به صورت جداگانه تهیه و به سیستم HPLC تزریق شد و سپس معادله رگرسیون به منظور محاسبه غلظت هر یک از مواد مؤثره موجود در هر نمونه برآزش داده شد. پس از انجام اندازه‌گیری‌ها و محاسبات لازم، تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها از جمله تجزیه واریانس و مقایسه میانگین‌ها براساس آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح پنج درصد توسط نرم‌افزارهای SAS 9 و Excel انجام شد.

نتایج و بحث

ارتفاع بوته: نتایج نشان داد که اعمال تیمار هورمون تأثیر معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد روی صفت ارتفاع بوته داشت (جدول ۱). مقایسه میانگین‌ها نشان داد که بیشترین ارتفاع بوته در تیمار محلول پاشی با غلظت ۱۰۰ میکرومولار بود که نسبت به شاهد (عدم کاربرد هورمون) ۱۸/۲ درصد افزایش داشت و با سایر تیمارها تفاوت معنی‌داری نداشت (جدول ۲). سالارپور و فرح‌بخش (۱۳۹۳) گزارش کردند که محلول پاشی سالیسیلیک منجر به افزایش تعداد میانگره، طول

جدول ۱- تجزیه واریانس صفات مختلف ارزیابی شده با اعمال تیمارهای مختلف هورمون سالیسیلیک اسید در گیاه استویا

میانگین مربعات							
منابع تغییر	درجه آزادی	ارتفاع بوته	تعداد شاخه‌های فرعی	شاخص سبزی‌نگی (SPAD)	وزن خشک شاخه‌ها	وزن خشک برگ‌ها	نسبت وزن برگ به شاخه‌ها
هورمون	۳	۵۴/۹**	۲۱۱۷/۴**	۲/۷۶ ^{ns}	۱۶/۷۷**	۵/۸۱**	۳۱/۶۶**
خطا	۸	۴/۰	۴/۲۸	۱/۴۸	۰/۳۹	۰/۲۱	۰/۰۰۴
ضریب تغییرات (%)	۳/۴۱	۴/۸۸	۴/۱۷	۴/۴۶	۳/۱۷	۳/۱۶	۶/۱۹

ns و ** به ترتیب نشان‌دهنده عدم تفاوت معنی‌دار و وجود تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال پنج و یک درصد است.

ادامه جدول ۱-

میانگین مربعات							
منابع تغییر	درجه آزادی	درصد ربودیوزاید آ	درصد ربودیوزاید ب	درصد ربودیوزاید س	عملکرد ربودیوزاید آ	عملکرد ربودیوزاید ب	عملکرد ربودیوزاید س
هورمون	۳	۷/۲۸**	۱/۷۳**	۰/۰۳**	۰/۰۰۵**	۰/۱۳**	۰/۰۰۰۷*
خطا	۸	۰/۲۸	۰/۱۷	۰/۰۰۰۸	۰/۰۰۰۵	۰/۰۰۰۷	۰/۰۰۰۰۱
ضریب تغییرات (%)	۱۰/۳۸	۱۲/۸۶	۱۷/۳۳	۲۵/۰۴	۱۱/۴۵	۱۳/۹۵	۲۷/۸۰

ns و ** به ترتیب نشان‌دهنده عدم تفاوت معنی‌دار و وجود تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال پنج و یک درصد می‌باشد.

جدول ۲- مقایسه میانگین صفات مختلف ارزیابی شده با کاربرد غلظت‌های مختلف هورمون سالیسیلیک اسید در گیاه استویا

سطح هورمون	ارتفاع بوته (سانتی‌متر)	تعداد شاخه‌های فرعی	شاخص سبزی‌نگی (SPAD)	وزن خشک شاخه‌ها	وزن خشک برگ‌ها	وزن خشک بوته	نسبت برگ به شاخه‌ها
شاهد	۵۲/۷ ^b	۱۵/۸ ^d	۲۸/۴ ^a	۱۵/۵ ^a	۱۴/۵ ^b	۳۰/۰ ^b	۰/۹۳ ^b
SA _{۱۰۰} μM	۶۲/۳ ^a	۲۵/۷ ^c	۲۹/۲ ^a	۱۳/۴ ^b	۱۲/۶ ^c	۲۶/۰ ^c	۰/۹۴ ^b
SA _{۳۰۰} μM	۶۱ ^a	۵۴/۷ ^b	۲۸/۶ ^a	۱۶/۱ ^a	۱۶ ^a	۳۲/۱ ^a	۰/۹۹ ^b
SA _{۶۰۰} μM	۵۸/۶ ^a	۷۳/۶ ^a	۳۰/۵ ^a	۱۰/۹ ^c	۱۴/۴ ^b	۲۵/۳ ^c	۱/۳۳ ^a

میانگین‌های با حروف مشابه در یک صفت، مطابق آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

میانگره و به‌واسطه آنها ارتفاع گیاه رازیانه گردید. افزایش ارتفاع بوته در تیمارهای محلول‌پاشی نسبت به تیمار شاهد (عدم کاربرد هورمون)، می‌تواند ناشی از افزایش تقسیم سلولی در ناحیه مرستم انتهایی گیاه باشد. افزایش ارتفاع در گیاه جو نیز در اثر افزایش کاربرد سالیسیلیک اسید تا غلظت ۰/۵ میلی‌مولار نیز گزارش شده است (منتظری و همکاران، ۱۳۹۵). با توجه به همبستگی مثبت و معنی‌دار این صفت ($P \leq 0/01$) با صفت عملکرد استویوزاید، به‌منظور داشتن محتوای بیشتر از

میانگره و به‌واسطه آنها ارتفاع گیاه رازیانه گردید. افزایش ارتفاع بوته در تیمارهای محلول‌پاشی نسبت به تیمار شاهد (عدم کاربرد هورمون)، می‌تواند ناشی از افزایش تقسیم سلولی در ناحیه مرستم انتهایی گیاه باشد. افزایش ارتفاع در گیاه جو

سطح هورمون	درصد استویوزاید	درصد ربودیوزاید- آ	درصد ربودیوزاید- ب	درصد ربودیوزاید- س	عملکرد استویوزاید	عملکرد ربودیوزاید- آ	عملکرد ربودیوزاید- ب	عملکرد ربودیوزاید- س
شاهد	۳/۶ ^b	۲/۳ ^c	۰/۰۶ ^c	۰/۰۵ ^b	۰/۵۲ ^b	۰/۳۳ ^c	۰/۰۰۹ ^d	۰/۰۰۷ ^b
SA _{۱۰۰} μM	۶/۹ ^a	۳/۲ ^b	۰/۱۵ ^b	۰/۱۳ ^a	۰/۸۷ ^a	۰/۴ ^{bc}	۰/۰۲ ^c	۰/۰۲ ^a
SA _{۳۰۰} μM	۶/۰ ^a	۴/۱ ^a	۰/۱۷ ^b	۰/۰۶ ^b	۰/۹۶ ^a	۰/۶۶ ^a	۰/۰۳ ^b	۰/۰۰۹ ^b
SA _{۶۰۰} μM	۴/۱ ^b	۳/۳ ^b	۰/۲۹ ^a	۰/۱۱ ^a	۰/۵۹ ^b	۰/۴۸ ^b	۰/۰۴ ^a	۰/۰۲ ^a

میانگین‌های با حروف مشابه در یک صفت، مطابق آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی داری با یکدیگر ندارند.

اسید نیز می‌تواند ناشی از کاهش غالبیت و رشد مریستم انتهایی و همچنین، تحریک رشد مریستم‌های جانبی و به عبارت دیگر تمایل گیاه به کوتاه‌تر و پرشاخه‌تر شدن باشد (Hayat et al., 2013). در پژوهشی دیگر نیز گزارش شده است که تعداد شاخه‌های گیاهان ریحان و مرزنگوش در اثر محلول پاشی سالیسیلیک اسید افزایش یافت (Abdel and Gharib, 2006).

شاخص سبزیگی (SPAD): نتایج نشان داد که اثر کاربرد غلظت‌های مختلف سالیسیلیک اسید بر شاخص سبزیگی یا محتوای کلروفیل برگ معنی دار نبود (جدول ۱). کلروفیل به‌عنوان یکی از اجزای کلروپلاست نقش مهمی را در فرایند فتوسنتز ایفا می‌کند. غلظت‌های پایین رنگدانه‌های فتوسنتزی می‌تواند به‌طور مستقیم پتانسیل فتوسنتز و تولیدات اولیه را محدود نماید (Anjum et al., 2011). برخلاف مطالعه حاضر، افزایش میزان شاخص سبزیگی و رنگدانه‌های فتوسنتزی در اثر کاربرد سالیسیلیک اسید به‌دلیل افزایش محتوای کلروفیل برگ در گیاهان چای ترش (*Hibiscus sabdariffa* L.) و خردل (*Brassica juncea*) گزارش شده است (Yusuf et al., 2012; Ali et al., 2012). محققان گزارش کردند که محلول پاشی سالیسیلیک اسید باعث تغییرات ساختار برگ از جمله کاهش ضخامت اپیدرم و مزوفیل در گیاه فیکوس (*Ficus deltoidea*) به‌همراه افزایش حجم کلروپلاست و تورم تیلکوئیدها و تغلیظ مایع استروما می‌گردد و این موضوع در

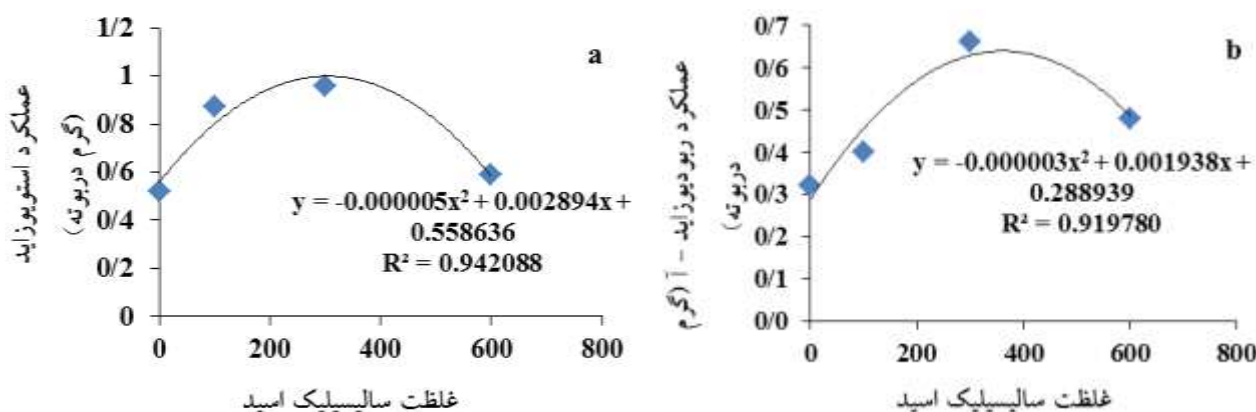
با توجه به همبستگی مثبت و معنی‌دار این صفت ($P \leq 0.01$) با صفت عملکرد استویوزاید، به‌منظور داشتن محتوای بیشتر از این ماده مؤثره، می‌توان روی گیاهانی با ارتفاع بیشتر، مطالعه نمود (جدول ۳). روند کند در شدت افزایش میزان ارتفاع بوته با کاربرد سطح غلظت ۱۰۰ میکرومولار تا ۶۰۰ میکرومولار محلول پاشی سالیسیلیک اسید می‌تواند به‌دلیل اختلال در مسیر بیوسنتزی سایر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی از جمله مسیر فعالیت آنزیم انت کائورون سینتاز (Enthase kaurene synthase)، جیبرلیک اسید و برهم‌خوردن تعادل هورمونی گیاه بر اثر غلظت بیش از حد سالیسیلیک اسید باشد (پیراسته انوشه و امام، ۱۳۹۸؛ Hayat et al., 2013).

تعداد شاخه‌های فرعی: اثر محلول پاشی سالیسیلیک اسید بر صفت تعداد شاخه‌های فرعی در سطح یک درصد معنی دار بود (جدول ۱). کاربرد سالیسیلیک اسید در غلظت ۶۰۰ میکرومولار منجر به افزایش تعداد شاخه‌های فرعی به میزان ۳۶۵/۸ درصد نسبت به تیمار شاهد (عدم کاربرد هورمون) گردید (جدول ۲). با توجه به همبستگی مثبت و معنی‌دار تعداد شاخه‌های فرعی و صفات کیفی، معادله رگرسیون خطی روی داده‌ها برآزش داده شد و نتایج نشان داد که روند تغییرات تعداد شاخه‌های فرعی در پاسخ به کاربرد غلظت‌های مختلف سالیسیلیک اسید به صورت خطی و افزایشی با شیب ۰/۰۹۸ بود (جدول ۳ و شکل ۱). روند افزایشی تعداد شاخه‌های فرعی با کاربرد غلظت ۱۰۰ تا ۶۰۰ میکرومولار سالیسیلیک

در غلظت‌های ۱۰۰ و ۶۰۰ میکرومولار، وزن خشک شاخه‌ها به ترتیب با ۱۳/۵ و ۲۹/۷ درصد نسبت به تیمار شاهد کاهش یافت. با توجه به اینکه با افزایش غلظت محلول‌پاشی سالیسیلیک اسید تعداد شاخه‌های فرعی افزایش ولی وزن آنها کاهش یافته است؛ بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که این هورمون بیشتر در شاخه‌زایی گیاه استویا و به همین واسطه در برگ‌تر شدن آن روی شاخه‌های فرعی نقش مهمی دارد که با نتایج راستگو و همکاران (۱۳۹۸) نیز مطابقت دارد. نتایج نشان داد که وزن خشک شاخه‌ها همبستگی منفی و معنی‌داری با محتوای ربودیوزاید-ب و ربودیوزاید-س به ترتیب در سطح احتمال پنج و یک درصد داشت (جدول ۳). این موضوع به واسطه افزایش میزان تنفس، کاهش تثبیت دی‌اکسید کربن و در نتیجه کاهش تولیدات فتوسنتزی و متابولیت‌ها می‌تواند منجر به کاهش عملکرد کیفی گیاه استویا (ربودیوزاید ب و س) گردد.

وزن خشک برگ‌ها، وزن خشک بوته و نسبت وزن خشک برگ‌ها به وزن خشک شاخه: نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر کاربرد هورمون سالیسیلیک اسید بر صفات وزن خشک برگ‌ها، وزن خشک بوته و نسبت وزن خشک برگ‌ها به وزن خشک شاخه در سطح یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). کاربرد محلول‌پاشی هورمون سالیسیلیک اسید در غلظت ۳۰۰ میکرومولار، منجر به افزایش وزن خشک برگ‌ها و وزن خشک بوته به ترتیب به میزان ۱۰/۳ و ۷/۰ درصد نسبت به تیمار شاهد گردید. ویژگی‌های کیفی استویا مانند میزان استویوزاید رابطه مستقیمی با تعداد و وزن برگ‌ها دارد (کریمی و همکاران، ۱۳۹۲). بنابراین، به نظر می‌رسد برگ بودن و سنگین‌تر بودن برگ‌ها نسبت به شاخه‌ها، دارای تأثیر قابل توجهی روی وزن نهایی بوته در این گیاه باشد که با نتایج حاصل از پژوهش برخی محققین در خصوص تأثیر سالیسیلیک اسید بر افزایش کارایی فتوسنتز برگ‌ها، فعالیت‌های آنزیمی و سنتز پروتئین‌ها و در نتیجه بهبود جذب عناصر غذایی و افزایش تولید گیاه همخوانی دارد (El- & Sharafizad *et al.*, 2012; Housini *et al.*, 2014). با توجه به این‌که در پژوهش حاضر،

محلول‌پاشی در غلظت‌های ۱۰۰ و ۶۰۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید منجر به کاهش نسبی وزن خشک برگ‌ها و بوته نسبت به تیمار شاهد شده است؛ این موضوع می‌تواند ناشی از برهم‌خوردن تعادل نسبت هورمونی در گیاه و تأثیر آن بر رشد برگ‌ها باشد. بنابراین، به نظر می‌رسد سالیسیلیک اسید تنها در غلظت مناسب می‌تواند به دلیل گسترش سطح برگ و تولید برگ‌های بیشتر، با ایجاد منبع فیزیولوژیک کارآمد برای استفاده هر چه بیشتر از نور دریافتی، باعث افزایش تولید بیشتر ماده خشک شود. در گزارشی دیگر، محلول‌پاشی هورمون سالیسیلیک اسید (۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر) روی گیاه مرزه (*Satureja hortensis* L.)، بر افزایش وزن تر آن تأثیر معنی‌داری داشته است (حیاتی و روشن، ۱۳۹۲). محققین در بررسی تأثیر محلول‌پاشی سالیسیلیک اسید بر روی گیاه استویا، گزارش نمودند که محلول‌پاشی این هورمون با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر منجر به افزایش وزن خشک برگ‌های یک بوته تا شش گرم شد (El-Housini *et al.*, 2014). از سوی دیگر، نتایج پژوهش حاضر نشان داد که نسبت وزن خشک برگ به وزن خشک شاخه‌ها در تیمار سالیسیلیک اسید (غلظت ۶۰۰ میکرومولار)، بالاترین میزان را به دلیل دارا بودن کمترین میزان وزن شاخه‌ها بین تیمارهای مورد ارزیابی دارد (جدول ۲). سایر پژوهشگران نیز اعلام کردند که کاربرد تنظیم‌کننده‌های رشد منجر به تقویت جذب و توازن عناصر تغذیه‌ای، فراهم‌نمودن شرایط مطلوب‌تر فتوسنتزی، تولید متابولیت‌های مؤثر، بازدارندگی گلدهی و در نتیجه بهبود عملکرد نهایی در گیاه استویا می‌شود (Singh *et al.*, 2018). نتایج مشابهی نیز در خصوص تأثیر مثبت محلول‌پاشی سالیسیلیک اسید بر وزن خشک و تر گیاهان ریحان و مرزنگوش گزارش شده است (Abdel and Gharib, 2006). وجود همبستگی مثبت و معنی‌دار در سطح یک درصد بین وزن خشک بوته با وزن خشک شاخه‌ها و وزن خشک برگ‌ها نشان می‌دهد که در این مطالعه وزن خشک شاخه‌ها تأثیر بیشتری نسبت به وزن خشک برگ‌ها روی وزن خشک بوته دارند (جدول ۳). همچنین، با توجه به همبستگی مثبت و



شکل ۲- (a) عملکرد استویزاید؛ (b) عملکرد ربودیوزاید-آ در گیاه استویا با غلظت‌های مختلف محلول‌پاشی سالیسیلیک اسید

اسید جهت حصول بالاترین عملکرد استویزاید مشتق معادله رگرسیون حاصل از برازش داده‌ها بر غلظت‌های مختلف این هورمون برابر صفر قرار داده شد و بهترین غلظت جهت حصول بالاترین عملکرد استویزاید با کاربرد ۲۸۹ میکرومولار سالیسیلیک اسید محاسبه گردید (شکل ۲-ا). در بررسی دیگری روی گیاه استویا، محلول‌پاشی با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر هورمون سالیسیلیک اسید منجر به افزایش درصد استویزاید تا بیش از ۲۱ درصد گردید (El-Housini *et al.*, 2014). بیشترین درصد ربودیوزاید-آ نیز در تیمار محلول‌پاشی ۳۰۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید محاسبه شد که نسبت به تیمار شاهد ۷۸/۳ درصد افزایش داشت. بیشترین عملکرد ربودیوزاید-آ نیز به‌عنوان دومین شاخص مهم اقتصادی این گیاه در تیمار محلول‌پاشی ۳۰۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید با ۱۰۰ درصد افزایش نسبت به شاهد محاسبه شد (جدول ۲). به‌منظور پیشنهاد بهترین غلظت محلول‌پاشی سالیسیلیک اسید جهت به‌دست‌آوردن بیشترین عملکرد ربودیوزاید-آ، مشتق معادله رگرسیون حاصل از برازش داده‌ها بر میزان غلظت‌های مختلف این هورمون برابر صفر قرار داده شد و بهترین غلظت جهت حصول بالاترین عملکرد ربودیوزاید-آ با کاربرد ۳۲۳ میکرومولار سالیسیلیک اسید حاصل شد (شکل ۲-ب). بیشترین درصد و عملکرد ربودیوزاید-ب در تیمار محلول‌پاشی ۶۰۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید بود که نسبت به تیمار شاهد به‌ترتیب ۳۸۳/۳ و ۳۴۴/۴ درصد افزایش داشت (جدول ۲). بیشترین درصد و عملکرد ربودیوزاید-س در تیمار

معنی‌دار نسبت وزن خشک برگ‌ها به وزن خشک بوته با تعداد شاخه‌های فرعی، به‌نظر می‌رسد افزایش تعداد شاخه‌های فرعی منجر به افزایش تعداد برگ‌ها و کاهش وزن شاخه‌ها می‌گردد که این موضوع در همبستگی منفی بین وزن شاخه‌ها و تعداد شاخه‌های فرعی نیز مشاهده می‌گردد (جدول ۳).

مقادیر استویول گلوکوزایدها: تأثیر محلول‌پاشی هورمون سالیسیلیک اسید بر درصد استویزاید، درصد ربودیوزاید-آ، درصد ربودیوزاید-ب، درصد ربودیوزاید-س، عملکرد استویزاید، عملکرد ربودیوزاید-آ، عملکرد ربودیوزاید-ب، در سطح یک درصد و بر عملکرد ربودیوزاید-س در سطح پنج درصد معنی‌دار بود. بیشترین درصد استویزاید در تیمار محلول‌پاشی ۱۰۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید (به میزان ۶/۹ درصد) با افزایش ۹۱/۷ درصدی نسبت به تیمار شاهد (عدم کاربرد هورمون) مشاهده شد و با تیمار محلول‌پاشی ۳۰۰ میکرومولار در یک گروه آماری قرار گرفت. درحالی‌که، بیشترین عملکرد استویزاید به‌عنوان اولین شاخص مهم اقتصادی این گیاه، در تیمار محلول‌پاشی ۳۰۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید مشاهده شد که نسبت به تیمار شاهد ۸۴/۶ درصد افزایش نشان داد (جدول ۲). در مطالعه ثانی‌خانی و همکاران (۱۳۹۹) نیز گزارش گردید بیشترین عملکرد استویزاید و ربودیوزاید-آ به‌ترتیب به مقادیر ۶۰/۳۲ و ۲۴/۱۴ میلی‌گرم در گرم برگ خشک گیاه استویا در تیمار کاربرد ۰/۶ میلی‌مولار محلول‌پاشی سالیسیلیک اسید مشاهده شد.

به‌منظور پیشنهاد بهترین غلظت محلول‌پاشی سالیسیلیک

نتیجه گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که محلول پاشی هورمون سالیسیلیک اسید بر صفات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی تأثیر معنی داری داشت. با توجه به اینکه تیمار محلول پاشی سالیسیلیک اسید (با غلظت ۳۰۰ میکرومولار)، بالاترین میزان وزن خشک برگ‌ها، عملکرد استیویازید و ربود یوزادید-آ را دارا بود، بنابراین می‌توان کاربرد این غلظت از تنظیم کننده رشد سالیسیلیک اسید را جهت بهبود بر خصوصیات کمی و کیفی گیاه استویا، توصیه نمود.

محلول پاشی ۱۰۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید حاصل شد به ترتیب ۱۶۰ و ۱۸۶ درصد نسبت به تیمار شاهد افزایش نشان داد و با تیمار محلول پاشی ۶۰۰ میکرومولار در یک گروه آماری قرار گرفت (جدول ۲). محققان گزارش کردند که با افزایش غلظت هورمون سالیسیلیک اسید، با وجود بالا رفتن کمیت صفات مورفولوژیکی، میزان صفات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی مورد ارزیابی در گیاه استویا روند نزولی دارد (Ren *et al.*, 2011). بنابراین، به منظور توجیه پذیر بودن عملکرد کمی و کیفی در گیاه، هورمون‌های تنظیم کننده باید در غلظت بهینه‌ای در تعادل با سایر هورمون‌های گیاهی به کار روند.

منابع

- پیراسته‌نوشه، ه. و امام، ی. (۱۳۹۸) نقش تنظیم کننده‌های رشد در افزایش عملکرد گیاهان زراعی در شرایط شور: از تئوری تا عمل. نشریه علوم گیاهان زراعی ایران ۲۱: ۲۰۹-۱۸۸.
- ثانی‌خانی، م.، راستگو، ع.، خیری، ع. و اعلائی، م. (۱۳۹۹) اثرات محلول پاشی محرک‌های سالیسیلیک اسید و پرولین بر محتوای گلیکوزیدهای استویول و ترکیبات فنلی گیاه استویا (*Stevia rebaudiana* (Bert.)) مجله‌ی فرایند و کارکرد گیاهی ۹: ۱۵-۱.
- حیاتی، پ. و روشن، و. (۱۳۹۲) بررسی اثر سالیسیلیک اسید بر پارامترهای رشدی و کمیت و کیفیت اسانس گیاه مرزه (*Satureja hortensis* L.). فصلنامه علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران ۲۹: ۸۱۷-۸۰۸.
- راستگو، ع.، ثانی‌خانی، م.، خیری، ع. و اعلائی، م. (۱۳۹۸) اثر پرولین و سالیسیلیک اسید بر شاخص‌های مورفولوژیکی و فیتوشیمیایی استویا. مجله‌ی علوم باغبانی ایران ۵۰: ۲۱۹-۲۰۹.
- سالارپور غربا، ف. و فرح‌بخش، ح. (۱۳۹۳) تأثیر تنش خشکی و اسید سالیسیلیک بر صفات ظاهری و فیزیولوژیکی گیاه رازیانه. مجله‌ی به‌زراعی کشاورزی ۱۶: ۷۷۸-۷۶۵.
- کریمی، م.، هاشمی، ج.، احمدی، ع. و عباسی، ع. (۱۳۹۲) اثر تنش خشکی بر رشد و محتوای گلیکوزیدهای استویول در گیاه استویا (*Stevia rebaudiana*). نشریه علوم گیاهان زراعی ایران ۴۴: ۷۰۲-۶۹۳.
- منتظری تختی، ن.، خواجه‌ی نژاد، غ. ر. و آروین، م. ج. (۱۳۹۵) واکنش ارقام جو به تیمارهای شیمیایی سالیسیلیک اسید و سلنیوم تحت تنش خشکی در شرایط مزرعه. مجله‌ی به‌زراعی کشاورزی ۱۸: ۴۶۱-۴۳۱.

- Abdel, F. and Gharib, L. (2006) Effect of salicylic acid on the growth, metabolic activities and oil content of basil and marjoram. *International Journal of Agricultural Biology* 8: 458-492.
- Ali, H. M., Siddiqui, M. H., Basalah, M. O., Al-Wahaibi, M. H., Sakran, A. M. and Al-Amri, A. (2012) Effects of gibberellic acid on growth and photosynthetic pigments of *Hibiscus sabdariffa* L. under salt stress. *African Journal of Biotechnology* 11: 800-804.
- 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.
- Brandle, J. E. and Telmer, P. G. (2007) Steviol glycoside biosynthesis. *Phytochemistry* 68: 1855-1863.
- El-Housini, E. A., Ahmed, M. A., Hassanein, M. S. and Tawfik, M. M. (2014) Effect of salicylic acid (SA) on growth and quality of stevia (*Stevia rebaudiana* Bert.) under salt stress. *American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences* 14: 275-281.
- Gantait, S., Das, A. and Mandal, N. (2015) Stevia: A comprehensive review on ethnopharmacological properties and in vitro regeneration. *Sugar Tech* 17: 95-106.

- Hayat, Q., Hayat, S., Irfan, M. and Ahmad, A. (2010) Effect of exogenous salicylic acid under changing environment: A review. *Environmental and Experimental Botany* 68: 14-25.
- Hayat, S., Ahmad, A. and Alyemeni, M. N. (2013) *Salicylic Acid Plant Growth and Development*. Springer Dordrecht Heidelberg, New York, London.
- Ismail, A., Shahidan, N., Mat, N. and Othman, R. (2020) Effect of salicylic acid on carotenoids and chlorophyll content in Mas Cotek (*Ficus deltoidea* Jack var. *trengganuensis*) leaves and its retinol activity equivalents (RAE). *Journal of Pharmacy and Nutrition Sciences* 10: 25-33.
- Jahangir Chughtai, M. F., Pasha, I., Zahoor, T., Khaliq, A., Ahsan, S., Wu, Z. and Liaqat, A. (2020) Nutritional and therapeutic perspectives of *Stevia rebaudiana* as emerging sweetener; a way forward for sweetener industry. *CyTA- Journal of Food* 18: 164-177.
- Libik-Konieczny, M., Capecka, E., Kakol, E., Dziurka, M., Grabowska-Joachimiak, A., Sliwinska, E. and Pistelli, L. (2018) Growth, development and steviol glycosides content in the relation to the photosynthetic activity of several *Stevia rebaudiana* Bertoni strains cultivated under temperate climate conditions. *Scientia Horticulturae* 234: 10-18.
- Lokesh, C. H., Hiremath, J. S., Mahantesh, P. S., Sharatbabu, A. G., Pooja, M. R. and Nishchitha, M. (2018) Effect of nitrogen and GA3 on suppression of flowering for enhancement of vegetative phase in stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni.). *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 7: 412-419.
- Mejia-Espejel, L., Robledo-Paz, A., Lozoya-Gloria, E., Pena-Valdivia, C. B. and Carrillo-Salazar, J. A. (2018) Elicitors on steviosides production in *Stevia rebaudiana* Bertoni calli. *Scientia Horticulturae* 242: 95-102.
- Muthulakshmi, S. and Lingakumar, K. (2017) Role of salicylic acid (SA) in plants—a review. *International Journal of Applied Researches* 3: 33-37.
- Ren, G., Liu, X. and Shi, Y. (2011) Effects of plant growth regulator SY on diurnal changes in photosynthetic parameters and yield of *Stevia Rebaudina* Bertoni. *Energy Procedia* 5: 429-434.
- Sharafizad, M., Naderi, A., Ata Siadat, S., Sakinejad, T. and Lak, S. (2012) Effect of salicylic acid pretreatment on yield, its components and remobilization of stored material of wheat under drought Stress. *Journal of Agriculture Science* 4: 115-125.
- Singh, V. P., Vishwanath, Y. C., Kattimani, K. N., Sakhubai, H. T., Harish, B. S. and Sainath, R. (2018) Influence of different plant growth regulators on flower suppression, herb yield and stevioside content of stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni.). *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 3: 358-361.
- Tansi, L. S., Samadpourigani, E. and Gedik, S. (2017) Effects of different plant density and cutting times on yield of stevia under the Cukurova conditions. *International Journal of Secondary Metabolite* 4: 355-358.
- Tavakoli, H., Tavakoli, N. and Moradi, F. (2019) The effect of the elicitors on the steviol glycosides biosynthesis pathway in *Stevia rebaudiana*. *Functional Plant Biology* 46: 787-795.
- Vakilzadeh Anaraki, M., Mortazaeinezhad, F., Khalili, F., Gheisari, M. M. and Esfahanizadeh Hosseinpour, M. (2014) Effect of gibberllic acid and salicylic acid on secondary metabolites in leaf of *Curcuma longa* L. *Journal of Herbal Drug* 5: 137-142.
- Yadav, A. K., Singh, S., Dhyani, D. and Ahuja, P. S. (2011) A review on the improvement of stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni). *Canadian Journal of Plant Science* 91: 1-27.
- Yusuf, M., Fariduddin, Q., Varshney, P. and Ahmad, A. (2012) Salicylic acid minimizes nickel and/or salinity-induced toxicity in Indian mustard (*Brassica juncea*) through an improved antioxidant system. *Environmental Science and Pollution Research* 19: 8-18.
- Zeng, J., Chen, A., Li, D., Yi, B. and Wu, W. (2013) Effects of salt stress on the growth, physiological responses, and glycoside contents of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61: 5720-5726.

Effect of salicylic acid foliar application on the morphological and biochemical traits of Stevia (*Stevia rebaudiana*)

Hassan Jalilvand Shirkhanitabar¹, Afshin Tavakoli^{1*}, Foad Moradi² and Farid Shekari¹
¹ Department of Plant Production and Genetics, Agricultural Faculty, University of Zanjan, Zanjan, Iran

² Associated Professor, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran
(Received: 16/07/2020, Accepted: 06/10/2020)

Abstract

A greenhouse study was conducted to evaluate of salicylic acid foliar effect on morphological and biochemical characters of Stevia (*Stevia rebaudiana*) based on a Completely Randomized Design (CRD) experiment with three replications in Qazvin, Iran in 2016. The treatments of this research were defined as salicylic acid foliar levels as 0 (control), 100, 300 and 600 μM which were applied three months after transplanting. Evaluated characters included plant height, branch number, plant dry weight, leaves dry weight, branches dry weight, the ratio of leaf to total dry weight, the percentage and yield of stevioside, rebaudioside-A, rebaudioside-B and rebaudioside-c. The results of this study revealed that foliar levels of salicylic acid had a significant effect on all of the evaluated characters except for SPAD index. The treatment of foliar 100 μM salicylic acid led to a significant increase in plant height, stevioside percentage, rebaudioside C yield and its percentage compared with the control treatment (18.2%, 91.7%, 160% and 186%, respectively). By increasing the concentration of salicylic acid foliar level to 300 μM , the branches dry weight, leaves dry weight, plant dry weight, stevioside yield, and rebaudioside were observed. A percentage and its yield were increased in comparison to the control treatment (3.9%, 10.3%, 7.0%, 84.6, 78.3 and 100%, respectively). Finally the treatment of 600 μM salicylic acid foliar level significantly led to an increase in lateral branches number, the ratio of leaves dry weight to branches dry weight, rebaudioside-B percentage and its yield compared to the control treatment (365.8%, 43.0%, 383.3 and 344.4%, respectively). Therefore, a concentration of 300 μM foliar application of salicylic acid can be effective for increasing the quantitative and qualitative performance of Stevia.

Key words: Dry weight, Rebaudioside, SPAD index, Stevioside

Corresponding author, Email: tavakoli@znu.ac.ir