

بررسی اثر تیمارهای پاکلوبوترازول و جیرلین بر تعدیل تنفس خشکی در *Stevia rebaudiana* گیاه گالوس

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

^۱ گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه صنعتی خاتم الانبیاء بهبهان، خوزستان، ^۲ گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۴/۲۵، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۵/۰۷/۲۸)

چکیده:

تنفس 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 مختلف پلی‌اتیلن گلیکول، پاکلوبوترازول و جیرلین کشت داده شدند و سپس برخی از خصوصیات رشد و فیزیولوژیک مورد مطالعه قرار گرفتند. نتایج نشان داد که پلی‌اتیلن گلیکول سبب کاهش میزان وزن‌تر، وزن خشک، رشد نسبی و محتوای آب کالوس‌ها شد درحالیکه تیمارهای پاکلوبوترازول و جیرلین سبب کاهش اثرات منفی تنفس خشکی بر رشد کالوس‌ها شدند. تنفس خشکی بر روی لپیدهای غشاء اثر منفی داشت و باعث پراکسیداسیون لپیدهای غشاء و افزایش معنی‌دار مالون دی‌آلدئید شد. تیمارهای پاکلوبوترازول و جیرلین سبب کاهش پراکسیداسیون لپیدهای غشاء ناشی از تیمار پلی‌اتیلن گلیکول شدند. میزان کربوهیدرات‌های احیاء و محلول در پاسخ به تنفس خشکی کاهش معنی‌داری نشان دادند درحالیکه تیمارهای جیرلین و پاکلوبوترازول از اثرات منفی تنفس 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، جیرلین و پاکلوبوترازول میزان آنتی‌اکسیدان‌های فتل و آلفا-کوکوفرول را افزایش دادند که در کاهش اثرات منفی تنفس اکسیداتیو ناشی از تنفس خشکی نقش دارند. بر اساس بررسی نتایج، کالوس حاصل از گیاه *Stevia* حساس به تنفس خشکی است و تیمارهای پاکلوبوترازول و جیرلین سبب تعدیل اثرات سوء تنفس خشکی بر روی کالوس‌های این گیاه می‌شوند.

کلمات کلیدی: *Stevia rebaudiana*، پاکلوبوترازول، تنفس خشکی، جیرلین، کالوس

مقدمه:

گلیکوزیدها می‌باشد. استویول گلیکوزیدهای دارای اسکلت استویا (Stevia rebaudiana Bertoni)، گیاه دارویی از تیره تراسیکلیک 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 آستراسه و بومی منطقه نیمه مرطوب پاراگوئه است. ارزش دارویی گیاه استویا به دلیل سنتز شیرین کننده طبیعی استویول

است. یکی از ویژگیهای مهم ترکیبات فنلی خاصیت آنتیاکسیدانتی است که با گروههای هیدروکسیلی در ساختار مولکولی آنها در ارتباط است (Hatano *et al.*, 1990; Halliwell and Gutteridge, 2015). آلفاتوکوفرول نیز در جذب و خنثی کردن رادیکالهای آزاد نقش مهمی در گیاهان ایفا می‌کنند (Wang and Quinn, 2000).

امروزه بازدارنده‌های سنتز هورمون جیبریلین به طور وسیعی جهت مبارزه با تنفس‌های محیطی کاربرد دارند (Jaleel *et al.*, 2007; Sankar *et al.*, 2007; Sankar *et al.*, 2007). پاکلوبوترازول با دخالت در مسیر بیوسنتز اسید جیبریلیک در مرحله اکسیداسیونانت-کائورون به انت-کائورونیک اسید از تولید این هورمون گیاهی ممانعت می‌کنند. پاکلوبوترازول یک نمونه بسیار فعال و پرکاربرد از تریازول‌ها است که به عنوان مقاوم کننده گیاه در برابر تنفس‌های محیطی نیز شناخته شده است (Sankar *et al.*, 2007). بر اساس گزارشات تیمار پاکلوبوترازول سبب افزایش مقاومت *Triticum* (Sankar *et al.*, 2007) *Arachis hypogaea* (Aly and Latif, 2011) *aestivum* *Phillyrea angustifolia* (Aly and Latif, 2011) *rebaudiana* (Fernandez *et al.*, 2006) گیاهان (Hajjhashemi and Ehsanpour, 2014) و غیره در برابر تنفس خشکی شده است. پاکلوبوترازول با افزایش آنتی اکسیدانت‌های آنزیمی و غیر آنزیمی و تجمع مواد تنظیم کننده اسمزی سبب افزایش مقاومت گیاهان به شرایط تنفس می‌شود (Hajjhashemi and Ehsanpour, 2014; Jaleel *et al.*, 2007). همچنین گزارشاتی مبنی بر افزایش مقاومت گیاهان به تنفس در اثر تیمار جیبریلین در گیاهان *Brassica juncea* (Sheykhbaglou) *Sorghum bicolor* (Siddiqui *et al.*, 2008) *Hordeum* (Kaya *et al.*, 2006) *Zea mays* (et al., 2014) *vulgare* (Vettakkorumakankav *et al.*, 1999) وجود دارد. تیمار جیبریلین با افزایش میزان رشد، آنتی اکسیدان‌ها و کاهش اثرات مضر تنفس خشکی بر روی لیپیدهای غشاء سبب افزایش مقاومت گیاهان به تنفس می‌شود (ناصری و همکاران ۱۳۹۰).

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

مردم بومی منطقه پاراگوئه استفاده می‌شوند (Bcredible and Telmer, 2007; Geuns, 2003) خودناسازگار است و به دلیل عدم تلقیح موفق، بذرهای این گیاه دارای قدرت کم جوانه‌زنی هستند. لذا یکی از راهکارهای مناسب تکثیر این گیاه تکنیک کشت بافت و شرایط کشت درون شیشه (in vitro) می‌باشد (Hajjhashemi and Ehsanpour, 2013; Sivaram and Mukundan, 2003) خشکی یکی از مهمترین تنفس‌های محیطی است و از بین عوامل محیطی تنفس‌زا، 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 بیوشیمیابی در Chai *et al.*, 2016 (). ساخت گیاهان به تنفس خشکی متفاوت است و خصوصیات مورفو‌لوزیک و فیزیولوژیک زیادی در مقاومت به خشکی مؤثر هستند. تنفس 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 تنفس‌های محیطی از قبیل خشکی، شوری، دما و غیره با ذخیره مواد تنظیم کننده اسمزی با این تنفس‌ها مقابله می‌کنند. مواد تنظیم کننده اسمزی بیشتر شامل اسیدهای آمینه، قندها برخی یون‌های معدنی، هورمون‌ها و پروتئین‌ها هستند (Liu *et al.*, 2000). تنفس اسمزی ناشی از تنفس خشکی سبب تولید رادیکالهای آزاد اکسیژن (ROS) و تنفس ثانویه اکسیداتیو می‌شوند. تجمع ROS به دلیل این‌که سبب آسیب اکسیداتیو به لیپیدهای غشاء، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک می‌شوند برای سلول‌ها بسیار مضر می‌باشد (Sairam and Tyagi, 2004).

در گیاهان وجود دارد و به عنوان مثال می‌توان به سنتز آنتی اکسیدانت‌های غیر آنزیمی فنل‌ها و آلفاتوکوفرول اشاره نمود (Liu *et al.*, 2000). Kim و همکاران (۲۰۱۱) گزارش نمودند که بخشی از خاصیت آنتی اکسیدانی 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 وزن تر کالوس‌ها در اثر تیمار اندازه گیری گردید. به منظور بررسی تغییرات وزن خشک، تعداد شش کالوس قبل از تیمار برداشت شده و در آون با دمای ۷۰ درجه سانتیگراد به مدت ۷۲ ساعت خشک شدند. سپس از آون خارج شده و توزین 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)

$$\text{RGR\%} = \frac{(W_2 - W_1)}{W_1} \times 100 \quad (\text{فرمول ۱})$$

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)

$$\text{RWC\%} = \frac{(F_W - D_W)}{F_W} \times 100 \quad (\text{فرمول ۲})$$

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 میلی لیتر آب قطر گرم در هاون سائیده شد و با کمک کاغذ و اتمن شماره ۱ صاف شد. برای اندازه گیری هیدرات‌های کربن محلول، از روش فنل-اسید سولفوریک استفاده شد. به این صورت که ۵ میلی لیتر از عصاره گیاهی استخراج شده را با ۵۰ میکرولیتر فنل ۵٪ وزنی (حل شده در آب قطر) مخلوط کرده و سپس ۵ میلی لیتر اسید سولفوریک غلیظ به آن اضافه شد. این مخلوط به مدت ۱۰ دقیقه در محیط نگهداری شده و پس از آن به مدت

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 به طور وسیعی در مقابله با تنش‌های غیر زیستی کاربرد دارند (Jaleel et al., 2007). همچنین از آنجاییکه یکی از پاسخ‌های گیاه در مواجهه شدن با تنش خشکی کاهش رشد و تولید بیomas 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 وزن تر، وزن خشک، محتوی آب گیاه، میزان رشد نسبی گیاه، کربوهیدرات‌های احیا و محلول، پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء، آلفا-توكوفرول و فنل کالوس اندازه گیری شدند.

مواد و روش‌ها:

تولید کالوس و تیمار خشکی: به منظور تولید کالوس، جداکننده‌هایی از برگ گیاه استویا بدست آمده از United States, Prairie Oak Publishing, 221 South Saunders Street, Marville MO 64468 (Murashige and Skoog, 1962) MS لیتر ۴-۲,۴ و ۲ میلی گرم بر لیتر کیتین 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 ۴٪ وزنی)، پاکلوبوترازول

میلی لیتر عصاره را با ۱ میلی لیتر TPTZ مخلوط می کنیم و پس از ۱۰ دقیقه در تاریکی، ۲۰ میلی لیتر آب مقطر اضافه شده و جذب نمونه ها را در ۵۲۰ نانومتر می خوانیم. برای رسم منحنی استاندارد از آلفاتوکوفروف خالص با غلظت های ۲۰۰-۰ میکرومولار استفاده شد.

فنل: میزان فنل با استفاده از معرف فولین اندازه گیری شد (Singleton and Rossi, 1965). صد میلی گرم از نمونه توسط اتانول 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 ۵٪ افزوده شد. نمونه ها به مدت ۱ ساعت در تاریکی نگهداری شدند و سپس جذب نمونه ها 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 شاخص های رشد، تیمارهای پاکلوبوترازول و جیبرلین میزان وزن تر، وزن خشک، محتوی آب و رشد نسبی کالوس های استویا را در حد معنی داری افزایش دادند و بیشترین میزان افزایش در تیمار پاکلوبوترازول مشاهده شد (شکل های ۱ و ۲). تیمار پلی اتیلن گلیکول میزان رشد نسبی، وزن خشک، وزن تر و محتوی آب کالوس را در سطح معنی داری کاهش داد و میزان آنها به ترتیب معادل ۰/۳۴٪، ۰/۴۰٪ و ۰/۶۳٪ کمتر از گیاهان شاهد بود. نتایج نشان داد که بیشترین و کمترین تأثیر منفی تنش خشکی بر شاخص های رشد به ترتیب در محتوی آب و میزان رشد نسبی کالوس ملاحظه شد. تیمارهای پاکلوبوترازول و جیبرلین سبب کاهش معنی دار اثرات مضر پلی اتیلن گلیکول بر شاخص های رشد مذکور شدند. میزان وزن تر، وزن خشک، محتوی آب و رشد نسبی کالوس در تیمار پلی اتیلن گلیکول توانم با پاکلوبوترازول و جیبرلین تقریباً معادل گیاه شاهد (بدون تیمار) بودند و کاهش معنی داری نشان ندادند.

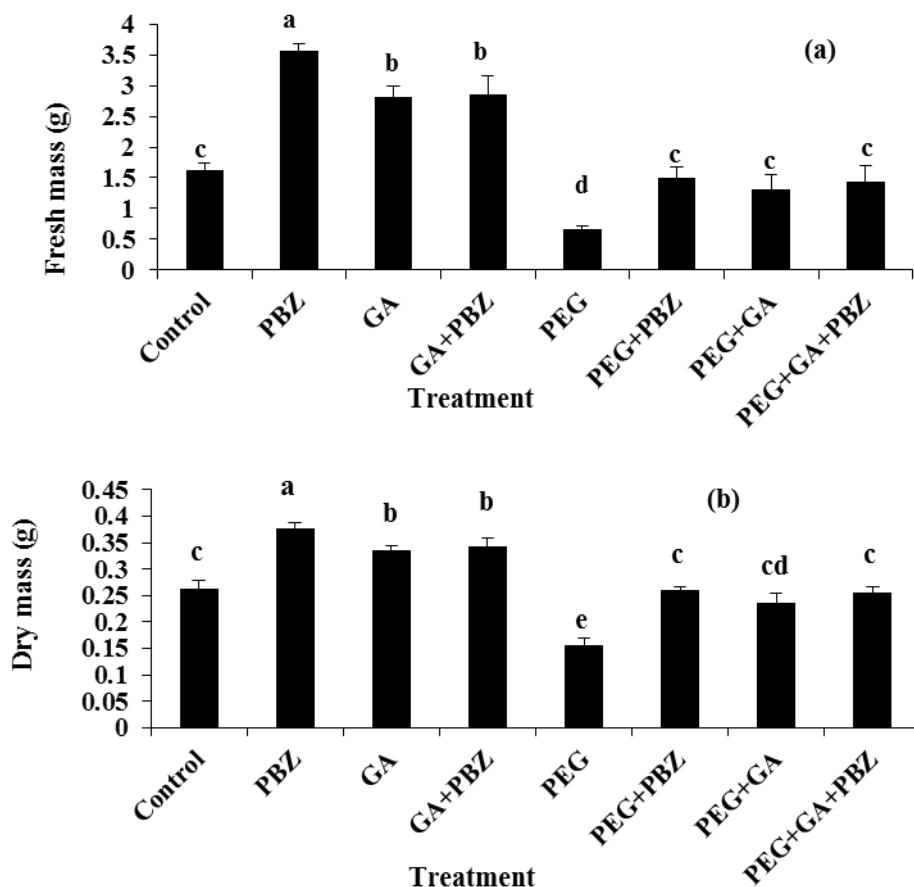
اثر تیمارهای مختلف بر میزان قندهای محلول کالوس گیاه

۱۰-۲۰ دقیقه در حمام آب گرم ۲۵-۳۰ درجه سانتیگراد قرار داده شد و سپس جذب محلول در ۴۹۰ خوانده شد و با کمک منحنی استاندارد مربوطه میزان کربوهیدرات های محلول محاسبه شد (Dubois *et al.*, 1956).

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

پراکسیداسیون لیپید غشاء: برای سنجش مقدار پراکسیداسیون لیپیدهای غشا، غلظت مالون دیالدئید (MDA) که محصول پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیر اشباع می باشد، اندازه گیری شد. اندازه گیری مالون دیالدئید به روش Heath و Packer (۱۹۸۶) انجام شد. طبق این روش ۰/۲ گرم از بافت تر با ۵ میلی لیتر ۰/۰۱ درصد TCA ساییده شد. به یک میلی لیتر از عصاره حاصل از سانتریفوژ، ۴ میلی لیتر محلول تری کلرو استیک اسید ۰/۵ درصد که حاوی ۰/۰۱ تیوباربیوتوریک اسید (TBA) بود، اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد در حمام آبگرم حرارت داده شد سپس بلا فاصله بر روی یخ سرد شد و دوباره مخلوط به مدت ۱۰ دقیقه در دور 10000 rpm سانتریفوژ شد. سپس شدت جذب این محلول در طول موج ۵۳۲ نانومتر خوانده شد. جذب بقیه رنگیزه های غیر اختصاصی در ۶۰۰ نانومتر تعیین و از این مقدار کسر شد. برای محاسبه غلظت مالون دالدئید از ضریب خاموشی معادل $155 \text{ mM}^{-1} \text{ Cm}^{-1}$ استفاده شد.

آلفاتوکوفروف: برای اندازه گیری آلفاتوکوفروف ۰/۵ گرم از نمونه با استفاده از ۱۰ میلی لیتر متابول اسیدی ساییده شده و پس از ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد (Baker *et al.*, 1980). سپس ۵

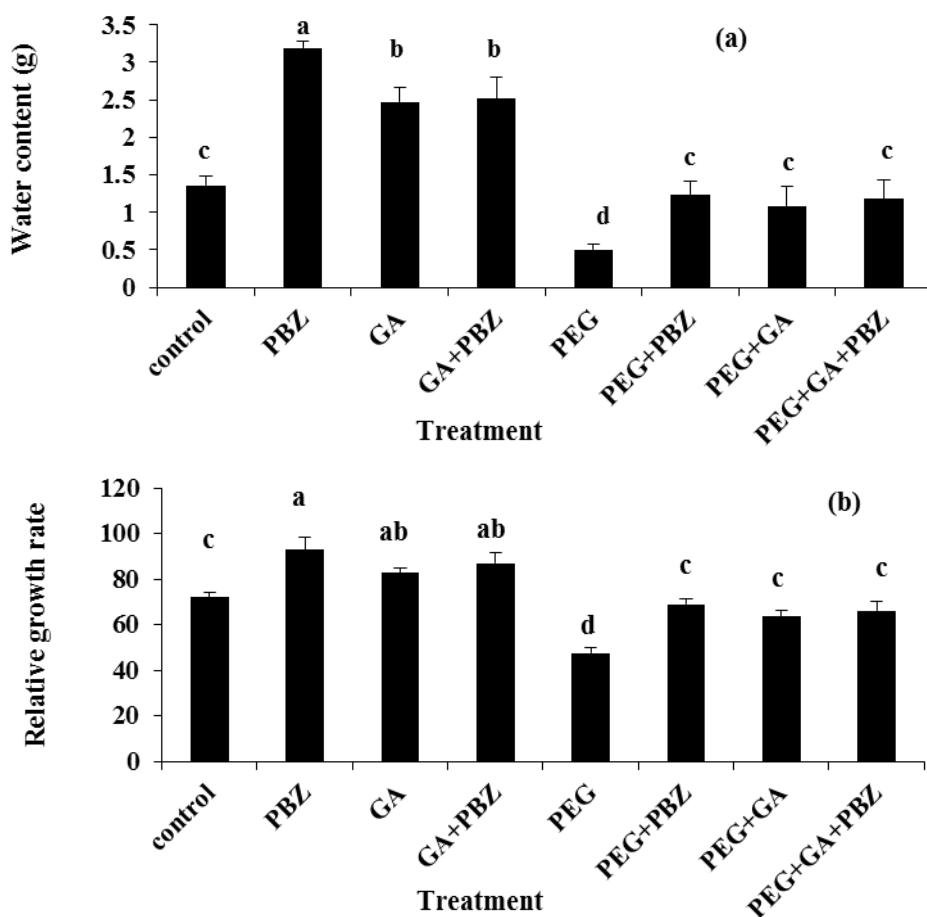


شکل ۱- تغییرات وزن تر (a ;Fresh mass) و وزن خشک (b ;Dry mass) در تیمارهای پاکلوبوترازول (PBZ)، جیبرلین (GA) و پلی اتیلن گلیکول (PEG). داده‌ها میانگین $3 \pm SD$ و حروف نامشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی دار ($P \leq 0.05$) بر اساس آزمون Duncan می‌باشد.

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 توأم با پاکلوبوترازول میزان افزایش بیشتر و حدود ۶۲٪ بود. بر اساس نتایج، در تیمار پلی اتیلن گلیکول میزان کربوهیدرات احیاء در سطح معنی داری (حدود ۷۰٪) نسبت به گیاه شاهد کاهش یافت (شکل ۳). میزان کربوهیدرات‌های احیاء تحت تیمارهای پلی اتیلن گلیکول توأم با پاکلوبوترازول و جیبرلین در سطح معنی داری 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 معنی داری بیشتر از گیاه شاهد بود و بیشترین میزان قند در تیمار پاکلوبوترازول ملاحظه گردید. میزان قندهای محلول در تیمارهای پاکلوبوترازول، جیبرلین و تیمار توأم 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 با پلی اتیلن گلیکول توأم با پاکلوبوترازول در گیاهان تیمار شده با پلی اتیلن گلیکول توأم با گیاه شاهد است. تیمار پلی اتیلن گلیکول توأم با جیبرلین اثر معنی داری بر میزان قند محلول در مقایسه با گیاه شاهد نشان نداد (شکل ۳). بررسی کربوهیدرات‌ها نشان داد که بیشترین میزان قندهای احیاء در



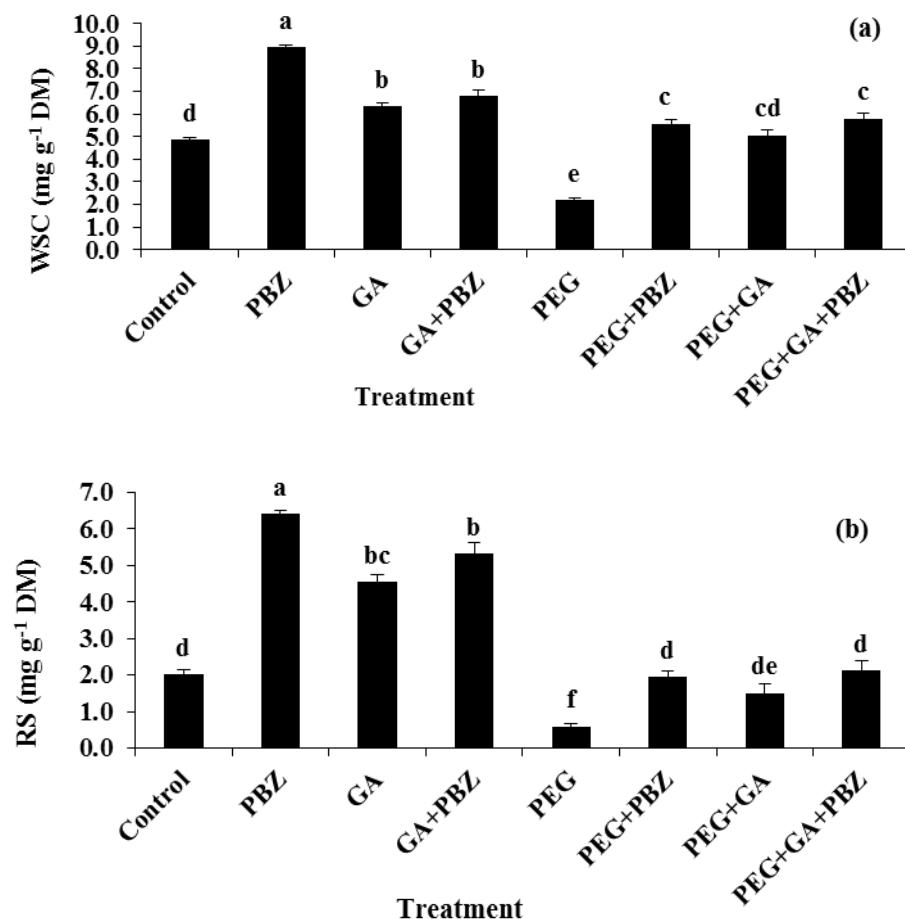
شکل ۲- تغییرات محتوی آب (a; Water content) و رشد نسبی (b; Relative growth rate) در تیمارهای پاکلوبوترازول (PBZ)، جیبریلین (GA) و پلی‌اتیلن گلیکول (PEG). داده‌ها میانگین ۳ تکرار \pm SD و حروف نامشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار ($P \leq 0.05$) بر اساس آزمون Duncan می‌باشد.

تیمار پاکلوبوترازول میزان آلفاتوکوفرول را در مقایسه با گیاه شاهد ۸.۸۵٪ افزایش داد. میزان آلفاتوکوفرول در تیمار جیبریلین حدود ۷۴٪ افزایش یافت درحالیکه تیمار توام جیبریلین و پاکلوبوترازول میزان آلفاتوکوفرول را ۸۳٪ افزایش داد. تنفس خشکی ناشی از پلی‌اتیلن گلیکول منجر به افزایش معنی‌دار میزان آلفاتوکوفرول (تقریباً ۸۰٪) شد. در پاسخ به تیمارهای پاکلوبوترازول و جیبریلین توام با پلی‌اتیلن گلیکول میزان آلفاتوکوفرول کالوس‌ها تقریباً یکسان بود و تفاوت معنی‌داری بین آنها ملاحظه نشد.

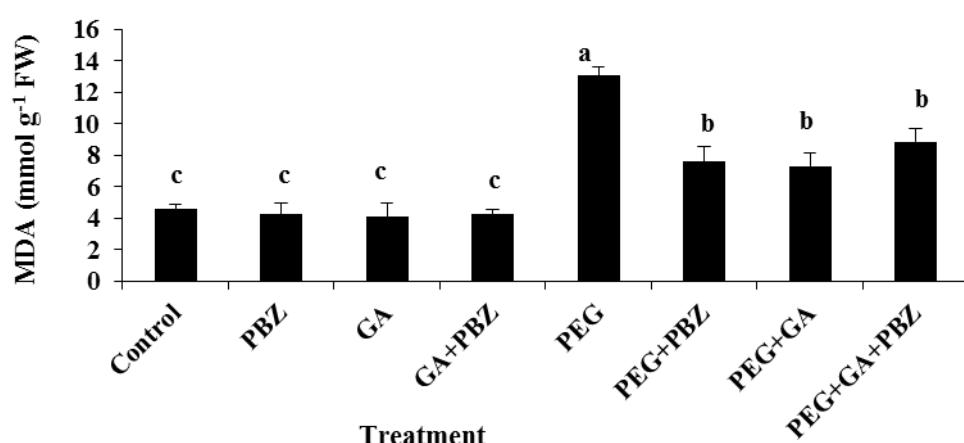
نتایج بررسی میزان فنل نشان داد که میزان تجمع فنل در کالوس استویا در تیمارهای مختلف در سطح معنی‌داری افزایش یافت (شکل ۶). میزان فنل کالوس استویا در تیمارهای

میزان MDA تقریباً معادل گیاه شاهد بود و تغییر معنی‌داری ملاحظه نشد. میزان MDA کالوس تحت تیمار پلی‌اتیلن گلیکول افزایش معنی‌داری نشان داد و حدود سه برابر بیشتر از گیاهان شاهد بود. تیمارهای پاکلوبوترازول و جیبریلین سبب کاهش معنی‌دار اثرات منفی پلی‌اتیلن گلیکول بر روی لیپیدهای غشاء شدند. میزان MDA در گیاهان تیمار شده با پلی‌اتیلن گلیکول توام با پاکلوبوترازول و جیبریلین به ترتیب کاهش ۴۱٪ و ۴۴٪ در مقایسه با گیاهان تیمار شده با پلی‌اتیلن گلیکول تنها نشان دادند (شکل ۱۱-۳).

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).

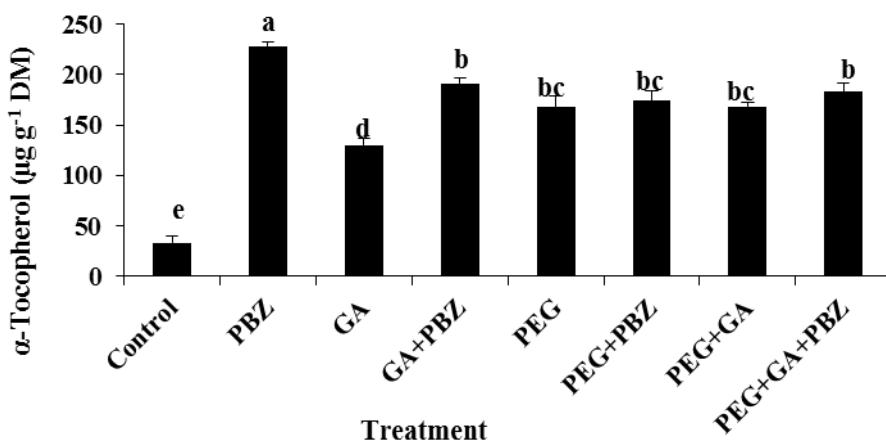


شکل ۳- تغییرات میزان قند محلول (a؛ WSC) و قند احیاء (b؛ RS) در تیمارهای *Stevia rebaudiana* کالوس (PBZ)، جیبرلین (GA) و پلی‌اتیلن گلیکول (PEG). داده‌ها میانگین ۳ تکرار و وزن خشک. حروف نامشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار (P≤0.05) بر اساس آزمون Duncan می‌باشد.

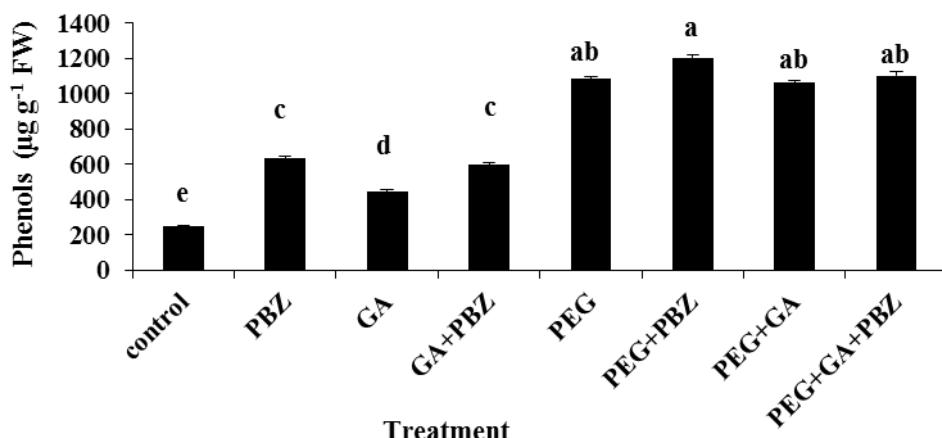


شکل ۴- تغییرات میزان مالون دی‌آلدئید (MDA) کالوس *Stevia rebaudiana* در تیمارهای پاکلوبوترازول (PBZ)، جیبرلین (GA) و پلی‌اتیلن گلیکول (PEG). داده‌ها میانگین ۳ تکرار و حروف نامشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار (P≤0.05) بر اساس آزمون Duncan می‌باشد.

پاکلوبوترازول، جیبرلین و تیمار توام جیبرلین با پاکلوبوترازول به ترتیب ۰.۶۰٪، ۰.۴۴٪ و ۰.۵۸٪ بیشتر از شاهد بود. در پاسخ به



شکل ۵- تغییرات میزان آلفا-توكوفرول کالوس *Stevia rebaudiana* در تیمارهای پاکلوبوترازول (PBZ)، جیبرلین (GA) و پلی‌اتیلن گلیکول (PEG) وزن خشک. داده‌ها میانگین $3 \pm \text{SD}$ تکرار 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 پلی‌اتیلن گلیکول (PEG). داده‌ها میانگین $3 \pm \text{SD}$ تکرار 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 پلی‌اتیلن گلیکول، پاکلوبوترازول و جیبرلین بر بافت کالوس در محیط‌های کشت مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که تنش خشکی ناشی از تیمار پلی‌اتیلن گلیکول باعث کاهش معنی‌دار وزن‌تر، وزن خشک، محتوی آب و میزان رشد نسبی بافت کالوس استویا شد. تنش خشکی با جلوگیری از بزرگ شدن سلول‌ها و کاهش تقسیم سلولی سبب کاهش رشد می‌شود (Anjum *et al.*, 2011).

گزارشات تیمار پلی‌اتیلن گلیکول میزان فنل افزایش معنی‌داری نشان داد و ۷۷٪ بیشتر از گیاه شاهد بود. تیمارهای مختلف پلی‌اتیلن گلیکول با جیبرلین و پاکلوبوترازول باعث افزایش معنی‌دار فنل شد در حالی که 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 آمامبی

هورمون رشد جیبرلین با تخریب پروتئین‌های Della سبب تحریک رژن‌های محرك 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 می‌باشد که این مولکول‌های شیرین دارای تعداد متغیری از گلوکز می‌باشند که ممکن است تحت تأثیر تیمارهای مختلف میزان آنها تغییر نمایند (Geuns, 2010). در تحقیق حاضر مقادیر کربوهیدرات محلول و احیاء کالوس استویا در تیمار پلی‌اتیلن گلیکول کاهش معنی‌داری نشان داد. اعمال تیمارهای توام پاکلوبوترازول و جیبرلین با پلی‌اتیلن گلیکول از اثرات منفی تنش خشکی بر میزان کربوهیدرات‌ها جلوگیری نمودند که می‌توانند در مقاومت بیشتر کالوس استویا در برابر تنش نقش داشته باشد. گیاهان با تجمع قندهای مختلف در پاسخ به پاکلوبوترازول و جیبرلین در شرایط تنش و ایفای نقش‌های مختلف حفاظتی از جمله تنظیم اسمولاریته سلولی و حفاظت ساختارهای سلولی مقاومت گیاهان را افزایش می‌دهند (Akter *et al.*, 2014; Sankar *et al.*, 2007) تاریخته 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.*, 1998; Rajam *et al.*, 2005; Fletcher *et al.*, 2010) آزمایشات ما نیز در تأیید نتایج مطالعات گذشته نشان داد که تیمارهای پاکلوبوترازول (Akter *et al.*, 2014; Fletcher *et al.*, 2010) و جیبرلین

مشابهی مبنی بر اثر منفی تنش خشکی بر رشد گیاهان استویا Specht *et al.*, (Hajihashemi and Ehsanpour, 2013) Wu *et al.*, (al., 2001; Zhang *et al.*, 2004 (Sankar *et al.*, 2007) *Abelmoschus esculentus*, (2008 آفتابگردان (Hussain *et al.*, 2008; Kiani *et al.*, 2008) و پنبه (Massacci *et al.*, 2008) موجود می‌باشد. در واقع کاهش وزن‌تر کالوس نه تنها به دلیل کاهش بیوماس گیاه بود بلکه بخشی از آن مربوط کاهش محتوی آب بافت کالوس بود. کاهش در مقدار نسبی آب در پاسخ به تنش خشکی در انواع مختلفی از گیاهان مانند (Türkan *et al.*, 2005) *Phaseolus vulgaris* (Anjum *et al.*, 2012)، فلفل (Sakthivelu *et al.*, 2008) سورگوم (Zhang and Kirkham, 1996) گزارش شده است. در تحقیق حاضر، تیمارهای پاکلوبوترازول و جیبرلین سبب افزایش معنی‌دار وزن‌تر، وزن خشک، محتوی آب و میزان رشد نسبی بافت کالوس شدند و همچنین اثرات منفی تنش خشکی را بر روی گیاه استویا کاهش داد. پاکلوبوترازول سبب کاهش Fletcher *et al.*, (2010; Jungklang *et al.*, 2015) اثرات مخبر تنش خشکی بر رشد گیاه می‌شود (Ehsanpour Hajihashemi 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 رشد کالوس استویا شد. براساس گزارش Chen و همکاران (2005)، 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 آنتی اکسیدانها در نگهداری یکپارچگی غشاء در شرایط تنفس نقش مهمی ایفا می‌کند (Munne-Bosch and Penuelas, 2003). توکوفرول‌ها مولکول‌های آمفی‌پاتیک شامل یک حلقه قطبی کرومانتول و یک دم چربی دوست ایزوپرینیلی هستند. این مولکولها به عنوان آنتی اکسیدان‌های مهمی مطرح هستند که قادر به حذف گونه‌های فعال اکسیژن و رادیکال‌های لیپید پیروکسیل در محیط‌های چربی دوست هستند. گیاهان در پاسخ به تنفس‌هایی 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 تباکو سبب کاهش مقاومت گیاه به تنفس‌های غیر زیستی گردید (Abbas et al., 2007). با توجه به نقش آنتی اکسیدانی آلفاتوکوفرول می‌توان نتیجه گیری نمود که کالوس استویا با آلفاتوکوفرول سبب کاهش اثرات مضر تنفس خشکی می‌شود. به طور کلی بررسی شاخص‌های رشد، میزان کربوهیدرات‌های احیا و محلول و پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء کالوس‌های *Stevia rebaudiana* در پاسخ به تنفس خشکی ناشی از تیمار پلی‌اتیلن گلیکول نشان داد که کالوس این گیاه به تنفس 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 تنفس خشکی شدند. نتایج این تحقیق با اثبات کارآمدی تیمارهای پاکلوبوترازول و جیبرلین در کاهش اثرات منفی تنفس 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 تنفس 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 تنفس‌های 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 تنفس خشکی عامل پراکسیداسیون لیپیدها و تخریب غشاء در گیاهان هستند (Nair et al., 2008). مقدار پراکسیداسیون لیپیدها نشان دهنده شدت تنفس خشکی در نظر گرفته می‌شود زیرا هرچه تنفس خشکی شدیدتر باشد میزان پراکسیداسیون لیپیدها افزایش می‌یابد (Jemai et al., 2008). تنفس خشکی سبب افزایش معنی‌دار میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء در بافت کالوس استویا شد در حالیکه تیمارهای پاکلوبوترازول و جیبرلین در سطح معنی‌داری سبب تعدیل اثرات مخرب تنفس 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 (Aly and Latif, 2011)، گندم (Anjum et al., 2012)، ترکان (Türkan et al., 2012)، بولداجی (Boldaji et al., 2005)، یونجه (Younje, 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. شولکا و همکاران (Shulka et al., 2009) بیان نمودند که رابطه مستقیمی

منابع:

- پازکی، ع.، رضایی، ح.، حبیبی، د. و پاکنژاد، ف. (۱۳۹۱) اثر تنفس 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 نباتات* 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 غیر محلول در برگ جو خوارکی (*Hordeum vulgar L.*). *فیزیولوژی محیطی گیاهی (پژوهش‌های اکوفیزیولوژی گیاهی ایران)* ۶ (۲): ۱۰-۱.
- 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, arsénomolybdate, 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: 1328-1332.
- 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. *Current 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 phytoltransferase gene (MdHPT1) increases tocopherol in transgenic tomato (*Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom) leaves and fruits. *Phytochemistry* 72: 321-329.
- Sheykhabaglou, 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.^۱
- 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.