تحقیقات علوم زراعی در مناطق خشک/ جلد ششم، شماره سوم، پاییز ۱۴۰۳، ص ۱۳۷-۱۲۱

مقاله پژوهشی

اثر تنظیم کننده‌های رشد جیبرلین و سیتوکنین بر برخی ویژگی‌های بیوشیمیایی و وزن خشک گیاه استویا (*Stevia rebaudiana* Bertoni)

سیده مهتا رحیم زاده[۱]، وحید پوزش[۲*]، سید فاضل فاضلی کاخکی[۳]

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم گیاهی، دانشکده زیست شناسی، دانشگاه دامغان، دامغان، ایران

۲- گروه علوم گیاهی، دانشکده زیست شناسی، دانشگاه دامغان، دامغان، ایران

۳- مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مشهد، ایران

* مسئول مکاتبه: poozesh@du.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۶/۱۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۸/۱۸ **DOI: 10.22034/CSRAR.2024.361299.1273**

چکیده

ارتباط بین یاخته‌ایی در گیاهان آلی به منظور رشد و نمو به وسیله پیام آورهای شیمیایی به نام تنظیم کننده‌های رشد گیاه انجام می‌شود. به منظور بررسی تغییرات برخی ترکیبات شیمیایی و وزن خشک اندام هوایی گیاه استویا آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در گلخانه مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی خراسان رضوی در سه تکرار انجام شد. فاکتورها شامل جیبرلین (صفر، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) و سیتوکنین (صفر، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) بودند. نتایج نشان داد که بیشترین مقدار قندهای محلول از کاربرد ۵۰ppm جیبرلین به همراه ۱۰۰ ppm سیتوکنین بدست آمد که نسبت به شاهد ۲۵ درصد افزایش نشان داد. مقدار پروتئین برگ تنها در حضور غلظت‌های مختلف تنظیم کننده رشد جیبرلین معنی‌دار بود. بیشترین مقدار پرولین از کاربرد تلفیقی ۱۰۰ ppm جیبرلین و ۰ ppm سیتوکنین حاصل شد که نسبت به شاهد ۶۳ درصد افزایش نشان داد. بیشترین مقدار کلروفیل b از اعمال سطوح ۵۰ ppm همزمان سیتوکنین و جیبرلین به دست آمد. کمترین مقدار وزن خشک اندام هوایی در حضور تیمار ترکیبی دو تنظیم کننده رشدی در سطح ۱۰۰ ppm مشاهده شد و بیشترین مقدار در سطح ۱۰۰ ppm تنظیم کننده رشد جیبرلین به دست آمد. نتایج ضرایب همبستگی نشان داد که وزن خشک اندام هوایی با میزان پرولین همبستگی مثبت و معنی‌داری (r = ۰/۶۳**) داشت. به طور کلی نتایج نشان داد که سطوح مختلف جیبرلین بر صفت‌های بیوشیمیایی و مورفولوژیکی استویا مؤثرتر از تنظیم کننده رشد سیتوکنین بود.

واژه‌های کلیدی: پروتئین، پرولین، رنگیزه‌های فتوسنتزی، قندهای محلول

مقدمه

گیاهان به عنوان یکی از اجزای طبیعت، دارای طیف وسیعی از ویژگی‌های دارویی بوده که از دیرباز پشتوانه غنی نیازهای بشری بوده‌اند (Ahmadi *et al*., 2004; Omid Beigi, 2011). افزایش جمعیت و کاهش فعالیت بدنی و نوع تغذیه آنها نسبت به گذشته نامناسب‌تر، ناسالم‌تر و پرحجم‌تر شده و در نهایت مجموعه این عوامل سبب شیوع بیماری‌های مختلفی از جمله دیابت شده است. در ایران حداقل ۳ میلیون نفر از جمعیت ایران مبتلا به دیابت و بیش از ۶ میلیون نفر در معرض خطر ابتلا به آن هستند (Azarpour *et al*., 2013). استفاده از گیاهان دارویی مانند استویا می‌تواند نسبت به کنترل شیوع آن در جامعه مفید باشد. گیاه استویا یکی از ۹۵۰ جنس متعلق به خانواده بزرگ کاسنی (Astraceae) است (Talaei, 2010). اگرچه بیش از ۲۰۰ گونه گیاهی در جنس استویا وجود دارد، اما گونه *S. rebaudiana* بیشترین مقدار اسانس شیرین را در میان همه گونه‌ها دارد. گیاهی خود ناسازگار، روز کوتاه، علفی و چند ساله با سیستم ریشه‌ای گسترده، ساقه‌های ترد و شکننده کوچک و برگ‌های افتاده است. ارتفاع گیاه استویا بطور متوسط حدود ۵۰ تا ۶۰ سانتی‌متر است که در مواردی به ۱۲۰ سانتی‌متر هم می‌رسد. گیاه استویا در مراحل اولیه زندگی دارای رشد آهسته‌تری است، ولی پس از گذراندن ماه اول و سازگاری با شرایط آب و هوایی منطقه، سرعت رشد گیاه افزایش می‌یابد (Brandle *et al*., 1998).

ترکیبات شیرین در استویا مربوط به حضور دی ترپن گلیکوزاید انت-کائورن است که در آب محلول بوده و ۳۰۰ بار شیرین‌تر از شکر معمولی (ساکارز) هستند (Ramesh *et al*., 2006). برگ‌های استویا از حداقل ۸ گلیکوزاید مختلف انباشته شده است که استویوزید به‌عنوان فراوان‌ترین ترکیب

شیرین‌کننده، ۵ تا ۱۰ درصد وزن برگ خشک را شامل می‌شود. ترکیبات ربادیوزید A (۲ تا ۴ درصد برگ خشک)، ربادیوزید B، C (۱ تا ۲ درصد)، ربادیوزید D و E (۰/۴ تا ۰/۷ درصد برگ خشک) و هم‌چنین دالکوزیدA۷ و استویول‌بیوزید نیز در این گیاه وجود دارند. از استویا و ترکیب استویوزید می‌توان بعنوان یک شیرین‌کننده سالم استفاده کرد (Kim *et al*., 2011; Ramesh *et al*., 2006).

رشد و نمو گیاهان حاصل برهمکنش ژنتیک و محیط است به عبارتی دیگر هم عوامل درونی و هم عوامل بیرونی در رشد و نمو گیاهان تأثیر دارند. از مهمترین عوامل درونی، تنظیم کننده‌های رشد گیاه هستند که عهده‌دار تنظیم و هماهنگی فرآیندهای مختلف داخل گیاه می‌باشند (Ahmadi *et al*., 2004). در مطالعه‌ای نشان داده شد که در شرایط آزمایشگاهی تیمارهای تنظیم کننده‌های رشد گیاهی عامل مهمی در بهبود چشمگیر تکثیر و سرعت ریشه‌زایی گیاه استویا بودند (Haji Mohammadi *et al*., 2017).

هم‌چنین استفاده بهینه از تنظیم کننده‌های رشد گیاهی برای تحریک رشد و تمایز قلمه‌های استویا ضروری است (Hartmann *et al*., 2010). در آزمایشی بخوبی نشان داده شد که رشد قلمه‌های استویا در واکنش به تنظیم کننده‌های رشد گیاهی IAA و NAA به طور پیوسته در حال افزایش بود (Abha Manohar *et al*., 2022). در این میان GA3 از جمله شناخته‌ترین تنظیم کننده‌های رشد گیاهی جبیرلین است که واکنش‌های رشدی مختلفی را در گیاه سبب می‌شوند و بیشتر فعالیت آنها رشد طولی میان گره‌ها است (Rafeekher *et al*., 2001).

سیتوکینین نوعی دیگر از تنظیم کننده‌های رشد گیاهی است که مهمترین تأثیر آن در فرآیند تقسیم یاخته‌ایی است (Ojha *et al*., 2010). بررسی‌ها نشان داد که می‌توان از تنظیم کننده رشد سیتوکنین در جهت افزایش اندام‌زایی و تولید استفاده کرد. بیشترین داده‌ها در خصوص تأثیر این تنظیم کننده رشد گیاه مربوط به کشت بافت و تأثیر آن بر اندام‌زایی است و در خصوص تأثیر این تنظیم کننده رشد بر مراحل مختلف فنولوژی گیاه اطلاعات لندکی در دسترس است. در همین ارتباط نشان داده شد که کاربرد کینتین (۵۰ میلی‌گرم در لیتر) موجب توسعه و نمو بیشتر سرآغازه خوشه گردید (Tafzali and Esmailizadeh, 2000). آزمایش‌ها نشان داد که کاربرد سیتوکینین در بذر ذرت باعث افزایش درصد جوانه‌زنی بذرها و طول ریشه‌چه می‌گردد (Modares Sanavi *et al*., 2006).

بنابراین، با توجه به اهمیت گیاه دارویی استویا در درمان بیماری دیابت و علی‌رغم کارهای مختلفی که در زمینه افزایش عملکرد آن صورت گرفته است؛ با این حال در خصوص استفاده از تیمار تنظیم کننده‌های رشد گیاهی بر افزایش شاخساره‌های گیاه اطلاعات اندکی در دسترس است. لذا در این پژوهش تأثیر تنظیم کننده‌های رشد سیتوکنین و جیبرلین بر برخی شاخص‌های بیوشیمیایی گیاه و افزایش بخش اقتصادی گیاه (وزن خشک برگ) در شرایط گلخانه مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار در گلخانه پژوهشی مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی مشهد در سال ۱۳۹۶ انجام شد. فاکتور اول جیبرلین در سه سطح (صفر، ۵۰ و ۱۰۰ ppm) و فاکتور دوم سیتوکنین در سه سطح (صفر، ۵۰ و ۱۰۰ ppm) بود. گلدان‌هایی با ابعاد ۲۰×۲۰ با ترکیبی از خاک برگ، شن و ماسه به نسبت ۱:۱:۱ پر شدند (جدول ۱). نشا گیاه استویا از موسسه باغات آستان قدس رضوی تهیه شد. میانگین دمای گلخانه تقریباً ۲۵ تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد و مقدار رطوبت آن ۶۵ درصد بود. آبیاری هر سه روز یک‌بار به صورت مرتب انجام شد. پس از اینکه گیاهان گلدان‌ها به مدت دو هفته در محیط گلخانه سازگار شدند، تیمار به صورت محلول‌پاشی برگی انجام شد.

محلول‌پاشی به مدت شش هفته و پیش از آبیاری در ساعت ۱۰ صبح برای هر بوته در ابتدا ۲۰ و در انتها رشد ۵۰ سی سی با محلول‌های مورد نظر انجام شد، به‌طوری‌که برگ‌ها کاملاً خیس شدند. در انتهای آزمایش اندام‌های هوایی از روی زمین برداشت و درون پاکت‌های کاغذی داخل آون تهویه‌دار با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۴۸ ساعت قرار داده شدند. نمونه‌ها بلافاصله پس از خروج از آون با ترازوی ۰/۰۰۱ وزن‌گیری شدند.

جدول ۱- ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک

Table 1- Physical and chemical characteristics of soil

پتاسیم K	فسفر P	نیتروژن N	نسبت کربن به نیتروژن C:N	درصد کربن آلی OC	شوری خاک EC	چگالی حجمی Bulk density	اسیدیته pH
($mg.kg^{-1}$)				(%)	($dS.m^{-1}$)	($g.cm^{-3}$)	
297	17	0.158	24	1.42	1.26	1.34	7.05

آنالیزهای بیوشیمیایی

رنگیزه‌های فتوسنتزی

به منظور سنجش میزان کلروفیل و کارتنوئیدها از روش لیختنتالر (Lichtenthaler, 1987) استفاده شده است. ۰/۱ گرم بافت تازه برگ به همراه ۵ میلی‌لیتر استون ۸۰٪ در هاون چینی سائیده و محلول همگن حاصل، به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. جذب محلول رویی با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر UV-Visible در طول موج‌های ۶۴۷ و ۶۶۳ و ۴۷۰ نانومتر خوانده شد. جهت تنظیم دستگاه استون ۸۰٪ مورد استفاده قرار گرفته است. غلظت رنگیزه‌ها با استفاده از رابطه‌های ۱، ۲، ۳ و ۴ محاسبه شده است:

$$Chla = (12/25\ A_{663}-2/79A_{647}) \quad (۱)$$

$$Chlb = (21/21A_{647}-5/1A_{663}) \quad (۲)$$

$$ChlT= (7/15A_{663}+18/71647) \quad (۳)$$

$$Car = A_{470}+[(0/114)(A_{663})-(0/638)(A_{647})] \quad (۴)$$

فرمول‌های ۱، ۲، ۳ و ۴ به ترتیب معرف غلظت‌های کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کارتنوئیدها (شامل کاروتن‌ها و گزانتوفیل‌ها) است.

قندهای محلول

سنجش قندها به روش میلر (Miller, 1959) انجام شد. مقدار قندهای محلول به روش فنول سولفوریک و براساس هیدرولیز اسیدی قندهای محلول و ایجاد ترکیب فورفورال که با فنول یک کمپلکس رنگی ایجاد می‌کند، اندازه‌گیری شد. به منظور تهیه عصاره گیاهی، ۰/۰۵ گرم بافت تر گیاه به همراه ۵ میلی‌لیتر آب مقطر در هاون چینی سائیده شد. محلول فوق به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. سپس ۱ میلی‌لیتر از محلول رویی جدا شده و پس از اضافه کردن ۰/۵ میلی‌لیتر فنول ۵٪ و ۱/۵ میلی‌لیتر اسیدسولفوریک ۹۸ درصد ورتکس شد. بعد از گذشت یک ساعت جذب محلول در طول موج ۴۸۵ نانومتر خوانده شد و با استفاده از منحنی استاندارد، غلظت قندهای احیا کننده محاسبه گردید. برای تنظیم دستگاه، مخلوط ۱ میلی‌لیتر آب مقطر به همراه ۰/۵ میلی‌لیتر فنول ۵ درصد و ۱/۵ میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۹۸ درصد، با رعایت همه شرایط مانند عصاره مورد استفاده قرار گرفت.

روش سنجش پرولین

جهت سنجش پرولین از روش بیتس و تایر (Bates and Teare, 1973) استفاده شد. ۰/۱ گرم از بافت تر گیاه در ۳ میلی‌لیتر محلول سه درصد اسید سولفوسالیسیلیک سائیده شد و مخلوط یکنواختی تهیه گردید. عصاره حاصل به مدت ۱۰ دقیقه در ۵۰۰۰ xg سانتریفیوژ شد. سپس ۱ میلی‌لیتر از محلول رویی با ۱ میلی‌لیتر معرف نین هیدرین و ۱ میلی‌لیتر اسید استیک خالص مخلوط شده و بعد از مسدود کردن درب لوله‌ها، یک ساعت در حمام آب گرم با دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. بعد از این مدت، جهت متوقف کردن کلیه واکنش‌ها، لوله‌های محتوی مخلوط در حمام یخ، سرد گردید. سپس جذب محلول‌ها در طول موج ۵۲۰ نانومتر تعیین شد و غلظت پرولین در هر نمونه با استفاده از منحنی استاندارد محاسبه گردید. برای تنظیم دستگاه ۱ میلی‌لیتر اسید سولفو سالیسیلیک ۳ درصد به همراه ۱ میلی‌لیتر نین‌هیدرین و ۱ میلی‌لیتر اسید استیک با رعایت همه شرایط مانند عصاره مورد استفاده قرار گرفت.

پروتئین

برای سنجش پروتئین از روش برادفور (Bradford, 1976) استفاده گردید. به این منظور ابتدا ۰/۵ گرم از بافت تر گیاه در یک هاون چینی سرد محتوی سه میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم

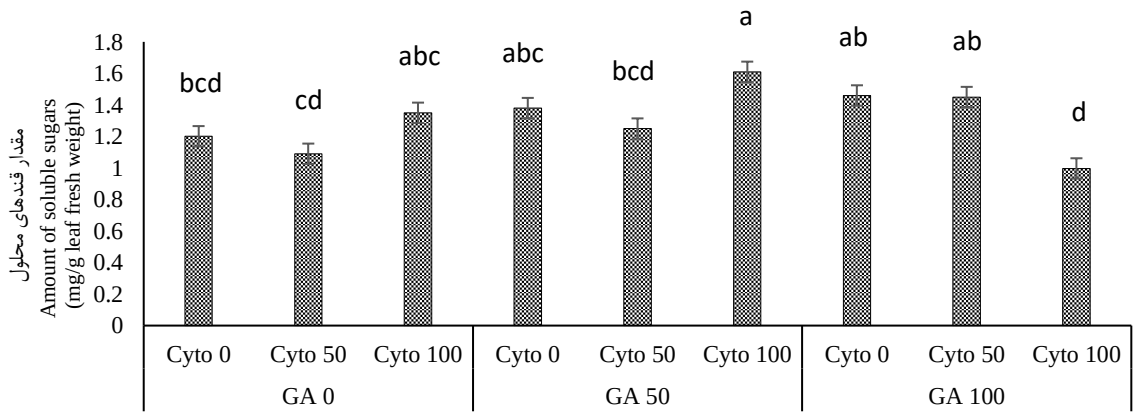
با pH=۷/۵ به طور کامل سائیده شد. مخلوط همگن به دست آمده به لوله سانتریفیوژ منتقل شد و پس از ۱۰ دقیقه سکون، توسط سانتریفیوژ یخچال‌دار در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، به مدت ۲۵ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه، سانتریفیوژ گردید. در پایان مرحله سانتریفیوژ، لوله‌ها به آرامی از دستگاه خارج و محلول رویی در چند لوله‌ی آزمایش توزیع گردید. عصاره‌های حاصل، برای سنجش غلظت پروتئین مورد استفاده قرار گرفتند. به منظور سنجش غلظت پروتئین، به لوله‌های آزمایش مقدار ۱۰۰ میکرولیتر عصاره‌ی پروتئینی و ۵ میلی‌لیتر معرف برادفورد افزوده و سریعا ورتکس شد. جذب محلول با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد. از لوله‌ای که در آن ۱۰۰ میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم و ۳ میلی‌لیتر معرف برادفورد مخلوط شده بود به عنوان شاهد و برای صفر نمودن دستگاه اسپکتروفتومتر استفاده شد.

داده‌های بدست آمده با استفاده از نرم‌افزار SAS و SPSS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. مقایسه میانگین‌ها بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۱٪ و ۵٪ انجام شد. نمودارها با نرم‌افزار Excel رسم شدند و به منظور تعیین روابط بین صفات از ضریب همبستگی پیرسون استفاده شد.

نتایج و بحث

قندهای محلول

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که مقدار قندهای محلول تحت تأثیر اثر متقابل تنظیم کننده‌های رشد جیبرلین (GA3) و سیتوکنین (Cyto) معنی‌دار ($p\leq0.01$) بود؛ اما تحت تأثیر اثرات ساده این تیمارها قرار نگرفت (جدول ۲). نتایج برهمکنش تیمارها نشان داد که بیشترین مقدار قندهای محلول از کاربرد ۵۰ ppm جیبرلین به همراه ۱۰۰ ppm سیتوکنین و به مقدار ۱/۶۱ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک برگ حاصل شد که نسبت به شاهد حدود ۲۵ درصد افزایش نشان داد. کمترین مقدار قندهای محلول در اثر کاربرد حداکثر مقدار هر دو تیمار جیبرلین و سیتوکنین (۱۰۰ ppm) دست آمد (شکل ۱). بنظر می‌رسد نسبت‌های مختلف سیتوکنین و جیبرلین در کاربرد تلفیقی، در حفظ و نگه‌داری و یا تولید قندهای محلول تأثیرگذار می‌باشد. نتایج همبستگی بین صفات هم نشان داد که بین قندهای محلول و مقدار پرولین (r = ۰/۴۶*) همبستگی مثبت معنی‌دار وجود داشت (جدول ۶). بطوری‌که با افزایش قندهای محلول، میزان پرولین هم افزایش یافت. بنظر می‌رسد که هر دو صفت در شرایط اعمال تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی افزایش می‌یابند (Ardakani *et al*., 2012).



شکل ۱- تأثیر برهمکنش تنظیم کننده‌های رشد جیبرلین (GA) و سیتوکنین (Cyto) بر مقدار قندهای محلول. GA0, GA50, GA100: به ترتیب غلظت تنظیم کننده رشد جیبرلین در صفر، ۵۰ و ۱۰۰ppm و در تنظیم کننده رشد سیتوکنین مقادیر Cyto0, Cyto50, Cyto100: به ترتیب صفر، ۵۰ و ۱۰۰ ppm می‌باشند. حروف مشترک در هر نمودار نشانگر غیر معنی‌دار بودن و حروف غیر مشترک نشانگر معنی‌دار بودن اختلافات در سطح احتمال ۵٪ است (مقادیر، میانگین ۳ تکرار ±SE است).

Figure 1- The effect of gibberellin (GA) and cytokinin (Cyto) interaction on the amount of soluble sugars. GA0, GA50, GA100: gibberellin hormone concentration at 0, 50 and 100 ppm, respectively, and Cytokinin hormone values of Cyto0, Cyto50, Cyto100: 0, 50 and 100 ppm respectively. Common letters in each graph indicate non-significance and non-common letters indicate significant differences at the 5% probability level (values are mean ± SE of 3 replicates).

نمو هماهنگ گیاهان وابسته به قابل دسترس بودن مواد غذایی از قبیل قندهای محلول است و به عنوان یک منبع مطمئن در تهیه مواد ساختمانی و انرژی لازم برای انجام برنامه‌های توسعه‌ای ویژه در گیاه کمک می‌کند (Gibson, 2005).

افزایش قندهای محلول (ساکاروز، گلوکز و فروکتوز) ضمن اینکه یک ماده غذایی محسوب می‌شود به عنوان یک سیگنال، بسیاری از تغییرات فیزیولوژیکی نموی همگام با تغییرات محیطی را در گیاه سبب می‌شود (Lemoine *et al*., 2013).

بررسی‌ها نشان داده است زمانی که قندهای محلول در غلظت زیاد در اندام وجود دارد، سبب تکثیر یاخته‌های آن اندام و تولید برگ‌های بزرگتر، افزایش تعداد و اندازه ریشه‌های جانبی می‌شود (Gibson, 2005).

هم‌چنین تری‌هالوزها که یکی دیگر از اجزای قندهای محلول است می‌تواند نمو، شکل و فعالیت اندام برای مثال در گل‌آذین، برگ، غده، و دلنه را تحت تأثیر قرار دهد (Paul and Dijck, 2011). به نظر می رسد تلفیق دو تیمار تنظیم کننده رشد گیاهی، بسیاری از مسیرهای سیگنالینگی را به راه می‌اندازد که منجر به تولید بیشتر قندهای محلول و در نتیجه افزایش ساختار رویشی و زایشی گیاه می‌شود. با این حال، نسبت تعادلی این دو تنظیم کننده رشدی در وضعیت ترکیبی جهت تولید بیشتر قندهای محلول دارای اهمیت است.

جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس (میانگین مربعات) اثر تنظیم کننده‌های رشد جیبرلین و سیتوکنین بر روی صفات مورد بررسی درگیاه استویا در شرایط گلخانه

Table 2- Results of analysis of variance (mean square) effect of gibberellin and cytokinin hormones on investigated traits in stevia plant under greenhouse conditions

منابع تغییر Source of Variation	درجه آزادی df	قندهای محلول Soluble sugars	پروتئین Protein	پرولین Proline	کلروفیل a Chl a	کلروفیل b Chl b	کاروتنویید Carotenoid	وزن خشک اندام هوایی Shoot dry weight
جیبرلین GA	2	0.096^{ns}	0.015^{**}	0.291^{ns}	2.11^{ns}	0.04^{ns}	0.034^{**}	0.137^{ns}
سیتوکنین Cyto	2	0.016^{ns}	0.000^{ns}	0.111^{ns}	0.154^{ns}	0.274^{**}	0.510^{*}	0.107^{*}
جیبرلین * سیتوکنین GA×Cyto	4	0.175^{**}	0.000^{ns}	0.515^{*}	1.53^{ns}	0.015^{**}	0.292^{ns}	0.073^{*}
خطای آزمایشی Error	18	0.035	0.000	0.130	1.28	0.012	0.085	0.028
ضریب تغییرات CV (%)		11.5	6.11	8.14	7.41	6.54	5.33	12.1

ns، * و **: به ترتیب عدم معنی‌داری و معنی‌داری در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد

ns, * and **: non-significant and significant at the probability level of 5 and 1%, respectively

جدول ۳- مقایسه میانگین اثر ساده تنظیم کننده رشد جیبرلین بر صفات بیوشیمیایی و وزن خشک اندام هوایی گیاه استویا

Table 3- Means comparison of the Gibberellin hormone effect on the biochemical traits and shoot dry weight of Stevia

جیبرلین GA Treatment	قندهای محلول Soluble sugars (mg.g DW^{-1})	پرولین Proline (mg.gFW^{-1})	کلروفیل a Chl a (mg.gFW^{-1})	کلروفیل b Chl b (mg.gFW^{-1})	وزن خشک اندام هوایی Shoot dry weight (g)
GA 0	1.21 ± 0.08 a	0.532 ± 0.13 a	2.54 ± 0.62 a	0.936 ± 0.08 a	1.10 ± 0.21 a
GA 50	1.41 ± 0.06 a	0.599 ± 0.12 a	1.86 ± 0.07 a	1.06 ± 0.19 a	1.23 ± 0.18 a
GA 100	1.30 ± 0.08 a	0.871 ± 0.18 a	1.60 ± 0.10 a	0.992 ± 0.07 a	1.41 ± 0.45 a

میانگین‌هایی که دارای یک حرف مشترک هستند بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌داری با هم ندارند.

GA0: صفر، GA50: ۵۰ و GA100: ۱۰۰ ppm تنظیم کننده رشد جیبرلین

Averages that have a common letter are not significantly different based on Duncan's test at the 5% probability level.
GA0: zero, GA50: 50 and GA100: 100 ppm gibberellin hormone

جدول ۴- مقایسه میانگین اثر ساده تنظیم کننده رشد سیتوکنین بر صفات بیوشیمیایی و وزن خشک اندام هوایی گیاه استویا

Table 4- Means comparison of the Cytokinin hormone effect on the biochemical traits and shoot dry weight of Stevia

سیتوکنین Cyto Treatment	قندهای محلول Soluble sugars (mg.g DW^{-1})	پروتئین Protein (mg.g FW^{-1})	پرولین Proline (mg.gFW^{-1})	کلروفیل a Chl a (mg.gFW^{-1})	کلروفیل b Chl b (mg.gFW^{-1})	وزن خشک اندام هوایی Shoot dry weight (g)
Cyto0	1.26 ± 0.08 a	0.474 ± 0.01 a	0.695 ± 0.16 a	1.91 ± 0.04 a	1.06 ± 0.08 a	1.55 ± 0.32 a
Cyto50	1.35 ± 0.07 a	0.487 ± 0.01 a	0.762 ± 0.17 a	1.94 ± 0.07 a	1.19 ± 0.17 a	1.22 ± 0.81 ab
Cyto100	1.32 ± 0.093 a	0.485 ± 0.01 a	0.545 ± 0.10 a	2.15 ± 0.67 a	0.732 ± 0.05 b	0.971 ± 0.14 b

میانگین‌هایی که دارای یک حرف مشترک هستند بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌داری با هم ندارند.

Cyto0: صفر، Cyto50: ۵۰ و Cyto100: ۱۰۰ ppm تنظیم کننده رشد سیتوکنین

Averages that have a common letter are not significantly different based on Duncan's test at the 5% probability level.

Cyto0: zero, Cyto50: 50 and Cyto100: 100 ppm cytokinin hormone

جدول ۵- مقایسه میانگین اثر متقابل تنظیم کننده‌های رشد جیبرلین و سیتوکنین بر صفات بیوشیمیایی گیاه استویا

the interaction effect of Gibberellin and Cytokinin hormones on the biochemical traits of Stevia Table 5- Means comparison of

جیبرلین در سیتوکنین GA × Cyto		پروتئین Protein (mg.g FW^{-1})	پرولین Proline (mg.gFW^{-1})	کلروفیل a Chl a (mg.gFW^{-1})	کاروتنوئید Carotenoid (mg.gFW^{-1})
GA0	Cyto0	0.427 ±0.02 a	0.473 ± 0.02 b	1.63 ± 0.07 a	1.63 ± 0.07 a
	Cyto50	0.445 ±0.00 a	0.855 ± 0.38 ab	1.52 ± 0.06 a	1.52 ± 0.06 a
	Cyto100	0.451 ± 0.00 a	0.469 ± 0.05 b	1.30 ± 0.08 a	1.30 ± 0.08 a
GA50	Cyto0	0.472 ± 0.00 a	0.299 ± 0.09 b	1.38 ± 0.06 a	1.38 ± 0.06 a
	Cyto50	0.491 ± 0.01 a	0.454 ± 0.23 b	1.51 ± 0.07 a	1.51 ± 0.07 a
	Cyto100	0.486 ± 0.00 a	0.843 ± 0.18 ab	1.15 ± 0.04 a	1.15 ± 0.04 a
GA100	Cyto0	0.524 ± 0.01 a	1.31 ± 0.11 a	1.57 ± 0.02 a	1.57 ± 0.02 a
	Cyto50	0.525 ± 0.00 a	0.978 ± 0.32 ab	1.48 ± 0.04 a	1.48 ± 0.04 a
	Cyto100	0.518 ± 0.00 a	0.323 ± 0.15 b	1.22 ± 0.05 a	1.27 ± 0.05 a

میانگین‌هایی که دارای یک حرف مشترک هستند بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌داری با هم ندارند.

GA0: صفر، GA50: ۵۰ و GA100: ۱۰۰ ppm تنظیم کننده رشد جیبرلین؛ Cyto0: صفر، Cyto50: ۵۰ و Cyto100: ۱۰۰ ppm تنظیم کننده رشد سیتوکنین

Averages that have a common letter are not significantly different based on Duncan's test at the 5% probability level.

GA0: zero, GA50: 50 and GA100: 100 ppm gibberellin hormone; Cyto0: zero, Cyto50: 50 and Cyto100: 100 ppm cytokinin hormone

پروتئین

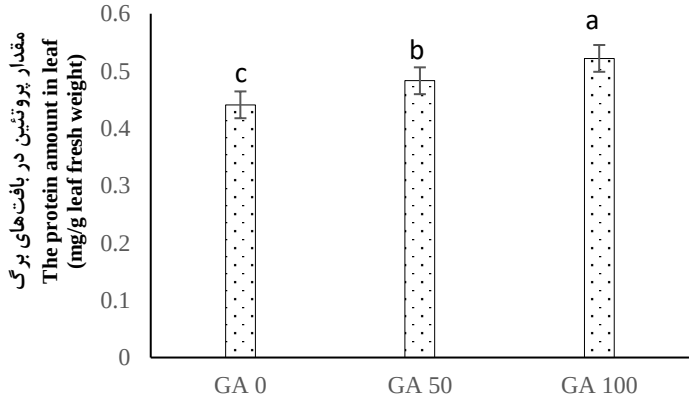
نتایج تجزیه واریانس نشـــان داد که مقدار پروتئین برگ تحت تأثیر غلظت‌های مختلف تنظیم کننده رشـــد جیبرلین معنی‌دار ($p\leq0.01$) بود، اما تحت تأثیر اثر ســـاده تنظیم کننده رشـد ســیتوکنین و برهمکنش جیبرلین و ســیتوکنین معنی‌دار نشـد (جدول ۲). بیشـترین مقدار پروتئین برگ از کاربرد ppm ۱۰۰ تنظیم کننده رشـد جیبرلین حاصـل شـد که نسـبت به سطوح صفر و ۵۰ ppm این تنظیم کننده رشد گیاهی به ترتیب ۲۰ و ۱۲ درصـد افزایش نشـان داد (شـکل ۲). اثر سـاده تنظیم کننده رشـد سـیتوکنین نتوانسـت تغییر محسـوسـی در مقدار پروتئین برگ ایجاد نماید (جدول ۴).

حتی زمانی که این دو تنظیم کننده رشد به صورت تلفیقی بر روی گیاه محلول‌پاشـی شـدند نیز همین موضـوع مشـاهده گردید. دامنه تغییرات مقدار پروتئین برگ ناشـــی از برهمکنش دو تنظیم کننده رشـد گیاه ذکر شـده بین ۰/۴۲۷ میلی‌گرم بر گرم وزن تازه برگ در تیمار شـــاهد و ۰/۵۲۵ میلی‌گرم بر گرم وزن تازه برگ در تیمار ppm ۱۰۰ تنظیم کننده رشـد جیبرلین و ppm ۵۰ تنظیم کننده رشد سیتوکنین بود (جدول ۵).

فرآیند پیری تحت تأثیر ســـنتز و فعالیت برخی پروتئین‌ها است. کار بر روی گونه‌های متعدد نشان داده است که همبستگی قوی بین کاهش محتوای سیتوکینین برگ و آغاز و توسعه پیری اسـت (Balibrea *et al*., 2004). همچنین گزارش شـده اسـت که سـیتوکنین‌ها در نگه‌داری و حفظ پروتئین‌ها مؤثر و سـازنده هســـتند (Richmond and Lang, 1957). لذا بنظر می‌رســد

سیتوکنین‌ها از طریق تأثیری که بر مقدار پروتئین‌ها دارند، می‌توانند فرآیند پیری را به تأخیر بیاندازند. بررسی‌ها نشان می‌دهد که سیتوکنین سنتز شده در ریشه از طریق جریان تعرق به داخل برگ منتقل می‌شود. با این حال سیتوکنین در برگ می‌تواند به صورت مکانی نیز تولید شود. هم‌چنین سیتوکنین می‌تواند روابط منبع و مخزن را از طریق فعالیت اینورتاز دیواره یاخته‌ای اعمال نماید (Zwack and Rashotte, 2013).

در مطالعه‌ای نشان داده شد که در یاخته‌های جدا شده از ساقه‌های جوان ذرت و تنباکو با اعمال تیمارهای تنظیم کننده رشدی سیتوکنین، مقدار پروتئین به میزان ۲۰ تا ۳۰ درصد افزایش می‌یابد (Szweykowska *et al*., 1981). نتایج داده‌های مطالعه حاضر نیز نشان داد که سیتوکنین می‌تواند سبب افزایش پروتئین شود ولی مقدار آن معنی‌دار نبوده است. تنظیم کننده رشد جیبرلین می‌تولند در سنتز پروتئین‌های متصل به DNA نقش داشته باشد. جیبرلین می‌تواند رونوشت‌برداری mRNA را القا نماید. از طرفی جیبرلین می‌تواند در سنتز و آزادسازی پروتئین‌های تنظیم کننده تولید mRNA نقش داشته باشد. این پروتئین‌ها به شکل فعال فقط در یاخته‌های آلورونی دیده می‌شود که پیام تنظیم کننده رشد گیاه را دریافت کرده‌اند. به نظر می‌رسد جیبرلین مقدار و یا فعالیت پروتئین اتصالی را افزایش می‌دهد اما چگونگی این عمل هنوز ناشناخته بوده است (Taiz and Zeiger, 2012).



شکل ۲- تأثیر غلظت‌های مختلف جیبرلین بر مقدار پروتئین در بافت‌های برگ گیاه استویا. GA0: صفر، GA50: ۵۰ و GA100: ۱۰۰ ppm جیبرلین

Figure 2- The effect of different concentrations of gibberellin on the protein amount in stevia leaf tissues; GA0: zero, GA50: 50 and GA100: 100 ppm gibberellin hormone

پرولین

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۲) نشان داد که مقدار اسید آمینه پرولین در برگ تحت تأثیر اثرات ساده تنظیم کننده‌های رشد جیبرلین و سیتوکنین معنی‌دار نبود، اما برهمکنش این دو تنظیم کننده رشد گیاه تأثیر معنی‌داری ($p\leq0.05$) بر مقدار آن داشت. بیشترین مقدار پرولین از کاربرد تلفیقی ppm ۱۰۰ جیبرلین به همراه عدم استفاده از سیتوکنین و به مقدار ۱/۳۱ میلی‌گرم بر گرم وزن تر برگ حاصل شد که نسبت به شاهد حدود ۶۳ درصد افزایش نشان داد. از طرفی زمانی که غلظت تنظیم کننده رشد سیتوکنین در ترکیب با جیبرلین به ppm ۵۰ و جیبرلین به ppm ۱۰۰ بود، مقدار پرولین به ۰/۹۷۸ میلی‌گرم برگرم وزن تر برگ رسید. در کاربرد سطوح پایین تنظیم کننده رشد جیبرلین با سطوح مختلف سیتوکنین نسبت به سطوح بالای جیبرلین مقدار تولید پرولین کمتری مشاهده شد (جدول ۵).

بیوسنتز پرولین از گلوتامات از طریق فسفریلاسیون گاما-گلوتامیل فسفات (γ-glutamyl phosphate) به وسیله فعالیت آنزیم γ-glutamyl kinase انجام می‌شود. با این حال در این

مسیر آنزیم‌های دیگری شامل پیرولین-۵- کربوکسیلاز ریدکتاز (pyrroline-5-carboxylate reductase) و گاما-گلوتامیل فسفات ریدکتاز (γ-glutamyl phosphate reductase) نیز مشارکت دارند. پرولین می‌تواند در تنظیم اسیدیته سیتوپلاسم و به عنوان یک ذخیره کربن و ازت در شرایط تنش و هم‌چنین به عنوان یه مولکول پیام‌رسان در فعال کردن پاسخ‌های دفاعی شرکت کند (Bandurska *et al*., 2017). مطالعات نشان داده است که تنظیم کننده‌های رشد گیاه می‌توانند میزان فراوانی mRNAهای به خصوصی را تغییر دهند و بنابراین پلی‌پپتیدهای مناسبی را تولید خواهند کرد.

تنظیم کننده‌های رشد گیاه از طریق بیان ژن‌ها می‌توانند بر مسیر بیوسنتزها ترکیبات گیاهی و در مجموع بر روی متابولیت‌ها خصوصا اسیدهای آمینه‌ای مانند پرولین تأثیر بگذارند. پرولین یکی از اجزای ساختمانی پروتئین‌ها است و به عنوان یک محلول سازگار تحت شرایط تنش محیطی نقش مهمی دارد. هم‌چنین این ماده می‌تواند به عنوان یک منبع ذخیره انرژی برای بهبود در شرایط تنش‌های محیطی مورد استفاده گیاه قرار گیرد (Lehmann *et al*., 2010). از این رو تحقیقات بسیاری نشان داده شده است که مقدار پرولین در شرایط تنش‌های زنده و غیر زنده افزایش می‌یابد (Mattioli *et al*., 2009). بر اساس نتایج این مطالعه اعمال تیمارهای تنظیم کننده‌های رشد گیاهی در مقدارهای متفاوت می‌تواند سبب تغییر در متابولیسم و مقدار انرژی یاخته شده که به نظر می‌رسد یاخته‌ها از طریق تغییر میزان پرولین، انرژی لازم برای مقاومت در برابر تغییر نوسانات داخلی خود را مدیریت می‌نمایند.

رنگیزه‌های فتوسنتزی

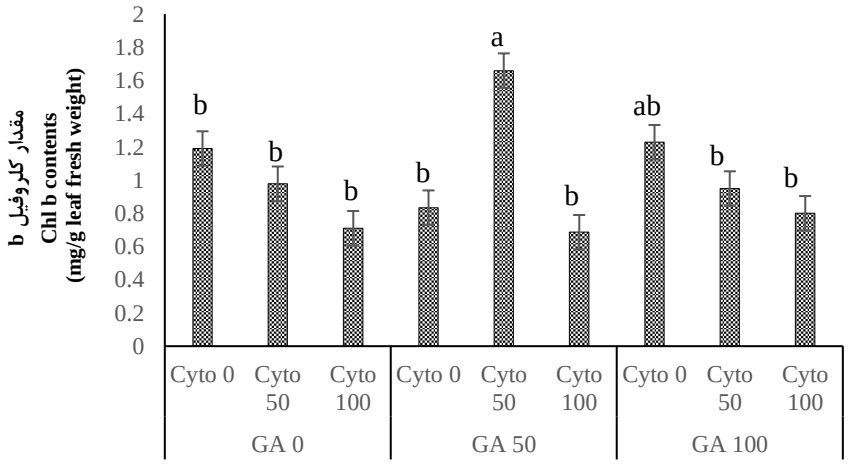
کلروفیل a: غلظت‌های به کار برده شده از تنظیم کننده‌های رشد گیاهی تأثیر معنی‌داری بر مقدار کلروفیل a نداشت (جدول ۲). با این حال محلول‌پاشی با تنظیم کننده رشد جیبرلین سبب کاهش مقدار کلروفیل a شد، به طوری که در سطوح صفر، ۵۰ و ۱۰۰ ppm تنظیم کننده رشد، مقدار کلروفیل a به ترتیب ۲/۵۴، ۱/۸۶ و ۱/۶۰ میلی‌گرم بر گرم ماده تازه برگ بود (جدول ۳). اما محلول‌پاشی با تنظیم کننده رشد سیتوکنین سبب افزایش مقدار کلروفیل a شد. در صفر، ۵۰ و ۱۰۰ ppm سیتوکنین مقدار صفت مورد بررسی به ترتیب ۱/۹۱، ۱/۹۴ و ۲/۱۵ میلی‌گرم بر گرم ماده تازه برگ بود (جدول ۴). نتایج برهمکنش این دو تنظیم کننده رشد نشان داد که بیشترین مقدار آن در تیمار شاهد به دست آمد و دامنه تغییرات کلروفیل a بین ۱/۱۵ و ۱/۶۳ میلی‌گرم بر گرم ماده تازه برگ قرارداشت (جدول ۵).

نتایج مطالعه‌ای نشان داد که کاربرد زآتین در گیاه چاودار سبب به تأخیر انداختن پیری برگ و کاهش مقدار کلروفیل برگ می‌شود (Musgrave *et al*., 1987). به نظر می‌رسد سیتوکنین در واکنش به حضور سوپر اکسید در یاخته، مولکول‌های آمید را تولید می‌کند (Liu and Haung, 2002). اتم‌های کربن در موقعیت آلفا در مولکول آمید می‌توانند با اتم هیدروژن ترکیب حاصل کرده و برای یک جفت الکترون موجود بر روی رادیکال آزاد آن را خنثی کند. بنابراین حضور سیتوکنین از طریق کاهش تولید رادیکال‌های آزاد و کمک به چرخش الکترون سبب افزایش سبزینگی برگ و تأخیر در پیری آن شده است. هم‌چنین سیتوکنین می‌تواند سبب انباشتگی کلروفیل و تبدیل اتیوپلاست به کلروپلاست گردد (Brault and Maldiney, 1999). از طرفی این احتمال وجود دارد که افزایش غلظت تنظیم کننده‌های رشد بویژه جیبرلین منجر به افزایش تقسیم یاخته‌ای و به دنبال آن فزونی سطح برگ گردد، بنابراین ضخامت برگ کاهش یافته و در نتیجه مقدار کلروفیل برگ‌ها و غلظت کلروفیل a کاهش می‌یابد. بنظر می‌رسد نسبت تعادلی در مقدار این دو تنظیم کننده رشدی می‌تولند بر مقدار تولید کلروفیل a تأثیر گذار باشد (Sifola and Barbieri, 2006).

کلروفیل b : نتایج تجزیه واریانس نشان داد که مقدار کلروفیل b تحت تأثیر تنظیم کننده رشد سیتوکنین و برهمکنش سیتوکنین و جیبرلین معنی‌دار شد، اما اثر ساده تنظیم کننده رشد جیبرلین تأثیر معنی‌داری بر آن نداشت (جدول ۲). با افزایش غلظت سیتوکنین به ۱۰۰ ppm، مقدار کلروفیل b، بطور معنی‌داری به ۰/۷۳۲ میلی‌گرم بر گرم ماده تازه برگ کاهش یافت (جدول ۴). نتایج برهمکنش تیمارها نشان داد که بیشترین مقدار کلروفیل b با اعمال ۵۰ ppm از هر دو تنظیم‌کننده رشدی سیتوکنین و جیبرلین (۱/۶۵ میلی‌گرم بر گرم ماده تازه برگ) به دست آمد. در این میان با محلول‌پاشی ترکیب ۱۰۰ ppm تنظیم کننده رشد سیتوکنین با ۵۰ ppm تنظیم کننده رشد جیبرلین، کمترین مقدار

کلروفیل b بدست آمد (شکل ۳).

بنظر می‌رسد نسبت توازن سیتوکنین و جیبرلین بر غلظت کلروفیل b مؤثر است. نتایج ضرایب همبستگی نشان داد مقدار کلروفیل b با مقدار رنگیزه کارتنوئید همبستگی مثبت و معنی‌دار (r = ۰/۴۷*) داشت (جدول ۶). به نظر می‌رسد از آنجا که حضور مولکول‌های کلروفیل در گسیل انرژی الکترونی نور به اولین پذیرنده الکترون فوتین نقش حیاتی در فرآیند فتوسنتز دارد لذا برای جلوگیری از بازدارندگی نوری در مرکز فتوسیستم II حضور مولکول‌های کارتنوئید ضروری است (Zeiger and Taiz, 2006). به نظر می‌رسد تنظیم کننده رشد سیتوکنین از طریق تقویت غشاهای یاخته‌ای و به تأخیر انداختن پیری برگ، سبب افزایش کارآیی فرآیندهای گیاهی می‌شود (Liu and Haung, 2002).



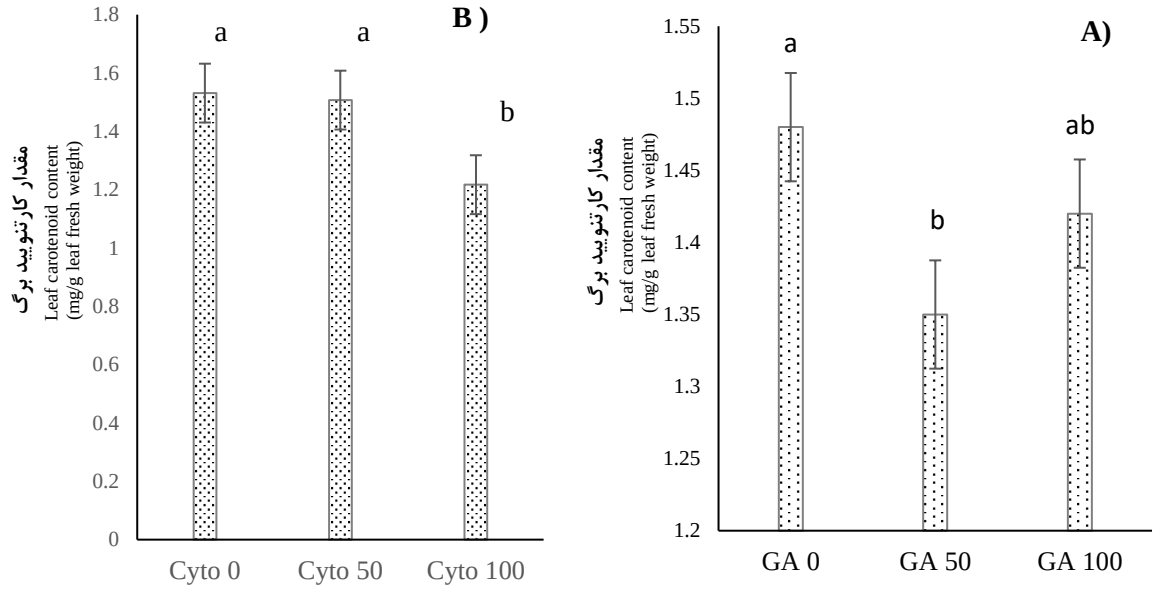
شکل ۳- تأثیر برهمکنش تنظیم‌کننده‌های رشدی جیبرلین (GA) و سیتوکنین (Cyto) بر مقدار کلروفیل b. GA0, GA50, GA100 : به ترتیب غلظت جیبرلین در صفر، ۵۰ و ۱۰۰ppm و در سیتوکنین مقادیر Cyto0, Cyto50, Cyto100 : به ترتیب صفر، ۵۰ و ۱۰۰ ppm می باشند. حروف مشترک در هر نمودار نشانگر غیر معنی‌دار بودن و حروف غیر مشترک نشانگر معنی‌دار بودن اختلافات در سطح احتمال ۵٪ است (مقادیر، میانگین ۳ تکرار ±SE است)

Figure 3- The interaction effect of gibberellin (GA) and cytokinin (Cyto) on chlorophyll b. GA0, GA50, GA100: Gibberellin hormone concentration is zero, 50, and 100 ppm, and Cytokinin hormone values are Cyto0, Cyto50, Cyto100: zero, 50, and 100 ppm, respectively. Common letters in each graph indicate non-significance and non-common letters indicate significant differences at the 5% probability level (values are mean ± SE of 3 replicates)

کارتنویید: محلول‌پاشی تنظیم کننده‌های رشد سیتوکنین و جیبرلین به تنهایی تأثیر معنی‌داری بر مقدار کارتنوئید داشتند، اما این رنگیزه تحت تأثیر برهمکنش دو تنظیم کننده رشد گیاه قرار نگرفت (جدول ۲). واکنش تغییرات کارتنویید نسبت به اعمال تیمارهای تنظیم کننده رشد سیتوکنین روند کاهشی و معنی‌داری را نشان داد (شکل ۴). به طوری که تیمار شاهد و سطح ۵۰ ppm سیتوکنین تنها ۰/۰۲۴ میلی‌گرم بر گرم ماده تازه برگ اختلاف داشتند و این تفاوت معنی‌دار نبود. اما زمانی که غلظت تنظیم کننده رشد سیتوکنین به ppm ۱۰۰ رسید سبب کاهش معنی‌دار مقدار کارتنویید شد، بطوری‌که به مقدار ۱/۲۱ میلی‌گرم بر گرم ماده تازه برگ رسید. روند تغییرات مقدار کارتنویید با اعمال تیمار تنظیم کننده رشدی جیبرلین کاهشی بود، به‌طوری‌که در شاهد بیشترین مقدار کارتنویید (۱/۴۸ میلی‌گرم بر گرم ماده تازه برگ) به دست آمد که نسبت به سطوح ppm ۵۰ و ۱۰۰ آن به ترتیب ۷ و ۴ درصد بیشتر بود. البته سطح ppm ۱۰۰ تنظیم کننده رشد جیبرلین با شاهد معنی‌دار نبود و تنها با سطح ppm ۵۰ آن معنی‌دار شد (شکل ۴).

کارتنوییدها رنگیزه‌های جذب کننده نور هستند که نقش اصلی آن در جلوگیری از فتواکسیداسیون مولکول کلروفیل و کمک با جذب طیف‌های نوری و گسیل آن به مرکز واکنش در مرکز فتوسیستم نوری II است. گزانتوفیل‌ها یکی از مولکول‌های غنی از اکسیژن و از اجزای مولکول‌های کارتنویید است که در پیری و زوال برگ نقش دارد. به نظر می‌رسد تحت شرایط اعمال

سیتوکنین مقدار این مولکول (گزانتوفیل) به طور چشمگیری کاهش یافته و سبب بازدارنگی پیری برگ شده است (Czerpak and Bajguz, 1997). در آزمایشی نشان داده شد که محلول‌پاشی گیاه توسط تنظیم‌کننده‌های رشد باعث تحریک سطح سبز و بدنبال آن افزایش رنگیزه‌های فتوسنتزی در ذرت، لوبیای چشم بلبلی و باقلا شد (Shaddad, 1989). هم‌چنین نتایج نشان داد که محلول‌پاشی اسید جیبرلیک باعث افزایش میزان کاروتنویید در همیشه بهار (Sardoei and Shahdadneghad, 2014) و پسته (Mozafari and Khaleghi, 2016) شده است.



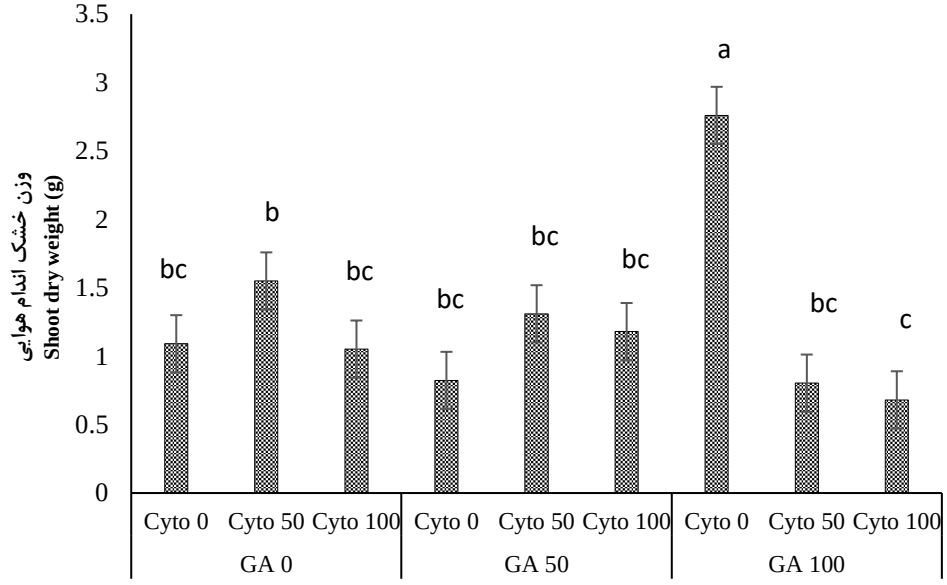
شکل ۴- تأثیر محلول‌پاشی غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد جیبرلین (A) و سیتوکنیین (B) بر مقدار کارتنویید برگ. GA0, GA50, GA100 : به ترتیب غلظت‌های جیبرلین در صفر، ۵۰ و ۱۰۰ppm و Cyto0, Cyto50, Cyto100 : به ترتیب غلظت‌های سیتوکنین در صفر، ۵۰ و ۱۰۰ ppm. حروف مشترک در هر نمودار نشانگر غیر معنی‌دار بودن و حروف غیر مشترک نشانگر معنی‌دار بودن اختلافات در سطح احتمال ۵٪ است (مقادیر، میانگین ۳ تکرار SE± است).

Figure 4- The effect of foliar spraying with different concentrations of gibberellin (A) and Cytokinin (B) hormone on the amount of leaf carotenoids. GA0, GA50, GA100: Gibberellin hormone concentration is zero, 50, and 100 ppm, and Cytokinin hormone values are Cyto0, Cyto50, Cyto100: zero, 50, and 100 ppm, respectively. Common letters in each graph indicate non-significance and non-common letters indicate significant differences at the 5% probability level (values are mean ± SE of 3 replicates)

وزن خشک اندام هوایی: نتایج تجزیه واریانس نشان داد که مقدار وزن خشک اندام هوایی تحت تأثیر برهمکنش اعمال دو تیمار تنظیم کننده رشدی جیبرلین و سیتوکنین و نیز اثر ساده تنظیم کننده رشد سیتوکنین معنی‌دار شد؛ اما تحت تأثیر اثر ساده تنظیم کننده رشد جیبرلین قرار نگرفت (جدول ۲). در تیمار اثر ساده سیتوکنین، بیشترین مقدار وزن خشک اندام هوایی از سطح صفر تنظیم کننده رشد سیتوکنین و کمترین مقدار آن (۰/۹۷۱ گرم) از ۱۰۰ ppm تنظیم کننده رشد سیتوکنین حاصل شد (جدول ۴). در مجموع روند کاهشی با اعمال سطوح مختلف تنظیم کننده رشد سیتوکنین در وزن خشک اندام هوایی مشاهده شد.

نتایج برهمکنش تیمارها نشان داد که تلفیق دو تنظیم کننده رشد در سطح ۱۰۰ ppm آنها کمترین وزن خشک اندام هوایی را داشت و بیشترین مقدار آن در سطح ۱۰۰ ppm تنظیم کننده رشد جیبرلین با سطح صفر تنظیم کننده رشد سیتوکنین به دست آمد (شکل ۵). دامنه تغییرات مقدار وزن خشک اندام هوایی گیاه استویا در کاربرد تلفیقی این دو تنظیم کننده رشد بین ۰/۶۸۱ تا ۲/۷۶ گرم قرار داشت و از لحاظ آماری کلیه این تغییرات در سه طبقه آماری قرار گرفت (شکل ۶). نتایج ضرایب همبستگی نشان داد که وزن خشک اندام هوایی با میزان پرولین همبستگی مثبت و معنی‌داری ($r = ۰/۶۳^{**}$) داشت (جدول ۶). به نظر می‌رسد افزایش مقدار پرولین در

یاخته سبب تأمین انرژی و نیز منبع برای تأمین کربن و نیتروژن لازم برای اندام‌زایی و افزایش وزن خشک گیاه را فراهم کرده باشد لذا در شرایط نامساعد می‌تواند قدرت دفاعی گیاه را افزایش و سبب رشد اندام هوایی گردد (Bandurska *et al*., 2017).



شکل ۵- تأثیر برهمکنش تنظیم کننده رشد جیبرلین (GA) و سیتوکنین (Cyto) بر مقدار وزن خشک اندام هوایی. GA0, GA50, GA100: به ترتیب غلظت تنظیم کننده رشد جیبرلین در صفر، ۵۰ و ۱۰۰ppm و در تنظیم کننده رشد سیتوکنین مقادیر Cyto0, Cyto50, Cyto100 : به ترتیب صفر، ۵۰ و ۱۰۰ ppm می باشند. حروف مشترک در هر نمودار نشانگر غیر معنی‌دار بودن و حروف غیر مشترک نشانگر معنی‌دار بودن اختلافات در سطح احتمال ۵٪ است (مقادیر، میانگین ۳ تکرار SE± است).

Figure 5- Effect of gibberellin (GA) and cytokinin (Cyto) interaction on shoot dry weight. GA0, GA50, GA100: Gibberellin hormone concentration is zero, 50, and 100 ppm, and Cytokinin hormone values are Cyto0, Cyto50, Cyto100: zero, 50, and 100 ppm, respectively. Common letters in each graph indicate non-significance and non-common letters indicate significant differences at the 5% probability level (values are mean ± SE of 3 replicates).

سیتوکنین‌ها در ریشه و جنین‌های در حال رشد سنتز شده و از طریق آوند چوبی به صورت غیر فعال به لندام‌های هوایی منتقل و در یاخته‌های جوان و درحال تقسیم سریع مریستم انتهایی ساقه و ریشه انباشته می‌شوند، مکانیزم عمل این تنظیم کننده رشد وابسته به عوامل دیگری است. بررسی تغییرات صفات مورد بررسی نشان می‌دهد که تنظیم کننده‌های رشد گیاهی به تنهایی عمل نمی‌کنند و بافت‌های گیاهی ممکن است دارای تنظیم کننده‌های رشدی داخلی بوده که به انجام یک واکنش ممکن است کمک، تأخیر و یا مانع انجام آن شوند. بنابراین تغییرات صفات مورد بررسی در گیاهان عالی تحت تأثیر ارتباط‌های پیچیده میان تنظیم کننده‌های رشد گیاهی است. برای مثال اثرگذاری مؤثر سیتوکنین‌ها در تنظیم واکنش‌های فیزیولوژیکی، متابولیکی، بیوشیمیایی و رشدی، در ارتباط با سایر تنظیم کننده‌های رشد داخلی گیاه می‌باشد. در این ارتباط نشان داده شده است، هنگامی سیتوکنین می‌تواند سبب افزایش رشد شود که مقدار اکسین در بافت‌های گیاهی در مقدار مناسب و مورد نیاز باشد (Taiz and Zaiger, 2012).

بررسی‌های انجام شده نشان داد که در کشت بافت تنباکو اعمال مقدار مناسب اکسین سبب افزایش تکثیر DNA یاخته می‌شود. با این حال یاخته‌ها تقسیم نشدند مگر این که سیتوکنین در مقدار مناسب به آنها اضافه شد (Zamanzadeh *et al*., 2011). این مطالب نشان می‌دهد که چرخه تکثیری و رشد گیاه حاصل برآیند نسبت‌های مناسب از تنظیم کننده‌های رشد در آنها می‌باشد. در خصوص جیبرلین مسئله مقداری متفاوت است و به نظر می‌رسد واکنش رشد یاخته به کاربرد

جیبرلین، متفاوت از غلظت سایر تنظیم کننده‌های رشد داخلی باشد. جیبرلین تقسیم یاخته‌ای و طویل شدن آنها را افزایش می‌دهند، برای مثال در اثر کاربرد تنظیم کننده رشد جیبرلین تعداد قطعات میتوزی در گیاه بذرالبنج افزایش یافت (Taiz and Zaiger, 2012). بنابراین تأثیر جیبرلین بر تکثیر و طویل شدن یاخته‌ها در گیاهان به ثبت رسیده است.

در مطالعه‌ای بر روی گیاه کاهو نشان داده شد که کاربرد جیبرلین می‌تواند از طریق تأثیر بر توسعه دیواره یاخته‌ای سبب افزایش طویل شدن آن شود و این تنظیم کننده رشد تأثیری بر اسموزیته یاخته‌ای نداشت (Métraux, 1987). به نظر می‌رسد که تنظیم کننده رشد اکسین (اسیدی شدن و سست شدن دیواره یاخته‌ای) و جیبرلین از طریق تغییر ویژگی‌های دیواره یاخته‌ای امکان طویل شدن و رشد را فراهم می‌آورند. بنابراین بر اساس نتایج این آزمایش افزایش وزن خشک اندام هوایی را می‌توان به این اثر جیبرلین و نسبت‌های متفاوتی از تنظیم کننده‌های رشد داخل گیاه نسبت داد.

جدول ۶- نتایج ضرایب همبستگی بین صفات بیوشیمیایی و وزن خشک اندام هوایی در گیاه استویا

Table 6- Results of correlation coefficients between biochemical traits and shoot dry weight in Stevia plant

صفات Traits	وزن خشک اندام هوایی Shoot dry weight	پرولین Proline	پروتئین Protein	قندهای محلول Soluble sugars	کلروفیل b Chl b	کلروفیل b Chl b	کلروفیل a Chl a	کاروتنوئید Carotenoid
وزن خشک اندام هوائی Shoot dry weight	1							
پرولین Proline	0.63**	1						
پروتئین Protein	0.17ns	0.25ns	1					
قندهای محلول Soluble sugars	0.13ns	0.46*	0.16ns	1				
کلروفیلb Chl b	0.39*	0.28ns	-0.08ns	-0.08ns	1	1		
کلروفیلa Chl a	0.20ns	-0.02ns	-0.19ns	-0.01ns	0.10ns	0.10ns	1	
کاروتنوئید Carotenoid	0.17ns	0.15ns	0.08ns	-0.04ns	0.47*	0.47*	-0.04ns	1

ns، * و **: به ترتیب غیر معنی‌داری و معنی‌داری در سطح احتمال پنج و یک درصد

ns, * and **: non-significant and significant at the five and one percent probability level, respectively

نتیجه‌گیری کلی

به طور کلی نتایج این مطالعه نشان داد که تأثیر تنظیم کننده رشد جیبرلین بر بسیاری از ساختارهای بیوشیمیایی و مورفولوژیکی بیشتر از تنظیم کننده رشد سیتوکنین بود. تأثیر غلظت ppm ۱۰۰ جیبرلین بر مقدار پروتئین، قندهای محلول و پرولین نسبت به سایر سطوح آن قابل توجه بود. رنگیزه‌های فتوسنتزی واکنش‌های متفاوتی را به غلظت‌های مختلف تنظیم کننده‌های رشد مورد مطالعه نشان دادند. هم‌چنین بیشترین مقدار وزن خشک اندام هوایی از تأثیر ppm ۱۰۰ جیبرلین به دست آمد. بنابراین بنظر می‌رسد تنظیم کننده رشد جیبرلین می‌تواند تأثیر قابل توجه‌تری در افزایش تراکم شاخ و برگ گیاه استویا از خود نشان دهد که منجر به افزایش درصد شیرین کننده‌های طبیعی و دارویی گیاه استویا می‌شود. لذا کاربرد این تنظیم کننده رشدی از طریق محلول‌پاشی می‌تواند در بالا بردن کیفیت و کمیت مواد شیرین‌کننده کارآمد و مفید باشد.

سپاس‌گزاری

از دانشگاه دامغان بابت حمایت مالی و معنوی این پژوهش کمال سپاسگزاری را داریم.

References

Abha Manohar, K., Shukla, G., Roy, B. and Chakravarty, S., 2022. Effects of plant growth regulators and growing media on propagation and field establishment of *Stevia rebaudiana*: a medicinal plant of commerce. *CABI Agriculture and Bioscience, 3*(4), pp.1-12. **doi: 10.1186/s43170-021-00072-5**

Ahmadi, A., Ehsanzadeh, P. and Jabari, F., 2004. An introduction to plant physiology, first volume. University of Tehran. 653pp. [In Persian].

Ardakani, M.R., Abbaszadeh, B., Assare, M.H., Paknezhad, F., Kashani, A. and Layegh Haghigh, M., 2012. Evaluation of morphological characters, essential oil percentage and some mineral elements of *camphorosma monspilica* L. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 28*(2), pp.267-279. [In Persian]. **doi: 10.22092/ijmapr.2012.3041**

Azarpour, A., Motamed, M.K. and Zaguri, H.R., 2013. Cultivation and propagation of Stevia (botany, planting, growing, harvesting, chemistry, industry and processing). Lahijan Azad University Publications. 826 pp. [In Persian].

Balibrea Lara, M.E., Gonzalez Garcia, M.C., Fatima, T., Ehness, R., Lee, T.K., Proels, R., Tanner, W. and Roitsch, T., 2004. Extracellular invertase is an essential component of cytokinin-mediated delay of senescence. *Plant Cell, 16*(5), pp.1276–87. **doi: 10.1105/tpc.018929**

Bandurska, H., Niedziela, J., Pietrowska-Borek, M., Nuc, K., Chadzinikolau, T. and Radzikowska, D., 2017. Regulation of proline biosynthesis and resistance to drought stress in two barley (*Hordeum vulgare* L.) genotypes of different origin. *Plant Physiology and Biochemistry, 118*, pp.427-437. **doi: 10.1016/j.plaphy.2017.07.006**

Bates, L., Waldren, R.P. and Teare, I.D., 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant Soil, 39*, pp.205-207. **doi: 10.1007/bf00018060**

Bradford, M.M., 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry, 72*, pp.248-254. **doi: 10.1006/abio.1976.9999**

Brandle, J.E., Starratt, A.N. and Gijzen, M., 1998. Stevia rebaudiana: its agricultural, biological, and chemical properties. *Canadian Journal of Plant Science, 78*, pp.527–536. **doi: 10.4141/P97-114**

Brault, M. and Maldiney, R., 1999. Mechanisms of cytokinin action. *Plant Physiology and Biochemistry, 37*, pp.403-412. **doi: 10.1016/s0981-9428(99)80046-1**

Czerpak, R. and Bajguz, A., 1997. Stimulatory effect of auxins and cytokinins on carotenes, with differential effects on xanthophylls in the green alga Chorella pyrenoidosa chick. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae, 66*(1), pp.41-46. **doi: 10.5586/asbp.1997.006**

Gibson, S.L., 2005. Control of plant development and gene expression by sugar signaling. *Current Opinion in Plant Biology, 8*, pp.93-102. **doi: 10.1016/j.pbi.2004.11.003**

Haji Mohammadi, A., Zarghami, R., Kashani, A., Heydari Sharifabad, H. and Nour Mohammadi, G., 2017. Effect of Different Hormonal Treatment on Stevia (*rebaudiana Bertoni*) Micro-propagation. *Pakistan Journal of*

Biological Sciences, *20*, pp.457-464. **doi: 10.3923/pjbs.2017.457.464**

Hartmann, H.T., Kester, D., Davies, F. and Geneve, R., 2010. Plant propagation. Principles and practices.8th ed. Prentice Hall, New Jersey, NJ, USA. 2010. 770p.

Kim, S., Yang, M., Lee, O.H. and Kang, S.K., 2011. The antioxidant activity and the bioactive compound content of *Stevia rebaudiana* water extracts. *Food Science and Technology, 44*(5), pp.1328-1332. **doi: 10.1016/j.lwt.2010.12.003**

Lehmann, S., Franck, D. and Szabados, L., 2010. Proline metabolism and transport in plant development. *Amino Acids*, *39*, pp.949–962. **doi: 10.1007/s00726-010-0525-3**

Lemoine, R., Camera, S., Atanassova, R., Dedald echamp, F., Allario, T., Pourtau, N., Bonnemain, J.L., Laloi, M., Coutos-Thevenot, P., Maurousset, L., Faucher, M., Girousse, Lemonnier, C.P., Parrilla, J. and Durand, M., 2013. Source-to-sink transport of sugar and regulation by environmental factors. *Frontiers in Plant Science, 4*, pp.272. **doi: 10.3389/fpls.2013.00272**

Lichtenthaler, H.K., 1987. Chlorophylls and carotenoids, the pigments of photosynthetic biomembranes. In: Douce, R. and Packer, L. (eds.), *Methods Enzymol*. 148, 350-382, Academic Press Inc., New York.

Liu, X. and Huang, B., 2002. Cytokinin effects on creeping bentgrass response to heat stress: II. Leaf senescence and antioxidant metabolism. *Crop Science, 42*(2), pp.466–472. **doi: 10.2135/cropsci2002.4660**

Mattioli, R., Costantino P. and Trovato, M., 2009. Proline accumulation in plants: not only stress. *Plant Signal and Behaviour, 4*(11), pp.1016–1018. **doi: 10.4161/psb.4.11.9797**

Métraux, J.P., 1987. Gibberellins and Plant Cell Elongation. In: Davies, P.J. (eds) Plant Hormones and their Role in Plant Growth and Development. Springer, Dordrecht. pp: 296-317. Kluwer, Boston. **doi: 10.1007/978-94-009-3585-3_16**

Miller, G.L., 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, *31*(3), pp.426-428. **doi: 10.1021/ac60147a030**

Modares Sanavi, A., Mahdavi, B., Hamialavanq, V. and Ehtshami, R., 2006. The effect of gibberellin and cytokinin on salinity tolerance in the germination stage of corn cultivars. The 9th Congress of Agricultural Sciences and Plant Breeding of Iran. Tehran. [In Persian].

Mozafari, V. and Khaleghi, F., 2016. Effects of gibberellic acid and nitrogen on some physiology parameters and micronutrients concentration in Pistachio under salt stress. *Journal of Water and Soil, 30*(3), pp.955-967. **doi: 10.22067/jsw.v30i3.42977**

Musgrave, M.E., Miller, C.O. and Siedow, J.N., 1987. Do some plant responses to cytokinins involve the cyanide-resistant respiratory pathway?. *Planta, 172*, pp.330–335. **doi: 10.1007/bf00398661**

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), pp.319-321.

Omid Beigi, R., 2011. Production and processing of medicinal plants. The first volume, Astan Quds Razavi Publishing House, Mashhad, 348 pp. [In Persian]. **dor: 9789640208274**

Paul, M. and Dijck, P., 2011. How do sugars regulate plant growth? *Front Plant Science, 2*, pp.90. **doi:**

10.3389/fpls.2011.00090

Rafeekher, M., Gondane, S.U., Goramnagar, H.B., Murkute, A.A., Chandhari, D.U. and Patil, R.R., 2001. Hormonal regulation of growth, sex expression and yield of cucumber in Kharif Season. *Journal of Soils and Crops, 11*(1), pp.95-98.

Ramesh, K., Singh, V. and Megeji, N.W., 2006. Cultivation of Stevia [Stevia rebaudiana (Bert.) Bertoni]: A Comprehensive Review. *Advances in Agronomy*, *89*, pp.137-177. **doi: 10.1016/s0065-2113(05)89003-0**

Richmond, A.E. and Lang, A., 1957. Effect of Kinetin on Protein Content and Survival of Detached Xanthium Leaves. *Science*, *125*, pp.650-651. **doi: 10.1126/science.125.3249.650**

Sardoei, A.S. and Shahdadneghad, M., 2014. Effects of foliar application of gibberellic acid on chlorophyll and carotenoids of Marigold (*Calendula officinalis* L.). *International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research, 2*(6), pp.1887-1893.

Shaddad, M.A. and El-Tayeb, M.A., 1989. Interactive Effects of Soil Moisture Content and Hormonal

Treatment on Dry Matter and Pigment Contents of Some Crop Plants. *Acta Agronomica, 39*(1-2), pp.49-57.

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*(4), pp.408-413. **doi: 10.1016/j.scienta.2006.02.002**

Szweykowska, A., Gwóźdź, E. and Spychała, M., 1981. The Cytokinin Control of Protein Synthesis in Plants. In: Guern, J., Péaud-Lenoël, C. (eds) Metabolism and Molecular Activities of Cytokinins. Proceedings in Life Sciences. Springer, Berlin, Heidelberg.

Tafzali, A. and Esmailizadeh, M., 2000. Effects of quintine gibberellic acid on flowering and fruit characteristics of grape (*Vitis vinifera* L.) Shiraz black variety. *Horticultural Sciences and Techniques of Iran, 1*(1,2), pp.43-54. [In Persian].

Talaei, N., 2010. Research on production of stevia plant (*Stevia rebaudiana*) in Gilan province. Master thesis, Faculty of Agricultural Sciences, University of Gilan. [In Persian].

Taiz, L. and Zeiger, E., 2006. Plant Physiology, 4th edition. Sinauer Associates Inc. Publishers, Massachusetts, USA.

Taiz, L. and Zeiger, E., 2012. Plant Physiology. Sunderland: Sinauer Associates. 778 pp.

Zamanzadeh, Z., Ehsanpour, A.A. and Amini, F., 2011. The study of auxin content in regenerated plants from transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) roots carrying Ri-TDNA. *Journal of Cell & Tissue (JCT), 1*(2), pp.1-7. **doi: 10.52547/jct.1.4.1**

Zwack, P.J. and Rashotte, A.M., 2013. Cytokinin inhibition of leaf senescence. *Plant Signaling & Behavior, 8*(7), pp.e24737. **doi: 10.4161/psb.24737**

Journal of Crop Science Research in Arid Regions/ Volume 6, Issue 3, Autumn 2024, P. 121-137

Effect of gibberellin and cytokinin growth regulators on some biochemical characteristics and dry weight of stevia plant (*Stevia rebaudiana* Bertoni)

Seyed Mehta Rahimzadeh[1], Vahid Pozesh[2*], Seyed Fazel Fazeli Kakhki[3]

[1] M.Sc Graduate, Department of Plant Sciences, Faculty of Biology, Damghan University, Damghan, Iran
[2] Department of Plant Sciences, Faculty of Biology, Damghan University, Damghan, Iran
[3] Khorasan Razavi Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Mashhad, Iran
[*]Corresponding Author: poozesh@du.ac.ir

Received: 9 September 2022 Accepted: 9 November 2022 **DOI: 10.22034/CSRAR.2024.361299.1273**

Abstract

Introduction: Communication between cells in organic plants for growth and development is done by chemical messengers called hormones. Meanwhile, GA3 is one of the most well-known plant hormones that cause various growth reactions in the plant, and most of their activity is the longitudinal growth between the nodes. Cytokinin is another type of plant phytohormones whose most important effect is in the process of cell division. In this research, the effect of cytokinin and gibberellin hormones on some chemical compounds and the dry weight of the Stevia plant shoot was studied under controlled conditions.

Materials and Methods: A factorial experiment was conducted in the form of a completely randomized design in the greenhouse of Razavi Khorasan Agricultural Research and Training Center in three replications in 2017. Factors included gibberellin (0, 50 and 100 ppm) and cytokinin (0, 50 and 100 ppm). The average temperature of the greenhouse was approximately 25 to 30 degrees Celsius and its humidity was 65%. Irrigation was done regularly every three days. Before treatment, the potted plants were adapted to the greenhouse environment for two weeks. The treatment was carried out as foliar spraying, in this way, for six weeks and before watering at 10 am for each plant, 20 cc at the beginning and 50 cc at the end of the growth were sprayed with the desired solutions so that the leaves were completely wet. At the end of the experiment, the aerial parts were removed from the ground and placed in paper envelopes inside a ventilated oven with a temperature of 70°C for 48 hours. The samples were weighed immediately after leaving the oven with a scale of 0.001.

Results and Discussion: The results showed that the highest amount of soluble sugars was obtained from the application of 50 ppm of gibberellin along with 100 ppm of cytokinin (1.61 mg/g dry weight of leaves), which showed an increase of about 25% compared to the control. The amount of leaf protein was significant only in the presence of different concentrations of gibberellin hormone. The highest amount of proline was obtained from the combined application of 100 ppm gibberellin and 0 ppm cytokinin (1.31 mg/g fresh weight of leaf), which showed an increase of about 63% compared to the control. Foliar spraying with gibberellin hormone decreased the amount of chlorophyll a. The highest amount of chlorophyll b was obtained from simultaneous application of 50 ppm levels of cytokinin and gibberellin. The lowest dry weight of the shoot was shown in the presence of the combined treatment of two hormones at the level of 100 ppm, and the highest value was obtained at the level of 100 ppm of gibberellin hormone. The results of the correlation coefficients showed that the dry weight of the shoot had a positive and significant correlation with the amount of proline (r=0.63**). It seems that the hormone auxin (acidification and loosening of the cell wall) and gibberellin enable elongation and growth by changing the characteristics of the cell wall. Therefore, based on the results of this experiment, the increase in the dry weight of aerial parts can be attributed to the effect of gibberellin and different ratios of hormones inside the plant.

Conclusion: In general, the results showed that gibberellin levels were more effective than cytokinin hormone on the biochemical and morphological indicators of stevia plant; So that the maximum dry weight of shoot was obtained from the effect of 100 ppm gibberellin hormone. Photosynthetic

pigments showed different reactions to different concentrations of studied hormones. The effect of 100 ppm concentration of gibberellin on the amount of protein, soluble sugars and proline was significant compared to other levels.

Keywords: Photosynthetic pigments, Proline, Protein, Soluble sugars